

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. med. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**STROMALE MARKER ALS PROGNOSTISCHE FAKTOREN BEIM
MAMMAKARZINOM – EVALUATION DER ALDO-KETO-REDUKTASEN
AKR1C1 und AKR1C2**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Felix Johannes Sebastian Hartmann
aus Mannheim
Kiel, 2018

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Maret Bauer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Mark Lüdde, Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2019

Zum Druck genehmigt: 28.06.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Mammakarzinom.....	1
1.2 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom.....	2
1.2.1 Prognostische Marker: Definition und Anforderung	2
1.2.2 Klassische Prognosefaktoren beim Mammakarzinom.....	3
1.2.3 Molekulare Prognosefaktoren	4
1.2.3.1 Östrogen- (ER) und Progesteron-(PR)-rezeptorstatus	4
1.2.3.2 Wachstumsfaktoren und -rezeptoren	5
1.2.3.3 Zellzyklus-Faktoren	7
1.2.3.4 Faktoren der Invasivität und metastatischen Kapazität	8
1.2.3.5 Genexpressionstests	9
1.2.4 Stromale Genexpression als prognostischer Marker.....	9
1.2.4.1 Interaktion Tumor – Tumorstroma	9
1.2.4.2 Genexpressionen in stromalen Fibroblasten	10
1.2.4.3 AKR1C1 und AKR1C2: Potential als Prognose-Marker?.....	11
1.3 Problemstellung und Zielsetzung.....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Patientenkollektiv	14
2.2 Laborgeräte und Materialien.....	15
2.2.1 Geräte.....	15
2.2.2 Puffer, Medien und Lösungen.....	16
2.3 Immunhistochemie.....	17

2.3.1	Erstellung eines Tissue Micro Array (TMA).....	17
2.3.2	Anfertigen der Paraffinschnitte.....	18
2.3.3	Immunhistochemische Färbung.....	19
2.3.4	Immunhistochemische Analyse.....	20
2.3.4.1	Wahl der Antikörper und ihrer Konzentrationen.....	20
2.3.4.2	Färbeprotokoll.....	20
2.3.5	Auswertung der Immunhistochemie.....	22
2.3.6	Statistische Auswertung.....	24
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika.....	25
3.2	Markerexpression in den Tumorproben.....	27
3.3	Morphologische Charakteristika des Tumorstromas.....	28
3.4	Zusammenhang der stromalen und tumoralen Markerexpression mit klinisch-pathologischen Parametern.....	28
3.5	Survival Analysen.....	29
3.5.1	Gesamtüberleben: Expression in Stromafibroblasten.....	29
3.5.2	Gesamtüberleben: Expression in Tumorzellen.....	31
3.5.3	Krankheitsfreies Überleben: Expression in Stromafibroblasten.....	32
3.5.4	Krankheitsfreies Überleben: Expression in Tumorzellen.....	34
4	Diskussion.....	37
4.1	Tumormarker-Expression in Relation zur Tumor-Morphologie.....	37
4.2	Hormonrezeptorstatus.....	38
4.3	Die Eignung der stromalen Expression von AKR1C1 und AKR1C2 als prognostische Marker beim Mammakarzinom.....	41
5	Zusammenfassung.....	44
6	Literaturverzeichnis.....	46

7	Anhang.....	59
8	Danksagung.....	63

Abkürzungsverzeichnis

AKR	Aldo-Keto-Reduktase
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA 1 und 2	Breast Cancer Gene
CAF	Cancer Associated Fibroblasts
DCIS	Ductal Carcinoma In Situ
DFS	Desease Free Survival (Krankheitsfreies Überleben)
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Östrogenrezeptor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IARC	International Agency for Research on Cancer
IGF	Insulin-like Growth Factor
MRM	Modifizierte Radikale Mastektomie
OS	Overall Survival (Gesamtüberleben)
PR	Progesteronrezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
TMA	Tissue Micro Array
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor-Node-Metastasis
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellung eines Tissue Micro Array (In Anlehnung an Shannon et al. 2008).....	18
Abbildung 2: EnVision™ -Methode (in Anlehnung an Boenisch et al. 2006)	19
Abbildung 3: Tumorstadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	25
Abbildung 4: Verteilung der histologischen Subtypen der Tumoren	26
Abbildung 5: Hormonrezeptor-/HER2/neu-Status der Tumoren	26
Abbildung 6: Repräsentative Darstellung der immunhistochemischen Färbung von AKR1C1 und AKR1C2 und ihrer stromalen und tumoralen Expression. Mit Pfeilen sind jeweils Fibroblasten mit starker, mittlerer, schwacher und negativer Färbeintensität gekennzeichnet.	27
Abbildung 7: Überlebenszeitanalyse (OS) in Abhängigkeit der Allred-Scores der Proteinexpression (AKR1C1/AKR1C2) in stromalen Fibroblasten	31
Abbildung 8: Überlebenszeitanalyse (OS) in Abhängigkeit der Allred-Scores der Proteinexpression (AKR1C1/AKR1C2) in Tumorzellen	32
Abbildung 9: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (DFS) in Abhängigkeit der Allred-Scores der Proteinexpression (AKR1C1/AKR1C2) in Fibroblasten	34
Abbildung 10: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (DFS) in Abhängigkeit der Allred-Scores der Proteinexpression (AKR1C1/AKR1C2) in Tumorzellen	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	20
Tabelle 2: Verdünnungen und Inkubationszeiten der jeweiligen Antikörper	22
Tabelle 3: Kategorisierung und Auswertung des Allred-Scores	23
Tabelle 4: Kaplan-Meier-Analyse Overall survival - Univariate Analyse.....	30
Tabelle 5: Kaplan-Meier-Analyse Disease-free survival - Univariate Analyse.....	33
Tabelle 6: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (UICC2010) (Kreienberg et al. 2010).....	60
Tabelle 7: Stadiengruppierung des Mammakarzinoms nach UICC-Kriterien (Kreienberg et al. 2010).....	60
Tabelle 8: Zusammenhang der Allred-Scores der Expressionen von AKR1C1 und AKR1C2 in stromalen Fibroblasten und Tumorzellen mit histopathologischen Parame- tern.....	62

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Weltweit stellt das Mammakarzinom die häufigste maligne Erkrankung bei Frauen und die zweithäufigste Krebstodesursache nach dem Bronchialkarzinom dar (WHO and International Agency for Research on Cancer (IARC) 2017). Laut der Gesundheitsberichterstattung des Robert Koch-Instituts (Berlin) aus dem Jahr 2015 erkrankten im Jahr 2012 in Deutschland 69.550 Frauen an Brustkrebs. Dies entspricht einer Inzidenz von 169,1/100.000. Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist bislang nicht vollständig geklärt. Als wichtigster populationsbezogener Risikofaktor des Mammakarzinoms zählt heute das Alter der Patientin bzw. des Patienten. Die Tumorgenese verläuft nach modernen Erkenntnissen in einer mehrstufigen Kaskade von Zellwachstum und -proliferation. Neben einer möglichen inflammatorischen oder radiogenen Genese sind zu 80-90% Gen-Dysregulationen und Mutationen für Entstehung und Progression des Tumors verantwortlich.

Die Grundlage der exakten Stadieneinteilung von Tumoren bildet die TNM-Klassifikation. Sie beschreibt deren anatomische Ausbreitung und wird heute gemäß der Übereinkunft der UICC (International Union Against Cancer) üblicherweise angewandt (vgl. Tabelle 6 und Tabelle 7, Anhang). Das histopathologische Grading dient der Angabe des Differenzierungsgrades invasiver Mammakarzinome und wird auch in neueren Studien immer wieder als wichtiger Prognosefaktor zusammen mit weiteren morphologischen und molekularen Faktoren bestätigt (Ehinger et al. 2017).

Hinsichtlich der Therapie richtet sich die jeweilige Behandlungsstrategie nach der Art des Brustkrebses sowie nach dessen Ausprägung. Die chirurgische Therapie dient der lokalen Tumorkontrolle im Bereich der Brust und Lymphabflussgebiete (S3-Leitlinie 2018). Unterschieden werden eine brusterhaltende Operation (BET) mit nachfolgender Radiatio von einer modifizierten radikalen Mastektomie (MRM) mit oder ohne anschließende rekonstruktive Maßnahmen (S3-Leitlinie 2018). In der Regel werden die Patientinnen nach der Operation mit einer adjuvanten Therapie weiterbehandelt. Die postoperativ-unterstützende (adjuvante) systemische Hormon- und/oder Chemotherapie ist heute ein Teil der Therapie des primären, nicht metastasierten Mammakarzinoms (Untch et al. in Kreienberg et al. 2010). Neoadjuvante Therapien sind bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem, primär inoperablem oder inflammatorischem Mammakarzinom indiziert. Sie ist gegenüber der adjuvanten Chemotherapie hinsichtlich des Überlebens als gleichwertig zu betrachten, jedoch kann sie die Rate an BET anheben (von

Minckwitz et al. 2011; Jonat et al. 2011, S3-Leitlinie 2018). Beim Vorliegen von Fernmetastasen wird der Hormontherapie der Vorzug gegeben, weil sie insbesondere bei Langzeitanwendung weniger belastend für die Patientin ist. Um die Rezidivrate zu senken und die Entstehung von Fernmetastasen zu verhindern, ist die Radiotherapie mit Gammastrahlen obligater Bestandteil der Therapie nach brusterhaltender Operation und wird unter bestimmten Voraussetzungen (pT4, pT3 pN0 R0 bei Vorliegen von Risikofaktoren, > 3 befallene axilläre Lymphknoten, ggf. auch bei weniger Lymphknoten und gleichzeitig hohem Rezidivrisiko, R1- bzw. R2-Situation ohne Nachresektionsmöglichkeit) auch nach einer Mastektomie angewandt (EBCTCG 2011; S3-Leitlinie 2018).

1.2 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

1.2.1 Prognostische Marker: Definition und Anforderung

Prognosefaktoren dienen der Einschätzung der Malignität des Tumors und des Krankheitsverlaufes und somit dazu, eine Aussage bezüglich der Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens der Erkrankung (Rezidiv, Metastasierung) oder des Eintritts des Todes zu treffen. Aus ihnen kann eine prognoseorientierte Therapieplanung hergeleitet werden. Relevanz erhält ein prognostischer Faktor, wenn er zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens, des rezidivfreien Überlebens oder der Lebensqualität beiträgt (Harris et al. 2016). Prädiktiv ist ein Biomarker dann, wenn er zu einer Aussage bezüglich der Wirksamkeit einer Therapie führen kann. Bevor ein neuer prognostischer Faktor als solcher akzeptiert werden kann, sollte er gewisse Anforderungen erfüllen (Harris et al. 2016):

- Biologisches Modell / biologische Hypothese als Rationale für den klinischen Nutzen
- Reproduzierbare und validierte Nachweismethode für eine breite Anwendbarkeit
- Eindeutig definierte Schwellenwerte für eine klinische Entscheidungsfindung
- Qualitätssicherung der (Labor-)Tests
- Studien mit prospektiver statistischer Planung
- Statistische Signifikanz in multivariaten Analysen
- Eindeutige Resultate in mindestens einer großen, gut geplanten prospektiven, möglichst multizentrischen Studie bzw. in einer multizentrischen Phase-III-Studie
- Validierung der Bedeutung in prospektiver Konfirmationsstudie bzw. in Meta-Analyse, besser noch in einer „Pooled“ Analysis.

Ein „neuer“ Faktor sollte sich von den etablierten Faktoren abgrenzen, indem er entweder die prognostische Sicherheit erhöht, u.U. auch in Kombination mit anderen etablierten Markern, oder eine valide und klinisch relevante Auswahl der Therapie zulässt. Man kann „klassische“, etablierte Faktoren, von „modernen“, tumorbiochemischen Faktoren unterscheiden.

1.2.2 Klassische Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Als klassische Prognosefaktoren werden **morphologische Faktoren**, wie Grading, histologischer Typ, Lymphangiosis oder Hämangiosis, und der **pTNM-Status** mit Tumorgröße, axillärem Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung verwendet.

Die Tumorgröße stellt einen wichtigen unabhängigen Prognosefaktor des Mammakarzinoms dar, besonders bei nodal-negativen Patientinnen. Auch das histologische Grading gehört zu den etablierten Prognosefaktoren, wie Schwartz et al. in ihrer im Jahr 2014 publizierten großangelegten Studie des SEER-Programms mit 161.708 Brustkrebspatientinnen bestätigten. Der negative Einfluss von Tumorgröße, Lymphknotenstatus und -anzahl auf die Überlebenszeit wurde in zahlreichen, hier nur beispielhaft aufgeführten, Studien untersucht (Rosen et al. 1993; Cutuli et al. 2001; Kreienberg et al. 2010; Weissenbacher et al. 2010; Rose et al. 2015) und im Jahr 2016 erneut von Diessner et al. anhand der Daten von 9.625 Brustkrebspatientinnen bestätigt.

Die **Lymphangiogenese** stellt einen weiteren relativ jungen morphologischen Prognoseparameter dar. Die Lymphangiogenese scheint nach bisherigen Untersuchungen verantwortlich für die Ausbreitung der Tumorzellen über die Lymphbahnen in andere Organe zu sein und damit zur Metastasierung von Tumoren beizutragen (Alitalo et al. 2005; Aleskandarany et al. 2015). Von Tumorzellherden in intratumoralen Lymphgefäßen streuen Tumorzellen in andere Organe (Lymphgefäßinvasion). Die Anzahl der tumoralen Lymphgefäße kann über spezifische Endothelmarker wie LYVE-1 (Lymphgefäß-Hyaluronsäure-Rezeptor-1) oder D2-40 (Immunglobulin IgG1) detektiert werden, und darüber eine Korrelation zwischen Lymphgefäßdichte und Überleben oder Metastasen hergestellt werden (Abe et al. 2016). Es konnte bei invasiven Mammakarzinomen eine Korrelation von peritumoralen lymphovaskulären Invasionen mit schlechter Überlebensprognose gezeigt werden (Bono et al. 2004; Aleskandary et al. 2015; Abe et al. 2016). Schoppmann et al. (2004), El-Gohary et al. (2008) und Abe et al. (2016) fanden mithilfe von D2-40 eine signifikante Korrelation zwischen überwiegend peritumoraler Lymphgefäßdichte und Lymphmetastasen. Niemiec et al. (2014) ermittelten eine Korrelation zwischen

der Lymphgefäßdichte im Zellverband der Stromalen Fibroblasten und dem Grading der Tumoren. G3 und triple-negative Tumoren wiesen die höchsten Dichten auf.

Der Zusammenhang zwischen Lymphgefäßinvasion und einer Überexpression von Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), hier insbesondere VEGF-C und D sowie TGF- β (Transforming Growth Factor- α) wurde bisher kontrovers beschrieben: Nicht alle Studien, welche Lymphangiogenese beim Mammakarzinom beschreiben, finden auch erhöhte VEGF-Expressionen. Hier scheinen die chemische Struktur des Markers sowie der Ort der Lymphangiogenese (peri- oder intratumoral) eine Rolle zu spielen.

1.2.3 Molekulare Prognosefaktoren

Molekulare Marker zeigen Veränderungen auf molekularer Ebene an. Dies kann eine veränderte Genexpression, eine Mutation des gesamten Genoms oder nur einer Base (z.B. Promotor-methylierung), oder die veränderte Expression von Wachstumsfaktoren sein. Da diese Veränderungen bereits in Frühstadien oder bei Vorsorgeuntersuchungen erkannt werden können, wird ihnen heute hohe Bedeutung beigemessen.

1.2.3.1 Östrogen- (ER) und Progesteron-(PR)-rezeptorstatus

Immunhistochemische Marker werden zur Unterscheidung der Karzinom-Subtypen herangezogen. Die Erkenntnis, dass das Mammakarzinom östrogenabhängiges Wachstum zeigt, führte zur Entdeckung der Hormonrezeptoren, wichtiger Transkriptionsfaktoren. Der Hormonrezeptorstatus definiert den Anteil an Tumorzellen, welche im Zellkern Hormonrezeptoren tragen, also auf Östrogen oder Progesteron reagieren. Der Nachweis wird immunhistochemisch durch eine Anfärbereaktion mithilfe monoklonarer Antikörper durchgeführt. Sowohl der international gebräuchliche Allred-Score (Harvey et al. 1999) als auch der in Deutschland meist eingesetzte Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (1987) eignen sich dafür. Beide ermitteln Scores über die Färbintensität und die Anzahl angefärbter Zellen. Bei positivem Ergebnis wird der Tumor dann als ER+ oder PR+ bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle invasiven Mammakarzinome ER+-Zellen aufweisen, jedoch in unterschiedlicher Menge (Allred et al. 2004; Ellmann et al. 2009). Der überwiegend exprimierte Typ der ER-Untereinheiten ist ER-alpha.

Da sich nach derzeitigem Kenntnisstand ER-positive Zellen aus prämaligen Vorläuferzellen entwickeln, empfehlen die aktuellen ASCO (American Society of Clinical Oncology) / CAP (College of American Pathologists) Leitlinien, auch beim Ansprechen von weniger als 10% der Tumorzellen (> 1%) von einem positiven Hormonrezeptorstatus zu sprechen. Ein negativer Rezeptorstatus besteht nur bei weniger als 1% immunreaktiver Tumorzellkerne (Goldhirsch et al. 2011; Hammond et al. 2010).

Der Hormonrezeptorstatus ist damit eher ein prädiktiver als ein prognostischer Marker. Die Ermittlung des Östrogen (ER) und Progesteron (PR oder PgR)-Status gehört heute zur Basisdiagnostik, um eine geeignete Therapieempfehlung geben zu können. Die wenigen Studien, die sich mit der prognostischen Relevanz befassen, sind bisher widersprüchlich. Einige Ergebnisse zeigten, dass ein positiver Östrogenrezeptorstatus sowie ein positiver Progesteronrezeptorstatus mit einem längeren Gesamtüberleben unter Chemotherapie einhergeht (Bogina et al. 2015; Nordenskjöld et al. 2016; Gluz et al. 2016), wohingegen beispielsweise Chan et al. (2015) an großen Kollektiven eine Korrelation zwischen ER+ und dem Risiko von Rezidiven und frühzeitigem Tod ermittelten. Wie Salmen et al. (2014) in ihrer Auswertung der Daten von 7.965 Brustkrebspatientinnen sahen, hat der Progesteronrezeptorstatus am meisten klinische Relevanz bei negativem ER-Status und guter Differenzierung des Tumors.

Wie die Heterogenität des Mammakarzinoms zeigt, sind Dignität und Tumorentwicklung multifaktoriell bedingt. Einige Autoren weisen daher z.B. auf einen altersabhängigen Zusammenhang bezüglich des Rezeptorstatus hin, auch spielen Tumorgröße und Differenzierung ebenso wie der HER2/neu-Status zusätzlich eine Rolle, sodass der Hormonrezeptorstatus nur ergänzend bewertet werden kann (Ono et al. 2016). Die Therapieresistenz einiger ER-positiver Tumoren wird wiederum auf Mutationen des ER-Gens zurückgeführt (Thomas und Gustafsson 2015).

