

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

**Charakterisierung stromaler Faktoren beim Mammakarzinom von  
BRCA1- und BRCA2- Mutationsträgerinnen im Vergleich zum  
sporadischen Mammakarzinom**

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

vorgelegt von  
**Christina Richter**  
aus Luckenwalde

**Kiel 2020**

1. Berichterstatterin: PD Dr. med. Maret Bauer,  
Frauenpraxis, Ostufer, Kiel
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Susanne Sebens,  
Institut für Experimentelle Tumorforschung

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.07.2021

gez.: Priv.-Doz. Dr. André Farrokh  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Für meine Eltern  
Cordula und Jens Richter

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XVI
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das invasive Mammakarzinom . . . . .	3
1.1.1 Epidemiologie . . . . .	3
1.1.2 Ätiologie . . . . .	4
1.1.3 BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen . . . . .	6
1.1.4 Forschungsgeschichte der Pathogenese des Mammakarzinoms . . . . .	10
1.1.5 Klassifikation des Mammakarzinoms . . . . .	12
1.2 Komposition und Funktion des Stromas beim Mammakarzinom . . . . .	15
1.2.1 Die Rolle des Stromas in der physiologischen Brust und beim Mammakarzinom . . . . .	15
1.2.2 Aussehen der Fibroblasten . . . . .	16
1.2.3 Aktivierung und Funktion der Tumor-assoziierten Fibroblasten . . . . .	17
1.2.4 Herkunft der Tumor-assoziierten Fibroblasten . . . . .	18
1.3 Hintergrund zu den untersuchten Proteinen . . . . .	20
1.3.1 ST6GALNAC5 . . . . .	20
1.3.2 GATA-3 . . . . .	20
1.3.3 AKR1C1 und AKR1C2 . . . . .	21
1.3.4 WISP1 . . . . .	22
1.3.5 KLF4 . . . . .	23
1.3.6 TGF $\beta$ 2 . . . . .	25
1.3.7 GALNT3 . . . . .	25
1.4 Ziele der Arbeit . . . . .	27



<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	Material . . . . .	30
2.1.1	Tumorkollektiv . . . . .	30
2.1.2	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Substanzen, Primärantikörper, selbst hergestellte Lösungen . . . . .	31
2.2	Methoden . . . . .	37
2.2.1	Anfertigung von Gewebeschnitten . . . . .	37
2.2.2	Immunhistochemische Färbung - Prinzip und Methodik . . . . .	37
2.2.3	Erarbeitung von Färbeprotokollen der einzelnen Antikörper . . . . .	40
2.2.4	Immunhistochemische Färbungen mit dem Färbeautomat . . . . .	41
2.3	Auswertung . . . . .	42
2.3.1	Histologische Auswertung . . . . .	42
2.3.2	Statistische Auswertung . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Morphologische Untersuchungen . . . . .	46
3.1.1	Analyse der Stromaproportion . . . . .	46
3.1.2	Analyse des Verteilungsmusters des Stromas . . . . .	47
3.1.3	Analyse des Zellreichtums des Stromas . . . . .	48
3.1.4	Analyse des lymphozytären Infiltrates des Stromas . . . . .	49
3.2	Immunhistochemische Färbung mit ST6GALNAC5 . . . . .	51
3.2.1	Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten . . . . .	51
3.2.2	Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen . . . . .	52
3.2.3	Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten . . . . .	54
3.3	Immunhistochemische Färbung mit GATA-3 . . . . .	56
3.3.1	Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten . . . . .	56
3.3.2	Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen . . . . .	57
3.3.3	Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten . . . . .	59
3.4	Immunhistochemische Färbung mit AKR1C1 . . . . .	61

3.4.1	Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten . . . . .	61
3.4.2	Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen . . . . .	62
3.4.3	Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten . . .	64
3.5	Immunhistochemische Färbung mit AKR1C2 . . . . .	66
3.5.1	Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten . . . . .	66
3.5.2	Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen . . . . .	67
3.5.3	Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten . . .	69
3.6	Immunhistochemische Färbung mit WISP1 . . . . .	71
3.6.1	Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten . . . . .	71
3.6.2	Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen . . . . .	72
3.6.3	Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten . . .	74
3.7	Immunhistochemische Färbung mit KLF4 . . . . .	75
3.7.1	Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten . . . . .	75
3.7.2	Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen . . . . .	76
3.7.3	Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten . . .	78
3.8	Immunhistochemische Färbung mit TGF $\beta$ 2 . . . . .	80
3.8.1	Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten . . . . .	80
3.8.2	Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen . . . . .	81
3.8.3	Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten . . .	83
3.9	Immunhistochemische Färbung mit GALNT3 . . . . .	85
3.9.1	Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten . . . . .	85
3.9.2	Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen . . . . .	86
3.9.3	Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten . . .	88
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1	Diskussion über Material und Methoden . . . . .	92
4.1.1	Diskussion zur Methodik und Studiendesign . . . . .	92
4.1.2	Diskussion zum Patientengut, patientenbezogene Daten und Daten- erfassung . . . . .	92
4.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	94

4.2.1	Diskussion der morphologischen Auswertung der untersuchten Kollektive . . . . .	94
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit ST6GALNAC5 . . . . .	100
4.2.3	Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit GATA-3 . . . . .	102
4.2.4	Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit AKR1C1 und AKR1C2 . . . . .	105
4.2.5	Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit WISP1 . . . . .	108
4.2.6	Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit KLF4 . . . . .	111
4.2.7	Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit TGF $\beta$ 2 . . . . .	114
4.2.8	Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit GALNT3 . . . . .	117
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung</b>	<b>164</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>166</b>

# Abkürzungsverzeichnis

**Aqua dest.** Aqua destilata, Destilliertes Wasser

**AKR1C1** aldo-keto reductase family 1 member C1

**AKR1C2** aldo-keto reductase family 1 member C2

**AR** Androgenrezeptor

**BHS** Blut-Hirn-Schranke

**BMC** bone marrow derived cell, aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzelle

**BRCA1** BReast CAncer 1, Brustkrebsgen 1

**BRCA2** BReast CAncer 2, Brustkrebsgen 2

**BRCAm** BRCA1-/BRCA2-Mutation

**BSA** bovine serum albumin

**bzw.** beziehungsweise

**CUP-Syndrome** Carcinoma with unknown primary tumor, Krebs bei unbekanntem Primärtumor

**°C** Grad Celsius

**CTGF** connective tissue growth factor, Bindegewebe-Wachstumsfaktoren

<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin
<b>DAPI</b>	4'-6'-Diamidin-2-phenylindol
<b>DCIS</b>	Duktales Carcinoma in situ
<b>DFS</b>	Disease free survival, fernmetastasenfreies Überleben/krankheitsfreies Überleben
<b>DNA</b>	Desoxy Ribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
<b>DPBS</b>	Dulbecco's phosphate-buffered saline
<b>DYRK2</b>	dual-spezifische Tyrosin-Phosphorylierung-Kinase 2
<b>ECM</b>	extracellular matrix, extrazelluläre Matrix
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EFS</b>	Event free survival, ereignisfreies Überleben
<b>EGF</b>	epidermal growth factor, Epidermale Wachstumsfaktor
<b>EMT</b>	epithelial to mesenchymal transition, Epithelialer-mesenchyaler Übergang
<b>EndMT</b>	endothelial to mesenchymal transition, Endotheliale-mesenchmaler Übergang
<b>ER</b>	Östrogen-Rezeptor
<b>et al.</b>	et alii
<b>FAP</b>	fibroblast activation protein alpha, Fibroblasten-Aktivierungsprotein alpha
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor
<b>g</b>	Gramm
<b>GALNT3</b>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3
<b>GATA-3</b>	GATA Binding Protein 3

<b>h</b>	Stunde(n)
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HGF</b>	hepatocyte growth factor, Hepatozyten-Wachstumsfaktor
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HR</b>	Hormon Rezeptor
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>IGF2</b>	insulin-like growth factor 2, insulinähnlicher Wachstumsfaktor Typ 2
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>IL6</b>	Interleukin 6/ Interferon, beta 2
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KI67</b>	Ki67-Antigen
<b>KLF4</b>	Kruppel-like factor 4
<b>K1</b>	Kohorte 1, BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen
<b>K2</b>	Kohorte 2, Patientinnen mit einem sporadischen Mammakarzinom
<b>LCIS</b>	Lobuläres Carcinoma in situ
<b>m</b>	milli-
<b>M</b>	Konzentration (Mol pro Liter, mol/l)
<b>MC</b>	Mammakarzinom
<b>MAPK</b>	mitogenaktivierten Proteinkinase
<b>ml</b>	Milliliter (10 <sup>-3</sup> l)
<b>μl</b>	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> l)

<b>mg</b>	Milligramm ( $10^{-3}$ g)
<b>Min.</b>	Minute
<b>MMPs</b>	Matrixmetallo-Proteinasen
<b>NF</b>	Normalgewebe-assoziierte Fibroblasten, aus histologisch normalem Gewebe eines Tumor-befallenden Organs Prozent, Anteil (1/100)
<b>NGF</b>	Nerve Growth Factor, Nervenwachstumsfaktor
<b>NST</b>	Invasive carcinoma of no special type, kein spezieller Typ des invasiven Mammakarzinoms
<b>OS</b>	Overall survival, Gesamtüberleben
<b>p</b>	Statistische Signifikanz
<b>PARP</b>	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
<b>PARBi</b>	Poly(ADP-ribose)-Polymerase-Inhibitor, Poly(ADP-ribose)-Polymerase-Hemmer
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PDGF</b>	platelet-derived growth factor
<b>PFS</b>	Progression free survival, progressionsfreies Überleben
<b>PR</b>	Progesteron-Rezeptor
<b>RT-PCR</b>	Realtime-Polymerase Chain Reaction, Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	alpha-smooth muscle actin
<b>s/sec</b>	Sekunden
<b>ST6GALNAC5</b>	ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5
<b>TAA</b> s	Tumorassoziierte Antigene

<b>TAF</b>	Tumor-assoziierte Fibroblasten
<b>TAM</b>	Tamoxifen
<b>TGF<math>\beta</math></b>	transforming growth factor beta
<b>Th1</b>	Typ1-T-Helferzellen (TH1-Lymphozyten)
<b>Th2</b>	Typ2-T-Helferzellen (TH2-Lymphozyten)
<b>TIL</b>	Tumorerinfiltrierende Lymphozyten
<b>TNBC</b>	Triple-negative breast cancer, triple negatives Mammakarzinom
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (THAM)
<b>TSR</b>	Tumor-Stroma-Ratio
<b>tp53</b>	tumor protein p53
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UICC</b>	Union internationale contre le cancer
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>WHO</b>	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
<b>WISP1</b>	WNT1-inducible-signaling pathway protein 1, Wnt-1 induzierbarer Signalweg-1
<b>z.B.</b>	zum Beispiel



# Abbildungsverzeichnis

3.1	Histogramm der Stromaproportion über 2 Kohorten. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	47
3.2	Histogramm der Verteilungsmuster des Stromas 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . .	48
3.3	Histogramm über das Zellreichtum des Stromas. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . .	49
3.4	Histogramm über das lymphozytäre Infiltrat des Stromas. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	50
3.5	Proteinexpression von ST6GLANAC5 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	51
3.6	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von ST6GLANAC5. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	52
3.7	Proteinexpression in positiven Tumorzellen von ST6GLANAC5. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	53
3.8	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von ST6GLANAC5. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	53

3.9	Proteinexpression von ST6GLANAC5 in anderen positiven Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	54
3.10	Zytoplasmatische Ausprägung der immunhistochemische Färbung von Tumorzellen und TAF mit ST6GLANAC5 (a) mäßige ST6GALNAC5-Expression der TAF bei starker ST6GALNAC5-Expression in den Tumorzellen (b) mäßige Expression von ST6GALNAC5 in den Tumorzellen (c) schwache ST6GALNAC5-Expression von ST6GALNAC5 in den TAF und Tumorzellen Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF . . . . .	55
3.11	Proteinexpression von GATA-3 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	56
3.12	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von GATA-3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	57
3.13	Proteinexpression in Tumorzellen von GATA-3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	58
3.14	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von GATA-3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	58
3.15	Proteinexpression von GATA-3 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	59
3.16	Überwiegend nukleäre Ausprägung der immunhistochemische Färbung von Tumorzellen und TAF mit GATA-3 (a) starke GATA-3-Expression in den TAF und Tumorzellen (b) mäßige Expression von GATA-3 sowohl in den TAF als auch in den Tumorzellen (c) schwache GATA-3-Expression in den TAF und Tumorzellen Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF . . . . .	60

3.17	Proteinexpression von AKR1C1 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	61
3.18	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von AKR1C1. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	62
3.19	Proteinexpression in Tumorzellen von AKR1C1. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	63
3.20	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von AKR1C1. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	63
3.21	Proteinexpression von AKR1C1 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	64
3.22	Überwiegend zytoplasmatische, teils nukleäre Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit AKR1C1 (a) starke Markerexpression von AKR1C1 in den Tumorzellen (b) mäßige Expression von AKR1C1 sowohl in den TAF als auch in den Tumorzellen (c) AKR1C1-negative TAF bei schwacher AKR1C1-Expression in den Tumorzellen Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF . . . . .	65
3.23	Proteinexpression von AKR1C2 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	66
3.24	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von AKR1C2. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	67
3.25	Proteinexpression in Tumorzellen von AKR1C2. 1.Kohorte: BRCA1- / BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	68

3.26	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von AKR1C2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	68
3.27	Proteinexpression von AKR1C2 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	69
3.28	Überwiegend zytoplasmatische, teils nukleäre Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit AKR1C2 (a) starke AKR1C2-Expression in den TAF, Tumorzellen sowie Endothelzellen (b) mäßige Expression von AKR1C2 in den Tumorzellen (c) schwache Expression in den TAF und Tumorzellen Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF . .	70
3.29	Proteinexpression von WISP1 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	71
3.30	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von WISP1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	72
3.31	Proteinexpression in Tumorzellen von WISP1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . .	72
3.32	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von WISP1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	73
3.33	Proteinexpression von WISP1 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	74
3.34	Proteinexpression von KLF4 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	75

3.35	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von KLF4. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	76
3.36	Proteinexpression in Tumorzellen von KLF4. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . .	76
3.37	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von KLF4. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	77
3.38	Proteinexpression von KLF4 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	78
3.39	zytoplasmatische und nukleäre Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit KLF4 (a) starke KLF4-Expression sowohl in den TAF als auch in den Tumorzellen (b) mäßige Expression von KLF4 in den TAF und Tumorzellen (c) KLF4-negative TAF bei schwacher KLF4-Expression in den Tumorzellen Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF	79
3.40	Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	80
3.41	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von TGF $\beta$ 2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	81
3.42	Proteinexpression in Tumorzellen von TGF $\beta$ 2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . .	82
3.43	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von TGF $\beta$ 2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	82
3.44	Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	83

3.45	zytoplasmatische Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit TGF $\beta$ 2 (a) starke Expression von TGF $\beta$ 2 in den TAF und Tumorzellen (b) mäßige TGF $\beta$ 2-Expression in den Tumorzellen (c) schwache Expression von TGF $\beta$ 2 sowohl in den TAF als auch in den Tumorzellen Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF . . . . .	84
3.46	Proteinexpression von GALNT3 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	85
3.47	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von GALNT3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	86
3.48	Proteinexpression in Tumorzellen von GALNT3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	87
3.49	Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von GALNT3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	87
3.50	Proteinexpression von GALNT3 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom . . . . .	88
3.51	zytoplasmatische Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit GALNT3 (a) starke GALNT3-Expression in den Tumorzellen bei mäßiger Expression in den TAF (b) GALNT3-negative TAF bei mäßiger Expression von GALNT3 in den Tumorzellen (c) schwache Expression von GALNT3 in den TAF und Tumorzellen Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF . . . . .	89

# Tabellenverzeichnis

1.1	T-Klassifikation [Kreienberg et al., 2012]	13
1.2	N-Klassifikation [Kreienberg et al., 2012]	14
1.3	M-Klassifikation [Kreienberg et al., 2012]	14
2.1	Kohortenstruktur	30
2.2	Geräte	32
2.3	Verbrauchsmaterial	33
2.4	Substanzen	34
2.5	Primärantikörper	35
2.6	Sekundärantikörper	35
2.7	selbst hergestellte Reagenzien / Lösungen	36

# 1. Einleitung

Die kontinuierlich steigende Lebenserwartung sowie die Exposition gegenüber krebserregenden Stoffen im Laufe des Lebens führt zu einem fortlaufenden Anstieg der krebisbedingten Mortalität. Der überwiegende Anteil der Malignomkrankungen ist epithelialen Ursprungs, so auch das Mammakarzinom. Bislang ist vor allem das heterogene Ansprechen einer Therapie das große Problem in der Behandlung von Karzinomen. Die Intention vieler Forschungsarbeiten ist, Mammakarzinompatientinnen eine bessere individualisierte Therapie anbieten zu können. Dazu müssen weitere Eigenschaften des Tumors und des Tumorstromas sowie deren Fähigkeit zur Initiation, Progression, Invasion und Metastasierung analysiert werden. Ziel der heutigen Forschungsansätze ist es, durch den Nachweis eines tumorspezifischen Merkmals ein effizienteres Therapieverfahren etablieren zu können.



## 1.1 Das invasive Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist nach Angaben der International Association on Research of Cancer weltweit mit 1,3 Millionen jährlich und mit 71640 Neuerkrankungen in Deutschland die häufigste Krebserkrankung bei Frauen im Jahre 2013 [Kunze, 1994, Barnes et al., 2016]. Pro Jahr versterben daran 465000 Frauen weltweit. Nach einer fallenden Inzidenz 2009 mit 73340 und 2010 mit 70340 Brustkrebsneuerkrankungen ist die Vorhersage des Krebsregister Deutschlands für 2014 mit 75200 Neuerkrankungen wieder ansteigend [Barnes et al., 2016]. 31,3% aller Krebsneuerkrankungen bei der Frau sind durch das Mammakarzinom bedingt und mit 17815 Todesfällen im Jahre 2011 bleibt es die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen in Deutschland [Barnes et al., 2016]. Von 100 Frauen erkrankt jede achte bis zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom [DeSantis et al., 2014, Schneider et al., 2014].

Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren, welches damit deutlich niedriger ist als bei anderen Krebserkrankungen [Bertz et al., 2010]. Während die Inzidenz sich seit 1980 ungefähr verdoppelt hat, konnte ein Sinken der Mortalität erst von 1990 bis 2002 um 2,3% pro Jahr verzeichnet werden [Smigal et al., 2006]. Dieses ist vor allem auf die Einführung der Brustkrebsfrüherkennungsuntersuchungen zurückzuführen. Dazu gehören das Abtasten der Brust ab dem 30. Lebensjahr und die Mammographie zwischen dem 50. bis 69. Lebensjahr. Dadurch können signifikant mehr prämaligne Vorstufen und kleine Tumore detektiert werden, sodass die Prognose insgesamt verbessert werden konnte [Kreienberg et al., 2012]. Ebenfalls spielt auch die stets präzisere und gezieltere Entwicklung von Therapieansätzen eine große Rolle bei der Abnahme der Mortalität. Aus diesem Grund nimmt die Erforschung und Weiterentwicklung von neuen Therapieoptionen nach wie vor einen hohen Stellenwert in der Forschung ein.

### 1.1.2 Ätiologie

Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet konnte die Ätiologie des Mammakarzinoms noch nicht endgültig geklärt werden. Es können lediglich Risikofaktoren beschrieben werden.

Das **Alter** stellt für viele Karzinome den bedeutendsten Einflussfaktor dar. Das Erkrankungsalter für das Mammakarzinom liegt dabei deutlich unter dem Altersdurchschnitt für andere Karzinome. Frauen im Alter von 35 Jahren haben ein Erkrankungsrisiko von 1:110, in den nächsten 10 Jahren an einem Mammakarzinom zu erkranken. Mit 55 Jahren steigt das Risiko auf 1:31. Ungefähr 50% aller Mammakarzinompatientinnen erkranken vor dem 65. Lebensjahr [Barnes et al., 2016].

Der Einfluss von **Hormonen** zeigte sich in vielen Gesichtspunkten als bedeutender Faktor in der Entstehung des Mammakarzinoms. Seit langem ist bekannt, dass eine frühe Menarche, eine späte Menopause sowie die Einnahme von Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparaten in der Menopause das Risiko für eine Erkrankung erhöhen. Dieses wird maßgeblich auf den hormonellen Einfluss von Östrogen und Progesteron auf das Brustgewebe zurückgeführt. Nulliparae und Frauen, die bei der ersten Schwangerschaft über 35 Jahre sind, haben ebenfalls ein signifikant erhöhtes Risiko [Shah et al., 2014]. Orale Kontrazeptiva werden kontrovers diskutiert, konnten aber in einer Vielzahl von Studien nicht zweifellos als Risikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms detektiert werden [Iversen et al., 2017, Lovett et al., 2017].

Epidemiologische Studien zeigten einen deutlichen **geographischen und ethnischen Einfluss** auf das Erkrankungsrisiko. So ist die Wahrscheinlichkeit, in den westlichen Industriestaaten an einem Mammakarzinom zu erkranken, um ein Siebenfaches höher als in Südostasien [Ziegler et al., 1993] oder Afrika. Aus den Studien geht ebenfalls hervor, dass **Ernährungsgewohnheiten** eine große Rolle spielen [De Waard, 1975]. Viele Nahrungsmittel zeigen Rückstände von Pestiziden, denen eine Hormon-imitierende Ak-

tivität zugesprochen wird [Crisp et al., 1998, Gray et al., 2017]. Ebenso gehen Lebensstil abhängige Faktoren wie **geringe Aktivität, Adipositas, Rauchen, erhöhter Alkoholkonsum, Ernährungsgewohnheiten und Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung** mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms einher [Binai et al., 2010, Vachon et al., 2001, Singletary, 2003, Olver, 2016, Couch et al., 2001, Harvie et al., 2015, Nekolla, 2004].

Prä-invasive Neoplasien wie das **duktale Carcinoma in situ (DCIS)**, die **ductale atypische Hyperplasie (ADH)** und die **lobuläre intraepitheliale Neoplasie (LIN)** korrelieren mit einem signifikant erhöhtem Karzinomrisiko [Hartmann et al., 2005]. Zudem erhöhen das Vorliegen eines Endometrium- oder Ovarialkarzinoms sowie das eines Mammakarzinoms auf der kontralateralen Seite das Erkrankungsrisiko signifikant [Singletary, 2003, Maass, 1994].

Bei einer Häufung von Mammakarzinomen innerhalb der Familie ist von **genetischen Ursachen** auszugehen. Das trifft bei 20 - 25% der Patientinnen zu [Houlston and Peto, 2004]. Allerdings kann nur bei ungefähr 5 - 10% der Erkrankten eine bekannte Genmutation im Sinne eines autosomal-dominanten Erbganges nachgewiesen werden [Hall et al., 1990]. Die bekanntesten Hochrisikogene sind das BRCA1- und BRCA2-Gen, welche 60 - 70% aller Genmutationen ausmachen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Penetranz aus. Seit kurzem sind zwei weitere Hochrisikogene, das RAD51C (BRCA3-Gen) und das RAD51D identifiziert [Meindl et al., 2010]. Das Erkrankungsrisiko wird ähnlich hoch eingeschätzt wie bei dem BRCA1- und BRCA2-Gen. Für den restlichen Anteil der hereditären Mammakarzinomerkrankungen wird von einem Zusammentreffen moderat-penetranter Gene (ATM, CHECK2, BRIP1, PALB2 und NSB1) im Rahmen einer polygenen Vererbung ausgegangen. Das Vorliegen eines dieser Gene erhöht das Mammakarzinomrisiko um ein Zwei- bis Vierfaches [Byrnes et al., 2008, Hollestelle et al., 2010].

### 1.1.3 BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen

#### Lokalisation und Aufbau des BRCA1- und BRCA2-Gens

Das BReast CAncer 1-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosom 17, an der Chromosomenregion 17q21. Es wurde 1990 entdeckt [Hall et al., 1990] und 1994 erstmals kloniert. Das BRCA1-Gen setzt sich aus 24 Exons zusammen und kodiert ein Polypeptid, bestehend aus 1863 Aminosäuren mit einem Gewicht von 220 kD [Miki et al., 1994]. Nur kurze Zeit später (1995) wurde das BReast CAncer 2-Gen lokalisiert und auf dem langen Arm des Chromosom 13, Bande 12 (13q12) entdeckt. Im Vergleich zum BRCA1-Gen enthält es 27 Exons und kodiert ein 384 kD schweres Protein aus 3418 Aminosäuren [Wooster et al., 1995, Tavtigian et al., 1996].

#### Funktion des BRCA1- und BRCA2-Gens

BRCA1 und BRCA2 sind Tumorsuppressorgene, deren kodierte Proteine sich vor allem innerhalb des Zellkerns finden und dort mit anderen Proteinen und wichtigen Zellabläufen interagieren [Yoshida and Miki, 2004]. Sie spielen eine bedeutende Rolle im Zellwachstum [Ludwig et al., 1997], in der Zelldifferenzierung, Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität sowie der Regulierung der Transkription, Genexpression und bei Reparaturmechanismen von geschädigten DNA-Abschnitten [Wang, 2012, Welcsh et al., 2000]. Die DNA-Reparaturproteine des BRCA1-, BRCA2- und BRCA3-Gen interagieren zusammen und spielen eine wichtige Rolle im DNA-Doppelstrang-Reparaturmechanismus [Reid et al., 2008, Henderson, 2012, Yoshida and Miki, 2004]. Das Vorhandensein dieser Mutation in beiden Allelen führt zu einem erhöhten Auftreten eines Mamma- und/oder Ovarialkarzinoms. Außerdem zeigt sich ein erhöhtes Risiko für ein Pankreas-, Colon-, Magen und Prostatakarzinom sowie für weitere Krebserkrankungen [Cavanagh and Rogers, 2015, Mersch et al., 2015, Thompson and Easton, 2002, Easton et al., 1999].

## Mammakarzinomrisiko bei BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen

Die BRCA1-/BRCA2-Mutation ist eine Keimbahnmutation, die autosomal-dominant vererbt wird. Träger dieser Mutation, egal ob Mutter oder Vater, geben das betroffene Allel zu 50% an ihre weiblichen und männlichen Nachkommen weiter. Der Mensch besitzt von jedem Gen zwei Allele. Im Laufe des Lebens haben die BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen ein hohes Risiko, dass es zu einer somatischen Mutation und dadurch zum Funktionsverlust des zweiten Allels kommt. Dieser Vorgang wird *loss of heterozygosity* und *second hit* genannt [Rosen and Pishvaian, 2014, Simon and Zhang, 2008, Bell et al., 2002]. Das Eintreten des *second hit* kann durch viele Faktoren wie z.B. Ernährung, Alkoholkonsum, ionisierende Strahlung und bestimmte Toxine begünstigt werden [Dennis et al., 2011, Pijpe et al., 2012, Kiechle et al., 2016]. Durch eine Deletion oder Loss-of-function-Mutation bei Mutationsträgerinnen entsteht die Prädisposition zur Mammakarzinomentstehung. Liegt eine BRCA1-Mutation vor, so ist das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken (bis zum 70. Lebensjahr) mit 60 - 65% sehr hoch. Für die Erkrankung an einem Ovarialkarzinom liegt das Risiko bei dieser Mutation zwischen 39 - 59%. Bei einer BRCA2-Mutation sind es 45 - 55% für eine Mammakarzinom- und zwischen 11 - 16,5% für eine Ovarialkarzinomerkkrankung bis zum 70. Lebensjahr [Antoniou et al., 2003, Mavaddat et al., 2013]. Neueste prospektive Kohortenstudien besagen, dass bis zum 80. Lebensjahr die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Mammakarzinoms bei 72% für eine BRCA1- und 69% für eine BRCA2-Mutation liegen. Im Rahmen dieser Untersuchung lag das Risiko für die Erkrankung an einem Ovarialkarzinom von BRCA1-Mutationsträgerinnen bei 44% gegenüber 17% in Anbetracht einer BRCA2-Mutation [Kuchenbaecker et al., 2017]. Die Erkrankung tritt im Durchschnitt 20 Jahre früher und gehäuft bilateral auf. Die betroffenen Patientinnen hatten im Verlauf ihres Lebens ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms in der kontralateralen Brust als Frauen ohne diese Keimbahnmutation [Salhab et al., 2010].

## **Histopathologische Besonderheiten BRCA1-/BRCA2-assoziiierter Mammakarzinome**

Mammakarzinome von BRCA1-Mutationsträgerinnen treten vor allem im jungen Alter auf. Sie haben zwischen 75 - 80% einen triple negativen immunhistochemischen Phänotyp und kennzeichnen sich durch ein hohes Grading (G3) und somit einer schlechten Differenzierung aus. Triple negative Mammakarzinome weisen im Vergleich zu den anderen Subgruppen des Mammakarzinoms sehr hohe Werte des Proliferationsmarkers Ki67 auf. Dieser Wert gibt die Proliferationsaktivität des Tumors an [Hashmi et al., 2019].

Sie sind Östrogen-Rezeptor(ER)-negativ, Progesteron-Rezeptor(PR)-negativ und zeigen keine HER2neu Amplifikation [Lips et al., 2013, Kunze, 1994, Eisinger et al., 1996]. Ca. 7% der BRCA1-Karzinome sind HER2neu positiv und 20% ER/PR positiv

[Honrado et al., 2005]. Auf der Ebene der Genexpressionsprofile zählen diese Karzinome zu den basal-like molekularen Subtyp. Es besteht vor allem in den ersten drei Jahren nach der Diagnosestellung ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv und einer hämatogenen Metastasierung im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom [Yan et al., 2015, Dent et al., 2007]. BRCA1-assoziierte Karzinome sind oft vom medullärem oder aytischen medullärem Typ (13%) mit einem eher soliden, verdrängendem Tumorwachstum und einem prominenten lymphozytären Infiltrat in der Peripherie sowie im Tumor selbst [Lakhani et al., 1998, Lakhani, 1999]. Trotz ihres oft negativen Lymphknoten-Nodalstatus haben diese Karzinome durch ihr schnelles Wachstum und einer frühen hämatogenen Metastasierung (v.a. Lunge, Leber und Gehirn) eine sehr schlechte Prognose.

Kontrovers dazu zeigt sich das gute Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie [Tischkowitz and Foulkes, 2006].

BRCA2-positive Mammakarzinome besitzen keinen signifikanten Unterschied im Expressionsverhalten des ER und PR im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom. Nur 6% der BRCA2-Karzinome weisen dagegen einen HER2neu positiven Status auf (sporadisches Mammakarzinom: 18% HER2neu positiv) [Honrado et al., 2005]. Sie sind meist

von einem tubulären, lobulären oder intraduktalen Subtyp und tendieren zu einem höheren Grading (G2 - 3) im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom. Dennoch besitzen diese ein geringeres Grading als BRCA1-positive Mammakarzinome. Das Erkrankungsalter bei BRCA2-Mutationsträgerinnen liegt höher als bei denen mit einer BRCA1-Mutation. Zudem zeigt solch ein Karzinom tendenziell eine niedrige Proliferationsrate [Lakhani, 1999, Marcus et al., 1997, Honrado et al., 2005].

### **Spezielle Therapieansätze BRCA1-/BRCA2-assoziiierter Mammakarzinome**

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es für BRCA1-/BRCA2-assoziierte Mammakarzinome keine spezifischen Leitlinien zur Therapieempfehlung. Die Therapieschemata werden analog zum sporadischen Mammakarzinom in Abhängigkeit von ihrem Tumorstadium, Grading und immunhistochemischen Phänotyp erstellt. Neueste präklinische Studien besagen, dass Mammakarzinome, die eine BRCA1-Mutation aufweisen eine gewisse Resistenz gegenüber vinca-alkaloid- und taxanhaltige Chemotherapeutika besitzen. Diese gehören zu der Gruppe der Spindelgifte [Meindl et al., 2011, Lafarge et al., 2001, Quinn et al., 2003]. Im Gegensatz dazu haben Studien eine erhöhte Sensitivität für Platinderivate (Cisplatin und Carboplatin) gezeigt [Byrski et al., 2010, Meindl et al., 2011, Vetter et al., 2017].

PARP-Inhibitoren (PARPi) hemmen das Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), welches für die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen verantwortlich ist. Sie verhindern die Reparatur von Zytostatika sowie durch adjuvante Radiotherapie induzierte DNA-Schäden und tragen somit zu deren verbesserten Wirkung bei. BRCA1-/BRCA2-Gene sind an der DNA-Doppelstrangreparatur durch die homologe Rekombination beteiligt [Rios and Puhalla, 2011, Livraghi and Garber, 2015]. Eine Mutation und dadurch der Defekt dieser Gene führt zu einer gesteigerten Wirkung von PARPi und verbessert somit das progressionsfreie Überleben dieser Patientinnen. Aktuell laufen zahlreiche Studien über die Gabe von PARPi als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie im Rahmen einer neoadjuvanten, adjuvanten und palliativen (metastasierten) Situation eines BRCA1-/BRCA2-assoziierten Karzinoms [Arun et al., 2015, Livraghi and Garber, 2015, O'Sullivan Coyne et al., 2015, Llombart-Cussac et al., 2015, Telli et al., 2015]. Das initiale gute Ansprechen der BRCA1-/BRCA2-positiven Mammakarzinome auf eine platinhal-

tige Chemotherapie und PARPi stellt durch die Entstehung einer erworbenen Resistenz ein erneutes therapeutisches Problem dar. Es wird dabei von einer weiteren sekundären Mutation ausgegangen, die als einer von vielen Mechanismen zu dieser Resistenz beiträgt [Wang et al., 2016, Lord and Ashworth, 2013, Livraghi and Garber, 2015].

### 1.1.4 Forschungsgeschichte der Pathogenese des Mammakarzinoms

Die ersten Schriften und Darstellungen, die sich mit dem Mammakarzinom und der operativen Therapie beschäftigten, stammen aus dem alten Ägypten ca. 2500 bis 3000 v. Chr. (»Edwin Smith Surgical Papyrus«). Seitdem existieren über die Jahrhunderte unterschiedliche Ansichten über die Pathogenese und Therapie des Mammakarzinoms [Kaufman et al., 2007, Lakhtakia, 2014]. In der Antike befasste sich Hippokrates (460 - 377 v. Chr.) mit dem Mammakarzinom und ging von einer systemischen Erkrankung aus. So auch Galen (130 - 201 n. Chr.), der in seiner Humoraltheorie davon sprach, dass diese systemische Erkrankung auf eine Ansammlung von schwarzer Galle zurückzuführen ist. Virchow (1821 - 1902) dagegen war der Ansicht, dass es sich um eine lokale Erkrankung handelt, die durch ein operatives Vorgehen geheilt werden kann [Kaufman et al., 2007]. Aufgrund von Sektionen post mortem stellte er fest, dass sich der Tumor entlang der Muskelfaszie und Lymphgefäße ausdehnte. Auf diese Hypothese baute Halsted seine Theorie (1894) der lokoregionären Erkrankung mit einer geordneten Tumorausbreitung sowie Fernmetastasierung per continuitatem auf und widerlegte dadurch die bisherige Systemtheorie. Er setzte die radikale Mastektomie mit Entfernung aller axillären Lymphknoten als operatives Vorgehen durch [Kaufmann et al., 2013, Kaufman et al., 2007, Comen, 2012, Schreiber and Carstensen, 1983]. Fisher (1979) war der Erste, der wieder zur Theorie der systemischen Erkrankung zurückging. Er entwickelte auf der Basis randomisierter Studien die brusterhaltende Operation mit postoperativer Bestrahlung der Mamma. Durch das Nachweisen der hämatogenen und lymphogenen Tumorzellausbreitung widerlegte er die Halsted-Hypothese [Fisher et al., 2002]. Heute wird sich meist auf die Spektrumstheorie von Harris und Hellman (1987) berufen, die besagt, dass das Mammakarzinom eine systemische Erkrankung mit einer lokaler Komponente ist



[Tiefenbacher et al., 2003, Kaufmann et al., 2013].