1.2.3.2 Wachstumsfaktoren und -rezeptoren

HER2/neu- Status

Die HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)/neu-oder c-erb-B2-Tyrosin-Kinase ist einer der Rezeptoren des EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)-Komplexes, welche sich im Gegensatz zu den Hormonrezeptoren an der Zelloberfläche befinden, und eines der wesentlichen Onkogene. Auch dieses Protein kann immunhistochemisch analysiert werden. Es wird

vom c-erb-B2-Gen (cellular avian erythroblastosis homologue B2) kodiert, welches auf Chromosom 17q21 lokalisiert ist. Punktmutationen oder auch Genamplifikationen führen zu einer HER2/neu-Überexpression, welche weitere Genexpressionen beeinflusst und über Signaltransduktionswege wie die MAPK-Kaskade und die PI3-K-Kaskade Tumorzellproliferation, Migration und Apoptose verstärkt (Worthington et al. 2010; Lauring et al. 2013; Kirouac et al. 2016). In Mammakarzinomen wurden Korrelationen zwischen HER2/neu-Überexpressionen und geringerem Überleben bzw. dem Auftreten von Rezidiven ermittelt (Al-Kuraya et al. 2004; Tiezzi et al. 2007; de Roos et al. 2007). HER2/neu-Überexpression oder Genamplifikationen wurde mit einer Häufigkeit von 10 bis 20 % der Tumoren entdeckt (Ross et al. 2009). HER2/neu ist daher einer der Marker zu Unterscheidung der Subtypen.

Die biologische Aktivität des HER2/neu ist auf dessen Affinität zur Homodimerisierung und Bindung an andere Wachstumsfaktoren zurückzuführen (Yarden 2001; Lauring et al. 2013; Kirouac et al. 2016). HER2/neu und Hormonrezeptoren beeinflussen sich auf diese Weise gegenseitig: so wurden Hochregulierungen des Östrogenrezeptors durch HER2/neu analysiert (Arpino et al. 2008).

Der HER2/neu- Status gilt heute als wichtiger evidenzbasierter Faktor, der bei der Erstellung von Therapiekonzepten zum Einsatz kommt (Jonat et al. 2011; Kreienberg et al. 2010; Untch et al. 2015).

Die Beteiligung der Wachstumsfaktoren an der Tumorgenese ist vielfach bestätigt worden. Insbesondere bei therapieresistenten Karzinomen spielt die Hochregulierung von **EGFR, VEGF und TGF- β** eine wichtige Rolle (Xu et al. 2011; Zavadova et al. 2014). So fanden Hadzisejdić et al. (2010) hinsichtlich der Expression von EGFR eine Korrelation zwischen nukleärem EGFR und geringem Überleben. Nukleäres EGFR war in 40% der Fälle zu finden, wogegen membranständiges EGFR nur bei 2% der Karzinome nachgewiesen wurde. Zavadova et al. (2014) fanden erhöhte VEGF- und TGF- β -Werte bei hormontherapieresistenten Mammakarzinomen. Die Untersuchungen von Scherbakov et al. (2013) ergaben, dass EGFR und VEGF insbesondere an der Tumorphiliferation bei Östrogen-unabhängigem Wachstum, also ER-negativem Status eine Rolle spielen. Bahnassy et al. (2015) fanden eine Hochregulierung von VEGF in triple-negativen Karzinomen.

Die hohe Variabilität von TGF- β hinsichtlich seiner Bindungsmöglichkeiten an Proteine der Bindegewebszellen und hinsichtlich seiner Transmembran-Rezeptoren bedingt die Vielfalt an

Interaktionen im Zellzyklus. In der Tumorgenese verläuft die Aktivität von einer Tumorsuppression in frühen Stadien hin zu einer Tumorprogression (Pinkas et al. 2006). Pang et al. (2014) fanden eine Korrelation zwischen verminderter Expression des TGF- β Rezeptors III (TBR3) und Tumoren schlechter Differenzierung und geringem Überleben. Sie verstehen TGF- β daher als Marker für triple-negative Karzinome. Es gibt allerdings bisher wenige aussagekräftige Studien.

Die Analyse von Wachstumsfaktoren sollte aufgrund ihres heterogenen biochemischen Verhaltens in Karzinomen nur in Kombination mit anderen Markern ausgewertet werden. Wie die Studie von Tripsianis et al. (2013) und die Übersicht von Patani et al. (2013) zeigt, hat die Co-Verwendung der Marker HER2, IL-6, TNF- α und TGF- β hohe prognostische Relevanz.

1.2.3.3 Zellzyklus-Faktoren

Die Analyse des **Proliferationsfaktors Ki-67** dient ebenfalls zur Unterscheidung der molekularen Tumor-Subtypen. Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, das durch das MIB1-Gen kodiert wird. Es wird im Zellkern produziert und während der Proliferation der Zellen exprimiert (Scholzen et al. 2000). Der Nachweis wird mithilfe des monoklonalen Antikörpers Ki-67 durchgeführt.

Ki-67 wird in der Klassifikation als Ergänzung eingesetzt, da seine alleinige Aussagekraft nach zahlreichen Studien nicht belegbar ist (Park et al. 2012; Harbeck 2013). Der Ki-67-Labeling-Index (Prozent der Zellen mit Ki-67) ist mit dem Metastasierungs- und Rezidivrisiko korreliert (Aziz et al. 2016; Ehinger et al. 2017) und erlaubt eine Aussage zur Prognose des Mammakarzinoms und, wie neue Studien zeigen, eine erheblich bessere Differenzierung der Subtypen (Park et al. 2012; Criscitiello et al. 2014; Wishart et al. 2014; Niemic et al. 2015; Cirqueira et al. 2015; Aziz et al. 2016). So fanden Liu et al. (2017) bei 125 Patientinnen mit triple-negativ-Karzinom erhöhte Ki-67-Werte.

Cyclin D1 (kodiert durch das CCND1-Gen) und **Cyclin E** sind wesentliche, den Zellzyklus kontrollierende Proteine. Sie sind an der Steuerung der Zellproliferation durch Regulation der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und der Aktivierung diverser Gene beim Übergang der G1 zur S-Phase beteiligt. Wie Studien ergaben, sind die Cycline auch an der Regulation von Wachstumsfaktoren beteiligt, was ihre Bedeutung in der Tumorgenese unterstützt. In Abhän-

gigkeit des Tumorstatus und -differenzierungsgrades, des Geschlechts und des Alters der Patienten sollte die Interpretation der Cyclin-Expression ebenfalls nur in Kombination mit anderen Markern erfolgen.

Ein weiteres Protein der Zellzykluskontrolle ist das Tumorsuppressorprotein **P53**, bzw. das Gen **TP53**. Mutationen von TP53 gelten seit langem als wesentlich für die Karzinogenese. Aber auch hier sind die Studienergebnisse in Abhängigkeit des Tumorstatus und Subtyps heterogen. Veränderte Expression von TP53 oder Punktmutationen dienen in Kombination mit anderen Markern, wie HIF-alpha, HER2/neu, Cyclin D1 und Ki-67 zur Prognostizierung des Mammakarzinoms (Bos et al. 2004; de Ross et al. 2009; Mylona et al. 2013).

Die Proteine der Gene **BRCA 1 und 2** sind in normaler Expression wichtige Transkriptionsfaktoren in der Regulierung des Zellzyklus, indem sie beispielsweise Chromosomenstabilität und DNA-Reparatur regulieren. Mutationen in BRCA 1 und 2 führen zur Inaktivierung ihrer ursprünglich tumorsuppressiven Wirkung und damit zum Entgleisen des Zellmetabolismus (Welch et al. 2001). BRCA-Gene gelten als etablierte Nachweisparameter für das hereditäre Mammakarzinom. Korrelationen zu anderen molekularen Parametern, wie z.B. zum Hormonrezeptorstatus, werden bisher kontrovers beschrieben. So fanden Bane et al. (2007) BRCA2-Mutationen korrelierend mit einem positiven ER-Status. In anderen Studien wurden Korrelationen mit schlechter differenziertem Gewebe und negativem ER-Status gefunden (Schmutzler et al. 1997; Okada et al. 2012; Yang et al. 2015).

1.2.3.4 Faktoren der Invasivität und metastatischen Kapazität

Der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (**uPA**) und dessen Inhibitor Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (**PAI-1**) kennzeichnen das Potenzial der Tumorzellen zur Invasion und Metastasenbildung. Die Enzyme uPA/PAI-1 erfüllen wichtige Funktionen einerseits der Proteolyse/Fibrinolyse, andererseits der Adhäsionsunterstützung von Tumorzellen an Zellmembranen und sind damit in Chemotaxis, Proliferation und Angiogenese involviert (Reuning et al. 2003; Harbeck et al. 2004). Die prognostische Relevanz wurde in vielen Studien bestätigt: So zeigen Patientinnen mit einem niedrigen PAI-1- Level eine signifikant bessere Überlebenschancen als Patientinnen mit einem erhöhten PAI-1. Die Plasminogen-Parameter dienen heute zur Einschätzung der Therapieoptionen bei Patientinnen mit Nodal-negativem Mammakarzinom (Harbeck et al. 2013, Kolben et al. 2016).

1.2.3.5 Genexpressionstests

Für adjuvante Therapieentscheidungen kann heute mittels einer Reihe von Genexpressionstests für Patientinnen mit frühem hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom durch die zusätzlich gewonnenen prognostischen Informationen über die individuelle Tumorbiologie ein möglichst präzises Rezidivrisiko abgeschätzt werden. Der Risikoeinschätzung kommt insofern eine bedeutende Rolle zu, als dass Patientinnen mit einem geringen absoluten Risiko nur einen geringen absoluten Nutzen von einer adjuvanten Therapie haben. Der Erstellung genomischer Profile des Tumors, sogenannte Gensignaturen, werden daher herangezogen, um Patientinnen, welche von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren können, von denen, denen eine nebenwirkungsreiche Therapie erspart bleiben kann, abzugrenzen (S3-Leitlinie 2018). Neben den klassischen klinisch-pathologischen Prognosefaktoren kommen heute in Deutschland bereits verschiedene verfügbare Genexpressionstests zum Einsatz (u.a. EndoPredict®, MammaPrint®, Oncotype DX®, Prosigna®) (Sinn et al. 2013). Die Ergebnisse der OPTIMA Prelim Machbarkeitsstudie mit 313 Patientinnen aus 2016 zeigen jedoch, dass verschiedene kommerziell verfügbare Genexpressionstests zu unterschiedlichen Risikoeinteilungen der individuellen Patientin führen können. Aus diesen unterschiedlichen Risikoeinteilungen resultieren in der Folge z.T. divergente Empfehlungen für oder gegen eine Chemotherapie (Bartlett et al. 2016; Stein et al. 2016).

1.2.4 Stromale Genexpression als prognostischer Marker

1.2.4.1 Interaktion Tumor – Tumorstroma

Die Interaktion zwischen Epithel und Stroma ist bereits für die normale Entwicklung der Brustdrüse und ihre Funktion notwendig. Darüber hinaus wird auch der Bedeutung der Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Stroma für die Karzinogenese seit einigen Jahren in wissenschaftlichen Untersuchungen zunehmend Beachtung geschenkt. Sind es zum einen die Tumorepithelzellen, die durch Invasion und Angiogenese das Stroma infiltrieren bzw. Signale auslösen und im Stroma Veränderungen initiieren, so beeinflusst andererseits das Stroma selbst die Tumorprogression.

Vom Tumor ausgehende Chemotaxis der Monozyten, die Wanderung von Mastzellen in die EZM (extrazelluläre Membran) und die Expression von TGF- β und VEGF bereiten die EZM und die Basalmembran durch Degradation der Strukturproteine für die Angiogenese und Migration der Tumorzellen vor, wobei Proteasen eine besonders wichtige Rolle spielen (Kim et al.

2006; Fakhrjou et al. 2016). Andererseits können Veränderungen in Stromazellen, wie ein Ungleichgewicht von Fibrinbildung und Fibrinolyse, das Tumorwachstum sowohl fördern als auch inhibieren.

Das Stroma stellt Bindegewebe überwiegend aus Kollagenfasern dar, worin neben Mastzellen und Lymphozyten aktivierte Fibroblasten, so genannte cancer associated fibroblasts (CAF), aktiv sind. Die Aufgabe von stromalen Fibroblasten liegt in Generierung und Reparatur interzellularen Gewebes, also des Kollagens. Die Interaktion mit CAF und deren Steuerung der Zellaadhäsion und Migration trägt nun ebenfalls entscheidend zur Tumorprogression bei (Kim et al. 2006; Angelucci et al. 2012; Fu et al. 2013; Augsten 2014; Loi et al. 2014). CAF ähneln in ihrer Aktivität hinsichtlich Kollagensynthese und Steuerung von Wachstumsfaktoren und Interleukinen wie IL-6 den Fibroblasten in einer überschießenden Wundheilungsreaktion (Gabbiani et al. 2003; Kalluri et al. 2006; Erez et al. 2013; Augsten 2014; Osuala et al. 2015; Fakhrjou et al. 2016). Daher wird die Tumorprogression auch mit einem hämostatischen System verglichen, welches außer Kontrolle gerät.

Die Aktivierung der CAF erfolgt über PDGF und TGF- β : Tumorzellen aktivieren Thrombozyten, welche PDGF, IGFa1, VEGF, TGF- β 1 und Selectine sezernieren (Lal et al. 2013). Unter der Einwirkung dieser Wachstumsfaktoren differenzieren Fibroblasten zu Myofibroblasten, den wichtigen Untereinheiten in der nachfolgenden Reaktionskaskade: Sie entwickeln Eigenschaften wie Muskelzellen und passen sich dem umliegenden Gewebe an. Einmal aktivierte CAF setzen in der Folge ihrerseits eine Signalkaskade in Gang, welche ausgehend vom Stroma Makrophagen rekrutiert, woraufhin weitere Überschüsse von Wachstumsfaktoren sezerniert werden, welche die Tumorprogression fördern (Gabbiani et al. 2003; Augsten 2014; Acerbi et al. 2015).

1.2.4.2 Genexpressionen in stromalen Fibroblasten

Aufschlussreiche Analysen der letzten 6 Jahre konnten zeigen, dass sich das Expressionsspektrum der stromalen Fibroblasten sehr stark von dem der Fibroblasten gesunden Gewebes (NF) unterscheidet (Sadlonova et al. 2009; Bauer et al. 2010; Pasanen et al. 2016). Sadlonova et al. (2009) analysierten in Fibroblasten aus Mammakarzinomen 420 Gene, welche ein unterschiedliches Expressionsprofil in NF bzw. CAF zeigten. In der Regel sind die Expressionen in NF geringer als in CAF, es gibt jedoch einige besondere Abweichungen. Unter den 27 Genen, die

Bauer et al. (2010) in CAF von primären Mammakarzinomen herunterreguliert gegenüber normalen Fibroblasten (NF) analysierten, befanden sich auch die Gene von AKR1C1 und AKR1C2.

Bei der Untersuchung der Stromalen Aktivität wurde deutlich, dass sich die Genexpression von der des gesunden Gewebes insbesondere hinsichtlich Zytokinen, EZM-Molekülen und Proteasen unterscheidet (Casey et al. 2009; Sadlonova et al. 2009; Bauer et al. 2010). Neuere Untersuchungen ergaben auch die Aktivierung von VEGF durch CAF (Wang et al. 2017). Die Vaskularisierung, insbesondere die Lymphangiogenese, aber auch die Kollagenbildung, werden durch erhöhte Level von VEGF, Laminin- α -2 und FGF-2 sowie TGF- β gesteuert (Vitolo et al. 2001; Mylona et al. 2007; Niemic et al. 2014; Acerbi et al. 2015).

Zahlreiche Studien der letzten 5 Jahre bestätigen, dass die Histochemie des Stromas demnach zur Beurteilung und Prognostizierung von Karzinomen herangezogen werden sollte. Weitere Studien unterstützen die Annahme, dass das Expressionsprofil stromaler Zellen mit dem Tumortyp und der -progression korreliert. So untersuchten Schoppmann et al. (2012) die Podoplanin-Expression in Mammakarzinomen, welche in diversen Tumorentitäten einen statistischen Zusammenhang mit einer schlechten Prognose aufwies. Bei 9 bzw. 8% der Patientinnen war die Expression auch in Stromazellen erhöht und korrelierte mit geringerem Überleben. Wie Tchou et al. (2012) herausfanden, variiert die CAF-induzierte Genexpression zwischen den Subtypen des Mammakarzinoms. In der Studie von Frings et al (2013) fanden die Autoren einen Zusammenhang zwischen der PGDF-Expression von CAF und HER2/neu / ER-Tumoren sowie einem hohen Grading. In der Untersuchung von Niemic et al. (2014) korrelierte die stromale Lymphgefäßdichte mit G3, triple-negativen Karzinomen und der Expression weiterer Zytokine. Die Untersuchung von Kim et al. (2015) von Proteinexpressionen aus CAF in Tumoren unterschiedlicher Metastasierung ergab Variationen zwischen Lungen-, Knochen- und Lebermetastasen. Nach Park et al. (2016) unterscheidet sich die Expression der CAF-induzierten Proteine in invasiven duktalem Mammakarzinomen von der in lobulären Karzinomen.

1.2.4.3 AKR1C1 und AKR1C2: Potential als Prognose-Marker?

In diesem Zusammenhang kommt den Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) AKR1C1 und AKR1C2, welche beim Mammakarzinom in luminalen Epithelzellen und in Myofibroblasten gefunden wurden, hohe Bedeutung zu. Die AKR-Superfamilie fungiert als Katalysator für Oxidations-Reduktions-Reaktionen in diversen Geweben, nicht nur bei Säugetieren, sondern z.B. auch in

Mikroorganismen. Beim Menschen wurden bisher 15 unterschiedliche AKR-Proteine entdeckt. Die AKR1C-Familie (Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, in englischen Publikationen HSD) umfasst vier Enzyme AKR1C1-4, die alle von dem AKR1C1-Gen auf Chromosom 10p15-p14 codiert werden. AKR1C1-4 sind monomere Proteine aus 323 Aminosäuren, wobei AKR1C1 und C2 sich nur in 7 Aminosäuren unterscheiden. Sie wurden bisher überwiegend in der Prostata, in der Zervix und der Brustdrüse gefunden und regulieren die Aktivierung von Androgen-, Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie des GABA-Rezeptors (Barski et al. 2008; Penning et al. 2009, Penning et al. 2015).

Diese vier AKR1C-Proteine werden in der Literatur auch unter der Bezeichnung 20 α -HSD geführt, was ihre Aktivitätszentren im Progesteron-Metabolismus kennzeichnet. Dabei reagiert AKR1C2 allerdings auch als 3 α -HSD, wie im Weiteren gezeigt wird. AKR1C1 und AKR1C2 sind in verschiedene Wege des Progesteron-Metabolismus involviert. Beide Isoformen reduzieren Progesteron zu den inaktiven Metaboliten 20- α -Hydroxyprogesteron (20 α -HP) sowie 5 α -Dihydrotestosteron (5 α -DHT) zu 3 α -Androstandiol und darüber hinaus Östrogen zu 17 β -Östradiol (Penning et al. 2015). AKR1C2 katalysiert zusätzlich die Reduktion von 5 α -DHP zu 3 α -HP (Rižner et al. 2014). Die Progesteronmetaboliten haben eine wichtige Funktion in der Hemmung von Zellproliferation und -adhäsion, indem sie über die Bindung an membranständige Rezeptoren proliferationshemmende Aktionen wie Apoptose und die Regulierung von Adhäsionsfaktoren beeinflussen (Wiebe et al. 2006).

Die Herunterregulierung der Reduktasen und die nachfolgende Reduktion von 20 α -DHP und 3 α -HP führt nicht nur zu einer Erhöhung der Expression des Gegenspielers, der proliferativen 5 α -Reduktase, sondern auch zu höheren Progesteron-Ausschüttungen mit nachfolgender Tumorprogression (Wiebe et al. 2013; Ji et al. 2004). Somit könnte AKR1C1 und AKR1C2 eine tumorprotektive Funktion zugeschrieben werden.

Beide Reduktasen wurden in Mammakarzinomen reduziert gefunden (Lewis et al. 2004; Ji et al. 2004; Pau et al. 2010; Hlaváč et al. 2014). Wie Wiebe et al. (2013) zeigen konnten, hemmt 3 α -HP die Tumorprogression in ER/PR-negativ-Karzinomen. Zusammenhänge zwischen der Aktivität der AKR1C im Brustgewebe und Brustkrebs wurden bislang noch nicht publiziert. Die Publikation von Hlaváč et al. (2014) gibt jedoch folgenden Hinweis: Im Kollektiv von 68 Mammakarzinomen wurden höhere intratumorale Expressionen von AKR1C1 und AKR1C2 im Anschluss an die neoadjuvante Therapie ermittelt.

In der umfangreichen Analyse von Sadlanova et al. (2009) der Proteinexpressionen in Mammakarzinom-Stroma und normalen Fibroblasten wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression des EZM-Proteins FBLN1 (Fibulin1) im Stroma und verminderter Tumorproliferation gefunden. Es läge daher die Vermutung nahe, dass auch weitere Proteine der Stromalen Expression im Zusammenhang mit der Tumorproliferation stehen.

Die Stromale Expression derartiger repräsentativer Gene bzw. Proteine könnte damit eine prognostische Relevanz besitzen. Der AKR1C-Familie kommt damit eine besondere Bedeutung zu.

1.3 Problemstellung und Zielsetzung

Wie die Übersicht zeigt, gibt es eine Reihe molekularer Marker, die Aussagen zur Prognose des Mammakarzinoms zulassen, jedoch wiederum mit einer Reihe anderer Abläufe korreliert sind. Die Heterogenität des Mammakarzinoms limitiert daher die Relevanz einzelner prognostischer Marker. Es erscheint derzeit sinnvoll, unterschiedliche molekulare Parameter zu einer Aussage bezüglich Dignität und Prognose des Mammakarzinoms heranzuziehen. Wie die Studien der jüngsten Zeit herausarbeiten, ist die Tumorgenese äußerst komplex und insbesondere von einer Interaktion zwischen Tumor und Tumorstroma abhängig. Signalinduktionen seitens des Stromas initiieren Veränderungen in Gen- und Proteinexpressionen, welche Tumorzellzyklus und Migration beeinflussen. Das Stroma als Auslöser der Tumorprogression sollte demnach intensiv betrachtet werden, wobei genetischen Veränderungen eine hohe Bedeutung zukommt.

Die vorliegende Arbeit dient dazu, die prognostische Relevanz der Proteinexpression von AKR1C1 und AKR1C2 zu überprüfen. Zielsetzung ist die Darstellung von AKR1C1 und 2 sowie weiterer Proteine entsprechend ihres Expressionsverhalten in Stromalen Fibroblasten und in Tumorzellen unter Berücksichtigung von Alter, Tumorstadium, Nodalstatus, Rezidiv, Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv für diese Arbeit umfasste 504 Mammakarzinom-Patientinnen, die sich zwischen den Jahren 1997 und 2010 zur Therapie des Tumors in der Universitätsfrauenklinik Kiel Schleswig-Holstein befanden. Die chirurgische Therapie erfolgte im Brustzentrum (Mammazentrum) des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Als Grundlage der Datensatzgewinnung dienten die Patientenakten der Universitätsfrauenklinik Kiel.

Es galten folgende Einschlusskriterien: Vollendung des 17. Lebensjahres, Therapie des Mammakarzinoms an der Universitätsfrauenklinik, Kiel. Alle Patientinnen wurden vorab über die Ziele der Studie informiert und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme und Entnahme von Tumorbiopsien. Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden alle Arztbriefe und Operationsberichte der Universitätsfrauenklinik zwischen 1997 und 2010 zusammengetragen und in einem Register festgehalten. Auf diese Weise wurden Informationen aus Anamnesebögen, präoperativer Diagnostik, Operationsberichten, histologischen Befunden, Entlassungsberichten und Nachuntersuchungen des Mammazentrums der Universitätsfrauenklinik sowie des Instituts für Pathologie extrahiert. Es wurden Patientinnen mit Erstdiagnose eines Mammakarzinoms im Zeitraum von 1997 bis 2009 ausgewählt. Die daraus gewonnenen Daten wurden durch eine Evaluierung aller histopathologischen Befunde von Mammakarzinomen in der Tumordokumentation der Universitätsfrauenklinik ergänzt. Die Recherche ergab somit ein Kollektiv von 454 Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom und 50 Patientinnen mit DCIS (Ductal Carcinoma In Situ), wovon etwa 100 Patientinnen mit dem Event Rezidiv und 80 Patientinnen mit dem Event Tod gekennzeichnet waren. Insgesamt waren 386 der 504 Patientenproben auswertbar.

Die auf diese Weise extrahierten Daten wurden tabellarisch in einem Register erfasst (Microsoft Excel). Dieses Register enthielt abschließend folgende Komponenten:

Allgemeine Patientencharakteristika: Alter zum Diagnosezeitpunkt, Erstdiagnose, Geschlecht

Tumorcharakteristika des Primärtumors: Tumorstadium vor und ggf. nach Chemotherapie, Nodalstatus, Grading, histologischer Subtyp, Resektions-Status (R-Status), Befall des Lymphgefäßsystems (L-Status), Fernmetastasen (M-Status), Einbruch in die Venen (V-Status), Rezeptorstatus (Östrogen und Progesteron, HER2/neu).

Durchgeführte adjuvante bzw. neoadjuvante Therapie: Bestrahlung, Chemotherapie, endokrine Therapie.

Vorliegen eines intra- oder peritumoralen Carcinoma in situ

Vorliegen von Fernmetastasen, Rezidiv und Simultantumoren

Follow-Up (Zeitpunkt des letzten Follow-Up und Ergebnis (Tod, Todesursache). Hieraus erfolgte die Berechnung von Disease Free- und Overall Survival.

Das mediane Follow-Up betrug 46 Monate mit einer Reichweite von 0 bis 168 Monaten.

2.2 Laborgeräte und Materialien

2.2.1 Geräte

Mikrowellengerät (Sharp R332, Sharp Electronics Europe GmbH, Hamburg)

Accu Jet (Pipettierhilfe)

Inkubator

Deckgläschen, Langenbrinck Teningen, Deutschland

Präzisionswaage 2001 MP2, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Lichtmikroskop Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Kühlschrank, Siemens

Magnetrührer mit Heizplatte

Mikroskop, Axioskop, Zeiss, Göttingen, Deutschland

Statistische Auswertung: R-Software

Mikrotom HM 400R

Objektträger Superfrost®Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig

pH-Meter pH 300, Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland

Paraffin, Langenbrinck Teningen, Deutschland

Research Pipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Trockenschrank, Ehret, Emmendingen, Deutschland

Vortex (Genie 2), Scientific Industries, Darmstadt, Deutschland

2.2.2 Puffer, Medien und Lösungen

Xylol/ Xylol- Isomere Gemisch 2,5l Riedel-de Haen; Art.: 16446

100%iger Alkohol, 96%iger Alkohol, 70%iger Alkohol

Citratpuffer

0,01 molare Zitronensäure (Citronensäure-Monohydrat, Fa. Merck, Darmstadt)

1 molare Natronlauge (NaOH (1N), Fa. Merck, Darmstadt)

Destilliertes Wasser, aufbereitet mit einer Seradest SD 2800 Patrone, Zitt-Thoma Laborbedarf-Glasbläserei, Freiburg, Deutschland

pH-Wert: 6,0

TBS Puffer

83,6g NaCl (Walter GmbH&Co KG, Kiel, Deutschland), 12g Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

25% HCL (Salzsäure Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Destilliertes Wasser

pH-Wert: 7,4-7,6 NaCl

Blocking solution für die endogene Peroxidase

Hydrogenperoxide 30% Merck 8.22287.1000 1L UN2014

PBS- Puffer pH 7,6

PBS Dulbecco Instamed (Biochrom, Berlin, Deutschland) in Aqua dest.

0,8-0,9%ige NaCl-Lösung in 0,03M Phosphatpuffer

Waschpuffer

DAB Substrat und Chromogen

Bright-DAB-Substrate Kit Immunologic BS04 sample

Hämalaun Lösung

Merck 1.09249.0500 Mayers Hämalaun Lösung RSS

Leitungswasser

Eindeckmedium

Eukitt, Kindler R10-90/21-38, 59-25-37

Roti-mount/ Roth Art.: HP68-1

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Erstellung eines Tissue Micro Array (TMA)

Die Tissue Micro Array-Technik beruht auf der Überlegung, durch parallele Anordnung unterschiedlicher Gewebeproben in einem Paraffinblock die Möglichkeit zu einer Simultanbestimmung immunhistochemischer Daten ganzer Patientenkollektive erreichen zu können (Kononen et al. 1998). Tissue Micro Arrays bestehen aus Paraffinblöcken, in denen bis zu 1000 separate Gewebekerne im Array Mode angeordnet sind. Für die Entnahme von Gewebeproben wird in der Regel eine Hohlnadel mit 0,6mm Kerndurchmesser verwendet. Die Gewebeproben werden aus in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten klinischen Biopsien oder Tumorproben entnommen und in einen leeren Paraffinblock (Empfängerblock) in einem Abstand von 0,7 bis 0,8 mm transferiert und bei 40°C eingeschmolzen. Die Oberfläche jeder Probe ist damit 0,28 Quadratmillimeter groß. Dadurch können Mehrfach-Proben oder Gewebeproben großer Patientenkollektive nach einem Dünnschnitt dieses Blocks gemeinsam gefärbt und ohne einen Wechsel des Objektträgers unmittelbar nacheinander betrachtet werden.

Zur Analyse werden Schnitte des Paraffinblocks hergestellt. Man entnimmt dazu Proben aus den Paraffinblöcken (Spenderblöcke), die einerseits klein genug sind, um den Block nicht zu zerstören und andererseits groß genug, um die Morphologie der Probe beurteilen zu können. Nach einer kurzen Erwärmung, um die Stanze der Probe mit dem Paraffinblock zu verbinden, wird der Tissue Array Block im Mikrotom fixiert und geschnitten. Dann wird der Dünnschnitt auf den Objektträger aufgebracht, fixiert und anschließend mit HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt und analysiert. Hierbei erscheinen Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa.

Tissue Micro Arrays erlauben es, eine Vielzahl von Gewebeproben gleichzeitig zu untersuchen, sowie bis zu 100 Folgeschnitte anzufertigen. Es empfiehlt sich, nach jeder Folge von 50 Schnitten neue HE-Schnitte zu färben, um Fehler durch die mögliche Änderung der Morphologie des Gewebes zu vermeiden (Kallioniemi et al. 2001). Der Nachteil, dass jeder Kern nur einen Bruchteil des Gewebes darstellt, wird durch das Erstellen mehrfacher Stanzungen aus einer Gewebeprobe ausgeglichen. Eine größere Stanzdicke geht mit weniger Proben einher.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Anfertigung der Tissue Micro Arrays mit einem Personal Tissue Arrayer MTA-1 (Alpha Metrix Biotech) und einer Stanzgröße von 1 mm. Der Empfängerblock wurde aus thermostabilem Paraffin hergestellt. Die Anordnung der TMA und die Anzahl der Proben sind aus den „TMA-Maps“ im Anhang zu ersehen.

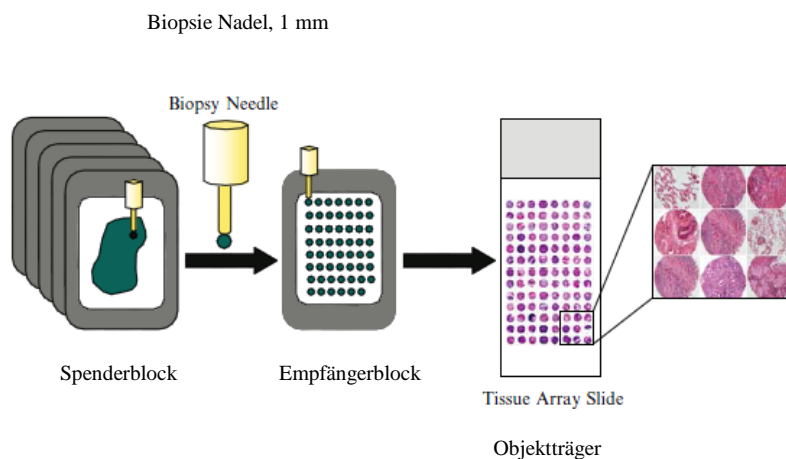


Abbildung 1: Herstellung eines Tissue Micro Array (In Anlehnung an Shannon et al. 2008)

2.3.2 Anfertigen der Paraffinschnitte

Zur Anfertigung der Schnittpräparate wurden die tiefgefrorenen Paraffinblöcke in ein Rollenmikrotom (Modell 2050 Supercut, Fa. Reichert und Jung, Nussloch, Deutschland) gespannt und anschließend mit quergestelltem Messer und einer Schnittdicke von 2-5µm geschnitten. Die in einem auf 50°C erwärmten Wasserbad temperierten Schnitte wurden dann auf Objektträger (Super Frost Plus, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Anschließend wurden diese Objektträger bei 37°C im Inkubator über Nacht getrocknet. Die Präparate wurden anschließend bei Zimmertemperatur gelagert.

2.3.3 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie bezeichnet den Nachweis von Antigenen in Geweben, im übergeordneten Sinn spezifischer Moleküle wie Proteine, anhand von sichtbaren Reaktionsprodukten, die bei der Bindung eines markierten Antikörpers an das Protein entstehen. Als Antikörper können Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Bei der in der vorliegenden Arbeit angewandten enzymatischen oder auch indirekten Methode erfolgte die Analyse der Proteinexpression der Gene AKR1C1 und AKR1C2 mit Hilfe spezieller Primär-Antikörper und konjugierter Sekundär-Antikörper, welche über Peroxidase markiert sind.

Der Ablauf der Farbreaktion erfolgt in zwei Schritten (Abb. 2). Der erste Schritt der Färbung ist die Inkubation mit dem Primärantikörper, worauf die Bindung des EnVision-Polymerantikörpers an den Primärantikörper folgt. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten sekundären Antikörpern (EnVision™ System, Dako, Agilent Technologies) handelt es sich um Peroxidasemarkiertes Polymer, konjugiert an Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobuline in Tris-HCl-Puffer. Es wurde Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) verwendet. Die Polymere sind patentrechtlich geschützte Polymerkonjugate, deren Rückgrat aus einem inerten Dextranmolekül bestehen. Daran können neben durchschnittlich 70 Peroxidasemolekülen weitere 10 Antigenmoleküle gebunden werden.

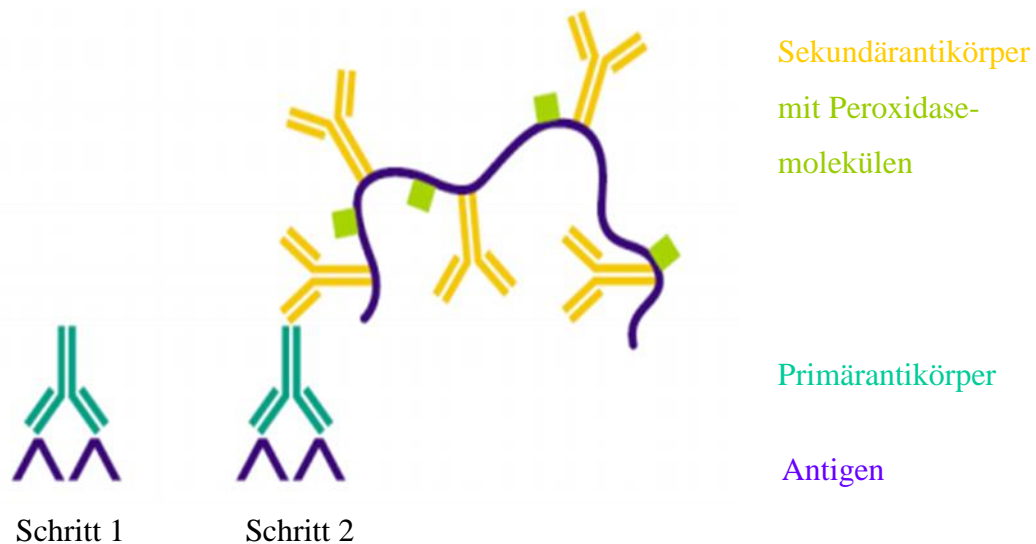


Abbildung 2: EnVision™ -Methode (in Anlehnung an Boenisch et al. 2006)

2.3.4 Immunhistochemische Analyse

2.3.4.1 Wahl der Antikörper und ihrer Konzentrationen

Die Wahl der Antikörper, ihre jeweiligen Verdünnungen, die Inkubationszeiten sowie der jeweilige immunhistochemische Ablauf wurden zuvor in mehreren Versuchsreihen evaluiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Protein	Primär-Antikörper / Ursprung	Verdünnung	Ig-Sub-klasse	Hersteller
AKR1C1	Kaninchen, polyklonaler Antikörper [N1C2]	1:50 in PBS	IgG	GeneTex
AKR1C2	Maus, nonoklonaler Antikörper Clone 1G1	1:100 in PBS	IgG1 Kappa	Abnova
	Sekundär-Antikörper			
	Peroxidase-markiertes Polymer konjugiert an Ziegen-Anti-Kaninchen Immunglobuline in Tris-HCl-Puffer	Gebrauchsfertig, gepufferte Lösung		Dako, Agilent

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

2.3.4.2 Färbeprotokoll

Die zuvor angefertigten Paraffinschnitte der Tissue Micro Array wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, mit Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe dehydriert. Diese Reihe bestand aus 3x Xylol, 3x 100%igem Alkohol, 2x 96%igem Alkohol, 2x 70%igem Alkohol.

Durch die Fixierung von Gewebeproben in Formalin kann es, bei formalinsensitiven Epitopen, zur Veränderung vieler Epitopstrukturen kommen. Dieses als Maskierung eines Epitops bezeichnete Phänomen, entsteht infolge chemischer Quervernetzungen, die sowohl innerhalb (intramolekulare Cross-Links) als auch zwischen verschiedenen Proteinen (intermolekulare Cross-Links) auftreten können.

Ergebnis dieser Maskierung kann sowohl ein partieller als auch ein totaler Verlust der Immunreaktivität sein.

Zur Demaskierung wurden die TMA in 1000mL Citratpuffer, pH 6,0, bei 900 Watt 20 Minuten in einer handelsüblichen Mikrowelle bis nahe dem Siedepunkt erhitzt, anschließend nochmals

20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und 5 Minuten unter mehrfachem Austausch von Leitungswasser gewaschen. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Objektträger in Waschpuffer gesetzt um Färbeartefakte durch Luftsauerstoff auszuschließen.

Das Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität soll eine unspezifische braune Hintergrundfärbung am Ort der Reaktion, die das spätere mikroskopische Auswerten stark erschwert, verhindern. Dazu wurden die TMA in 3%iger Hydroxyperoxid-Lösung (H_2O_2 , Stammlösung 30%ig, 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. oder Methanol) inkubiert. Die Inkubationszeiten können Tabelle 2 entnommen werden. Anschließend wurden die Objektträger wieder unter Leitungswasser ausgewaschen und in Waschpuffer platziert.

Um die Hintergrundfärbungen weiter zu reduzieren, wurden die Schnitte für 20 Minuten einem Anti-Goat-Normalserum (X0907 Dako, Glostrup, Dänemark) in Verdünnung mit PBS (phosphate-buffered-saline) in einer feuchten Kammer ausgesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger auf Zellstofflagen abgeklopft, um noch einen geringen Flüssigkeitsfilm auf dem Gewebe zu garantieren.