Wissenschaftler gehen gegenwärtig von einer multifaktoriellen Pathogenese aus, die noch nicht vollständig geklärt ist. Eine kaskadenartige Mehrschrittkarzinogenese soll letztendlich durch die Interaktionen in allen Regulationsebenen des Zellwachstums und der Zellproliferation zur Entstehung eines Mammakarzinoms führen [Calaf and Hei, 2000]. Es werden unterschiedliche Entwicklungspfade angenommen, da es verschiedene histologische Subtypen des Mammakarzinoms gibt. Es handelt sich um eine Erkrankung des gesamten laktierenden Systems der Brust. Aus normalem Brustepithel entsteht durch Initiation von Östrogen, Progesteron, Zyklinen und der Einwirkung von Risikofaktoren eine Umwandlung dieser Zellen in eine atypische ductale oder eine atypische lobuläre Hyperplasie. Der nächste Schritt ist die Promotion in ein Carcinoma lobulare in situ oder Carcinoma ductale in situ durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren (EGFR, TGF- $\alpha$ ), Überexpression von Onkogenen und dem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen. Die Progression in ein invasives Karzinom entsteht durch die Zunahme eines genetischen Ungleichgewichts bzw. der Akkumulation genetischer Alterationen [Roth-Ganter and Fischer, 2002]. Für die Entstehung von Fernmetastasen beim Mammakarzinom gilt bis heute das “Seed and Soil”-Konzept, welches von Paget entwickelt wurde [Paget and Paget, 1989]. Es lösen sich täglich Millionen von Karzinomzellen (Seed) aus dem Zellverband des Primärtumors und dringen in das umliegende Gefäßsystem ein. So kommt es zu einer Zirkulation von Karzinomzellen, deren Überleben und Ansiedlung von einem geeigneten Gewebemilieu (Soil) abhängig ist. Dieses lokale Milieu, das Stroma, begünstigt durch eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, chemotaktische Substanzen, Wachstumsfaktoren und dem Einfluss von stromalen Komponenten die Proliferation und zugleich das Überleben im bevorzugten Zielorgan. Die Erforschung der Interaktionen zwischen Karzinomzellen und dem Stroma bietet die Grundlage zur Weiterentwicklung von neuen Therapieoptionen und Prävention von Metastasen [Comen, 2012, Schlegel et al., 2003]

### 1.1.5 Klassifikation des Mammakarzinoms

Die Stadieneinteilung bzw. Tumorausbreitung des Mammakarzinoms basiert auf der TNM-Klassifikation der UICC in Bezug auf die Größe des Primärtumors, gekennzeichnet durch T (Tabelle 1.1), den Befall der regionären Lymphknoten durch N (Tabelle 1.2) und das Vorliegen von Fernmetastasen mit M (Tabelle 1.3). Die histologische Klassifikation der Malignität erfolgt nach dem Grading mit G1 - G3. Das Staging und die gezielte Therapieplanung sowie die Aussage zur Prognose basieren auf dieser Klassifikation. Das Präfix c- vor dem TNM-System bedeutet klinisches Stadium, p- pathologisches Stadium durch histologische Sicherung, y- Zustand nach neoadjuvanter Therapie und r- Rezidiv.

<b>pT</b>	<b>Primärtumor</b>
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ Tis (DCIS) Duktales Carcinoma in situ Tis (LCIS) Lobuläres Carcinoma in situ Tis (Paget) M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T1	Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser T1mic Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger im größten Durchmesser T1a größer 0,1 cm bis maximal 0,5 cm im größten Durchmesser T1b größer 0,5 cm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser T1c größer 1 cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor größer als 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor größer als 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit Befall der Thoraxwand oder der Haut. T4a Befall der Thoraxwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, vorderer Serratusmuskel, jedoch nicht die Pektoralismuskulatur) T4b Ödem (einschließlich “peau d’orange”), Ulzeration der Haut oder Satellitenknoten der Haut der gleichen Brust T4c Vorliegen von T4a und T4b T4d Inflammatorisches Karzinom

Tabelle 1.1: T-Klassifikation [Kreienberg et al., 2012]

<b>pN</b>	<b>regionäre Lymphknoten</b>
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1mi	Mikrometastasen (>0,2 mm und/oder mehr als 200 Tumorzellen, aber nicht größer als 0,2cm)
N1	Metastasen in 1–3 ipsilateralen Lymphknoten und/oder mikroskopische Metastasen im Sentinel-Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. mammaria interna
N2	Metastasen in 4–9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Metastasen
N3	<p>pN3a Metastasen in <math>\geq 10</math> ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten</p> <p>pN3b Metastasen in 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</p> <p>pN3c Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten</p>

Tabelle 1.2: N-Klassifikation [Kreienberg et al., 2012]

<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Nachweis von Fernmetastasen

Tabelle 1.3: M-Klassifikation [Kreienberg et al., 2012]

## 1.2 Komposition und Funktion des Stromas beim Mammakarzinom

### 1.2.1 Die Rolle des Stromas in der physiologischen Brust und beim Mammakarzinom

Das Stroma (bindegewebiges Stützgerüst) macht ungefähr 80% der gesamten tubuloalveolären Drüsenarchitektur der Mamma aus. Es umgibt die epitheliale Komponente, bestehend aus den Acini, die sich zu Lobuli organisieren und in den terminalen Ductus enden. Diese Einheit wird als Lobus bezeichnet. Die Brust besteht aus 15 - 20 solcher Drüsenlappen. Mehrere terminale Ductuli enden im Ductus lactifer, welche sich wiederum vereinigen und in die Brustwarze münden [Arendt et al., 2010].

Während des gesamten Lebens einer Frau unterliegt die Brustdrüse kontinuierlichen und aktiven Veränderungen. In der Embryonalentwicklung wird die Brustdrüse hormonunabhängig als Drüsenbaum-Knospen ektodermalen Ursprungs angelegt, welche sich dann bis zum Beginn der Pubertät in der Ruhephase befinden [Sternlicht et al., 2006]. Mit Einsetzen der Pubertät unterliegt das Drüsengewebe während des Menstruationszyklus ständigen Veränderungen in Form von hormonabhängigen Proliferationen und Apoptose. Während der Stillzeit ist die Brustdrüse erstmalig vollkommen lobuloalveolar entwickelt [Arendt et al., 2010].

In der physiologischen Brustentwicklung spielen Wechselwirkungen zwischen den Epithelzellen und dem Stroma eine bedeutende Rolle [Kim et al., 2005]. Aus vielen Studien geht hervor, dass die Entwicklung der Epithelzelle bei normalem aber auch malignem Brustgewebe stark von den Interaktionen des Stromas abhängig ist.

Das Stroma kann die Eigenschaft einer Tumor-unterdrückenden aber auch Tumor-fördernden Umgebung durch eine reziproke Kommunikation darstellen. Diese Eigenschaft entsteht durch die essentielle Regulierung der Homöostase, Proliferation, Differenzierung, Migra-

tion und das Überleben der Epithelzelle [Arendt et al., 2010, Nelson and Bissell, 2006, Bhowmick et al., 2004, Luhr et al., 2012]. Es gibt unzählige Studien, die belegen, dass das Tumorstroma eine bedeutende Rolle in der Kontrolle von Tumorwachstum, -progression und -hemmung einnimmt [Kalluri and Zeisberg, 2006]. Nur 20% des Zellverbandes beim Mammakarzinom stellen Karzinomzellen da. Der Rest setzt sich aus Zellen des Tumorassoziierten Stromas zusammen, welche maßgeblich die Tumorgenese fördern. Die Zusammensetzung des Stromas, welches das normale Brustdrüsengewebe umgibt, unterscheidet sich in vielen Gesichtspunkten von dem Tumorstroma beim Mammakarzinom. Das Tumormikromilieu zeichnet sich durch eine erhöhte Anzahl von Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen, Adipozyten, inflammatorischen, lymphatischen Zellen, Immunzellen sowie verstärkte Kollagen- und Fibrinablagerung und eine erhöhte Vaskularisierung aus (Angelucci et al. 2015). Im Tumorstroma zeigt sich eine erhöhte Expression von glattem Muskelaktin ( $\alpha$ -smooth muscle actin), Kollagen IV, Prolyl-4-hydroxylase, Fibroblasten aktivierendes Protein, Fibronectin, Tenascin, Desmin, Calponin und Calesmom [Kalluri and Zeisberg, 2006, Ronnov-Jessen et al., 1995, Arendt et al., 2010]. Daraus resultiert eine veränderte fibrotische Struktur der gesamten extrazellulären Matrix, welche als desmoplastische Stromareaktion beschrieben wird [Arendt et al., 2010, Ronnov-Jessen et al., 1996]. Die Sekretion von Fibronectin und Tenascin führt zu einer Veränderung in der Zelladhäsion und Proliferation [Schor and Schor, 2001]. Es konnte in wissenschaftlichen Experimenten bereits bewiesen werden, dass sich ein Mammakarzinom in Abwesenheit dieses Mikroiroment nur erschwert entwickeln kann [Ronnov-Jessen et al., 1996].

### 1.2.2 Aussehen der Fibroblasten

Fibroblasten [von lateinisch \*fibra = Fasern, griech. blastanein = bilden] sind bewegliche, teilungsaktive und nicht voll differenzierte, spindelförmige Zellen mesenchymaler Herkunft im stromalen Bindegewebe. Sie besitzen einen ovalen hellen Zellkern mit einem Nucleolus, multiple irreguläre zytoplasmatische Fortsätze, zudem reichlich raues Endoplasmatisches Retikulum und einen sehr effizient ausgebildeten Golgi-Apparat. Normalgewebe-

assoziierte Fibroblasten (NF) sind für die Synthese von Prokollagen, Kollagenasen und Glykosaminoglycanen verantwortlich [Addicks et al., 2013, Lüllmann-Rauch, 2011].

Das Aussehen der Fibroblasten ändert sich in Abhängigkeit von ihrer Funktion und dem jeweiligen Wirkungsort [Heinzeller and Büsing, 2001]. Die Mehrzahl der aktivierten Fibroblasten und Tumor-assoziierten Fibroblasten weisen als Marker das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (FAP) auf. Ein Marker, der lediglich sensitiv für alle Fibroblasten ist, konnte noch nicht detektiert werden [Tyulkina et al., 2016].

### 1.2.3 Aktivierung und Funktion der Tumor-assoziierten Fibroblasten

Im gesunden Gewebe haben Fibroblasten eine geringe Proliferationsrate sowie Metabolisierung. Im Gegensatz dazu werden die Fibroblasten während der Wundheilung und bei einer Karzinomkrankung aktiviert und ihre Proliferation und deren Metabolismus stimuliert. Es findet eine gesteigerte Sezernierung von Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) statt. Sie erlangen kontraktile Eigenschaften und regulieren die Differenzierung von Epithelzellen bei Entzündungen sowie während der Wundheilung [Polyak and Kalluri, 2010]. Man nennt Fibroblasten, die sich in der Umgebung von Tumorzellen befinden und durch deren Signale aktiviert werden, aktivierte Fibroblasten oder Tumor-assoziierte bzw. Cancer-assoziierte Fibroblasten (TAF) [Gabbiani et al., 1971]. Früher wurden sie auch als Myofibroblasten bezeichnet, da viele der TAF eine erhöhte  $\alpha$ -smooth muscle actin-Exprimierung aufweisen.

Die aktivierten Fibroblasten stellen den größten Anteil des Tumorstromas dar. Sie beeinflussen die Angiogenese, Tumorentstehung und Progression durch maligne Transformation der Tumorzellen sowie die Immortalisierung der Karzinomzellen [Bhowmick et al., 2004]. Das begünstigt letztendlich die Invasion der Karzinomzellen in das Gefäßsystem und damit die Fernmetastasierung [Polyak and Kalluri, 2010]. Durch die erhöhte Rasanze des Tumorwachstums, der Progression und der Metastasierung sinken die Heilungschancen rapide und steigern dadurch die Mortalität der Krebserkrankungen. Eine Verbesserung

der Prognose könnte durch die Elimination dieser Funktionen der TAF erreicht werden [Li et al., 2007, Shimoda et al., 2010].

Die Interaktion zwischen den TAF und den Tumorzellen ist gekennzeichnet durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren (für viele verschiedene Zelltypen im Tumorgewebe), Zytokinen, Chemokinen und die Bildung einer extrazellulären Matrix [Hu and Polyak, 2008b, Hu and Polyak, 2008a]. Einige der bedeutendsten Wachstumsfaktoren sind VEGF, PDGF, FGF, HGF, TGF, IGF, EGF und NGF [Bhowmick et al., 2004]. Der Metabolismus von TAF wird ebenfalls als tumorfördernd beschrieben. TAF entgiften toxische Stoffwechselprodukte der Tumorzellen und wirken als Puffer im sauren Milieu [Koukourakis et al., 2006]. Die Genexpressionsmuster der TAF gleichen annähernd denen von Karzinomen und weisen somit ein verändertes Genexpressionsmuster im Vergleich zu den NF auf. [Bauer et al., 2010, Allinen et al., 2004, Chang et al., 2004].

Weitere relevante Veränderungen der TAF sind der gestörte p53/p21-abhängige Signalweg nach einer  $\gamma$ -Strahlung, eine hohe Survivinkonzentration, eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin, Tamoxifen und UV-Licht sowie eine hohe Expression von Ki-67 [Hawsawi et al., 2008].

#### 1.2.4 Herkunft der Tumor-assoziierten Fibroblasten

Es werden hauptsächlich drei verschiedene Entstehungsmöglichkeiten der TAF als wissenschaftlich relevant betrachtet. Als erste Möglichkeit wird die Transformation bereits vorhandener aktivierter Fibroblasten im Stroma zu TAF am wahrscheinlichsten angesehen. Experimentell konnte eine Aktivierung von Fibroblasten durch spezielle Wachstumsfaktoren bewiesen werden. Diese besitzen eine Tumor-assoziierte parakrine Wirkung. Zu diesen Wachstumsfaktoren zählt das  $TGF\beta$  (transforming growth factor beta), welches die Produktion von  $\alpha$ -SMA induziert [Kalluri and Zeisberg, 2006, Ronnov-Jessen et al., 1996, Vaughan et al., 2000]. Die Aktivierung der TAF kann mit dem Prinzip der Wundheilung verglichen werden, wo die Proliferation der Fibroblasten und Epithelzellen im Fokus stehen. Als zweite Möglichkeit wird die Differenzierung von Fibrozyten und mesenchymalen



Stammzellen (BMC), die in den Tumor immigriert sind, beschrieben [Quante et al., 2011]. Des Weiteren wird der Prozess der Endothelialen-Mesenchymalen Transition (EndMT) anerkannt, wobei Endothelzellen zu TAF modifiziert werden [Zeisberg et al., 2000]. Andere Theorien sind momentan nur Hypothesen. So wird angenommen, dass in einigen Fällen Epithelzellen möglicherweise auch Fibroblasten produzieren können. Dieser Prozess wird als Epithelialer-mesenchymaler Übergang (EMT) bezeichnet [Radisky et al., 2007].

## 1.3 Hintergrund zu den untersuchten Proteinen

### 1.3.1 ST6GALNAC5

ST6GALNAC5 gehört zur Familie der Sialyltransferasen. Es verändert Proteine und Ceramide an der Zelloberfläche, welche Matrixinteraktionen zwischen den Zellen und zwischen Zelle und extrazellulären Komponenten modifiziert. ST6GALNAC5 kodiert eine  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase, welche an der Biosynthese von Gangliosiden der  $\alpha$ -Serie beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen bei der Hirnmetastasierung von Brustkrebs eine wichtige Rolle spielt [Drolez et al., 2016]. ST6GALNAC5 kommt bei gesunden Menschen nur im Gehirn vor. Beim Vorliegen eines Mammakarzinoms führt ST6GALNAC5 aufgrund einer Oberflächenveränderung der Karzinomzellen dazu, dass diese länger an den Hirndothelzellen anheften und schließlich die Blut-Hirn-Schranke passieren können [Bos et al., 2009].

### 1.3.2 GATA-3

Das GATA-bindende Protein 3 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und hat eine entscheidende Funktion bei der Stimulation sowie Steuerung von Zellwachstum, -entwicklung und -differenzierung. Das trifft vor allem beim Mamma- und Urothelkarzinom zu [Ordonez, 2013, Asch-Kendrick and Cimino-Mathews, 2016]. GATA-3 wird hauptsächlich bei einem lobulären und invasiv duktalem Mammakarzinom exprimiert (80 - 90%) [Vrba and Futscher, 2017, Sun et al., 2017, Liu et al., 2012]. Die Expression in ER positiven Karzinomen ist am höchsten [Ordonez, 2013, Yoon et al., 2010]. In triple negativen Mammakarzinomen liegt die Expression von GATA-3 bei nur 67% [Miettinen et al., 2014]. Dieser Transkriptionsfaktor ist für die Regulation der luminaren Epithelzellabspaltung in der Milchdrüse verantwortlich. Das Protein hat einen Einfluss auf die Entwicklung von T-Zellen. Zusätzlich spielt es eine dominante Rolle in der Biologie von Endothelzellen. Es hat sich gezeigt, dass GATA-3 die Absonderung von IL-4, IL-5 und IL-13 bei Th2 Zellen fördert. Außerdem induziert es die Ausprägung von Th0 Zellen zum Th2 Subtyp, während es die Ausprägung zu Th1 Zellen unterdrückt [Yagi et al., 2011]. Es wird vermutet, dass

die Regulierung von GATA-3 in CD4-positiven Zellen auf der transkriptionalen Ebene durch die IL-4 Rezeptoren wie auch auf der Übersetzungsebene durch die Signalisierung von T-Zellrezeptoren stattfindet. Laut dem Cancer Genome Atlas ist GATA-3 eine der drei Genmutationen in mehr als 10% aller Brustkrebstumoren [Koboldt et al., 2012].