Zur Inkubation mit den Antikörpern wurden diese mit PBS auf die gewünschte Konzentration hin angesetzt. Die mit dem Antikörper beschichteten Objektträger (OT) wurden, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten, mit Parafilm bedeckt, in einer feuchten Kammer angeordnet und der ermittelten Inkubationszeit ausgesetzt. Die Inkubationszeit und die Lagerungstemperatur wurden im Vorfeld in verschiedenen Versuchsreihen ermittelt, um ein optimales Färbeergebnis zu erzielen. Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationen werden die OT wiederum abgeklopft und es erfolgt eine Auswaschung mit Waschpuffer.

Zur Inkubation mit der EnVision™-Polymerlösung wurden die Präparate mit N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI), „ready to use“ unverdünnt und direkt aus dem Kit präpariert. Die Inkubation betrug 30 Minuten in der feuchten Kammer.

Nach Beendigung folgten Waschschritte, wobei der Puffer mehrmals verworfen und erneuert werden sollte.

Zur Farbentwicklung wurde bei allen Untersuchungen DAB (3,3-Diaminobenzidin +Chromogen X50, Envision Kit) als Substrat-Chromogen verwendet, das in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist. Das farblose DAB wird unter der Reaktion mit HRP, H_2O_2 und H_2O auf den das gesuchte Protein exprimierenden Zellen in einen braunen Farbton umgewandelt, welcher einen sehr guten Farbkontrast zur nachfolgenden Gegenfärbung des Kernes mit Hämalaun darstellt. Die DAB- Pufferlösung wurde erst kurz vor ihrer Verwendung

mit H₂O₂ versetzt, um ein bestmögliches Färberesultat zu erzielen. Die Inkubationszeit lag bei 2 Minuten. Nach der Farbentwicklung wurden die Präparate zur Beendigung der Färbereaktion gut mit Leitungswasser gespült.

Nach der 10-minütigen Inkubation mit DAB folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 5 min. Mit dieser Methode werden die nicht-spezifisch gefärbten Gewebeareale in einer anderen Farbe (blau) kenntlich gemacht. Vor dem Gebrauch wurde die Lösung durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schill GmbH) gegeben, um eventuell vorhandene ungelöste Farbkomplexe zu entfernen. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Präparate so lange mit Leitungswasser gewaschen, bis keine Farbwolken mehr aufstiegen. Die entstehende Blaufärbung wurde durch das "Bläuen" der Schnitte unter einem schwachen Wasserstrahl für mindestens 30 Minuten intensiviert.

Unter aufsteigender Alkoholreihe (2x 70%, 2x 96%, 3x100%, 3x Xylol) wurden die Präparate unter mehrmaligem Ein- und Austauschen dehydriert und im letzten Xylolbad für 2 Minuten belassen. Die mit Eukitt (Kindler) abgedeckten Schnitte wurden über Nacht unter dem Abzug belassen.

Um eine unspezifische Färbereaktion auszuschließen, wurde jede Färbereihe mit zwei Negativkontrollen versehen. Diese durchliefen dieselbe Prozedur, jedoch ohne die Applikation des Primärantikörpers.

Färbeschritt	AKR1C1	AKR1C2
Blocken der endogenen Peroxidase Inkubationszeit (min)	30	20
Background-Reduce Verdünnung (mit PBS)	1:5	1:10
Primärer Antikörper Verdünnung (mit PBS) Inkubationszeit (min)	1:50 30 bei 20°C	1:100 über Nacht bei 4°C

Tabelle 2: Verdünnungen und Inkubationszeiten der jeweiligen Antikörper

2.3.5 Auswertung der Immunhistochemie

Die angefärbten, d.h. die Protein exprimierenden Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop (Axioskop, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Es wurde eine 40-fache Vergrößerung gewählt. Die Auswertung eines jeden Spots erfolgte anhand der Auszählung von jeweils 100 Fibroblasten und Tumorzellen und wurde von zwei unabhängigen Untersuchern vorgenommen und im Nachhinein verglichen. Die Auswertung wurde tabellarisch festgehalten.

Proteinexpression

Es wurden sowohl der Anteil der Expression der Proteine als auch die Expressionsintensität in Stromafibroblasten und Tumorzellen ermittelt. Die Proportion des Stromas bildete die nächste zu untersuchende Einheit. Dazu wurde der prozentuale Anteil des Stromas am Gesamt-TMA-Spot ermittelt. Die Unterteilung erfolgte gemäß folgender Skala: 1= 0 bis 10%, 2= bis 20%, 3= bis 30%, 4= bis 40%, 5= bis 50%, 6= bis 60%, 7= bis 70%, 8= bis 80%, 9= bis 90%, 10= bis 100%.

Die Proteinexpression in den Stromafibroblasten und den Tumorzellen wurde anhand des Scores nach DC Allred (Harvey et al. 1999) kategorisiert. Der Allred-Score wird über die Messung des Anteils gefärbter (positiver) Zellkerne in Prozent (Proportion Score, PS, gezählt auf einer Skala von 0-5), addiert mit der Intensität der Färbung (Intensity Score, IS, gezählt auf einer Skala von 0-3), ermittelt (Tabelle 3). Der somit maximal erreichbare, addierte Score (TS) beträgt 8.

Allred-Score (AS) (Harvey et al. 1999)		
Prozentsatz positive Zellkerne	Färbeintensität	Score
Keine positiven Zellkerne: 0 Punkte	keine Farbreaktion: 0 Punkte	0-8 Punkte
< 1 % positive Zellkerne: 1 Punkt	schwache Färbereaktion: 1 Punkt	
1–10 % positive Zellkerne: 2 Punkte	mäßige Färbereaktion: 2 Punkte	
11-33 % positive Zellkerne: 3 Punkte	starke Färbereaktion: 3 Punkte	
34-66 % positive Zellkerne: 4 Punkte		
> 66 % positive Zellkerne: 5 Punkte		

Tabelle 3: Kategorisierung und Auswertung des Allred-Scores

Zellreichtum

Darüber hinaus wurde das Zellreichtum des Stromas untersucht. Kategorisiert wurde in folgenden 3 Abstufungen: 1 = zellarm, 2 = mittel, 3 = zellreich. Das Zellreichtum beinhaltet nicht nur die Fibroblasten, sondern auch weitere Zellarten wie die Lymphozyten, Endothelzellen oder Makrophagen.

Lymphangiogenese

Das lymphozytäre Infiltrat wurde sowohl im Stroma als auch im Tumorgewebe selbst beurteilt. Das Auftreten von Infiltrat wurde ab einer Anzahl von >5 Lymphozyten festgelegt. Wiederum gab es 3 Abstufungen: 0 = keines, 1= gering, 2= deutlich/ausgeprägt.

2.3.6 Statistische Auswertung

Das Alter wurde für den Zeitpunkt der Erstdiagnose berechnet. Die beiden zu einem Patienten gehörenden TMA-Spots wurden bei kontinuierlichen Messungen zu einem Mittelwert und bei kategorialen Variablen zu einem Maximalwert zusammengefasst. Mögliche Zusammenhänge der klinisch-histologischen Parameter wurden mittels Kendalls Rangkorrelationstest beurteilt. Es wurden Subgruppenanalysen bezüglich des Hormonrezeptorstatus durchgeführt. In Fällen, in denen eine der Variablen dichotom war, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Überprüfung der Signifikanz verwendet. Alle Signifikanz-Tests wurden, soweit angegeben, zweiseitig durchgeführt. Allgemein erfolgt die Darstellung der Signifikanz mit Angabe des p-Wertes. Als signifikant werden Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ bzw. $\leq 5\%$ angenommen.

Des Weiteren wurden Kaplan-Meier-Analysen sowohl für das Gesamtüberleben als auch das krankheitsfreie Überleben durchgeführt, ausgewertet und graphisch dargestellt. Als primäre Endpunkte hinsichtlich des Überlebens wurden zum einen das krankheitsfreie oder rezidivfreie Überleben („Disease free survival“, beschreibt als ungünstigstes Ereignis bzw. Event das Wiederauftreten der Tumorerkrankung und/oder Fernmetastasen) und zum anderen das Gesamtüberleben („Overall survival“, beschreibt als ungünstigstes Ereignis bzw. Event den Tod) gewählt. Auch hier wurden Subgruppenanalysen bezüglich der Tumorcharakteristika durchgeführt.

Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mithilfe des Log-Rank-Tests statistisch verglichen. Zusätzlich wurden Cox-Regressionen zur Überlebenszeitanalyse eingesetzt, um gleichzeitig den Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable zu untersuchen (Ziegler et al., 2007). Alle statistischen Berechnungen wurden mit R-Statistics, Version 3.0.0, durchgeführt (R Development Core Team, 2014).

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika

Die Stichprobe umfasste Daten von insgesamt 504 Patientinnen im Alter zwischen 24 und 91 Jahren bei Erstdiagnose, mit einem Altersgipfel zwischen 55 und 60 Jahren. Die Verteilung des Tumorstadiums innerhalb der Stichprobe wird in Abbildung 3 wiedergegeben. Die Mehrzahl der Tumoren befand sich dabei im Stadium T1 a-c (61% der Patientinnen).

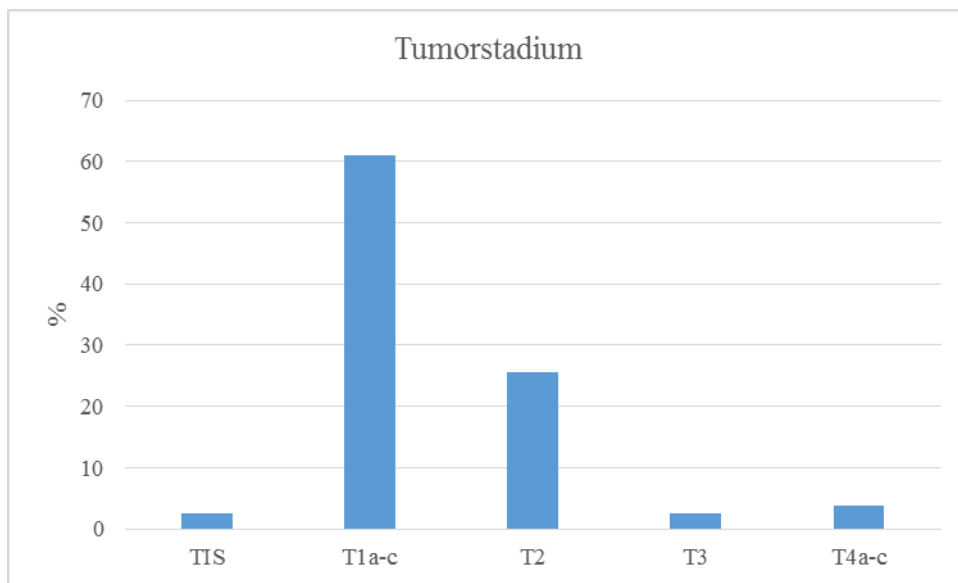


Abbildung 3: Tumorstadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Die Mehrzahl der Tumoren (61%) zeigten sich mäßig differenziert (G2), 24% galten als schlecht differenziert (G3) und 8% als gut differenziert (G1). Bei 1% der Patientinnen war ein CLIS, bei 4% ein DCIS diagnostiziert worden, 14% waren dem Subtyp invasiv lobulär, 72% dem Subtyp invasiv duktal und 1% dem Subtyp invasiv tubulär zuzuordnen (Abb. 4). In 48% der Fälle lag ein peri- oder intratumorales DCIS vor.

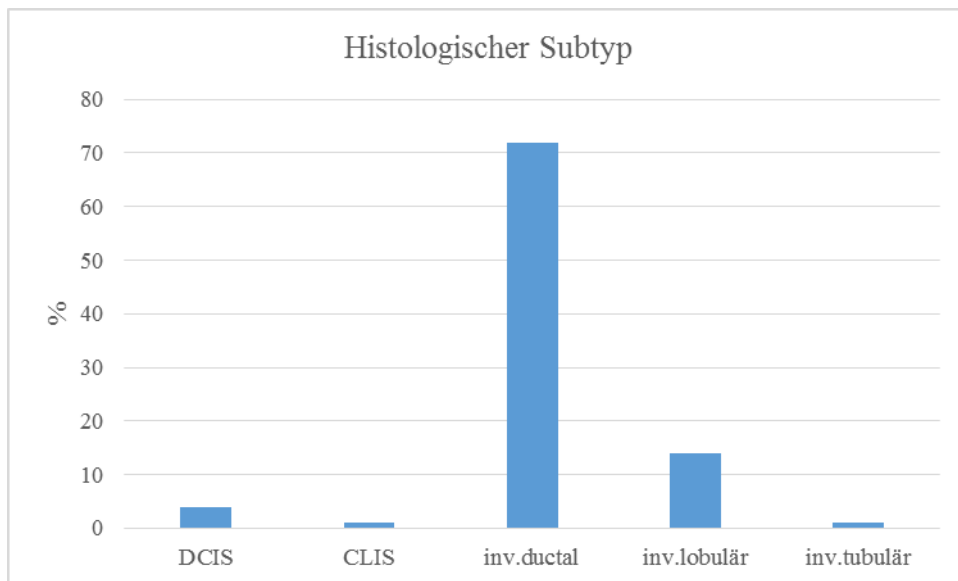


Abbildung 4: Verteilung der histologischen Subtypen der Tumoren

34% der Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einen Lymphknotenbefall. 94% der Patientinnen wiesen nach der Therapie keinen Residualtumor auf (R0). Bei 36% der Patientinnen wurde eine Invasion des Lymphgefäßsystems diagnostiziert, bei 3% ein Einbruch in das Venensystem und bei 4% Fernmetastasen. Des Weiteren wurde der Hormonrezeptor-/HER2/neu-Status ermittelt: 76% der Tumoren waren ER-positiv und 35% PR-positiv, 46% der Tumoren waren HER2/neu-negativ, 14% HER2/neu positiv und 13% 2fach-positiv (Abb. 5).

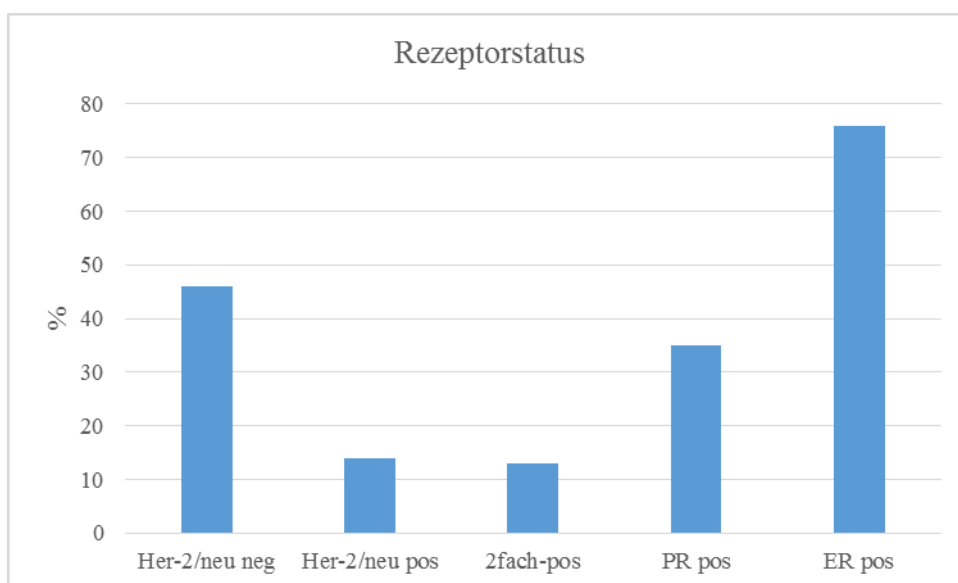


Abbildung 5: Hormonrezeptor-/HER2/neu-Status der Tumoren

87% der Patientinnen erhielten eine Radiotherapie, 43% eine Chemotherapie (davon 57 (11,3%) eine neoadjuvante Chemotherapie). 72% wurden einer endokrinen Therapie unterzogen. 18% der Patientinnen verstarben im Zeitraum der Datenaufnahme.

3.2 Markerexpression in den Tumorproben

Von 504 Tumorproben, die zu Beginn der Untersuchung zur Verfügung standen, waren nach der immunhistochemischen Anfärbung 386 Proben (76,6%) aufgrund von Materialverlusten verwertbar. Die Expression der stromalen Marker zeigte sich überwiegend im Zytoplasma und war dabei stärker im Stroma als im Tumorgewebe nachzuweisen, wie in Abbildung 6 zu erkennen ist. So wiesen mehr als 90% der stromalen Fibroblasten eine positive Expression der beiden Marker AKR1C1 und AKR1C2 auf. Die Expression von AKR1C1 und AKR1C2 in den Fibroblasten und Tumorzellen korrelierte dabei signifikant (beide $p < 0,001$).

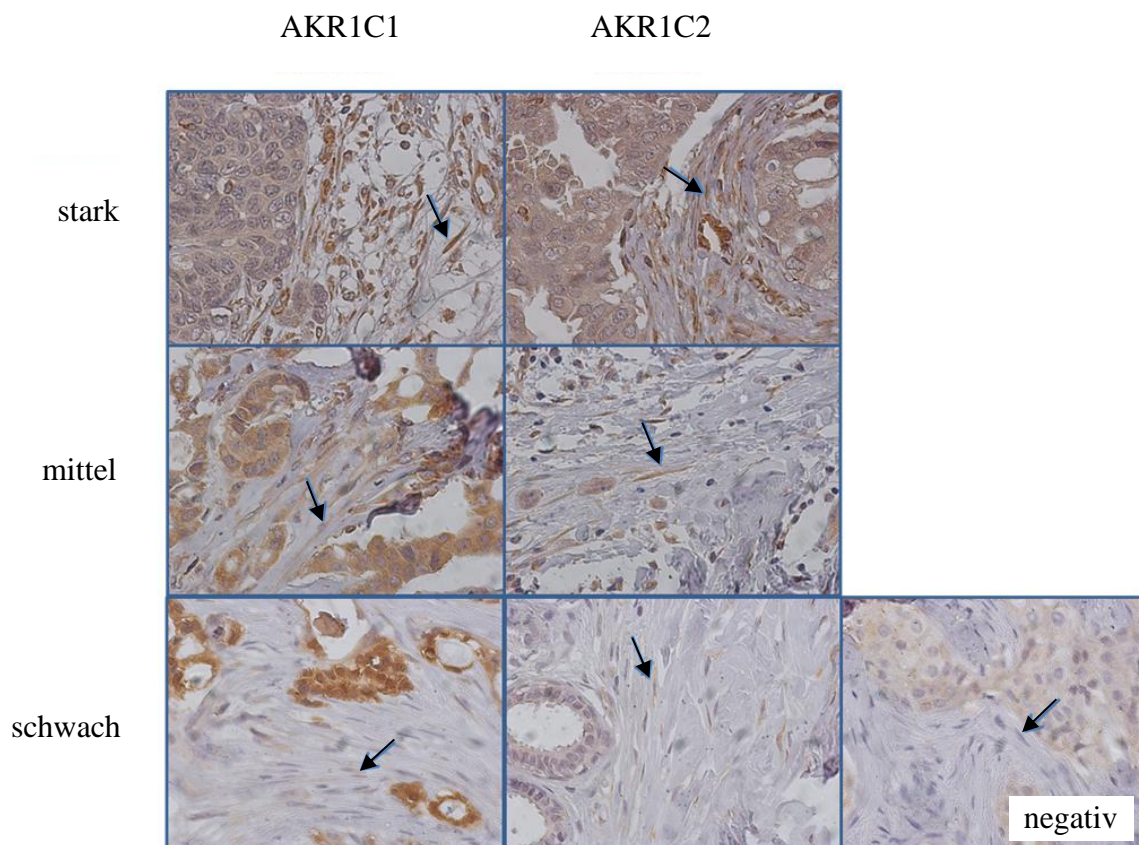


Abbildung 6: Repräsentative Darstellung der immunhistochemischen Färbung von AKR1C1 und AKR1C2 und ihrer stromalen und tumoralen Expression. Mit Pfeilen sind jeweils Fibroblasten mit starker, mittlerer, schwacher und negativer Färbeintensität gekennzeichnet.