### 1.3.3 AKR1C1 und AKR1C2

AKR1C1 gehört wie AKR1C2 zu der Familie der Aldo-Keto Reduktasen, welches aus ca. 40 Proteinen und Enzymen besteht. Diese Enzyme beschleunigen die Umwandlung von Aldehyden und Ketonen in ihre entsprechende Alkohole durch Verwendung von NADH und/oder NADPH als Kofaktor. Sie besitzen somit eine unabhängige regulierende Funktion in dem intratumoralen Progesteronmetabolismus [Zeng et al., 2017]. Die Reaktion von Progesteron in deren inaktive Metaboliten durch AKR1C1 zu 20-alpha-Dihydroxyprogesteron wird dadurch beschleunigt.

Diese Metaboliten unterstützen die Unterdrückung der Proliferation und Adhäsion von Zellen, indem sie an spezielle Plasmamembranrezeptoren binden und dadurch eine nicht proliferierende Funktion auf die Mitose, Apoptose, Adhäsions- und Zytoskettmoleküle haben [Wenners et al., 2016, Lewis et al., 2004, Penning and Byrns, 2009].

AKR1C1 und AKR1C2 wie auch deren Metabolite sind in den TAF im Vergleich zu den NF beim Mammakarzinom herunterreguliert. Daraus resultiert eine höhere Konzentration an 5-Alpha-Reduktase sowie Progesteron und folglich eine gesteigerte Tumorprogression und ein schnelleres Tumorwachstum [Lewis et al., 2004]. Im normalen Gewebe der Brust ist AKR1C1 vorwiegend in den myoepithelialen und in den luminalen Epithelzellen lokalisiert. Diese exprimieren auch Progesteron [Ji et al., 2004, Soyak et al., 2002]. Aus diesem Grund bilden AKR1C1 und AKR1C2 die Basis für die Funktion als neue Prognosefaktoren. Sie bilden ebenfalls die Grundlage für eine neue hormonbasierte Therapie bei einem primären Mammakarzinom, unabhängig von dem klassischen Hormonrezeptorstatus [Wenners et al., 2016]. AKR1C2 baut Progesteron zu dem inaktivem Metabolit 3- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron ab [Wenners et al., 2016].

### 1.3.4 WISP1

WISP1 steht für Wnt-1 induzierbarer Signalweg-1 und ist ein proteinkodierendes Onkogen, das ein Teil des WISP-Signalweg-Proteins verschlüsselt. Es gehört zu der Familie der CCN-Proteinfamilie (Abkürzung für CYR61/CCN1, CTGF/CCN2, NOV/CCN3). Diese sind ECM-assoziierte Proteine, die an interzellulären Signalwegen beteiligt sind. WISP1 ist auch ein Synonym für CCN4. Diese Proteine führen durch ihre cysteinreichen und glykosylierten Signalproteine zu verschiedenen Entwicklungsprozessen [Jun and Lau, 2011, Klee, 2016]. Sie werden charakterisiert durch vier cysteinreiche Domänen: Insulin-like growth factor-binding Domäne, von Willebrand factor type C Modul, Thrombospondin Domäne und die C-terminal cystine knot-like Domäne. WISP1 spielt eine Rolle in den Endschritten des WNT1 Signalweges, welche eine große Rolle in der Entstehung von malignen Prozessen besitzt. Es wird hauptsächlich in embryonalen Stammzellen und in großen Mengen in Fibroblasten exprimiert. Im Tumorgewebe wird WISP1 überexprimiert [Gurbuz and Chiquet-Ehrismann, 2015, Xu et al., 2000, Pennica et al., 1998]. Dieser Wachstumsfaktor ist an der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Adhäsion von menschlichen Zellen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, Entzündungsreaktion, Wundheilung, Skelettentwicklung, Angiogenese und bei Krebserkrankungen [Feng and Jia, 2016, Weizmann Institute of Science, 2016].

WISP1 hemmt den Zelltod, indem die Endphase des p53-vermittelten Apoptose-Signalweges durch DNA-Schäden blockiert wird. Es steigert ebenfalls die Ablagerung von extrazellulärer Matrix in menschlichen Fibroblasten. Eine gesteigerte WISP1-Expression steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Inzidenz von einem Mamma-, Kolon- und hepatozellulärem Karzinom. Die Expression von WISP1 begünstigt die Tumorprogression und besitzt somit eine onkogene Rolle und stellt damit einen wichtigen Ansatzpunkt für neue Therapieoptionen dar [Berschneider and Königshoff, 2011, Davies et al., 2007, Xie et al., 2001]. Im Bezug auf ein Bronchial- und Prostatakarzinom spielt WISP-1 eine tumorsuppressive Rolle [Feng and Jia, 2016].

### 1.3.5 KLF4

KLF4 (Kruppel-like factor 4) gehört als proteinkodierendes Gen zu der Familie der Kruppel Transkriptionsfaktoren, einem Zink-Finger-Transkriptionsfaktor [Shields et al., 1996]. Dieses Gen hat einen Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation und Differenzierung, die Apoptose und Neuprogrammierung von Körperzellen sowie der Selbsterneuerung von Stammzellen und der Aufrechterhaltung der Pluripotenz [Yang et al., 2005, Wei et al., 2013, Ghaleb and Yang, 2017]. Vermutet wird, dass KLF4 den Zellzyklusübergang von der G1- in die S-Phase als Folge von Gamma-Strahlen induzierter Schädigung der DNA durch die Unterdrückung von p53 kontrolliert und hemmt [Yoon et al., 2003, El-Karim et al., 2013, Chen et al., 2001]. Eine sehr hohe Konzentration von KLF4 findet sich in den nicht teilenden Zellen. Diese Überexpression führt zu einem Stillstand des Zellzyklus. KLF4 verhindert die Zellteilung, wenn eine DNA-Schädigung vorliegt. Es ist zugleich für die genetische Stabilität verantwortlich, indem es die Anzahl der Zentromere und Chromosomen sowie das Zellüberleben reguliert. Einige Studien besagen jedoch, dass unter gewissen Bedingungen in normalen Gewebezellen KLF4 Apoptose-fördernde Eigenschaften übernimmt. Somit kann KLF4 kontextabhängig unter gewissen Bedingungen seine tumorhemmende Eigenschaften verloren haben und als Onkogen aber auch als Tumorsuppressorgen fungieren. KLF4 wirkt regulierend auf die Zellproliferation und kann die Karzinomentstehung induzieren sowie inhibieren [Song et al., 2017]. Es wurden die E3-Ligasen identifiziert, die für die FBXO32-abhängige Ubiquitinierung und Degradation von KLF4 verantwortlich sind. FBXO32 (F-box only protein 32) inhibiert durch den Abbau von KLF4 die Initiation und Proliferation von Tumoren [Zhou et al., 2017]. Durch die Interaktion von FBXO32 mit KLF4 und deren Modifikation erhält diese eine tumorsuppressive Funktion und ist ebenfalls ein vielversprechender therapeutischer Ansatz in der Behandlung von Mammakarzinomen. Mimoto et al. fand heraus, dass KLF4 als wichtiger Mediator der dual-spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung-Kinase 2 (DYRK2) fungiert. Eine reduzierte DYRK2-Expression führt zu einer erhöhten KLF4-

Expression [Mimoto et al., 2017]. Darüber hinaus identifizierten Mimoto et al. einen Androgenrezeptor (AR) als Transkriptionsfaktor, der sich an die KLF4-Promotorregion abhängig von der DYRK2-Kinaseaktivität bindet. Dieser Mechanismus wird auch die “DYRK2-AR-KLF4-Achse” der Mammakarzinomentstehung genannt [Mimoto et al., 2017]. Durch ein medikamentöses Eingreifen in diesen Mechanismus könnten sich ebenfalls neue Behandlungsoptionen für Patientinnen mit einem Mammakarzinom ergeben. Jia et al. untersuchte die Bedeutung von KLF4 im Zusammenhang mit der Tamoxifen(Tam)-Sensitivität von Mammakarzinomzellen. Eine erhöhte Expression von KLF4 korrelierte stark mit einer erhöhten TAM-Sensitivität, was eine verbesserte Prognose zur Folge hatte [Jia et al., 2018]. Es wurde ein verbessertes Ansprechen von KLF4-sensibilisierten Mammakarzinompatientinnen auf eine endokrine Therapie mit TAM beschrieben. Eine Überexpression von KLF4 führte durch eine Phosphorylierungsmodifikation zur Hemmung des mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweges und somit zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber TAM. Eine Ausschaltung des KLF4-Gens hatte dagegen eine TAM-Resistenz zur Folge [Jia et al., 2018]. Das ist vor allem für TAM-resistente Mammakarzinompatientinnen wichtig, denn eine TAM-Resistenz verschlechtert das DFS und OS maßgeblich. KLF4 ist ein potentieller prädiktiver Marker für eine TAM-Resistenz, das Ansprechen auf eine endokrine Therapie bzw. die TAM-Sensitivität.

In vielen Karzinomen zeigt sich nur eine geringe KLF4-Expression mit einer hemmenden Wirkung auf das Tumorgeschehen wie z.B. beim Kolon- [Choi et al., 2006], Magen- [Wei et al., 2005], Blasen- [Ohnishi et al., 2003] oder Lungenkarzinom [Hu et al., 2009, Foster et al., 2000]. Beim Mammakarzinom unterdrückt KLF4 die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) [Wang et al., 2015a] und somit wird die Invasion und Fernmetastasierung gehemmt [Yori et al., 2011]. Multivariate Analysen haben gezeigt, dass KLF4 ein unabhängiger vorteilhafter Prognosefaktor bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom darstellt. Bei Patientinnen mit einem triple negativen Mammakarzinom (TNBC) ist die Proliferation und Tumordinvasion signifikant gesteigert. Es konnte nachgewiesen werden, dass KLF4 die Fähigkeit besitzt die Proliferation und Invasion beim triple negativen Mammakarzinom zu hemmen [Nagata et al., 2017].

### 1.3.6 TGF $\beta$ 2

Der Transforming Growth Factor $\beta$ 2 gehört zu den etablierten Tumorsuppressorgenen und ist ein Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie [Kingsley, 1994]. Er ist ein multifunktionaler EGF-Wachstumsfaktor mit unterschiedlichen Auswirkungen auf verschiedenartige Zelltypen [Lawrence, 1996]. Grundsätzlich sind folgende Wirkungen bekannt: Die Inhibition der Proliferation von epithelialen, endothelialen sowie hämatopoetischen Geweben im Gegensatz zur Stimulation der Proliferation von stromalen bzw. mesenchymalen Gewebe und damit die Produktion von extrazellulärer Matrix. Ebenso nachgewiesen ist die immun-modulierende Funktion im Rahmen der Immunsuppression, durch Inhibition von B- und T-Lymphozyten [Roberts, 1998, Tan et al., 2009, Lawrence, 1996] und die Angiogenese, Apoptose sowie Differenzierung [Huang and Huang, 2005, Ouhit et al., 2013]. Ist eine dieser Wirkungen von TGF $\beta$ 2 gestört, bietet das die Basis für ein malignes Wachstum. Es konnte eine Hemmung des Zellwachstums bei Patientinnen, die eine antihormonelle Therapie im Rahmen ihrer hormonsensitiven Mammakarzinomkrankung erhalten haben, nachgewiesen werden. Dieser Effekt basiert auf einer vermehrten Sekretion und Aktivierung von TGF $\beta$ 1, was wiederum zu einer erhöhten Expression von TGF $\beta$ 2 führt [Knabbe et al., 1996, Buck and Knabbe, 2006].

Im Rahmen des Zellzyklus der Mitose inhibiert TGF $\beta$ 2 den G2/S-Übergang durch die Herabregulierung von CDK4 und die Hemmung der Phosphorylierung [Kim et al., 2001]. Es wird angenommen, dass TGF $\beta$ 1/2 zu einer erhöhten Cox-2 Expression führt, welches eine gesteigerte Rate an Knochenmetastasierungen bei Mammakarzinompatientinnen bewirkt [Hiraga et al., 2006].

### 1.3.7 GALNT3

GALNT3 gehört zu der Familie der GalNAc-Transferase und kodiert die UDP-GalNAc Transferase 3. Es transferiert N-Acetyl Galactosamine (Glykosylgruppen) an eine Hydroxygruppe eines Proteins (Seitenkette der Aminosäure Serin oder Threonin) im ersten Schritt der O-Glykosylierung der Oligosaccharidbiosynthese [Weizmann Institute of Science, 2017]. Eine abweichende Glykosylierung durch GALNT3

führt zu vielen Erkrankungen wie z.B der hereditären Skeletterkrankung (hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis) [Hussain et al., 2014] oder dem Hyperostosis-hyperphosphatemia Syndrome (HHS) [Ghafouri-Fard et al., 2015] und einer Veränderung in menschlichen Karzinomzellen.



## 1.4 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eventuelle Unterschiede in der Proteinexpression gezielt ausgewählter Gene bei Patientinnen mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten und sporadischen Mammakarzinom herauszufinden. Trotz der immer voranschreitenden Forschungs- und Therapieerfolge beim Mammakarzinom gibt es Subtypen, die mit einer sehr schlechten Prognose vergesellschaftet sind. Dazu gehören vor allem die triple negativen Mammakarzinome, die gehäuft eine BRCA1-Mutation aufweisen. Viele Studien befassen sich mit der Erforschung der Eigenschaften und Interaktionen des Stromas und dem angrenzenden Karzinom. Diese Interaktionen zwischen dem Stroma und dem angrenzenden Tumor basieren hauptsächlich auf löslichen Wachstumsfaktoren. Die Tumor-assoziierten Fibroblasten stellen dabei den dominierenden Zelltyp des Stromas dar.

Auf der Grundlage von aberranten Genexpressionen im Tumor und Stroma ist der Grundbaustein für eine Progression und Metastasierung beim Mammakarzinom gelegt. Aufgrund des unterschiedlichen Ansprechens einer Therapie unter Berücksichtigung der einzelnen Subtypen stellt sich die Frage, ob diese Interaktionen zwischen Stroma und Tumor in unterschiedlichen Individuen variabel ausgeprägt sind. Diese möglichen Unterschiede können der Grund für die Barriere einer erfolgreichen Therapie beim Mammakarzinom sein.

Über die Tumor-Stroma-Interaktionen beim hereditären Mammakarzinom, welche durch eine BRCA1- oder BRCA2-Genmutationen verursacht werden, ist bisher nur wenig bekannt. Interessanterweise wirkt ein Östrogenentzug bei BRCA1-Mutationsträgerinnen präventiv bezüglich einer Tumorentwicklung, obwohl die meisten der BRCA1-Karzinome triple negativ sind. Hier wird diskutiert, ob der präventive Effekt möglicherweise über ein endokrin ansprechendes Stroma vermittelt wird.

Der Einfluss des Tumorstromas auf das Tumorwachstum und dessen Progression wird zunehmend in den Focus wissenschaftlicher Arbeiten gerückt. In den letzten Jahren konnten hier umfangreiche Erkenntnisse über die Tumor-Stroma-Interaktion beim Mamma-

karzinom gewonnen werden. Auf dieser Grundlage bauen viele innovativ therapeutische Strategieansätze und Entwicklungen auf. In der speziellen Subgruppe der BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen liegen jedoch zur Zeit keine relevanten Forschungsergebnisse über die Bedeutung stromaler Faktoren vor. Ziel dieses Projektes war es, die stromalen Faktoren in diesem Patientinnenkollektiv zu charakterisieren sowie die Stromafibroblasten und Tumorzellen zu analysieren.

In Vorarbeiten von PD Dr. med. Maret Bauer wurden globale Genexpressionsprofile von TAF im Vergleich zu normalen Fibroblasten (NF) im mammären Stroma charakterisiert und insgesamt 30 differentiell regulierte Gene identifiziert, von denen 10 Gene durch alternative Methoden (RT-PCR, Immunhistochemie) validiert wurden [Bauer et al., 2010].

In dieser Arbeit sollte an den Mammakarzinomparaffinschnitten von BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen (65 Patientinnen) eine immunhistochemische Analyse der stromalen Proteinexpression ausgewählter Kandidatengene aus den Vorarbeiten durchgeführt werden (5 überexprimierte: ST6GALNAC5, GATA-3, WISP1, TGF $\beta$ 2 sowie GALNT3 und 3 unterexprimierte Gene: AKR1C1, AKR1C2 und KLF4). Als Vergleichskollektiv dienten Paraffinschnitte von 69 Patientinnen mit einem sporadischem Mammakarzinom.

Die Ergebnisse dieser Arbeit mögen Aufschluss über die Verteilung, Lokalisation und Intensität der exprimierten Proteine innerhalb des Stromas und die Beschreibung der einzelnen stromalen Komponenten sowie ihrer Proportionen zwischen den Patientinnen mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom und denen mit einem sporadischen Mammakarzinom geben.

Eine umfassende Analyse der Proteinexpression der Tumor-assoziierten Fibroblasten und Tumorzellen sollte mögliche Unterschiede in der Expression beim Vorliegen einer BRCA1-/BRCA2-Mutation zeigen und die Basis für neue zielgerichtete Therapieoptionen ebnen.