3.3 Morphologische Charakteristika des Tumorstromas

Bei der morphologischen Charakterisierung wurden Korrelationen zwischen Tumorstroma und den Tumorcharakteristika Tumorstadium, Nodalstatus, Grading, histologischer Subtyp, R-, L- und M-Status, V-Status und Rezeptorstatus (Östrogen und Progesteron, HER2/neu) überprüft. Des Weiteren wurden die Tumorcharakteristika mit dem Zellreichtum des Stromas und dem lymphozytären Infiltrat abgeglichen.

Ein hoher Stromaanteil im Gesamt-TMA-Spot korrelierte signifikant mit einem günstigen Grading ($p < 0,01$), mit dem lobulären Subtyp ($p = 0,01$), geringer Tumorgröße ($p < 0,01$) sowie mit einem positiven Östrogenrezeptorstatus ($p < 0,01$). Eine hohe Zelldichte stromaler Zellen in einem TMA war signifikant mit geringer Tumorgröße ($p < 0,01$), lobulärem Subtyp ($p < 0,01$) und Überleben bis zum letzten Follow-Up-Termin assoziiert ($p = 0,024$).

Eine signifikante Korrelation wurde zudem zwischen einem ausgeprägten lymphozytären Infiltrat und einem hohen Tumorstadium ($p = 0,039$), einem negativen ER-Status ($p = 0,044$) und der Abwesenheit von Metastasen ($p = 0,035$) gefunden.

3.4 Zusammenhang der stromalen und tumoralen Markerexpression mit klinisch-pathologischen Parametern

Die Expression der Antikörper AKR1C1 und AKR1C2 wurde anhand der Allred-Scores definiert. Tabelle 8 (Anhang) gibt einen Überblick über die Korrelationen der Allred-Scores mit den folgenden klinisch-pathologischen Merkmalen: Tumorstadium, Grading, histologischer Subtyp, Lymphknotenbefall, Veneninvasion (V-Status), Fernmetastasen (M-Status), Residualtumor (R-Status), Hormonrezeptorstatus ER, PR und HER2/neu sowie Alter bei Erstdiagnose.

Eine starke Expression von AKR1C1 in den *Stromafibroblasten* war signifikant mit niedrigem Tumorstadium ($p = 0,012$), negativem Lymphknotenbefall ($p = 0,002$), dem duktalem Subtyp ($p = 0,009$), V0-Status ($p = 0,042$) und R0-Status ($p = 0,044$) korreliert. Bezüglich des Alters und des Hormonrezeptor-/HER2/neu-Status konnte keine statistische Korrelation der AKR1C1-Expression gefunden werden.

Die AKR1C1-Expression in den *Tumorzellen* korrelierte signifikant positiv mit jungem Alter ($p = 0,026$), kleiner Tumorgröße ($p = 0,011$) und der Abwesenheit von Fernmetastasen ($p = 0,049$). Keine Korrelationen ergaben sich hingegen für den histologischen Subtyp und den Hormonrezeptor-/HER2/neu-Status.

Bei AKR1C2 war eine hohe Expression des Markers in den *stromalen Fibroblasten* signifikant mit einem Alter unter 50 Jahren ($p=0,036$), kleiner TumorgroÙe ($p<0,001$), negativem Lymphknotenstatus ($p=0,014$), sowie nicht vorhandener Lymphgefäßinvasion ($p=0,026$) und der Abwesenheit von Fernmetastasen ($p=0,029$) assoziiert.

Eine hohe Expression von AKR1C2 in den Tumorzellen korrelierte dagegen signifikant mit hohem Alter ($p=0,036$), aber ebenfalls mit niedrigem Tumorstadium ($p<0,001$). Weitere positive Korrelationen gab es bezüglich des duktalem Subtyps ($p=0,015$), des L0-Status ($p=0,007$) und einem pTis ($p=0,004$). Auch hier war keine Korrelation zwischen der AKR1C2-Expression und dem Hormonrezeptor-/HER2/neu-Status nachweisbar.

3.5 Survival Analysen

3.5.1 Gesamtüberleben: Expression in Stromafibroblasten

Die Kaplan-Meier-Analyse ergab für AKR1C1 keinen nachweislichen, d.h. signifikanten, Zusammenhang zwischen den Allred-Scores der Expression im Stroma und dem Gesamtüberleben. Dagegen resultierte für AKR1C2 eine signifikant positive Korrelation der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit mit der Expression dieses Proteins in stromalen Fibroblasten ($p=0,001$). Weitere statistisch signifikante Korrelationen hinsichtlich der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit ergaben sich für eine hohe Anzahl an stromalen Zellen ($p=0,008$), ein deutliches lymphozytäres Infiltrat ($p=0,046$) sowie weiterhin – jedoch nur für AKR1C2 – für einen hohen Anteil an übrigen Stromazellen ($p=0,030$) und eine hohe Färbeintensität ($p=0,020$) (Tab. 4).

Die Subgruppenanalyse, ebenfalls in Tabelle 4 dargestellt, ergab sowohl bei ER-positiven als auch bei PR-positiven Karzinomen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von AKR1C1 oder AKR1C2 in stromalen Fibroblasten und dem Gesamtüberleben. Bei ER-negativen Tumoren wurde für die AKR1C1-Expression in Fibroblasten keine Korrelation mit dem Überleben gefunden, jedoch stieg die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit signifikant mit höheren AKR1C2-Expressionen ($p=0,037$). In der Subgruppe der PR-negativen Karzinome ging eine verstärkte AKR1C2-Expression in stromalen Fibroblasten signifikant mit einer höheren Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,005$) einher.

	AKR1C1	AKR1C2
Allred-Score Stroma-Fibroblasten 0 vs 2-4 vs 5-8	n=352; p=0,186	n=369; p=0,001
Allred-Score Tumorzellen 0 vs 2-4 vs 5-8	n=353; p=0,006	n=370; p=0,003
Zellreichtum Arm vs mittel vs reich	n=372; p=0,008	
Lymphozytäres Infiltrat 0 vs gering vs deutlich	n=353; p=0,0461	
Stromazellen Anteil 0 vs 1 vs 2	n=357; p=0,059	n=371; p=0,030
Stromazellen Färbeintensität 0 vs 1	n=357; p=0,065	n=371; p=0,020
Subgruppenanalyse	AKR1C1	AKR1C2
Stromafibroblasten		
Allred-Score ER-positive Tumoren	p=0,146	p=0,057
Allred-Score ER-negative Tumoren	p=0,689	p=0,037
Allred-Score PR-positive Tumoren	p=0,237	p=0,303
Allred-Score PR-negative Tumoren	p=0,543	p=0,005
Tumorzellen		
Allred-Score ER-positive Tumoren	p=0,074	p=0,0016
Allred-Score ER-negative Tumoren	p<0,001	p=0,262
Allred-Score PR-positive Tumoren	p=0,323	p=0,002
Allred-Score PR-negative Tumoren	p<0,001	p=0,083

Tabelle 4: Kaplan-Meier-Analyse Overall survival - Univariate Analyse

In Abbildung 7 sind die Überlebenszeitanalysen bezogen auf die Allred-Scores der Proteinexpression in den Stromalen Fibroblasten des Gesamtkollektivs graphisch dargestellt. Während die AKR1C2-Expression (p=0,001) in Fibroblasten das Gesamtüberleben signifikant begünstigte, hohe Allred-Scores von 5-8 demnach stark mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit korrelierten, ergab sich für die AKR1C1-Expression kein nachweisbarer Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben.

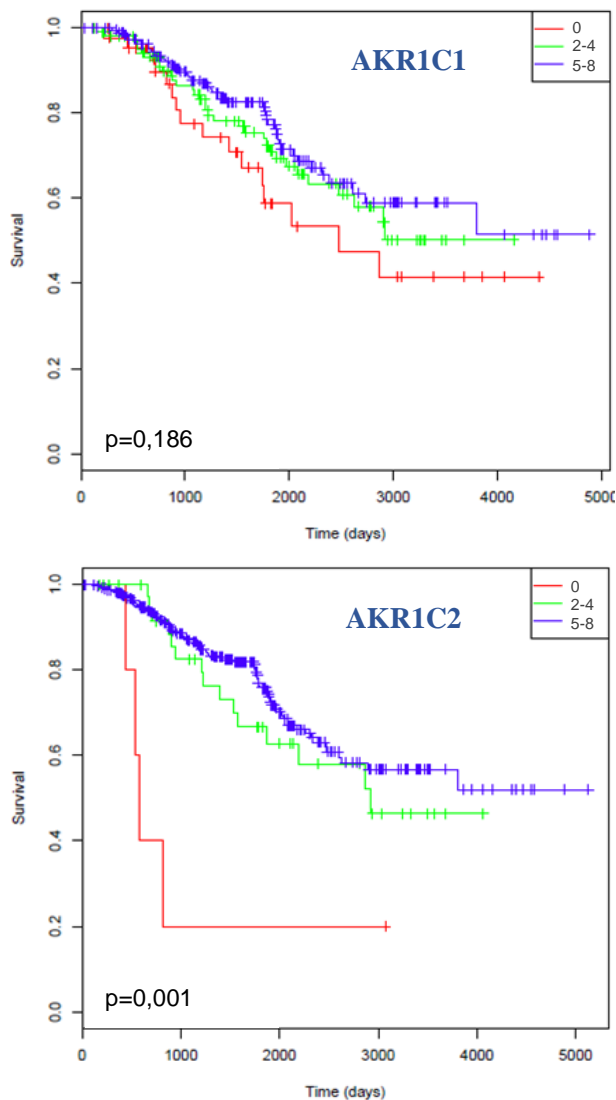


Abbildung 7: Überlebenszeitanalyse (OS) in Abhängigkeit der Allred-Scores der Proteinexpression (AKR1C1/AKR1C2) in Stromalen Fibroblasten

In der multivariaten Analyse zeigte sich keine der beiden Markerexpressionen in Stromafibroblasten statistisch nachweislich als Prognoseparameter geeignet.

3.5.2 Gesamtüberleben: Expression in Tumorzellen

Bezogen auf die Expression in den Tumorzellen stieg die Überlebenswahrscheinlichkeit mit steigender Expression sowohl von AKR1C1 ($p=0,006$) als auch von AKR1C2 ($p=0,003$) (Tab. 4).

Die Subgruppenanalyse ergab eine Korrelation zwischen positivem ER-Status und längerem Gesamtüberleben nur für AKR1C2. Für ER-negative Tumoren korrelierte die AKR1C1-Ex-

pression in Tumorzellen signifikant invers ($p < 0,001$) mit dem Gesamtüberleben. In der Gruppe der PR-positiven Patientinnen wurden höhere Überlebenswahrscheinlichkeiten bei höheren AKR1C2-Expressionen in Tumorzellen signifikant deutlich ($p = 0,002$). Keine Zusammenhänge zwischen der Marker-Expression und der Überlebenswahrscheinlichkeit wurden bei PR-negativen Karzinomen gefunden.

Abbildung 8 gibt die Überlebenszeitanalysen für die Expression in Tumorzellen graphisch wieder. Bezogen auf die Expression in den Tumorzellen gingen hohe Allred-Scores zwischen 5 und 8 der AKR1C1- ($p = 0,006$) und AKR1C2-Expression ($p = 0,003$) signifikant mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit einher. In der multivariaten Analyse erwies sich allein die AKR1C1-Expression in Tumorzellen signifikant als prognostisch hinsichtlich des Gesamtüberlebens ($p = 0,028$).

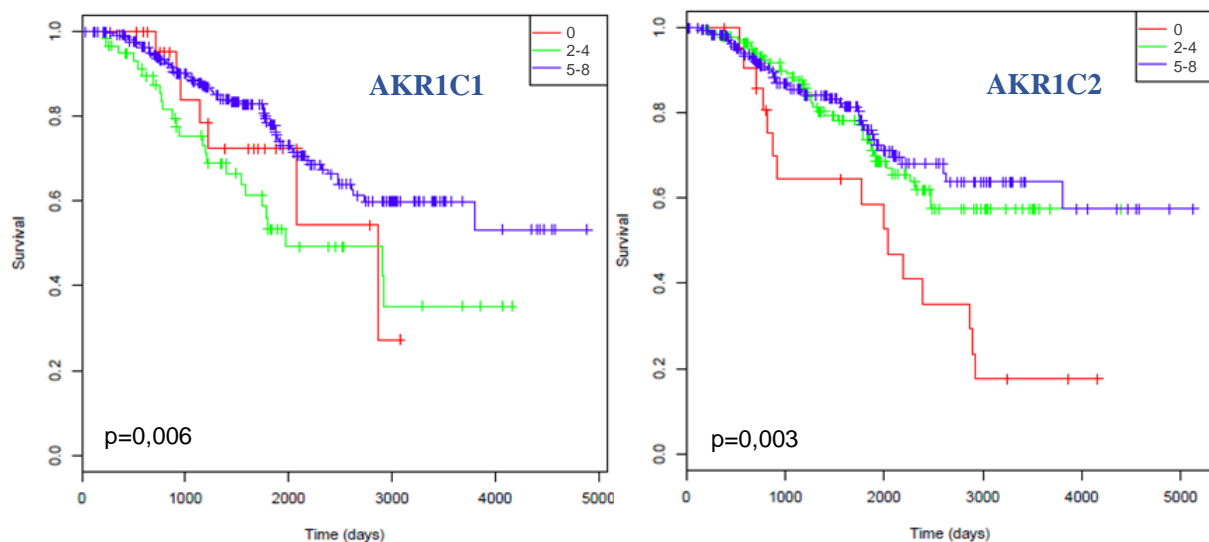


Abbildung 8: Überlebenszeitanalyse (OS) in Abhängigkeit der Allred-Scores der Proteinexpression (AKR1C1/AKR1C2) in Tumorzellen

3.5.3 Krankheitsfreies Überleben: Expression in Stromafibroblasten

Die univariate Kaplan-Meier-Analyse der krankheitsfreien Überlebenswahrscheinlichkeit (DSF) wird in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt.

Bezogen auf die Expression in *Stromafibroblasten* resultierte für AKR1C1 kein statistisch nachweisbarer Zusammenhang zwischen der Proteinexpression und dem krankheitsfreien

Überleben. Hingegen wurde für die Expression von AKR1C2 eine signifikant positive Korrelation der Allred-Scores mit höherer Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens nachgewiesen ($p=0,034$). Für AKR1C1 ergab sich ferner ein signifikanter Zusammenhang des DSF zu Anteil ($p=0,013$) und Intensität ($p<0,001$) der Proteinexpression in den übrigen Stromazellen. Ebenfalls waren Zellreichtum ($p=0,021$) und ein geringes lymphozytäres Infiltrat ($p=0,003$) mit einer längeren krankheitsfreien Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert.

Die Subgruppenanalyse ergab keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den stromalen AKR1C1- und AKR1C2-Expressionen und dem krankheitsfreien Überleben in den Untergruppen (Tab. 5).

	AKR1C1	AKR1C2
Allred-Score StromaFibroblasten 0 vs 2-4 vs 5-8	n=347; p=0,201	n=365; p=0,034
Allred-Score Tumorzellen 0 vs 2-4 vs 5-8	n=348; p=0,007	n=366; p<0,001
Proportion Stroma [%] 10-35 vs 40-70 vs 75-100	n=350; p=0,754	n=369; p=0,801
Zellreichtum	n=350; p=0,0207	
Lymphozytäres Infiltrat	n=348; p=0,00312	
Stromazellen Anteil 0 vs 1 vs 2	n=352; p=0,0126	n=367; p=0,0565
Stromazellen Intensität 0 vs 1	n=352; p<0,001	n=367; p=0,0794
Subgruppenanalyse	AKR1C1	AKR1C2
Stromafibroblasten		
Allred-Score ER-positive Tumoren	p=0,14	p=0,368
Allred-Score ER-negative Tumoren	p=0,613	p=0,255
Allred-Score PR-positive Tumoren	p=0,144	p=0,665
Allred-Score PR-negative Tumoren	p=0,906	p=0,0781
Tumorzellen		
Allred-Score ER-positive Tumoren	p=0,04	p<0,001
Allred-Score ER-negative Tumoren	p=0,004	p=0,383
Allred-Score PR-positive Tumoren	p=0,15	p<0,001
Allred-Score PR-negative Tumoren	p<0,001	p=0,13

Tabelle 5: Kaplan-Meier-Analyse Disease-free survival - Univariate Analyse

Abbildung 9 stellt die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analyse in Bezug auf die Korrelation der Allred-Scores der Expressionen des Gesamtkollektivs in Stromafibroblasten mit dem krankheitsfreien Überleben dar.

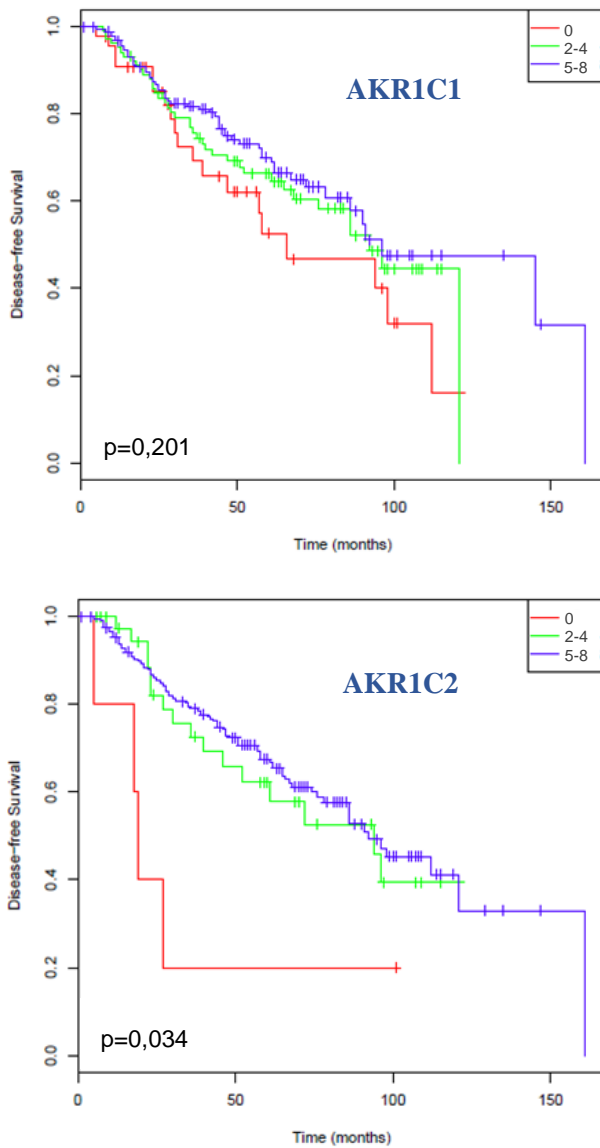


Abbildung 9: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (DFS) in Abhängigkeit der Allred-Scores der Proteinexpression (AKR1C1/AKR1C2) in Fibroblasten

3.5.4 Krankheitsfreies Überleben: Expression in Tumorzellen

Bei der Expression der Proteine in *Tumorzellen* korrelierten die Allred-Scores von AKR1C1 ($p=0,007$) und AKR1C2 ($p<0,01$) signifikant mit dem krankheitsfreien Überleben. In der Subgruppenanalyse, die ebenfalls Tabelle 5 zu entnehmen ist, resultierte bei ER-positiven Tumoren

sowohl für die AKR1C1-Expression als auch die AKR1C2-Expression in Tumorzellen ein starker positiver, signifikanter statistischer Zusammenhang mit dem krankheitsfreien Überleben ($p=0,04$ für AKR1C1; $p<0,001$ für AKR1C2). Eine statistische Assoziation zu kürzerem krankheitsfreien Überleben wurde hinsichtlich der AKR1C1-Expression in Tumorzellen sowohl bei ER-negativen als auch bei PR-negativen Tumoren nachgewiesen: Demnach gingen erhöhte Expressionen signifikant mit einem kürzeren DFS einher ($p=0,004$ bzw. $p<0,001$).