## 2. Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Tumorkollektiv

In dieser Studie wurden 134 maligne Mammatumore von 130 Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom untersucht. Das Tumorgewebe lag in Paraffin fixiertem Gewebe oder je nach Kohorte als fertige Objektträger vor. Es gab 2 Kohorten von Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom. Die erste Kohorte bestand aus 65 Patientinnen mit einer BRCA1- und/oder BRCA-2 Mutation. 15 von diesen Gewebeproben wurden vom Institut für Pathologie in Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. med. H.-H. Kreipe und 50 vom Institut für Pathologie in Bonn unter der Leitung von PD Dr. med. Nuran Bektas Serce zur Verfügung gestellt. Die zweite Kohorte setzte sich aus 69 Patientinnen mit einem sporadischen Mammakarzinom zusammen. Diese wurde als Vergleichskohorte benutzt und stammte aus dem Institut für Pathologie der Universität Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. med. Christoph Röcken. Alle Gewebeproben wurden von Frau Prof. Dr. med. Katharina Tiemann, Pathologin der Hämatopathologie Hamburg, erneut begutachtet und auf einen invasiven Tumoranteil geprüft. Die Übersicht der beiden Kohorten ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Bezeichnung	Präparate	Beschreibung
1. Kohorte	65	Patientinnen mit einer BRCA1- und/oder BRCA2-Mutation
2. Kohorte	69	Patientinnen mit einem sporadischen Mammakarzinom

Tabelle 2.1: Kohortenstruktur

### **2.1.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Substanzen, Primärantikörper, selbst hergestellte Lösungen**

Tabelle 2.2 listet alle in der Arbeit verwendeten Geräte und deren Hersteller auf. Tabelle 2.3 enthält alle verwendeten Verbrauchsmaterialien. Die Tabellen 2.4, 2.5 und 2.6 beinhalten die in der immunhistochemischen Färbung zum Einsatz gekommenen Substanzen, Primärantikörper und Sekundärantikörper. In der Tabelle 2.7 sind die selbst hergestellten Reagenzien und Lösungen zu finden.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axiolab 5 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Bond <sup>TM</sup> - maX System	A. Menarini Diagnostics Deutschland, Berlin
Inkubator, Heidolph 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Invertiertes Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG, Deutschland
Kolbenhubpipetten (0,5-1000 l $\mu$ l)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotom	Reichert-Jung SuperCut 2050, Mikrovid GmbH, Arnsberg, Deutschland
Mikrotom Klinge S 22	FEATHER <sup>®</sup> , Japan
Mikrotom Klinge S 35	FEATHER <sup>®</sup> , Japan
Mikrowelle	900 Watt , Sharp , Deutschland
Pipettierhilfe, Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Rotierender Plattformschüttler, Heidolph Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Schüttelwasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Vortexer, Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wärmebad	Kunz Instruments APS Dänemark
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.2: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser 24 x 50mm	Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger superfrost plus thermo scientific	Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Objektträgersystem	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Aqua dest.	Destille UFK Kiel
Citratpuffer pH 6,0	10 mmol Citrat, 0,05% Tween 20
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
DPBS (Phosphate buffered saline)	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline IBCO®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eukitt – Eindeckmedium	Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
Ethanol	Th. Geyer GmbH, Hamburg, Deutschland
Goat Normalserum/ Ziegen血清 Blocking Reagenz	DAKO GmbH Cat.NO. X0907, Hamburg, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco Invitrogen, Californien, USA Corporation, NY, USA
Tris HCL	Sigma Aldrich, Deutschland
Tween 20	Th. Geyer GmbH, Hamburg, Deutschland
30%-ige Hydrogenperoxidase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xyol	Th. Geyer GmbH, Hamburg, Deutschland
Waschpuffer pH 7,4	83,6g NaCl, 12,0g TIRS, 11ml HCL 25% Bernd Kraft GmbH, Deutschland

Tabelle 2.4: Substanzen



Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
GALNT3	Abgent/BioCatGmbH	1 : 200
GATA3	Atlas	1 : 200
AKR1C1	GeneTex	1 : 50
AKR1C2	Abnova	1 : 100
ST6GALNAC5	ProteinTechGroup	1 : 100
WISP1	R&D Systems	1 : 20
TGF $\beta$ 2	Abcam	1 : 500
KLF4	R&D Systems	1 : 40

Tabelle 2.5: Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Histofine Simple Stain Multi MAX PO	Medac GmbH, Wedel, Deutschland	ready to use
Rabbit anti goat biotinyla- ted	DAKO GmbH E 0466, Hamburg, Deutschland	1 : 1000

Tabelle 2.6: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
Citrat-Puffer	2,94g Tri-Na-Citrat-Dihydrat (10mM) werden in 1l Aqua dest. gelöst, pH = 6,0 einstellen
DAB (Substrat-Chromogen-Gebrauchslösung)	6mg DAB (1 DAB-Tablette) werden in 10ml 0,05M Trispuffer mit einem pH von 7,6 gelöst. 0,1ml 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> werden dazugegeben. Mischen, ggf. Präzipitat abfiltrieren.
DAPI	1 $\mu$ l DAPI-Grundlösung (Konzentration 5mg/ml) wird mit 99 $\mu$ l Blockierlösung verdünnt. Anschließend werden 1 $\mu$ l der entstandenen Lösung mit 399 $\mu$ l Blockierlösung gemischt, so dass eine Konzentration von 0,125 $\mu$ g/ml in 400 $\mu$ l entsteht.
DPBS	1%-iges BSA in PBS, 0,29g werden abgewogen 1% $\triangleq$ 29 = 100ml $\rightarrow$ 29ml DPBS
PBS (1 fach)	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,3g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> werden in 1l aqua dest. gelöst, pH=7,4 einstellen

Tabelle 2.7: selbst hergestellte Reagenzien / Lösungen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die Gewebeproben der Universitäten Bonn und Hannover wurden als fertige Objektträger zur Verfügung gestellt. Die Objektträger der Kohorte aus der Pathologie der Universität Kiel wurden selbst hergestellt. Die Gewebeblöcke waren bereits in Paraffin eingebettet. Das Schneiden der Gewebeblöcke wurde an einem Rotationsmikrotom durchgeführt. Die Dicke der Gewebeschnitte betrug 3 - 5  $\mu\text{m}$ . Sie wurden mit Hilfe eines warmen Wasserbades auf die silanisierten Objektträger aufgebracht. Diese Objektträger waren speziell für immunhistochemische Färbeprozesse beschichtet.

### 2.2.2 Immunhistochemische Färbung - Prinzip und Methodik

Ziel der Immunhistochemie (IHC) ist die Darstellung molekularer Strukturen in histologischen Gewebeschnitten. Dadurch ist es möglich, detaillierte Aussagen über die histologische Beschaffenheit von tumorösem Gewebe zu machen. Dieses wird durch das direkte oder indirekte Detektieren von Antigenepitopen mit Hilfe eines Antikörper-gekoppelten Markers ermöglicht. Mittlerweile wurden Methoden mit unterschiedlich hoher Anzahl von Zwischenschritten (Sekundär-, Tertiärantikörper etc.) entwickelt.

Immunhistochemische Färbungen sind aufgrund ihrer hohen Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion sehr genau [Boenisch and Henne, 2003]. In dieser Studie wurde eine indirekte Zwei-Schritt-Methode verwendet. Sie basiert auf der Bindung eines unkonjugierten Primärantikörpers an das Antigen. Gegen diesen Primärantikörper, der das Antigen darstellt, wird ein Sekundärantikörper aufgetragen. Der Sekundärantikörper ist enzymmarkiert und bindet dadurch an den Primärantikörper. Dieser ist gegen die Globuline der Primärantikörper gerichtet und führt somit zur Substrat-Chromogenreaktion. Damit diese Reaktion erfolgen kann, muss der Sekundärantikörper (z.B. Kaninchenimmunglobuline) entsprechend dem Primärantikörper (Kaninchen) gerichtet sein [Boenisch and Henne, 2003, Weir, 1986].

Nachfolgend sind die Arbeitsschritte für die Immunhistochemie aufgeführt.

## Entparaffinierung

Um die immunhistochemische Färbung durchführen zu können, mussten die Gewebeschnitte vollständig von Paraffin befreit und rehydratisiert werden. Die Epitope mussten frei vorliegen, so dass eine Antigen-Antikörper Reaktion stattfinden konnte. Eine unvollständige Entfernung führt zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung. Die Entparaffinierung erfolgte mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe in folgenden Schritten. Dazu wurden die Objektträger in:

1. Xylol für 20 min inkubiert und entparaffiniert
2. 3-4 mal in 100%-igem Ethanol für 1 min eingetaucht
3. 3-4 mal in 96%-igem Ethanol für 1 min eingetaucht
4. 3-4 mal in 96%-igem Ethanol für 1 min eingetaucht
5. 3-4 mal in 70%-igem Ethanol für 1 min eingetaucht
6. dreimaliges Waschen in Aqua dest.

## Hitzeinduziertes Antigen-Retrieval / Antigendemaskierung der Präparate

Nach der Formalindenaturierung wurde die Freilegung der Epitope durch eine weitere Vorbehandlung mit Hitze und Enzymen in einer Pufferlösung (Retrieval-Lösung) zur Wiederherstellung der Immunreaktivität gefördert. Das wurde durch die Auflösung der Aldehydvernetzung der Gewebeproteine erreicht. Die Objektträger mussten 20 Minuten in einem Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 unter Hitzeinwirkung bis nahe dem Siedepunkt (95 - 99 Grad Celsius) inkubiert werden. Die Hitzebehandlung erfolgte in einer Mikrowelle mit 900 Watt. Gefolgt von einer langsamen und vorsichtigen Abkühlung der Objektträger unter gering fließendem Leitungswasser über weitere 20 Minuten. Abschließend wurde eine dreimalige Waschung der Objektträger in Aqua dest. durchgeführt.

Die enzymatische Vorbehandlung bestand aus einer 20-minütigen Inkubation in einer 3%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung ( $\text{H}_2\text{O}_2$  in Aqua dest.). Das Ziel dieser Vorbehandlung war, die endogene Peroxidase im Mammagewebe zu inaktivieren. Granulozyten, Erythrozyten und Histozyten enthalten hauptsächlich diese endogene Peroxidase. Ohne die Inhibition der endogenen Peroxidase kann es während der IHC-Färbung zu Interferenzen wie einer

starken nicht spezifischen Hintergrundfärbung kommen. Daran schloss sich eine dreimalige Waschung in Aqua dest. sowie eine 5 minütige Waschung in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, isotonische Lösung) an. Der pH-Wert dieses Waschpuffers lag bei 7,4. Um die endogene Peroxidase im Mammagewebe nachzuweisen, wurde das Gewebe mit einer DAB-Lösung inkubiert. Eine Braunfärbung des Gewebes war der Beweis, dass diese vorhanden war und geblockt werden musste.

### **Inkubation mit Blockierungsserum**

Überflüssige und unerwünschte Reaktionen in Form von unspezifischen Anfärbungen entstehen ebenfalls durch Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers mit endogenen Immunglobulinen im Gewebe. Diese können durch Antiseren verhindert werden, indem hydrophobe Bindungen zwischen dem Sekundärantikörper und dem zu färbenden Gewebe verhindert werden. Bei allen unseren immunhistochemischen Färbungen haben wir Ziegenserum für diesen Vorgang eingesetzt. Es wurde für 20 Minuten vollständig auf den Objektträger aufgetragen und danach abgeschüttelt. Die Lösung setzte sich aus 1 ml Ziegenserum auf 10 ml steriles PBS zusammen.

### **Indirekte Zwei-Schritt-Färbemethode**

Die Inkubation mit den monoklonalen Primärantikörpern erfolgte über Nacht (20h). Alle Primärantikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung sind der Tabelle Primärantikörper 2.5 zu entnehmen. Nach Beendigung der Inkubation wurden alle Objektträger für 2 - 3 min in einem PBS-Puffer gewaschen. Zur farbigen Detektierung des Primärantikörper wurde ein Sekundärantikörper (Tabelle 2.6) angewendet, der für 30 Minuten auf die Objektträger aufgetragen wurde. Anschließend erfolgte die erneute Waschung der Objektträger für 2 - 3 Minuten mit einem PBS-Puffer.

### **Substrat-Chromogen-Färbung**

Eine DAB-Gebrauchslösung wurde für 5 Minuten auf den Objektträger aufgebracht. Danach erfolgte die Waschung in Aqua dest. zweimal jeweils für 1 Minute.

## **Gegenfärbung mit Hämalan**

Es ist empfehlenswert, die nicht spezifisch gefärbten Gewebeanteile gegenzufärben. Hämalan (pH 4,5) eignet sich durch die Blaufärbung der Zellkerne sehr gut zur Gegenfärbung. Andere Gewebestrukturen werden dagegen kaum angefärbt. Die Objektträger wurden für 4 Minuten mit Hämalan gefärbt und danach für 30 Minuten mit Leitungswasser gewaschen.

## **Entwässerung / Abdecken**

Abschließend wurden die Objektträger in aufsteigender Alkoholreihe mit 70%-igen, 96%-igen, nochmals 96%-igen und 100%-igen Ethanol entwässert. Danach wurde Eukitt auf das Gewebe aufgebracht und mit einem Deckglas luftdicht zur dauerhaften Konservierung verschlossen.

Bei allen acht Antikörperfärbungen wurde eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Die Positiv-Kontrolle enthielt das darzustellende Antigen, wodurch die Sensitivität bewiesen wurde. Im Gegensatz dazu enthielt die Negativ-Kontrolle das darzustellende Antigen nicht.

### **2.2.3 Erarbeitung von Färbeprotokollen der einzelnen Antikörper**

Ziel bei der Erarbeitung der einzelnen Färbeprotokolle war es, den optimalen Antikörpertiter zu ermitteln. Der optimale Antikörpertiter ist die maximale Verdünnung eines monoklonalen Antikörpers mit der eine maximale Anfärbung erreicht werden kann. Dabei spielt die Affinität des Antikörpers ebenfalls eine große Rolle. Bei einer höheren Affinität findet eine schnellere Reaktion und eine stärkere Färbung mit dem Antigen im Gewebe statt im Gegensatz zu einem Antikörper mit geringerer Affinität während gleicher Inkubationszeit. Die geeignete Verdünnung der Antikörper wurde durch Titration erreicht [Boenisch and Henne, 2003].

### 2.2.4 Immunhistochemische Färbungen mit dem Färbeautomat

Das Bond<sup>TM</sup>- maX System ist ein vollautomatisches Immunhistochemie-System, welches alle Arbeitsschritte von der Entparaffinierung bis zur Gegenfärbung durchführt. Die Färbungen an diesem Gerät wurden durch Marga Balvers am Institut für Hämatopathologie Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Katharina Tiemann vollzogen.

Mit dem Bond<sup>TM</sup>- maX System wurden die Färbevorgänge nach dem gleichen Prinzip, wie bereits im Kapitel Immunhistochemische Färbung - Methodik beschrieben, vollautomatisch durchgeführt. Der Gebrauch dieses Färbeautomaten hat viele Vorzüge gegenüber der manuellen immunhistochemischen Färbung wie z.B. verbesserte Reproduzierbarkeit, Qualität, Standardisierung und geringere Materialkosten. Eine Vakuum unterstützte Reagenzienverteilung führt zu einer gleichmäßigen, dünnen Reagenzienschicht auf dem Schnitt (100  $\mu$ l oder 150  $\mu$ l). Dadurch findet ein minimaler Reagenzienverbrauch statt und es kann eine bessere Reproduzierbarkeit der Färbungen durch standardisierte Arbeitsabläufe erreicht werden. Das stellt einen großen Vorteil dar, wenn multiple Objektträger gefärbt werden sollen. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 1152 Objektträger gefärbt [Boenisch and Henne, 2003, Diagnostics, 2008].

## 2.3 Auswertung

### 2.3.1 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte im onkologischen Labor der Universität Kiel an einem Axiolab 5 Mikroskop (Carl Zeiss AG) bei zehnfacher und zwanzigfacher Vergrößerung sowie am Institut für Hämatopathologie Hamburg an einem Mikroskop (Nikon Typ 120i) mit der gleicher Vergrößerung.

In der immunhistochemischen Auswertung werden spezifische und unspezifische Reaktionen und Färbintensitäten des Gewebes interpretiert. Unterschiedliche Intensitäten innerhalb eines gefärbten Schnittes können sich durch die ungleiche Verteilung von Antigenen in den Zellen ergeben. Ist kein Intensitätsunterschied festzustellen, kann das ein Hinweis auf eine unspezifische Färbung sein. Charakteristisch für eine spezifische Färbung ist die alleinige Anfärbung von Zellen, wobei sich die Bindegewebematrix und das Collagen durch eine unspezifische Färbung anfärben.

Die Morphologie des Stromas wurde unabhängig von der Markerexpression untersucht. Es folgen die Kriterien der Kategorisierung der Morphologie und Markerexpression:

#### Morphologie

1. **Stromaproportion** <11%; 11 bis 10%; 21 bis 30%; 31 bis 40%; 41 bis 50%; 51 bis 60%; 61 bis 70%; 71 bis 80%; 81 bis 90%; >90%
2. **Verteilungsmuster des Stromas** verzweigt/baumartig; diffus; Nester/Inseln; andere
3. **Zellreichtum des Stromas** zellarm; mittel; zellreich
4. **lymphozytäres Infiltrat** keines; gering; ausgeprägt



## Markerexpression

1. **Expression in Fibroblasten** (1. Anteil: negativ; <11%; 11 bis 10%; 21 bis 30%; 31 bis 40%; 41 bis 50%; 51 bis 60%; 61 bis 70%; 71 bis 80%; 81 bis 90%; >90% 2. Intensität: negativ; schwach; mäßig; stark; andere - entspricht nicht auswertbar)
2. **Expression in Tumorzellen** (1. Anteil: negativ; <11%; 11 bis 10%; 21 bis 30%; 31 bis 40%; 41 bis 50%; 51 bis 60%; 61 bis 70%; 71 bis 80%; 81 bis 90%; >90% 2. Intensität: negativ; schwach; mäßig; stark; andere - entspricht nicht auswertbar)
3. **Expression in anderen Stromakomponenten** (Lymphozyten, Endothelzellen, Makrophagen) 1.Anteil: 0%; partiell; alle 2. Intensität: negativ; positiv

In die immunhistochemische Auswertung der gefärbten Mammakarzinom Präparate wurde Christina Richter von der Gynäkologin PD. Dr. med. Maret Bauer und der Pathologin Prof. Dr. med. Katharina Tiemann gewissenhaft eingearbeitet. Die immunhistochemische Auswertung erfolgte getrennt für jeden der acht Antikörper. Die Auswertungsergebnisse wurden von der Pathologin Prof. Dr. med. Katharina Tiemann geprüft. Es fanden sich nur sehr geringfügige Abweichungen in der Auswertung, die sofort korrigiert wurden.

### 2.3.2 Statistische Auswertung

Die anhand des oben aufgeführten immunhistochemischen Scores erhobenen Daten wurden initial in einer Excel-Tabelle dokumentiert. Zur weiteren Bearbeitung und Analyse wurden die Daten im Anschluss in eine relationale Datenbank (MySQL Server 5.6<sup>1</sup>) überführt.

### Deskriptive Statistik

Im ersten Schritt wurden für die erhobenen Merkmale deskriptive Statistiken berechnet. Dazu wurden die Beobachtungen auf Basis der Kategorisierungen für Verteilung und Intensität aggregiert und als Säulendiagramme relativ zur Gesamtheit der Messgruppe dargestellt.

---

<sup>1</sup><https://dev.mysql.com/downloads/mysql/>

## Schließende Statistik

Alle in dieser Arbeit beschriebenen und verwendeten statistischen Analysen und Korrelationen wurden mit dem Programm Past3<sup>2</sup>, einer frei verfügbaren Software zur wissenschaftlichen Datenanalyse (MacOS - Version 3.16, englisch) durchgeführt. Signifikanztests wurden auf einem  $\alpha$ -Niveau von 0,05 (zweiseitiger Test) durchgeführt, d.h. p-Werte kleiner als 0,05 sprechen für signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Analyse der Unterschiede zwischen den Kohorten wurde auf Basis der Verteilung und Intensität der Färbung in Fibroblasten, Tumorzellen bzw. Stromata durchgeführt. Zur Bestimmung der Unterschiede wurde die Kombination aus Verteilung und Intensität in den jeweiligen Zelltypen mit dem One-Way ANOSIM Verfahren getestet. ANOSIM ist eine multivariate Analysemethode, welche besonders gut für die Untersuchung von Unterschieden zwischen Gruppen mit korrelierenden Variablen geeignet ist [Bellack and Hersen, 1998].

---

<sup>2</sup><https://folk.uio.no/ohammer/past/>

### 3. Ergebnisse

Das Mammakarzinom ist als ein Organsystem anzusehen, in welchem reziproke Interaktionen zwischen den epithelialen Tumorzellen und dem umgebenden Gewebestroma stattfinden. Die Subgruppe der hereditären Mammakarzinome basierend auf einer BRCA1- und/oder BRCA2-Genmutation zeichnet sich durch besondere histopathologische und prognostische Charakteristika gegenüber den sporadischen Mammakarzinomen aus. In der vorliegenden Arbeit wurden stromale Faktoren bei Brustkrebspatientinnen mit einer BRCA1- und/oder BRCA2-Mutation im Hinblick auf morphologische Charakteristika und Proteinexpression ausgesuchter Kandidatengene analysiert.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung und der Proteinexpression von 8 unterschiedlichen Markern präsentiert. Insgesamt konnten 1039 der 1072 Proben im Rahmen der immunhistochemischen Färbung ausgewertet werden. Eine zytoplasmatische Expression zeigten die Antikörper AKR1C1, AKR1C2, ST6GALNAC5, TGF $\beta$ 2 und GALNT3. Der Marker KLF4 hatte eine Expression im cytoplasmatischen sowie nukleären Kompartiment und GATA-3 erwies überwiegend eine nukleäre Expression. Die Ergebnispräsentation unterteilt sich in vier Abschnitte. Abschnitt 3.1 geht dabei auf die morphologischen Untersuchungen des Stromas ein. Abschnitte 3.2 bis 3.9 geben die Ergebnisse der Proteinexpression der Fibroblasten, der übrigen Stroma- sowie der Tumorkomponenten für die jeweiligen Antikörper wieder.

## 3.1 Morphologische Untersuchungen

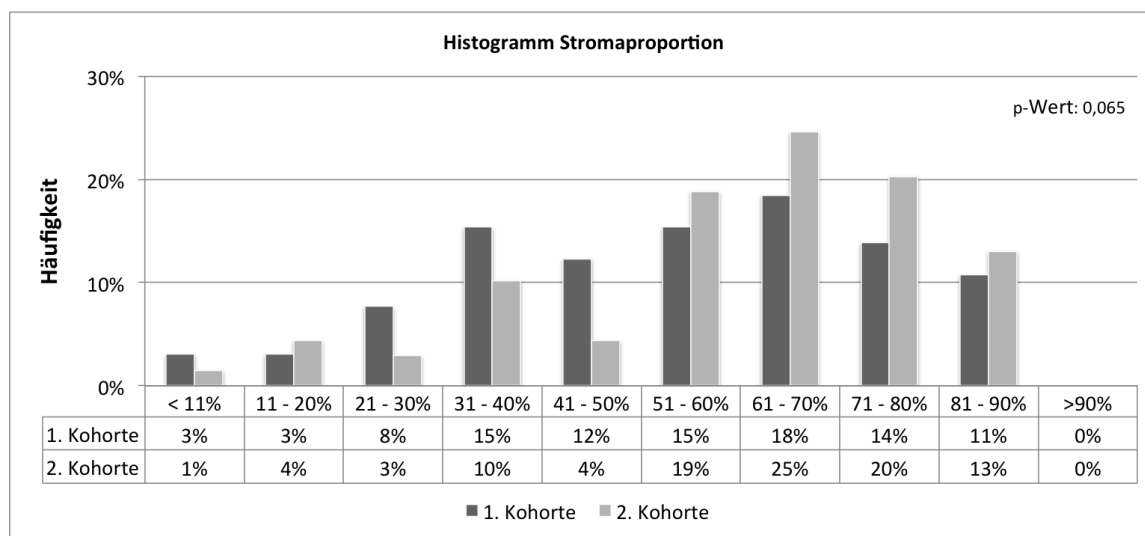
Im Folgenden werden die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen des Stromas nach Proportion, Verteilungsmuster, Zellreichtum und lymphozytärem Infiltrat dargestellt. Ziel dieser Untersuchung war es, signifikante Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Bezug auf die Morphologie des Stromas eines Mammakarzinoms bei BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen und dem eines sporadischen Mammakarzinoms festzustellen.

Insgesamt konnten 134 invasive Mammakarzinome von 130 Patientinnen evaluiert und ausgewertet werden. Für die 65 Proben des Kollektives mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinoms lagen keine klinischen Informationen vor. Es gab keine Daten über das Alter der Patientinnen, histopathologische Informationen oder welche Art von BRCA-Mutation vorlag. Die zugehörigen klinischen und histomorphologischen Informationen wie Alter der Patientinnen und Tumorphistologie waren lediglich für die 69 Proben des sporadischen Mammakarzinoms zugänglich.

### 3.1.1 Analyse der Stromaproportion

Die auf der Basis der mikroskopischen Auswertung identifizierten Stromaproportionen werden in der Abbildung 3.1 nach den in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Kohorten dargestellt. Die Grenze zwischen stroma-arm und -reich liegt bei 50%. Daraus ergibt sich die Tumor-Stroma-Ratio (TSR). Eine niedrige TSR impliziert einen großen Stromaproportionsanteil [Wu et al., 2016]. In der Kohorte der Mutationsträgerinnen zeigte sich mit 58% eine niedrige TSR, also ein stroma-reiches Tumorareal. Dieser Wert lag in der Kohorte des sporadischen Mammakarzinoms bei 77%. Somit konnte gezeigt werden, dass der Stromaanteil proportionsmäßig den größten Anteil am Präparat einnahm. Dieser Unterschied zwischen dem Stromaanteil der Präparate der BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen und dem sporadischen Mammakarzinom war jedoch statistisch nicht signifikant. Der p-Wert betrug 0,065. Aus diesen Ergebnissen geht die Annahme hervor, dass die Mutationsträgerinnen tendenziell einen kleineren Stromaanteil als die Patientinnen mit einem sporadischen Mammakarzinom aufweisen.

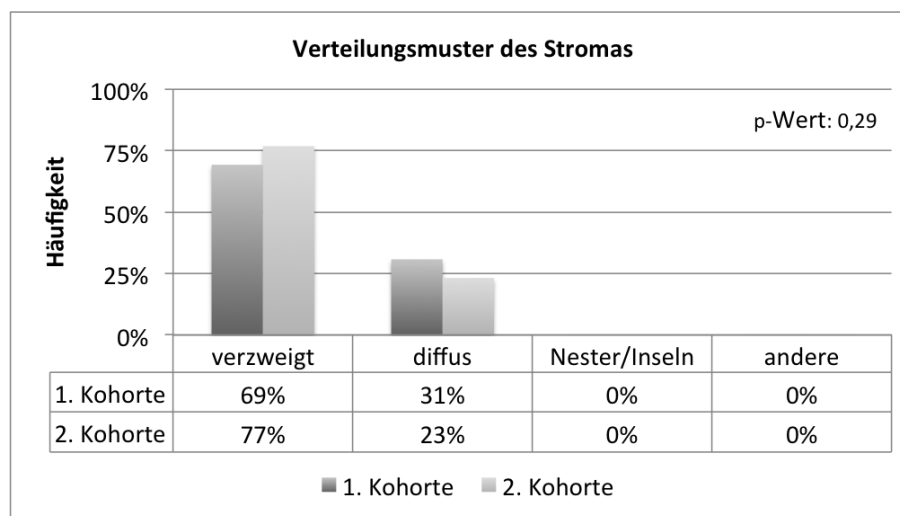
Abbildung 3.1: Histogramm der Stromaproportion über 2 Kohorten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.1.2 Analyse des Verteilungsmusters des Stromas

Bei einem invasiven Mammakarzinom infiltrieren die Karzinomzellen das umliegende Stroma. Das unterscheidet diese von einem nicht invasiven Mammakarzinom, wo keine Stromainfiltration nachweisbar ist. Das Tumorstroma, der nicht epitheliale Anteil eines Mammakarzinoms, kann dabei verschiedene Verteilungsmuster aufweisen: verzweigt bzw. baumartig, diffus und Nester bzw. Inseln. In diesen Untersuchungen zeigte das Tumorstroma hauptsächlich ein verzweigt, baumartiges oder ein diffuses Verteilungsmuster. In der Gruppe der BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen wiesen ca. 69% der untersuchten Tumore ein verzweigt oder baumartig wachsendes Stroma auf. Bei den Patientinnen mit einem sporadischen Mammakarzinom zeigten ca. 77% der Präparate solch eine Stromaverteilung. Damit war ein verzweigtes oder baumartiges Stroma die häufigste Verteilungsform des Stromas bei einem Mammakarzinom, unabhängig vom Vorhandensein einer BRCA1-/BRCA2-Mutation. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilungsform zwischen den beiden untersuchten Gruppen von Patientinnen nachgewiesen werden. Der Signifikanzwert lag bei 0,29.

Abbildung 3.2: Histogramm der Verteilungsmuster des Stromas 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

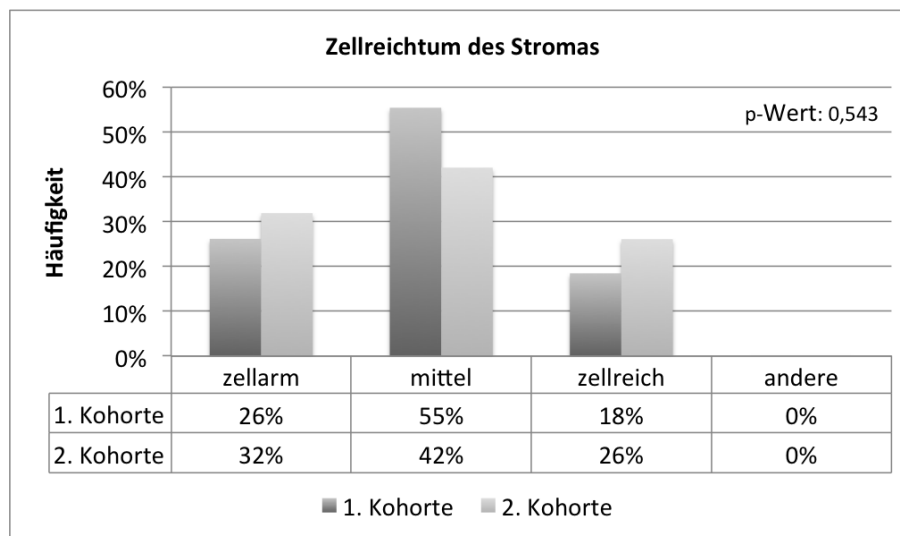


### 3.1.3 Analyse des Zellreichtums des Stromas

Das bindegewebige Stroma der Brust unterteilt sich zum einen in ein interlobuläres Stroma, welches relativ zellarm und kollagenreich ist und somit viele Fasern aufweist. Dieses straffe Bindegewebe hat einen hohen Anteil an Adipozyten, Blut- und Lymphgefäßen. Es befindet sich um die extralobulären terminalen Ductuli. Im Gegensatz dazu ist das intralobuläre Stroma, welches sich zwischen den terminalen Ductuli bzw. Azini befindet, zellreich und faserarm mit vielen Proteoglykanen [Heywang-Köbrunner and Schreer, 2015]. Neben zellreich und zellarm nahmen wir ein mittleres Zellreichtum und andere in die morphologische Auswertung mit auf. In beiden untersuchten Gruppen konnte am häufigsten ein mittleres Zellreichtum festgestellt werden. Bei den BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen waren es ca. 55%, während bei denen mit einem sporadischen Mammakarzinom der Anteil bei ca. 42% lag. Das Stroma setzt sich aus Zellen (Fibroblasten, Adipozyten, Histozyten, Makrophagen, Leukozyten, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten), der ECM (mit Glykosaminoglykane, Glycoproteine, Proteoglykane) und kollagenen sowie elastischen Fasern zusammen. Diese können in variablen Mengen vorkommen. Sie übernehmen die Abwehr-, Ernährungs- und Stützfunktion. Ein zellreiches Stroma war bei den Mutationsträgerinnen mit nur ca. 18% und bei den sporadisch Erkrankten mit ca. 26% vertreten. Ein zellarmes

Stroma zeigte sich mit ca. 26% bei den Mutationsträgerinnen und mit ca. 32% bei der Vergleichsgruppe. Die Signifikanzanalyse ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des stromalen Zellreichtums bei BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen und Patientinnen mit einem sporadischen Mammakarzinom (p-Wert = 0,543).

Abbildung 3.3: Histogramm über das Zellreichtum des Stromas. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



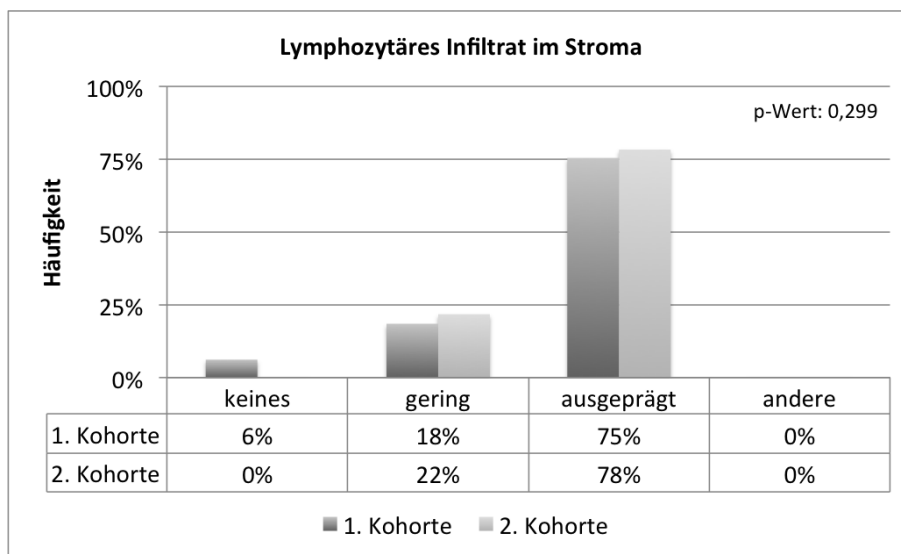
### 3.1.4 Analyse des lymphozytären Infiltrates des Stromas

Das Stroma eines Mammakarzinoms zeichnet sich vor allem durch das Vorliegen eines lymphozytären Infiltrates aus. In dieser Arbeit wurden die Präparate der BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen und der sporadisch erkrankten Patientinnen nach dem Vorliegen eines geringem, ausgeprägten oder abwesendem lymphozytären Infiltrat untersucht. In nur ca. 6% der Fälle konnte bei den Mutationsträgerinnen kein lymphozytäres Infiltrat nachgewiesen werden. Beide untersuchten Kohorten zeigten hauptsächlich ein ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat. Bei den Mutationsträgerinnen waren es ca. 75% und in der sporadischen Kohorte ca. 78%. Eine geringe Ausprägung des lymphozytären Infiltrates fand sich bei ca. 18% der Mutationsträgerinnen und bei ca. 22% der Patientinnen mit einem sporadischen Karzinom. Im Bezug auf die lymphozytäre Infiltration gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Kollektiven. Der

p-Wert betrug 0,299.

Schlussendlich belegen die vorliegenden Ergebnisse, dass die morphologischen Analysen hinsichtlich der untersuchten Punkte (Zellreichtum, Proportion usw.) keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten ergeben haben.