In Bezug auf PR-positiven Tumorzellen hing eine erhöhte AKR1C2-Expression signifikant positiv mit längerem krankheitsfreien Überleben ($p<0,001$) zusammen.

In Abbildung 10 sind die Korrelationen der Allred-Scores in Bezug auf die Proteinexpression in Tumorzellen mit dem krankheitsfreien Überleben graphisch dargestellt.

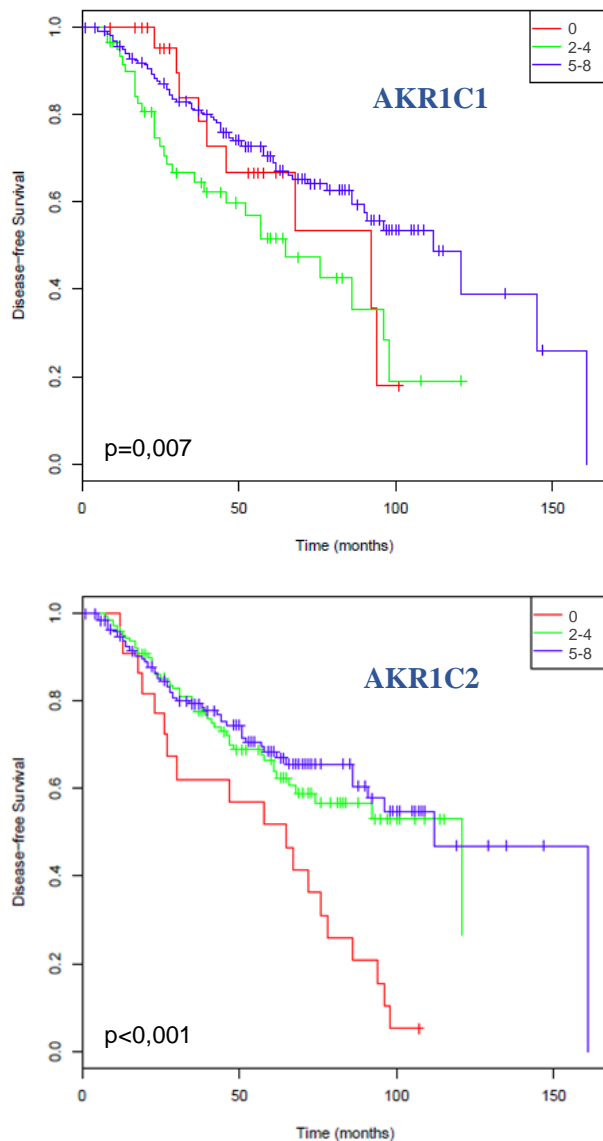


Abbildung 10: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens (DFS) in Abhängigkeit der Allred-Scores der Proteinexpression (AKR1C1/AKR1C2) in Tumorzellen

Insgesamt erwiesen sich in der multivariaten Analyse der Lymphknotenstatus ($p=0,001$), die Tumorgröße ($p=0,002$), der Progesteronrezeptorstatus und der HER2/neu-Status ($p=0,021$) sowie die AKR1C1-Expression in Tumorzellen ($p=0,028$) signifikant als unabhängige prognostische Marker sowohl für das Gesamt- als auch das krankheitsfreie Überleben.

4 Diskussion

4.1 Tumormarker-Expression in Relation zur Tumor-Morphologie

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten zeigen, dass die Expression der beiden Aldo-Keto-Reduktasen AKR1C1 und AKR1C2 in stromalen Fibroblasten und in Tumorzellen beim Mammakarzinom mit günstigen Tumoreigenschaften, einem jüngeren Patientinnenalter bei der Erstdiagnose und einem längeren Gesamtüberleben zusammenhängt. Während histologische Analysen der Tumor-Morphologie bereits seit Jahren Standard sind, wird der Morphologie des Stromas bisher wenig Beachtung beigemessen. Grundsätzlich werden mit steigendem Interesse die stromalen Expressionsprofile analysiert, jedoch werden histologische Untersuchungen des tumorumgebenden Gewebes, die in Zusammenhang mit dem kanzerogenen Geschehen gebracht werden, noch selten angewandt. Die wenigen, aber aufschlussreichen Publikationen, welche die Analyse des Stromas thematisieren, offenbaren Zusammenhänge zwischen Stroma- und Tumorcharakteristik, die auf eine wichtige wechselseitige Beeinflussung hinweisen (Yuen et al. 2007; Toullec et al. 2010; Acs et al. 2012; Sun et al. 2014; Huo et al. 2015; Maritz et al. 2017).

Daher wurden den Analysen dieser Arbeit auch weitere morphologische Charakteristika des Stromas mit einbezogen. Es ergab sich, dass ein hoher Stroma-Anteil ebenso wie eine hohe absolute Anzahl stromaler Zellen mit günstigen Tumoreigenschaften assoziiert ist. Ein hoher Stroma-Anteil wurde darüber hinaus auch bei positivem ER-Status gefunden. Dieses Ergebnis bezüglich ER-positiver Tumoren wurde von Gabrielson et al. (2016) bestätigt, wobei in jener Studie jedoch Biopsien zur Risikovorsorgeuntersuchung die Grundlage der Untersuchung bildeten.

Eine vergleichbare Assoziation war in der vorliegenden Studie auch bezüglich der Expression in Karzinomzellen zu erkennen. Es konnten jedoch bei der Expression in Karzinomzellen kein Zusammenhang mit dem Hormonrezeptor-Status ermittelt werden, der einer der wichtigsten und bekanntesten prognostischen Marker bei Brustkrebs ist. Es gibt bisher wenige Studien, die sich mit AKR1C1 und AKR1C2 befassen und nur zwei, welche den Hormonrezeptorstatus gleichzeitig betrachten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen dabei in Einklang mit den Arbeiten von Li et al. (2004), wohingegen Wiebe et al. (2013) höhere Reduktase-Aktivitäten in ER- und PR-negativen Zelllinien verglichen mit ER- und PR-positiven Zellen fanden. Ob diese Unterschiede auf unterschiedliche Analysenverfahren zurückzuführen sind, da Wiebe

et al. *in vitro*-Versuche machten, und noch weitere individuelle genetische oder klinische Prädispositionen der Patienten eine Rolle spielten, bleibt zu überprüfen.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation der Markerexpressionen mit günstigen Tumoreigenschaften wurden in dieser Arbeit ergänzt durch die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Expression von AKR1C1 und AKR1C2 und einem längeren Gesamtüberleben sowie krankheitsfreien Überleben. Demnach bestand einerseits eine Korrelation zwischen der Expression von AKR1C2 in stromalen Fibroblasten und einem längeren Gesamt- sowie krankheitsfreien Überleben, andererseits zeigte sich der gleiche Zusammenhang in Bezug auf die Expression beider Enzyme in Karzinomzellen. Diese Zusammenhänge sind kongruent mit den signifikanten Korrelationen der Markerexpressionen mit günstigen Tumoreigenschaften in diesen Gruppen, die gleichzeitig relevante prognostische Marker sind.

Der prognostische und möglicherweise prädiktive Wert tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL in internationalen Studien) wurde insbesondere für triple-negative Karzinome beschrieben, wobei der Basis-TIL-Wert eine Prognostizierung des Erfolgs der Chemotherapie zuzulassen scheint (Denkert et al. 2010; Loi et al. 2014; Ibrahim et al. 2014; Ignatiadis et al. 2018). Die Ermittlung der TIL wurde als Screening-Empfehlung zur Auswahl geeigneter Therapien sowie zur Differenzierung zwischen Subtypen mehrfach bestätigt (Denkert et al. 2010; Dieci et al. 2017 (International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer); Bequiot et al. 2018; Kojima et al. 2018), insbesondere in der kürzlich publizierten großen Studie von Denkert et al. (2018) mit Biopsien von 3771 Patienten. Auch in der vorliegenden Arbeit korrelierte die lymphozytäre Infiltration mit ungünstigen Tumoreigenschaften. Hinsichtlich des Überlebens waren allerdings die Zelldichte in einer Tumorprobe und die lymphozytäre Infiltration mit einem längeren Überleben korreliert.

4.2 Hormonrezeptorstatus

Da die Aldo-Keto-Reduktasen AKR1C1 und AKR1C2 unmittelbar in den Östrogen- und Progesteronmetabolismus eingreifen, liegt die Vermutung nahe, dass der Hormonrezeptorstatus bei der Aktivität sowie der Wirkung der Expressionen eine Rolle spielt. Diese Hypothese wird durch die Publikationen von Tchou et al. (2012) und Shan-Wei et al. (2012) gestützt, worin Hinweise zu Unterschieden in der stromalen Expression in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus dargestellt werden.

Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der beschriebenen Analysen bestätigt. In der vorliegenden Arbeit ging bei positivem ER-Status eine hohe AKR1C2-Expression in Tumorzellen mit längerem Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben einher, wohingegen die stromale Expression bei positivem Hormonrezeptorstatus keine Auswirkungen zu haben schien. Demgegenüber wurde bei negativem Östrogenrezeptorstatus die Tendenz zu kürzerem Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben bei hoher AKR1C1-Expression in den Tumorzellen, aber höhere Überlebenschancen bei verstärkter AKR1C2-Expression in Fibroblasten beobachtet.

Die in der Karzinogenese wesentliche Eigenschaft der AKR1C-Familie ist die Katalyse diverser Reaktionen. Die beschriebenen Ergebnisse spiegeln die Reaktivität der Aldo-Keto-Reduktasen im Progesteron- und Östrogen-Metabolismus wider. Die Tendenz zu kürzeren Überlebenschancen bei gesteigerter AKR1C1-Produktion in ER-negativen Tumoren könnte mit dem Einfluss des AKR1C1 auf Östrogen begründet sein: AKR1C1 erhöht in der Reduktionsreaktion der Östrogene den 17β -Östradiol-Spiegel (Penning et al. 2009). Dieses aktivste Östrogen bindet normalerweise an den ER-Rezeptor, worüber u.a. proapoptische Effekte initiiert werden. Sind jedoch nicht genügend Rezeptorstellen vorhanden, kann freies Östradiol offenbar auch selbst Signaltransduktionswege und Enzyme stimulieren, welche die Tumorzellproliferation anregen (Hu et al. 2008; Selcuklu et al. 2012).

In der Reduktionsreaktion von Progesteron führt die Hochregulierung der Reduktasen zu den inaktiven Steroiden 20α -DHP und insbesondere bei AKR1C2 zu 3α -HP, worüber die zur Tumourprogression notwendige Progesteron-Ausschüttung vermindert wird. Wie Wiebe et al. (2013) zeigen konnte, hemmt 3α -HP die Tumourprogression in ER/PR-negativ-Karzinomen über Einwirkung vorrangig auf 5α -Dihydroprogesteron (5α -P). Die Menge der 20α - und 3α -Metaboliten steigt mit der Höhe der Reduktasen-Aktivität und hemmt im weiteren Verlauf das Tumourwachstum und die Tumourproliferation, in erster Linie über die Hemmung von Sulfatasen und weiteren Tumourproliferationsfördernden Enzymen (Pasqualini et al. 2010). Für diese anti-proliferative Wirkung sind wiederum zahlreiche Membranrezeptoren notwendig (Wiebe et al. 2006).

Damit erklären sich die Befunde, dass Tumoren mit starker Expression von AKR1C1 und AKR1C2 ein niedriges Tumorstadium aufweisen, kein Lymphknotenbefall vorhanden und damit auch ein längeres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben wahrscheinlich ist. Während in ER-negativen Tumoren diese Reduktionsreaktion und die Reaktivität der inaktiven Metaboliten als „Gegenspieler“ zu 5α -P entscheidend sind (Wiebe et al. 2013), sind in ER-

positiven Tumoren zwei Wege der Tumorsuppression möglich: Neben dem steigenden Anteil an inaktiven Progesteronmetaboliten 20α -DHP und 3α DHP durch eine stärkere AKR1C1 und AKR1C2 Markerexpression und den entsprechenden Abbau von Progesteron können intrazellulär auch verminderte Progesteronspiegel erzeugt werden. D.h., in ER-positiven Tumorzellen kann eine niedrige Progesteronkonzentration ebenfalls eine Rolle spielen, da hier der Progesteronrezeptor von Bedeutung ist. Für die Aktivität des Progesteron-Moleküls ist die Bindung an dessen Rezeptor ausschlaggebend. Ein niedriger intrazellulärer Progesteronspiegel ist daher insbesondere bei einem hohen Rezeptorstatus wichtig, um eine tumorhemmende Wirkung zu erzielen. Diese Zusammenhänge erklären damit möglicherweise die Ergebnisse, dass eine hohe AKR1C1- und AKR1C2-Expression in Tumorzellen bei Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus zu einem längeren Überleben führt, als bei Patientinnen der Subgruppe mit negativem Hormonrezeptorstatus, weil das Angebot an freiem Progesteron nicht mehr ausreicht, um über die Bindung an den klassischen nuklearen Rezeptor die Aktivierung der tumorigenen Signalkaskade auszulösen (Daniel et al. 2011).

Die Assoziation zum Progesteronrezeptorstatus, die in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, untermauert diese biochemischen Zusammenhänge: Demnach ist eine verstärkte AKR1C2-Expression in stromalen Fibroblasten mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit in der Subgruppe der Tumoren mit negativem PR-Status assoziiert, während die AKR1C2-Expression in Tumorzellen bei positivem PR-Status mit einem längeren Überleben korreliert.

Diese molekularen Zusammenhänge werden durch weitere wissenschaftliche Arbeiten gestützt. Paulsson et al. (2009) fanden ein vergleichbares Ergebnis bei der Analyse der PDGF- β -Rezeptor-Expression in stromalen Fibroblasten: Auch in ihrer Untersuchung war eine hohe PDGF- β -Rezeptor-Expression in stromalen Fibroblasten mit einem negativen ER-Status assoziiert. Ebenso stellt der Review von Shan-Wei et al. (2012) dar, dass die Expression von Caveolin-1 in CAF mit günstigen Tumoreigenschaften und einem negativen ER-Status einhergeht.

Der Hormonrezeptorstatus wird vielfach diskutiert und insbesondere hinsichtlich einer chemotherapeutischen Prognose untersucht. Dabei wird besondere Forschungsaktivität auf die Frage konzentriert, welche molekularen Mechanismen und Signaltransduktionswege dafür verantwortlich sind, dass zahlreiche Patienten mit ER-positiven Tumoren eine Resistenz gegen Chemotherapien entwickeln (Daniel et al. 2011; Flaque et al. 2013). Der Einfluss des Progesteronrezeptors wird in der internationalen Studienliteratur kontrovers beschrieben. Sowohl proliferationsfördernde als auch -hemmende Effekte werden in Abhängigkeit von Tumorentitäten und -stadium beschrieben. Noch ist offenbar zu wenig nicht nur über die Aktivierungswege des

Rezeptors, sondern auch über Metaboliten und Signalwege bekannt (Flaque et al. 2013). Die bisherigen divergierenden wissenschaftlichen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass weitere Parameter eine Rolle spielen und die Aktivität des Progesteronrezeptors sowie der Progesteronausschüttung multifaktoriell bedingt sind. Dies umfasst nicht nur die bekannten progesteronabhängigen Signalwege, sondern auch verschiedenste Progesteronmetaboliten, welche in der Karzinogenese eine Rolle spielen könnten. Die umfangreiche Kenntnis dieser Zusammenhänge, insbesondere, welche Auslöser für die Expression der Zielenzyme im Progesteronmetabolismus verantwortlich sind, stellen nach wie vor eine große klinische Herausforderung dar, könnten aber bei der Entwicklung geeigneter hormonbasierter Therapieprotokolle von Nutzen sein, um Veränderungen im Progesteronstoffwechsel im Zusammenhang mit Brustkrebs zu verhindern oder umzukehren (Matrisian et al. 2001)

4.3 Die Eignung der stromalen Expression von AKR1C1 und AKR1C2 als prognostische Marker beim Mammakarzinom

Während stromale Fibroblasten eines gesunden Brustgewebes überwiegend Schutzfunktionen ausüben, indem sie wachstumshemmende Enzyme exprimieren, haben stromale Fibroblasten in Tumorumgebung, so genannte cancer associated fibroblasts (CAF), vielfältige proliferationsfördernde Einflüsse auf das Mammakarzinom, wie *in vitro*-Untersuchungen zeigen konnten. Die Korrelation zwischen stromaler Gen- bzw. Proteinexpression und der Tumorprognose ist in den letzten Jahren in den wissenschaftlichen Fokus gerückt und es wurden einige Gene sowie deren Enzyme entdeckt, die in der Karzinogenese eine Rolle zu spielen scheinen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen bisherige internationale Studienergebnisse, nach denen die Expression stromaler Proteine eine wesentliche Rolle in der Tumorbilogie spielt und sich diese Proteine daher zur Einschätzung einer Prognose eignen können, wie es für unterschiedliche Tumorentitäten gezeigt werden konnte (Finak et al. 2008; Sharma et al. 2010; Saadi et al. 2010; Winslow et al. 2016). Zudem gibt es bereits Hinweise, dass die Kenntnis stromaler Genexpression hilfreich bei der Wahl der geeigneten neoadjuvanten Chemotherapie sein kann (Farmer et al. 2009).

Eine Korrelation zur Prognose stellten Finak et al. (2008) beispielweise für ein Set an stromalen Genen dar. Diese Erkenntnisse, ergänzt durch die Arbeiten von Sharma et al. (2010) und Winslow et al. (2016), eröffnen neue Möglichkeiten einer gezielteren Therapie auf Basis der

individuellen stromalen Gen-Signaturen. Im Einzelnen gibt es Hinweise auf prognostische Zusammenhänge der Expression in stromalen Fibroblasten mit der Tumorentwicklung und der Überlebensprognose für Versican beim Mammakarzinom (Ricciardelli et al. 2002), Osteonectin beim Lungenkarzinom (Koukourakis et al. 2003), Podoplanin beispielsweise beim kolorektalen Karzinom und beim invasiven Mammakarzinom (Yamanashi et al. 2009; Schoppmann et al. 2012), DC44 (Kinugasa et al. 2014), diverse stromal-exprimierte Chemokin-Liganden wie CXCL-1 und CXCL-14 beim Mammakarzinom (Zou et al. 2014; Sjöberg et al. 2016) und Asporin, ein weiteres EZM-Protein, beim Mammakarzinom (Maris et al. 2015).

Die meisten dieser Gene bzw. Proteine weisen in Überexpression auf eine schlechte Prognose des Karzinoms hin. Ausnahmen, nach denen eine erhöhte Expression in stromalen Fibroblasten ein längeres Gesamtüberleben bzw. krankheitsfreies Überleben begünstigt, wie dies bei dem hier untersuchten AKR1C2 der Fall ist, stellen bisher nur Caveolin-1 (Shan-Wie et al. 2012) und das Proteoglycan Asporin dar. Diese beiden EZM-Proteine fungieren als Gegenspieler zu TGF- β . Die Funktion von AKR1C1 und AKR1C2 liegt hingegen in der Hemmung des Progesteronrezeptors sowie der Progesteronausschüttung. Die Assoziation zwischen erhöhter AKR1C1- und AKR1C2-Expression in stromalen Fibroblasten mit günstigen Tumoreigenschaften und bei AKR1C2 darüber hinaus mit einem längeren Gesamt- sowie krankheitsfreien Überleben weist auf die Bedeutung des Östrogen- und Progesteronmetabolismus hin und eröffnet Potential dieser Enzyme als prognostische stromale Marker.

Die Aldo-Keto-Reduktasen AKR1C1 und AKR1C2 sind bisher noch wenig untersucht. Auch kann die hier vorgestellte Untersuchung aufgrund der limitierten Tumorproben bisher nur als richtungsweisend gelten. Da sowohl der Östrogen- als auch der Progesteronezeptor in der Genese des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle spielen und der Progesteronmetabolismus ein bisher noch nicht vollständig verstandener Cofaktor in der Karzinogenese ist, kann die Forschung an Aldo-Keto-Reduktasen wie AKR1C1 und AKR1C2 nicht nur neue prognostische Möglichkeiten bringen, sondern auch zu weiterem Verständnis der Einflüsse der Steroidhormon-Metabolismen beitragen. Weitere Studien sollten daher folgen, welche zudem auch die Expression der Progesteronmetaboliten 20 α -DHP und 3 α -DHP einschließen.

In den letzten Jahren wurden für Brustkrebstumorzellen prognostische Genexpressionssignaturen für Tumorzellen etabliert, z.B. Mammaprint® und Oncotype DX® (vgl. Abschnitt 1.2.3.5). Es konnte zudem gezeigt werden, dass das Genexpressionsprofil des Stromaanteils ebenfalls ein prognostischer Faktor bei Brustkrebs ist (Finak et al 2008). Die Ergebnisse der Patientinnen könnten demzufolge durch Stroma-Gensignaturen noch genauer vorhergesagt werden, als

durch die bereits etablierten Gen-Signaturen von Tumorzellen. Darüber hinaus ist die Genexpression im Stromalraum auch ein Prädiktor für eine neoadjuvante Chemotherapie bei Brustkrebs. Die beiden Aldo-Keto-Reduktasen AKR1C1 und AKR1C2, die in dieser Studie als prognostische Faktoren bewertet wurden, könnten aus diesen Gründen wertvolle Indikatoren innerhalb eines prognostischen stromalen Gen-Signaturtests darstellen.

Aufgrund der hohen absoluten Fallzahlen in den TMA und der Datenbank können die Experimente der vorliegenden Arbeit als zuverlässig angesehen werden. Limitierend soll angemerkt werden, dass die Studienkohorte retrospektiv etabliert wurde. Zudem stellen die untersuchten TMA-Spots jeweils nur einen kleinen Teil des Tumors dar.

Es ist darüber hinaus zu berücksichtigen, dass trotz der großen Probengröße der Tumore in dieser Studie die AKR1C1- und AKR1C2-Expressionen in stromalen Fibroblasten keine unabhängigen prognostischen Marker für das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben waren. Weitere Studien zu diesem Thema sollten daher durchgeführt werden, um bezüglich der Eignung der stromalen Expression von AKR1C1 und AKR1C2 als prognostische Marker beim Mammakarzinom weitere wissenschaftliche Erkenntnisse zu erlangen.

5 Zusammenfassung

Wissenschaftliche Erkenntnisse haben gezeigt, dass maligne Tumoren durch die Interaktion zwischen Tumorzellen und dem umgebenden Stroma beeinflusst werden. Demzufolge hat das Tumorstroma einen Einfluss auf das Tumorwachstum und die Tumorprogression, jedoch ist bisher das Wissen über den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus unvollständig. Darüber hinaus ist die Korrelation zwischen stromaler Gen- bzw. Proteinexpression und der Tumorprognose in den letzten Jahren in den wissenschaftlichen Fokus gerückt, und es wurden einige Gene entdeckt, die in der Karzinogenese eine Rolle zu spielen scheinen. Dabei scheinen stromale Genexpressions-Signaturen nicht nur die Tumorausbreitung zu beeinflussen, sondern auch einen prognostischen und prädiktiven Faktor beim primären Mammakarzinom darzustellen.

In vorherigen wissenschaftlichen Arbeiten wurden Gene anhand von Genexpressionsprofilen in ihrer unterschiedlichen Expression in normalen Mammastromafibroblasten gegenüber tumorassoziierten Fibroblasten untersucht. Darauf aufbauend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die zwei Aldo-Keto-Reduktasen AKR1C1 und AKR1C2 aufgrund ihrer Beteiligung am intratumoralen Progesteronstoffwechsel als prognostische Faktoren beim primären Mammakarzinom evaluiert. Zentraler Gegenstand der Untersuchung war die Expression von AKR1C1 und AKR1C2 in Stromafibroblasten und Karzinomzellen und deren Korrelation mit günstigen Tumoreigenschaften und einem längeren Überleben bei primären Brustkrebspatientinnen.

Die Immunhistochemie wurde an eigens hergestellten Gewebemikroarrays aus 504 Kernbiopsien von Patientinnen mit invasivem Brustkrebs zwischen den Jahren 1997 und 2010 durchgeführt, von denen 386 Proben auswertbar waren. Die Daten wurden aus Arztbriefen und Operationsberichten der Universitätsfrauenklinik Kiel zwischen 1997 und 2010 zusammengetragen, durch eine Evaluierung aller histopathologischen Befunde von Mammakarzinomen in der Tumordokumentation der Universitätsfrauenklinik Kiel ergänzt und schließlich in einem Register festgehalten. Mehr als 90% der Tumorproben zeigten eine positive Markerexpression.

Als primäre Endpunkte wurden das krankheitsfreie (DFS) und das Gesamtüberleben (OS) definiert. Darüber hinaus wurden Zusammenhänge zwischen der stromalen und tumoralen Markerexpression und verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern untersucht.

Den Ergebnissen zufolge korreliert die AKR1C1 und AKR1C2 Expression in Fibroblasten und Tumorzellen mit einem jüngeren Patientinnenalter bei der Erstdiagnose sowie mit günstigen

Tumoreigenschaften, wie z.B. einer kleinen TumorgroÙe und einem negativer Lymphknotenstatus. In der univariaten Analyse korrelierte die AKR1C1-Expression in Karzinomzellen positiv mit DFS und OS. Die AKR1C2-Expression in Fibroblasten und Tumorzellen zeigte ebenfalls eine positive Korrelation mit DFS und OS. In der multivariaten Analyse war die AKR1C1-Expression in Karzinomzellen ein unabhängiger prognostischer Marker.

Es ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die unabhängigen regulatorischen Funktionen von AKR1C1 und AKR1C2 im Progesteronstoffwechsel zurückzuführen sind, womit sie die Grundlage für neue hormonbasierte Therapieoptionen für Brustkrebspatientinnen unabhängig vom klassischen Hormonrezeptorstatus darstellen können. Das Verständnis über die Ursachen von Veränderungen in der Expression von Progesteron-Metabolisierungsenzymen könnte bei der Entwicklung von Therapieprotokollen helfen, um Veränderungen im Progesteronstoffwechsel in Zusammenhang mit Brustkrebs zu verhindern oder umzukehren. Aus diesem Grund sollten die Aldo-Keto-Reduktasen AKR1C1 und AKR1C2 und insbesondere ihre Expression in stromalen Fibroblasten sowie in Tumorzellen als prognostische Faktoren beim Mammakarzinom den Gegenstand weiterer zukünftiger Forschungsarbeiten bilden.

6 Literaturverzeichnis

Abe N, Ohtake T, Saito K, Kumamoto K, Sugino T, Takenoshita S. Clinicopathological significance of lymphangiogenesis detected by immunohistochemistry using D2-40 monoclonal antibody in breast cancer. *Fukushima J Med Sci.* 2016 Jun 8;62(1):57-63.

Acs G, Esposito NN, Kiluk J, Loftus L, Laronga C. A mitotically active, cellular tumor stroma and/or inflammatory cells associated with tumor cells may contribute to intermediate or high Oncotype DX Recurrence Scores in low-grade invasive breast carcinomas. *Mod Pathol.* 2012 Apr;25(4):556-66.

Aleskandarany MA, Sonbul SN, Mukherjee A, Rakha EA. Molecular Mechanisms Underlying Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015 Sep;82(3-4):113-23.

Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 483:946-953.

Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Köchli O, Zuber M, Dieterich H, Mross F, Wilber K, Simon R, Sauter G. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8534-40.

Allred DC, Brown P, Medina D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004;6(6):240-5.

Angelucci C, Maulucci G, Lama G, Proietti G, Colabianchi A, Papi M, Maiorana A, De Spirito M, Micera A, Balzamino OB, Di Leone A, Masetti R, Sica G. Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness. *PLoS One.* 2012;7(12):e50804.

Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev.* 2008 Apr;29(2):217-33.

Bahnassy A, Mohanad M, Ismail MF, Shaarawy S, El-Bastawisy A, Zekri AR. Molecular biomarkers for prediction of response to treatment and survival in triple negative breast cancer patients from Egypt. *Exp Mol Pathol.* 2015 Oct;99(2):303-11.

Bane AL, Beck JC, Bleiweiss I, Buys SS, Catalano E, Daly MB, Giles G, et al. BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jan;31(1):121-8.

Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug metabolism reviews*. 2008;40(4):553-624.

Bartlett, JM et al. Comparing Breast Cancer Multiparameter Tests in the OPTIMA Prelim Trial: No Test Is More Equal Than the Others. *J Natl Cancer Inst*. 2016:108(9).

Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A. Heterogeneity of Gene Expression in Stromal Fibroblasts of Human Breast Carcinomas and Normal Breast. *Oncogene*. 2010;29(12):1732-1740.

Boenisch et al. *Immunchemische Färbemethoden*, Dako North America, USA: Inc. Carpinteria 2006:39-40.

Bogina G, Lunardi G, Coati F, Zamboni G, Gori S, Bortesi L, Marconi M, et al. Progesterone receptor status and clinical outcome in breast cancer patients with estrogen receptor-positive locoregional recurrence. *Tumori*. 2015 Jul-Aug;101(4):398-403.

Bono P, Wasenius VM, Heikkilä P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 1;10(21):7144-9.

Casey T, Bond J, Tighe S, Hunter T, Lintault L, Patel O, Eneman J et al. Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Mar;114(1):47-62.

Chan M, Chang MC, González R, Lategan B, del Barco E, Vera-Badillo F et al. Outcomes of Estrogen Receptor Negative and Progesterone Receptor Positive Breast Cancer. *PLoS One*. 2015 Jul 10;10(7):e0132449.

Cirqueira MB, Moreira MA, Soares LR, Cysneiros MA, Vilela MH, Freitas-Junior R. Effect of Ki-67 on Immunohistochemical Classification of Luminal A to Luminal B Subtypes of Breast Carcinoma. *Breast J*. 2015 Sep-Oct;21(5):465-72.

Criscitiello C, Disalvatore D, De Laurentiis M, Gelao L, Fumagalli L, Locatelli M, et al. High Ki-67 score is indicative of a greater benefit from adjuvant chemotherapy when added to endocrine therapy in luminal B HER2 negative and node-positive breast cancer. *Breast*. 2014 Feb;23(1):69-75.

Cutuli B, Velten M, Martin C. Assessment of axillary lymph node involvement in small breast cancer: analysis of 893 cases. *Clin Breast Cancer*. 2001 Apr;2(1):59-65; discussion 66.

Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2011; 6:359-369.

de Roos MA, de Bock GH, de Vries J, van der Vegt B, Wesseling J. p53 overexpression is a predictor of local recurrence after treatment for both in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *J Surg Res*. 2007 Jun 1;140(1):109-14.

Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 1;28(1):105-13.

Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018 Jan;19(1):40-50.

Dieci MV, Radošević-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F et al.; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol*. 2017 Oct 9. pii: S1044-579X(17)30217-1.

Diessner J, Wischnewsky M, Stüber T, Stein R, Krockenberger M, Häusler S, Janni W et al. Evaluation of clinical parameters influencing the development of bone metastasis in breast cancer. *BMC Cancer*. 2016 May 12;16:307.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011 Nov 12;378(9804):1707-16.

Ehinger A, Malmström P, Bendahl PO, Elston CW, Falck AK, Forsare C et al. South and South-East Swedish Breast Cancer Groups. Histological grade provides significant prognostic information in addition to breast cancer subtypes defined according to St Gallen 2013. *Acta Oncol.* 2017 Jan;56(1):68-74.

Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:2405-2426.

Erez N, Glanz S, Raz Y, Avivi C, Barshack I. Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Aug 2;437(3):397-402.

Fakhrjou A, Naghavi-Behzad M, Montazeri V, Karkon-Shayan F, Norouzi-Panahi L, Piri R. The relationship between histologic grades of invasive carcinoma of breast ducts and mast cell infiltration. *South Asian J Cancer.* 2016 Jan-Mar;5(1):5-7.

Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009; 15:68-74.

Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008; 14: 518-527.

Flaque MCD, Galigniana NM, Beguelin W et al. Progesterone receptor assembly of a transcriptional complex along with activator protein 1, signal transducer and activator of transcription 3 and ErbB-2 governs breast cancer growth and predicts response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res* 2013; 15:R118.

Frings O, Augsten M, Tobin NP, Carlson J, Paulsson J, Pena C, Olsson E et al. Prognostic significance in breast cancer of a gene signature capturing stromal PDGF signaling. *Am J Pathol.* 2013 Jun;182(6):2037-47.

Gabrielson M, Chiesa F, Paulsson J, Strell C, Behmer C, Rönnow K et al. Amount of stroma is associated with mammographic density and stromal expression of oestrogen receptor in normal breast tissues. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Jul;158(2):253-61.

Gluz O, Nitz UA, Christgen M, Kates RE, Shak S, Clemens M, Kraemer S et al. West German Study Group Phase III PlanB Trial: First Prospective Outcome Data for the 21-Gene Recurrence Score Assay and Concordance of Prognostic Markers by Central and Local Pathology Assessment. *J Clin Oncol.* 2016 Jul 10;34(20):2341-9.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes - dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol* 2011; 22(8): 1736-1747.

Hadzisejdić I, Mustać E, Jonjić N, Petković M, Grahovac B. Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis. *Mod Pathol*. 2010 Mar;23(3):392-403.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(16):2784-2795.

Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thrombosis and Haemostasis*. 2004, 91 (3): 450-456.

Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep CG et al. Chemo-N 0 Study Group. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 2013 May; 49(8):1825-35.

Harbeck N. Mammakarzinom: Tumorbiologie-basierte Konzepte für operative und medikamentöse Therapie *Dtsch Med Wochenschr* 2013; 1380: 180-182.

Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, Hammond EH et al. American Society of Clinical Oncology. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2016 Apr 1;34(10):1134-50.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:474-1481.

Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V et al. The role of cytochromes p450 and aldo-keto reductases in prognosis of breast carcinoma patients. *Medicine (Baltimore)*. 2014 Dec;93(28):e255.

Huo CW, Chew G, Hill P, Huang D, Ingman W, Hodson L, Brown KA et al. High mammographic density is associated with an increase in stromal collagen and immune cells within the mammary epithelium. *Breast Cancer Res*. 2015 Jun 4;17:79.

Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triplenegative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 148:467–476.

Ignatiadis M, Van den Eynden G, Roberto S, Fornili M, Bareche Y, Desmedt C, Rothé F et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients Receiving Trastuzumab/Pertuzumab-Based Chemotherapy: A TRYPHAENA Substudy. *J Natl Cancer Inst*. 2018 May 18.

Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Hrsg, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. Langversion 4.1, 2018; AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL.

Jonat W, Strauss A, Maass N, Mundhenke C. *Mammakarzinom-Diagnostik und Therapie*, 4. Auflage, Bremen: UNI-MED Verlag AG 2011.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 392-401.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology*. 2006 Oct;119(2):254-64.

Kim HM, Jung WH, Koo JS. Expression of cancer-associated fibroblast related proteins in metastatic breast cancer: an immunohistochemical analysis. *J Transl Med*. 2015 Jul 11;13:222.

Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells* 2014; 32:145-156.

Kirouac DC, Du J, Lahdenranta J, Onsum MD, Nielsen UB, Schoeberl B, McDonagh CF. HER2+ Cancer Cell Dependence on PI3K vs. MAPK Signaling Axes Is Determined by Expression of EGFR, ERBB3 and CDKN1B. *PLoS Comput Biol*. 2016 Apr 1;12(4):e1004827.

Kojima YA, Wang X, Sun H, Compton F, Covinsky M, Zhang S. Reproducible evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) using the recommendations of International TILs Working Group 2014. *Ann Diagn Pathol*. 2018 May 31;35:77-79.

Kolben T, Augustin D, Armbrust R, Kolben TM, Degenhardt T, Burgmann M et al. Impact of guideline-based use of uPA/PAI-1 on patient outcome in intermediate-risk early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Jan;155(1):109-15.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Brekken RA, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, Sage EH. Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5376-80.

Kreienberg R, Möbius V, Jonat W, Kühn T. *Mammakarzinom Interdisziplinär*, 4. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2010.

Lal I, Dittus K, Holmes CE. Platelets, coagulation and fibrinolysis in breast cancer progression. *Breast Cancer Research : BCR*. 2013;15(4):207.

Lauring J, Park BH, Wolff AC. The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013 Jun 1;11(6):670-8.

Lewis MJ, Wiebe JP, Heathcote JG. Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer* 2004; 4:27.

Liu X, Li H, Shao B, Wu J, Kong W, Song G, Jiang H, Wang J, Wan F. Identification of recurrent BRCA1 mutation and its clinical relevance in Chinese Triple-negative breast cancer cohort. *Cancer Med*. 2017 Jan 30.

Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol* 2014; 25:1544-1550.

Maris P, Blomme A, Palacios AP, Costanza B, Bellahcene A, Bianchi E et al. Asporin is a fibroblast-derived TGF- β 1 inhibitor and a tumor suppressor associated with good prognosis in breast cancer. *PLoS Med* 2015; 12:e1001871.

Maritz RM, Michelow PM. Cytological Criteria to Distinguish Phyllodes Tumour of the Breast from Fibroadenoma. *Acta Cytol*. 2017;61(6):418-424.

Mylona E, Nomikos A, Alexandrou P, Giannopoulou I, Keramopoulos A, Nakopou-lou L. Lymphatic and blood vessel morphometry in invasive breast carcinomas: relation with proliferation and VEGF-C and -D proteins expression. *Histol Histopathol*. 2007 Aug;22(8):825-35.

Mylona E, Tzelepis K, Theohari I, Giannopoulou I, Papadimitriou C, Nakopoulou L. Cyclin D1 in invasive breast carcinoma: favourable prognostic significance in unselected patients and within subgroups with an aggressive phenotype. *Histopathology*. 2013 Feb;62(3):472-80.

Niemiec JA, Adamczyk A, Ambicka A, Mucha-Małecka A, M Wysocki W, Ryś J. Triple-negative, basal marker-expressing, and high-grade breast carcinomas are characterized by high lymphatic vessel density and the expression of podoplanin in stromal fibroblasts. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Jan;22(1):10-6.

Nordenskjöld A, Fohlin H, Fornander T, Löfdahl B, Skoog L, Stål O. Progesterone receptor positivity is a predictor of long-term benefit from adjuvant tamoxifen treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Nov;160(2):313-322.

Okada S, Tokunaga E, Kitao H, Akiyoshi S, Yamashita N, Saeki H, Oki E, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. Loss of heterozygosity at BRCA1 locus is significantly associated with aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012 May;19(5):1499-507.