Abbildung 3.4: Histogramm über das lymphozytäre Infiltrat des Stromas. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



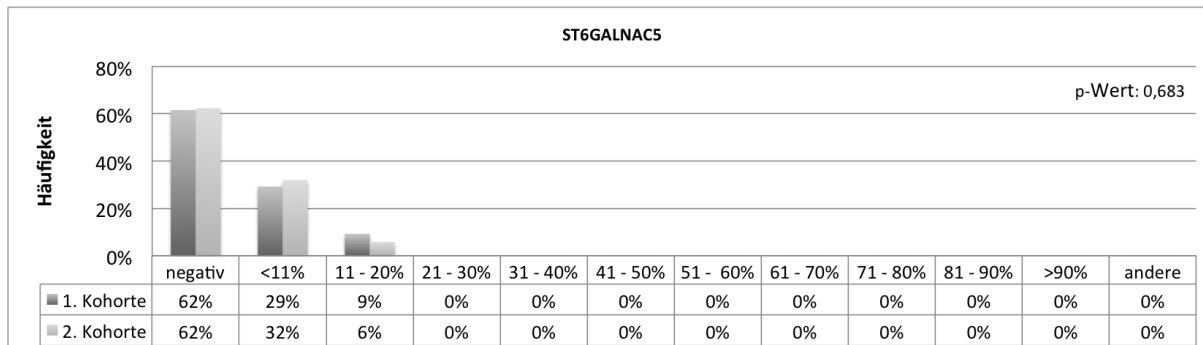


## 3.2 Immunhistochemische Färbung mit ST6GALNAC5

### 3.2.1 Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten

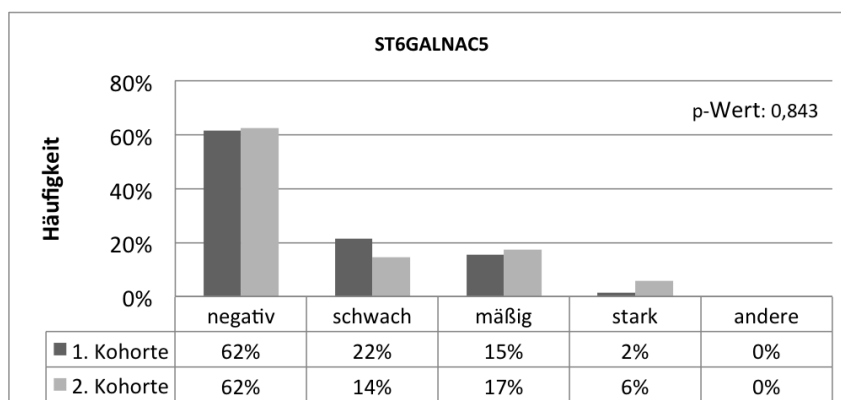
Die Proteinexpression von ST6GALNAC5 in den Fibroblasten (Abbildung 3.5) zeigte eine annähernd identische Verteilung für die BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen (Kohorte 1) und den sporadisch erkrankten Patientinnen (Kohorte 2). Folgend der Ergebnisse der Kohortenstruktur und dem p-Wert von 0,683 ließ sich ableiten, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kollektiven gab. In beiden untersuchten Kohorten zeigte der überwiegende Teil mit jeweils 62% eine negative Markerexpression. Die übrigen Proben beider Kollektive erwiesen nur eine sehr geringe Expression.

Abbildung 3.5: Proteinexpression von ST6GLANAC5 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Ein ähnliches Bild ließ sich bei der Betrachtung der Verteilung der Intensität von ST6GALNAC5 in den Fibroblasten erkennen (Abbildung 3.6). Die Expressionsstufen der positiven Fibroblasten verteilten sich in beiden Kohorten von schwach bis mäßig annähernd gleich. Die Intensität der Expression von ST6GALNAC5 zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kollektiven (p-Wert= 0,843).

Abbildung 3.6: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von ST6GALNAC5. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.2.2 Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen

Die Ausprägung von ST6GALNAC5 in Tumorzellen wird in der Abbildung 3.7 dargestellt. Im Gegensatz zur Fibroblastenexpression besaß das Tumorgewebe eine deutlich höhere Reaktion in beiden Kohorten. In dem Kollektiv mit einer BRCAm (BRCA1-/2-Mutation) zeigten lediglich 26% und in dem des sporadischen Mammakarzinoms nur 6% der Präparate keine Markerexpression. Die Verteilung der ST6GALNAC5-Expression im Tumorgewebe war deutlich weiter gefächert als in den der Fibroblasten. Zwar lag das Cluster-Zentrum der Expression immer noch im unteren Bereich, aber das Spektrum reichte weiter nach oben. Die Variabilität der Tumorexpressionsverteilung erwies sich in beiden Kohorten als annähernd gleich. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expressionsverteilung der Tumorzellen bei der Antikörperfärbung mit ST6GALNAC5 (p-Wert= 0,053). Bei der Betrachtung der Intensität von ST6GALNAC5 in den Tumorzellen war der Unterschied zu den Fibroblasten ebenfalls ersichtlich - Abbildung 3.8. Mengenmäßig erwies sich in beiden Kollektiven am häufigsten eine mäßige gefolgt von einer starken Expression. Jedoch bestand bei der Betrachtung der Intensität der Expression in den Tumorzellen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Kohorten (p-Wert< 0,001). Dieser hoch signifikante Unterschied ergab sich durch die gehäuft negative Markerexpression in dem Kollektiv mit einer BRCAm im Gegensatz zu der stärkeren mäßigen Expression in dem Kollektiv mit einem sporadischen Mammakarzinom.

Abbildung 3.7: Proteinexpression in positiven Tumorzellen von ST6GLANAC5. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

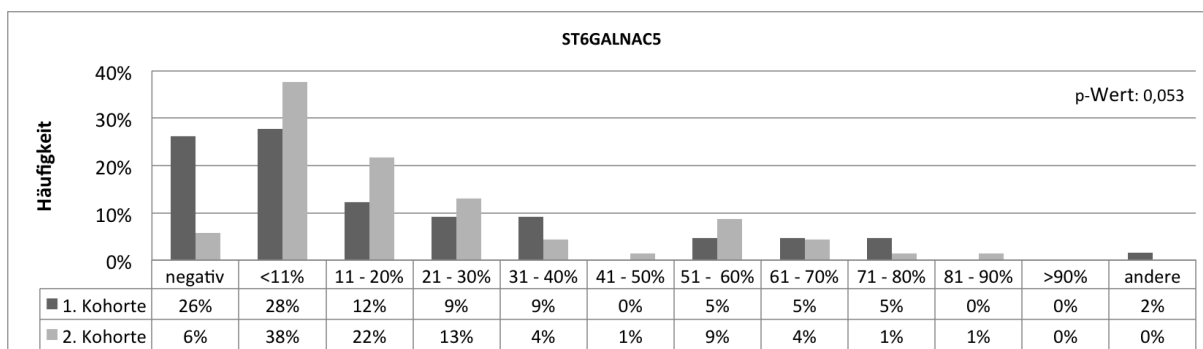
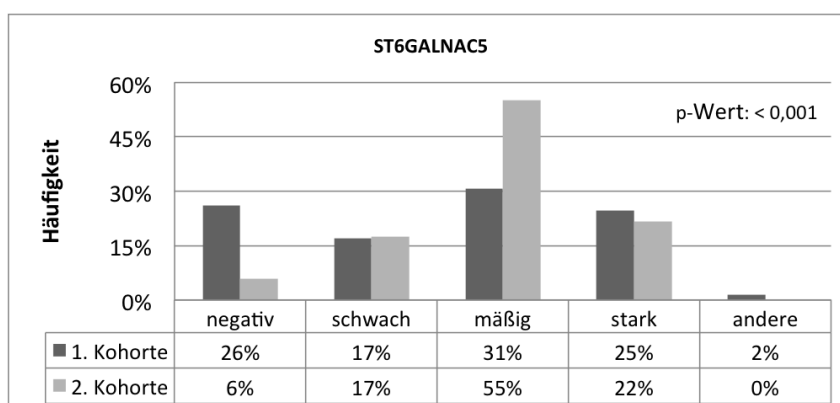


Abbildung 3.8: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von ST6GLANAC5. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.2.3 Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten

Die Proteinexpression für ST6GALNAC5 in anderen Stromakomponenten ist in Abbildung 3.9 abgebildet. In dieser Analyse konnte eine statistisch signifikante Differenz zwischen der Proteinexpression der beiden Kohorten nachgewiesen werden (p-Wert= 0,005). Die Kohorte des sporadischen Mammakarzinoms hatte eine stärkere Markerexpression in anderen Stromakomponenten.

Abbildung 3.9: Proteinexpression von ST6GLANAC5 in anderen positiven Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

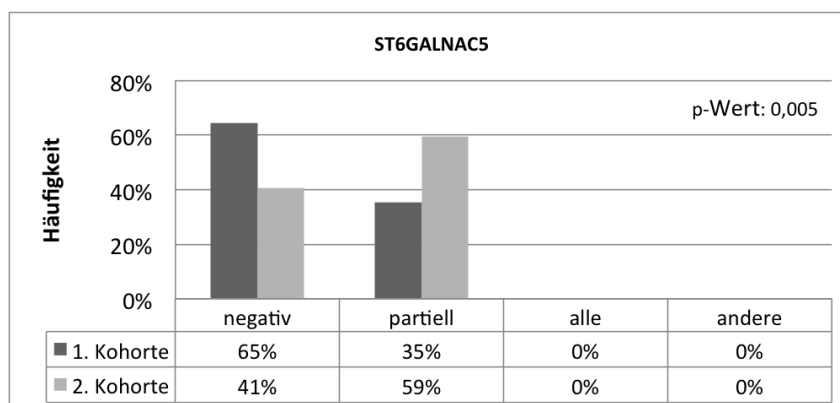
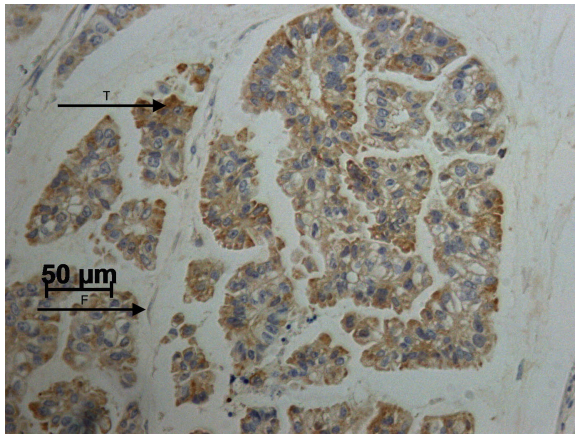


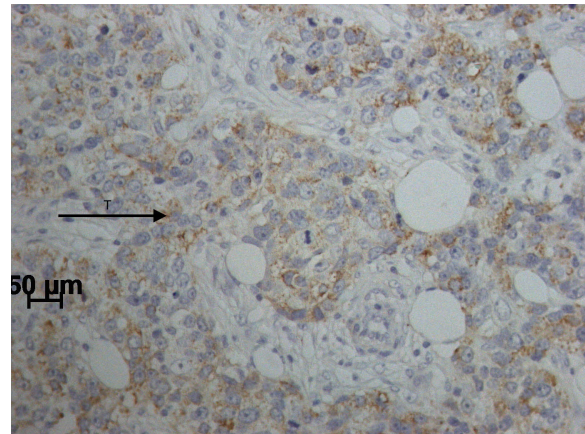
Abbildung 3.10: Zytoplasmatische Ausprägung der immunhistochemische Färbung von Tumorzellen und TAF mit ST6GLANAC5

- (a) mäßige ST6GALNAC5-Expression der TAF bei starker ST6GALNAC5-Expression in den Tumorzellen
- (b) mäßige Expression von ST6GALNAC5 in den Tumorzellen
- (c) schwache ST6GALNAC5-Expression von ST6GALNAC5 in den TAF und Tumorzellen

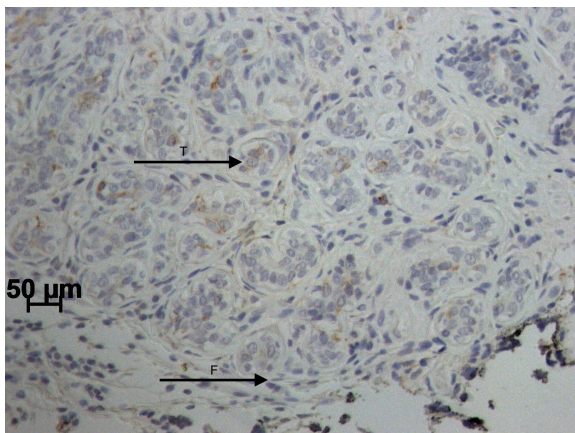
Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF



(a)



(b)



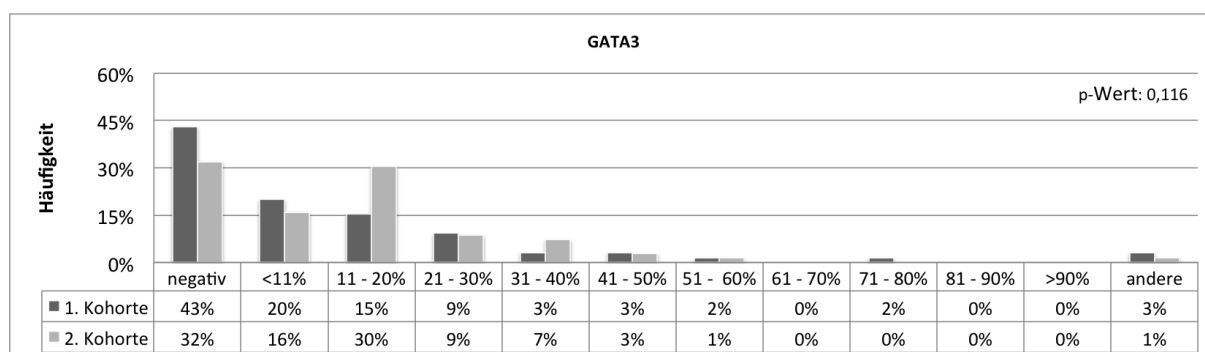
(c)

### 3.3 Immunhistochemische Färbung mit GATA-3

#### 3.3.1 Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten

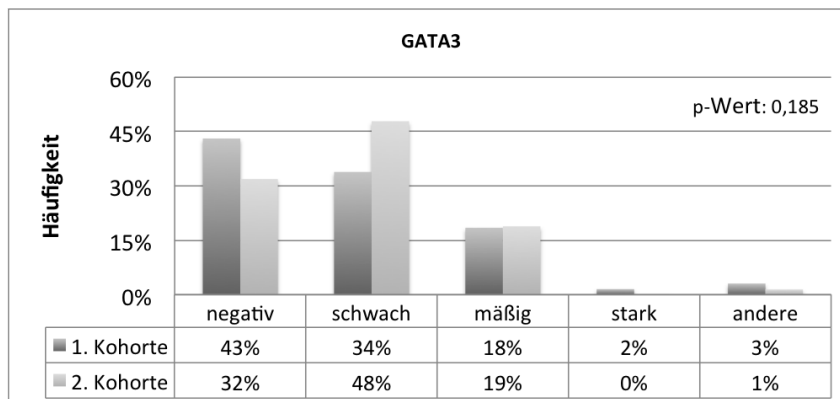
Die Analyse der GATA-3 Ausprägung in den Fibroblasten (Abbildung 3.11) präsentierte zu großen Anteilen keine Expression in beiden Kollektiven. Das Cluster-Zentrum der Expression in den Fibroblasten lag in beiden Kohorten annähernd symmetrisch in dem Bereich von unter 11 bis 50% abfallend. Alle Werte aggregiert betrachtet zeigte die Fibroblastenexpression der beiden Kohorten keinen statistisch signifikanten Unterschied (p-Wert= 0,116).

Abbildung 3.11: Proteinexpression von GATA-3 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Die Ergebnisse der Intensität der GATA-3-Expression in den Fibroblasten (Abbildung 3.12) ergaben am häufigsten eine schwache Expression in beiden Kohorten (Kohorte 1 mit 34% und Kohorte 2 mit 48%). Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied innerhalb dieser Auswertung zwischen der Kohorte 1 und 2 vor. Der p-Wert betrug 0,185.

Abbildung 3.12: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von GATA-3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.3.2 Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen

Im Gegensatz zur Ausprägung von GATA-3 in den Fibroblasten ließ sich in den Tumorzellen eine deutlich stärkere GATA-3-Expression erkennen (siehe Abbildung 3.13). Die Konzentration der Proteinexpression war vor allem an den Rändern des beobachteten Spektrums vorzufinden. So hatten 24% der Präparate der Kohorte 1 und 16% der Kohorte 2 eine GATA-3-Expression in dem Bereich von weniger 11 bis 20%. 32% der Präparate der Kohorte 1 und 43% der Kohorte 2 zeigten eine Markerexpression in dem Bereich 61 bis 90%. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten (p-Wert= 0,119).

Die Intensitätsverteilung der Expression von GATA-3 in den Tumorzellen (Abbildung 3.14) stellte für beide Kollektive am häufigsten eine mäßige Expression dar. Dicht gefolgt zeigte sich mengenmäßig eine schwache und am geringsten eine starke Expression von GATA-3 in beiden Kohorten. Es bestand keine statistisch differentielle Expression zwischen den beiden untersuchten Patientinnenkollektiven (p-Wert= 0,556).