Ono M, Tsuda H, Yoshida M, Shimizu C, Kinoshita T, Tamura K. Prognostic Significance of Progesterone Receptor Expression in Estrogen-Receptor Positive, HER2-Negative, Node-Negative Invasive Breast Cancer With a Low Ki-67 Labeling Index. *Clin Breast Cancer*. 2016 Jun 25. pii: S1526-8209(16)30167-7.

Osuala KO, Sameni M, Shah S, Aggarwal N, Simonait ML, Franco OE, Hong Y et al. Il-6 signaling between ductal carcinoma in situ cells and carcinoma-associated fibroblasts mediates tumor cell growth and migration. *BMC Cancer*. 2015 Aug 13;15:584.

Pang JC, Virani NK, Kidwell KM, Kleer CG. Characterization of type III TGF- β receptor expression in invasive breast carcinomas: a potential new marker and target for triple negative breast cancer. *J Cell Commun Signal*. 2014 Sep;8(3):211-8.

Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, Kim SI, Park BW. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012 Feb;21(1):50-7.

Park CK, Jung WH, Koo JS. Expression of cancer-associated fibroblast-related proteins differs between invasive lobular carcinoma and invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Aug;159(1):55-69.

Pasanen I, Lehtonen S, Sormunen R, Skarp S, Lehtilahti E, Pietilä M et al. Breast cancer carcinoma-associated fibroblasts differ from breast fibroblasts in immunological and extracellular matrix regulating pathways. *Exp Cell Res.* 2016 May 15;344(1):53-66.

Pasqualini JR, Chetrite GS Biological responses of progestogen metabolites in normal and cancerous human breast. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2010 Dec 1;3(3):427-35.

Patani N, Martin LA, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. *Int J Cancer.* 2013 Jul;133(1):1-13.

Paulsson J, Sjöblom T, Micke P, Pontén F, Landberg G, Heldin CH et al. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *Am J Pathol.* 2009 Jul;175(1):334-41.

Penning TM, Byrns MC. Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Feb;1155:33-42.

Penning TM. The Aldo-Keto Reductases (AKRs): Overview. *Chemico-biological interactions.* 2015;234:236-246.

R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich 2014.

Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immune-reactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 1987; 8:138-140.

Reuning U, Magdolen V, Hapke S, Schmitt M. Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol Chem.* 2003, 384: 1119-1131.

Ricciardelli C, Brooks JH, Suwivat S, Sakko AJ, Mayne K, Raymond WA et al. Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002 Apr;8(4):1054-60.

Rižner TL, Penning TM. Role of Aldo-Keto Reductase Family 1 (AKR1) Enzymes in Human Steroid Metabolism. *Steroids.* 2014;79:10.1016/j.steroids.2013.10.012.

Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *Journal of Clinical Oncology* 1993; 11: 2090-2100.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM & Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14: 320-368.

Saadi A, Shannon NB, Lao-Sirieix P, O'Donovan M, Walker E, Clemons NJ et al. Stromal genes discriminate preinvasive from invasive disease, predict outcome, and highlight inflammatory pathways in digestive cancers. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 2177-2182.

Sadlonova A, Bowe DB, Novak Z, Mukherjee S, Duncan VE, Page GP, Frost AR. Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron.* 2009 Dec;2(1):9-21.

Salmen J, Neugebauer J, Fasching PA, Haeberle L, Huober J, Wöckel A et al. Pooled analysis of the prognostic relevance of progesterone receptor status in five German cohort studies. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Nov;148(1):143-51.

Scherbakov AM, Krasil'nikov MA, Kushlinskii NE. Molecular mechanisms of hormone resistance of breast cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2013 Jul;155(3):384-95.

Schmutzler RK, Bierhoff E, Werkhausen T, Fimmers R, Speiser P, Kubista E et al. Genomic deletions in the BRCA1, BRCA2 and TP53 regions associate with low expression of the estrogen receptor in sporadic breast carcinoma. *Int J Cancer.* 1997 Jun 20;74(3):322-5.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182, 311-322.

Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M et al; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Prognostic value of lymphangiogenesis and lympho-vascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg.* 2004 Aug;240(2):306-12.

Schoppmann SF, Berghoff A, Dinhof C, Jakesz R, Gnant M, Dubsy P et al. Podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts are associated with poor prognosis in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jul;134(1):237-44.

Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a

study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER Program. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Aug;138(8):1048-52.

Shan-Wei W, Kan-Lun X, Shu-Qin R, Li-Li Z, Li-Rong C. Overexpression of caveolin-1 in cancer-associated fibroblasts predicts good outcome in breast cancer. *Breast Care (Basel)*. 2012 Dec;7(6):477-83.

Sharma M, Beck AH, Webster JA, Espinosa I, Montgomery K, Varma S et al. Analysis of stromal signatures in the tumor microenvironment of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123: 397-404.

Sinn P, Aulmann S, Wirtz R, Schott S, Marmé F, Varga Z, Lebeau A, Kreipe H, Schneeweiss A. Multigene Assays for Classification, Prognosis, and Prediction in Breast Cancer: A Critical Review on the Background and Clinical Utility. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. Band 73, Nummer 9, September 2013, ISSN 0016-5751: 932-940.

Sjöberg E, Augsten M, Bergh J, Jirstrom K, Östman A. Expression of the chemokine CXCL14 in the tumour stroma is an independent marker of survival in breast cancer. *Br J Cancer*. 2016 May 10;114(10):1117-24.

Stein, RC et al. OPTIMA prelim: a randomised feasibility study of personalised care in the treatment of women with early breast cancer. *Health Technol Assess*, 2016. 20(10): 23-29, 1-201.

Sun X, Sandhu R, Figueroa JD, Gierach GL, Sherman ME, Troester MA. Benign breast tissue composition in breast cancer patients: association with risk factors, clinical variables, and gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Dec;23(12):2810-8.

Tchou J, Kossenkov AV, Chang L, Satija C, Herlyn M, Showe LC, Puré E. Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Med Genomics*. 2012 Sep 6;5:39.

Thomas C, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Sep;26(9):467-76.

Tiezzi DG, Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Zola FE, Marana HR, Tiezzi MG. HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer*. 2007; 7:36.

Toullec A, Gerald D, Despouy G, Bourachot B, Cardon M, Lefort S, Richardson M, et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med.* 2010 Jun;2(6):211-30.

Tripsianis G, Papadopoulou E, Romanidis K, Katotomichelakis M, Anagnostopoulos K et al. Overall survival and clinicopathological characteristics of patients with breast cancer in relation to the expression pattern of HER-2, IL-6, TNF- α and TGF- β 1. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(11):6813-20.

Untch M, Harbeck N, Huober J, von Minckwitz G, Gerber B, Kreipe HH, Liedtke C et al. Primary Therapy of Patients with Early Breast Cancer: Evidence, Controversies, Consensus: Opinions of German Specialists to the 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015 (Vienna 2015). *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2015 Jun;75(6):556-565.

Vitolo D, Ciocci L, Cicerone E, Rossi C, Tiboni F, Ferrauti P, Gallo A, Baroni CD. Laminin alpha2 chain (merosin M chain) distribution and VEGF, FGF(2), and TGFbeta1 gene expression in angiogenesis of supraglottic, lung, and breast carcinomas. *J Pathol.* 2001 Sep;195(2):197-208.

von Minckwitz G, Untch M, Nuesch E, Loibl S, Kaufmann M, Kummel S, Fasching PA et al. Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Research and Treatment* 2011; 125(1):145-156.

Wang K, Wu F, Seo BR, Fischbach C, Chen W, Hsu L, Gourdon D. Breast cancer cells alter the dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions. *Matrix Biol.* 2017 Jul;60-61:86-95.

Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, Jeschke U, Dimpfl T, Mayr D et al. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jul;122(1):27-34.

Welcsh PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):705-13.

WHO. Breast cancer: prevention and control. <http://www.who.int/cancer/detection/breast-cancer/en/index1.html>, Zugriff am 01.06.2018.

WHO and International Agency for Research on Cancer (IARC). Cancer today. <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>. Zugriff am 20.07.2017.

Wiebe JP. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:717-738.

Wiebe JP, Zhang G, Welch I, Cadieux-Pitre HA. Progesterone metabolites regulate induction, growth, and suppression of estrogen- and progesterone receptor-negative human breast cell tumors. *Breast Cancer Res.* 2013 May 11;15(3):R38.

Winslow S, Lindquist KE, Edsjö A, Larsson C. The expression pattern of matrix-producing tumor stroma is of prognostic importance in breast cancer. *BMC Cancer.* 2016 Nov 4;16(1):841.

Wishart GC, Rakha E, Green A, Ellis I, Ali HR, Provenzano E, Blows FM, Caldas C, Pharoah PD. Inclusion of KI67 significantly improves performance of the PREDICT prognostication and prediction model for early breast cancer. *BMC Cancer.* 2014 Dec 3;14:908.

Worthington J, Bertani M, Chan HL, Gerrits B, Timms JF. Transcriptional profiling of ErbB signalling in mammary luminal epithelial cells--interplay of ErbB and IGF1 signalling through IGFBP3 regulation. *BMC Cancer.* 2010 Sep 14;10:490.

Xu JW, Li QQ, Tao LL, Cheng YY, Yu J, Chen Q, Liu XP, Xu ZD. Involvement of EGFR in the promotion of malignant properties in multidrug resistant breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2011 Dec;39(6):1501-9.

Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y et al. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology.* 2009;77(1):53-62.

Yang SY, Aisimutula D, Li HF, Hu Y, Du X, Li J, Luan MX. Mutational analysis of BRCA1/2 gene and pathologic characteristics from Kazakh population with sporadic breast cancer in northwestern China. *Genet Mol Res.* 2015 Oct 27;14(4):13151-61.

Yuen S, Uematsu T, Kasami M, Tanaka K, Kimura K, Sanuki J, Uchida Y, Furukawa H Breast carcinomas with strong high-signal intensity on T2-weighted MR images: pathological characteristics and differential diagnosis. *J Magn Reson Imaging.* 2007 Mar;25(3):502-10.

Zavadova E, Vocka M, Spacek J, Konopasek B, Fucikova T, Petruzelka L. Cellular and humoral immunodeficiency in breast cancer patients resistant to hormone therapy. *Neoplasma.* 2014;61(1):90-8.

Ziegler A, Lange S, Bender R. Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2007; 132: e36-e38.

Zou A, Lambert D, Yeh H, Yasukawa K, Behbod F, Fan F, Cheng N. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- β signaling proteins. *BMC Cancer.* 2014 Oct 24;14:781.

7 Anhang

Bezeichnung	Bedeutung
pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ (duktal und lobulär)
pT1	Maximaler Tumordurchmesser von 2,0cm
pT1mic	Mikroinvasion von 0,1cm oder weniger
pT1a	> 0,1-0,5cm
pT1b	> 0,5-1,0cm
pT1c	> 1,0-2,0cm
pT2	> 2,0-5,0cm
pT3	> 5,0cm
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand und Haut
pT4a	Mit Ausdehnung auf die Brustwand (Rippen, Interkostalmuskulatur oder vorderer Serratusmuskel, nicht auf Pektoralismuskulatur)
pT4b	Mit Ödem (einschließlich Apfelsinhaut) oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut derselben Brust
pT4c	Beide Kriterien von pT4a und pT4b gemeinsam
pT4d	Inflammatorisches Mammakarzinom
pN	Regionäre Lymphknoten
pNX	Keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1mi	Mikrometastasen(> 0,2mm und/oder mehr als 200 Tumorzellen, aber nicht größer als 0,2cm)
pN1	Metastasen in 1-3 ipsilateralen Lymphknoten und/oder mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. mammaria interna
pN1a	1-3 axilläre Lymphknotenmetastasen, mindestens eine > 2mm
pN1b	Mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pN1c	pN1a und pN1b
pN2	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknoten
pN2a	Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten darunter mindestens einer > 2mm
pN2b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen wie nachfolgend beschrieben
pN3a	Metastasen in >10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (wenigstens eine < 2mm) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten

pN3b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Lymphknotenmetastasen in mehr als 2 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Untersuchung des/der Sentinel-Lymphknoten(s), aber nicht klinisch erkennbar
pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraclaviculären Lymphknoten
pM	Fernmetastasen
pMX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 6: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (UICC2010) (Kreienberg et al. 2010).

Stadium	T-Status	N-Status	M-Status
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1mic, T1	N0	M0
Stadium IIA	T0	N1	M0
	T1mic, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0	N2	M0
	T1mic, T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1; N2	M0
Stadium IIIB	T4	Jedes N	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 7: Stadiengruppierung des Mammakarzinoms nach UICC-Kriterien (Kreienberg et al. 2010)

Kli- nik+ Mor- pholo- gie	Stromafibroblasten							Tumorzellen								
	AKRIC1 (Allred-Score) %			p- Wert	AKRIC2 (Allred-Score) %			p- Wert	AKRIC1 (Allred-Score) %			p- Wert	AKRIC2 (Allred-Score) %			p- Wert
	0	2-4	5-8		0	2-4	5-8		0	2-4	5-8		0	2-4	5-8	
Alter bei Erstdiagnose (n=488)																
< 50	14,4	29,9	55,7	0,548	1	12,2	86,7	0,036	9,3	11,3	79,4	0,026	2,1	41,2	56,7	0,246
> 50	12,2	31,4	56,5		1,5	10,3	88,2		6,2	19,5	74,2		7,3	38,8	53,8	
Tumorgröße (n=20)																
T1	0	40	60	0,012	0	33,3	66,7	<0,001	0	0	100	0,011	0	33,3	66,7	<0,001
T2/3	0	22,2	77,8		0	11,1	88,9		0	11,1	88,9		0	44,4	55,6	
Lymphknotenstatus (n=476)																
positiv	14,3	39,7	46	0,002	2,3	13	84,7	0,014	7,9	21,4	70,6	0,124	6,8	51,5	41,7	3,254
negativ	12,3	26	61,6		0,4	8,8	90,8		6,8	15	78,2		4,8	33,3	61,8	
Grading (n=475)																
G1/2	14,1	32,2	53,7	0,582	0,8	11,5	87,7	0,752	7,4	17,6	75	0,526	5,3	39,5	55,1	0,145
G3	9,3	30,2	60,5		3,1	10,4	86,5		5,8	17,4	76,7		7,4	40	52,6	
Histologischer Subtyp (n=480)																
duktal	11,8	33,1	55,1	0,009	1,6	11,1	87,3	0,169	7,1	16,8	76,1	1,495	6	38,2	55,8	0,015
lobular	20,8	16,7	62,5		0	8,9	91,1		8,3	20,8	70,8		6,7	48,9	44,4	
V-Status (n=181)																
V0	15,8	28,1	56,1	0,042	0	7,4	92,6	0,816	7,9	15,8	76,3	0,01	2,4	31,7	65,9	0,817
V1	0	0	100		0	0	100		0	0	100		0	40	60	
L-Status (n=244)																
L0	16	28	56	0,357	0	7,4	92,6	0,026	8	16	76	0,912	1,8	30,3	67,9	0,007
L1	11,4	40	48,6		2,8	9,7	87,5		7,1	20	72,9		8,3	40,3	51,4	
M-Status (n=447)																
M0	11,5	32,2	56,2	0,452	0,6	10,1	89,3	0,029	7,5	14,8	77,7	0,049	4,4	38,7	56,9	0,276
M1	15,4	30,8	53,8		7,1	28,6	64,3		15,4	30,8	53,8		14,3	35,7	50	
Resektionsstatus (n=467)																
R0	11,5	30,4	58	0,044	1,5	9,7	88,8	0,431	7,4	16,3	76,3	0,447	5,4	40,5	54,1	0,88
R1	19,2	42,3	38,5		0	17,4	82,6		7,7	19,2	73,1		13	21,7	65,2	

ER Status (n=481)																
positiv	13,7	30,2	56,1	0,725	1,1	11,4	87,5	0,615	8,7	16,7	74,5	0,366	6,2	41,6	52,2	0,698
negativ	9,4	34,1	56,5		1,1	8,7	90,2		2,4	20	77,6		5,5	34,1	60,4	
PR Status (n=482)																
positiv	12,2	31,1	56,8	0,707	0,9	11,1	88,1	0,816	8,1	17,6	74,3	0,516	5,3	41,7	53,1	0,627
negativ	12,7	31	56,3		1,4	10,1	88,5		5,5	16,5	78		6,5	37	56,5	
HER2/neu Status (n=366)																
positiv	10,5	33,7	55,8	0,754	1	10,8	88,2	0,477	8,4	20	71,6	0,599	4,9	39,2	55,9	0,458
negativ	13,9	27,8	58,2		0	7,5	92,5		8,9	16,5	74,7		1,2	41,7	57,1	
Peritumoral DCIS (n=416)																
ja	9	28,3	62,8	0,129	0,0	9,7	90,3	0,301	6,8	11,6	81,5	0,069	3,2	36,8	60	0,004
nein	15,1	32,9	52		1,9	10,1	88,1		7,2	21,7	71,1		7,5	41,6	50,9	
Lokoregional Rezidiv (n=450)																
ja	12,5	30	57,5	0,9	1,2	9,3	89,5	0,295	2,5	19,8	77,8	0,328	8,1	40,7	51,2	0,075
nein	11,5	32,1	56,4		0,8	10,8	88,4		8,2	15,2	76,5		3,2	39,6	57,2	
Fernmetastasen (n=420)																
ja	14,9	23,4	61,7	0,655	2,1	14,6	83,3	0,105	6,4	21,3	72,3	0,447	10,4	31,2	58,3	0,529
nein	11,6	29,5	59		0,4	9,2	90,5		6,3	14,7	79		1,9	40,3	57,8	
Simultantumor (n=488)																
ja	27,3	27,3	45,5	0,524	0	9,1	90,9	0,259	36,4	9,1	54,5	0,143	18,2	27,3	54,4	0,955
nein	12,3	31,1	56,6		1,4	10,9	87,7		6,1	17,5	76,3		5,6	39,8	54,6	

Tabelle 8: Zusammenhang der Allred-Scores der Expressionen von AKR1C1 und AKR1C2 in Stromalen Fibroblasten und Tumorzellen mit histopathologischen Parametern

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Jonat danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Universitätsfrauenklinik Kiel durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau PD Dr. med. Maret Bauer, für die wissenschaftlichen Vorarbeiten, die die Grundlage meiner Arbeit bildeten, die vielen fachkundigen Ratschläge und die Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit.

Frau Dr. med. Antonia Wenners danke ich für die gute Betreuung und Unterstützung.

Herrn Dipl. Math. Arne Jochens danke ich für die Beratung und die Durchführung der statistischen Analysen.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Klapper (Institut für Allgemeine Pathologie Kiel) möchte ich für die wertvolle Hilfestellung in allen immunhistochemischen und histologischen Fragen danken, Frau Olivera Batic für die Unterstützung bei der Erstellung der Tissue Micro Arrays.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen MTAs, Mitarbeitern und Doktorandenkollegen des onkologischen Labors 1 und 2 für ein stets angenehmes und kollegiales Zusammenarbeiten. Insbesondere gilt mein Dank dabei Frau Sigrid Hamann, die mir die Technik immunhistochemischer Färbungen beibrachte und mich mit vielerlei Ideen bei der Etablierung des Antikörpers unterstützte und beriet. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit, du gibst den jungen Doktoranden dort die nötige Wärme.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Freundin, Rike Bergmann, für ihre unglaublich hilfreiche Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Motivation bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Das letzte Dankeswort gilt meiner Familie, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichte und mich immer konsequent auf rücksichtsvolle Weise ermutigte.

Meiner Familie widme ich diese Arbeit.