Abbildung 3.13: Proteinexpression in Tumorzellen von GATA-3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

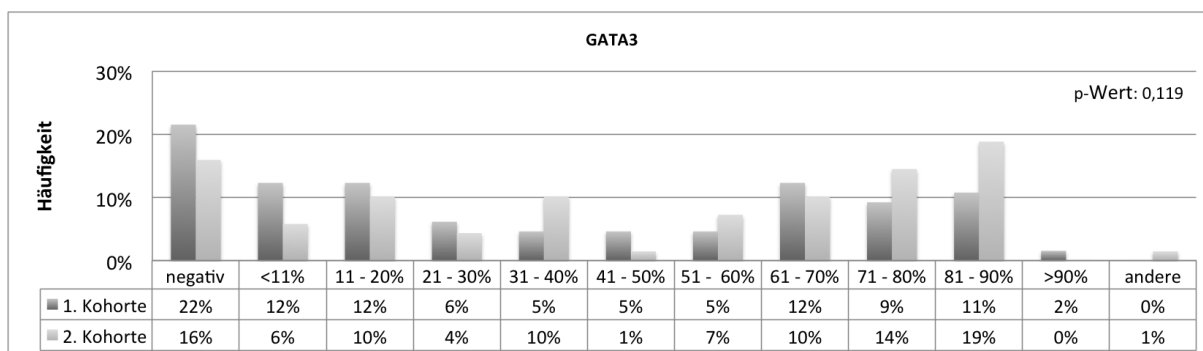
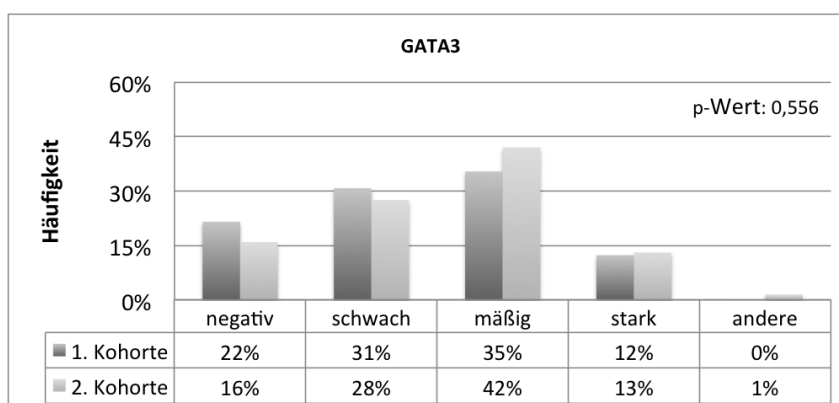


Abbildung 3.14: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von GATA-3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom





### 3.3.3 Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten

Die Ergebnisse der GATA-3 Expression in den anderen Komponenten des Stromas (Abbildung 3.15) ergab für beide Kohorten am häufigsten eine partielle Proteinexpression. In der Kohorte 1 waren es 58% und in der Kohorte 2 71%. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von GATA-3 in den anderen Stromakomponenten nachgewiesen werden (p-Wert= 0,129).

Abbildung 3.15: Proteinexpression von GATA-3 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

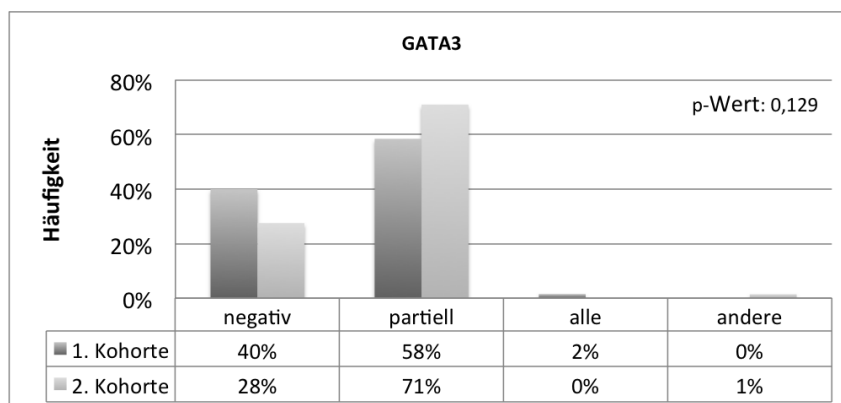
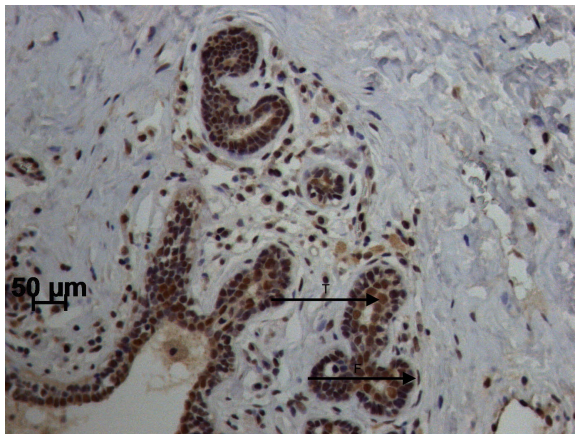


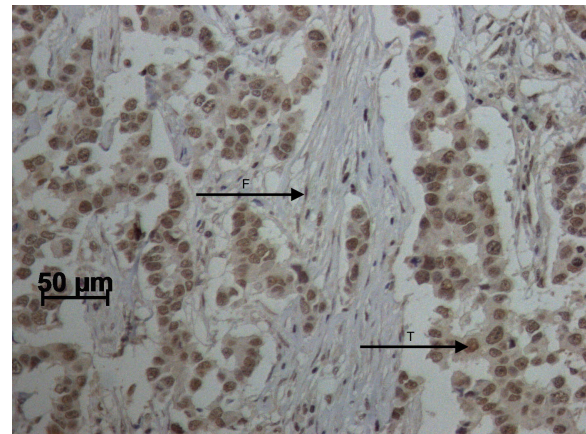
Abbildung 3.16: Überwiegend nukleäre Ausprägung der immunhistochemische Färbung von Tumorzellen und TAF mit GATA-3

- (a) starke GATA-3-Expression in den TAF und Tumorzellen
- (b) mäßige Expression von GATA-3 sowohl in den TAF als auch in den Tumorzellen
- (c) schwache GATA-3-Expression in den TAF und Tumorzellen

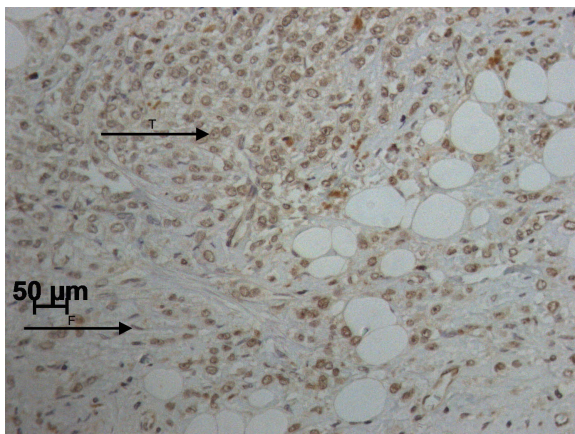
Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF



(a)



(b)



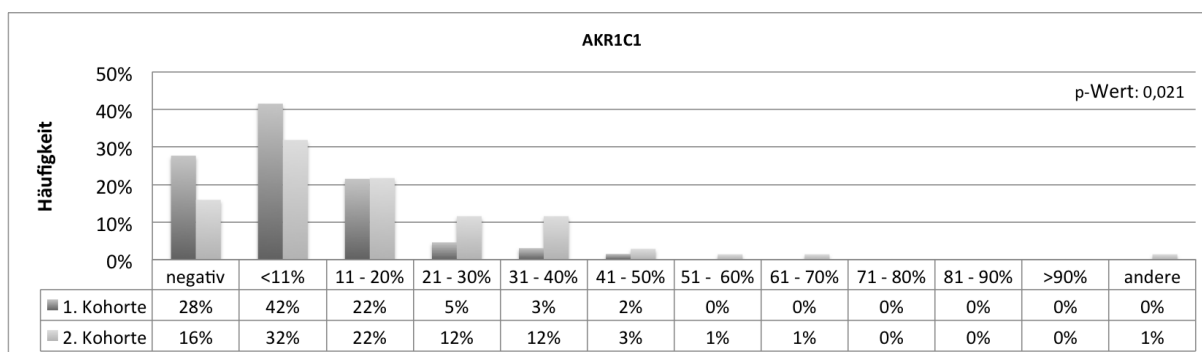
(c)

## 3.4 Immunhistochemische Färbung mit AKR1C1

### 3.4.1 Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten

Die Proteinexpression von AKR1C1 in den Fibroblasten bei einem Mammakarzinom mit einer BRCA1-/BRCA2-Mutation sowie einem sporadischen Mammakarzinom wird in Abbildung 3.17 dargestellt. AKR1C1 wurde überwiegend in beiden Kohorten nur in geringen Anteilen exprimiert. Der größte Anteil der AKR1C1-Expression in den Fibroblasten der Kohorte mit einer BRCA-M lag mit 64% in dem Bereich weniger 11 bis 20%. Im Vergleich dazu zeigte sich beim sporadischen Mammakarzinom eine Überexpression in den Fibroblasten im Bereich unter 11 bis 40%. Dieser Anteil betrug insgesamt 78%. Die Signifikanzanalyse ergab einen statistisch signifikanten Unterschied in der Verteilung der Expression der Fibroblasten hinsichtlich einer schwächeren Ausprägung in den Proben des BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinoms (p-Wert= 0,021).

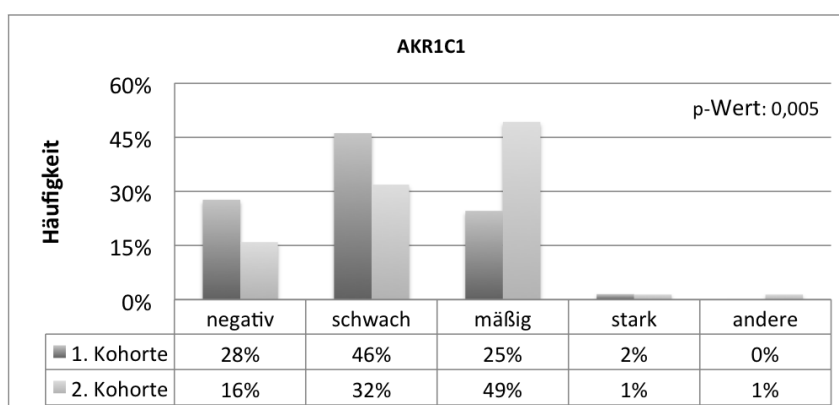
Abbildung 3.17: Proteinexpression von AKR1C1 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Die Verteilung der Intensität der AKR1C1-Expression in Fibroblasten (Abbildung 3.18) erwies für die Kohorte 1 (46%) am häufigsten eine schwache Intensität. Im Gegensatz dazu ergab die mikroskopische Auswertung für die Kohorte 2 mit 49% am häufigsten eine mäßige Intensität.

Somit wurde auch hier ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven im Bezug auf die Intensität der Proteinexpression mit AKR1C1 nachgewiesen. Der p-Wert hatte hierbei eine Signifikanz von 0,005.

Abbildung 3.18: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von AKR1C1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



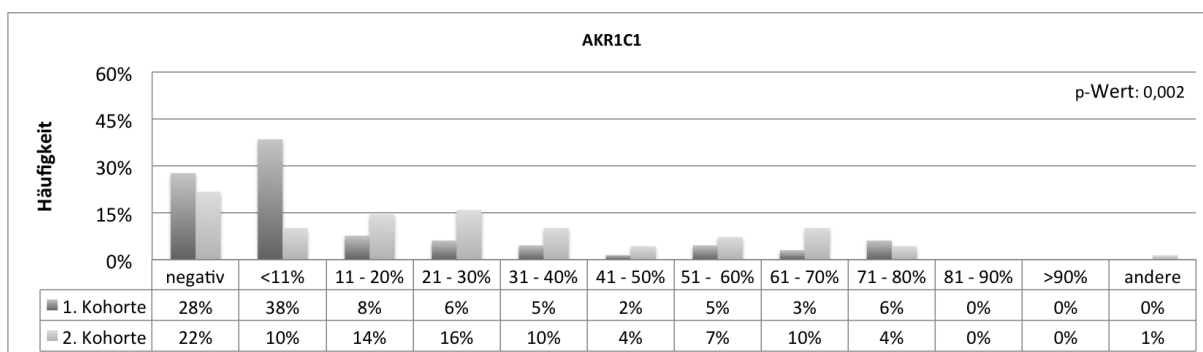
### 3.4.2 Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen

In der Abbildung 3.19 ist die Expression von AKR1C1 in den Tumorzellen graphisch dargestellt. In der Kohorte 1 war mit 38% der größte Anteil der Proteinexpression in dem Bereich unter 11% positiver Tumorzellen. 28% der Patientinnen der Kohorte 1 zeigten keine Expression von AKR1C1 in den Tumorzellen. Dagegen konnte in der Kohorte 2 bei 22% der Proben keine Expression in den Tumorzellen nachgewiesen werden. Die restlichen Proben der Patientinnen der Kohorte 2 präsentierten eine sehr geringe Ausprägung über den gesamten Bereich von unter 11 bis 80% positiver Tumorzellen.

Die Ergebnisse der Proteinexpression von AKR1C1 in den Tumorzellen erreichten eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,002. Dies war zurückzuführen auf den

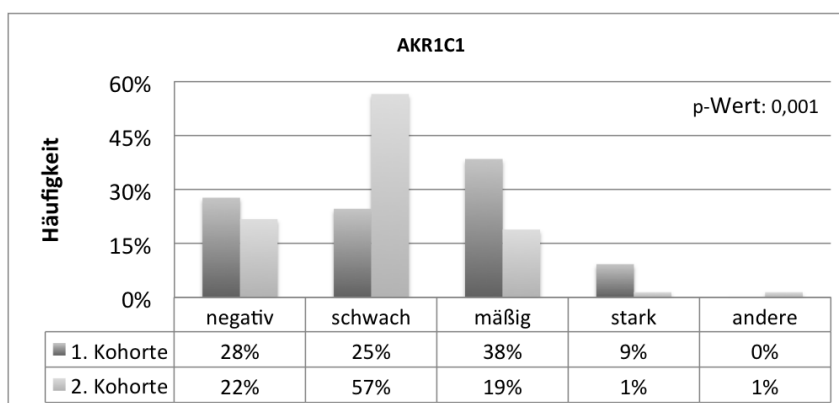
größeren Anteil an Tumorzellen mit einer positiver AKR1C1-Expression in der Gruppe des sporadischen Mammakarzinoms.

Abbildung 3.19: Proteinexpression in Tumorzellen von AKR1C1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Während in der Kohorte 1 am meisten eine mäßige Expression (38%) nachweisbar war, hatte die Kohorte 2 am häufigsten eine schwache AKR1C1-Expression (56%) in den Tumorzellen. Der p-Wert von 0,001 war in dieser Untersuchung hoch signifikant. Das Diagramm dieser Auswertung ist in der Abbildung 3.20 dargestellt.

Abbildung 3.20: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von AKR1C1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.4.3 Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten

Aus der Abbildung 3.21 geht deutlich hervor, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Expression von AKR1C1 in anderen Stromakomponenten zwischen den beiden Patientinnenkollektiven gab. In beiden Kohorten war mit Abstand eine partielle Proteinexpression am häufigsten vertreten (p-Wert= 0,058).

Abbildung 3.21: Proteinexpression von AKR1C1 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

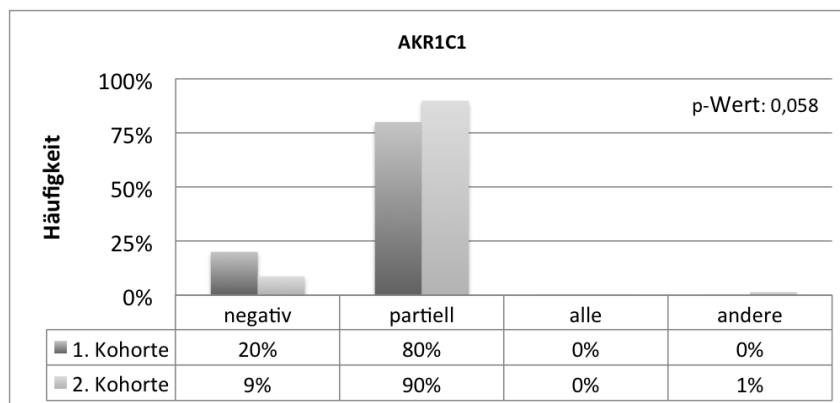
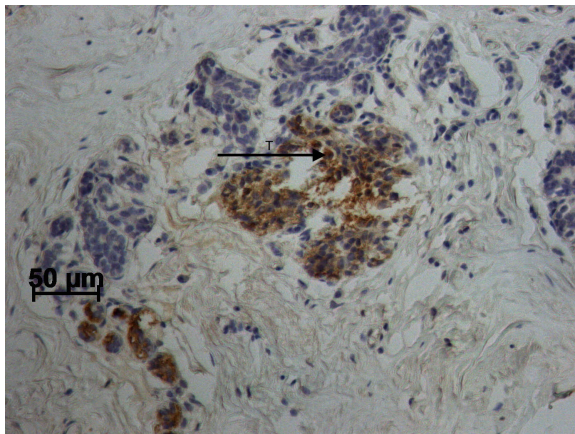


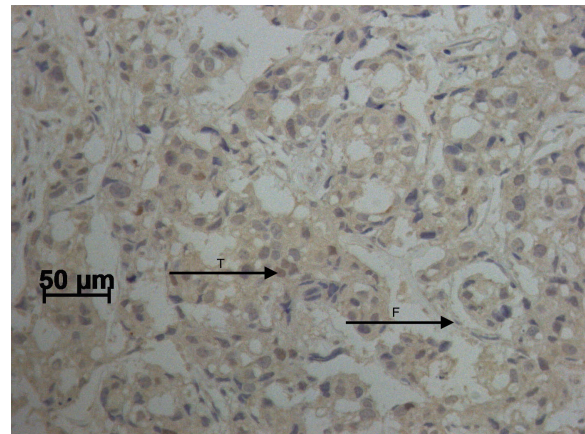
Abbildung 3.22: Überwiegend zytoplasmatische, teils nukleäre Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit AKR1C1

- (a) starke Markerexpression von AKR1C1 in den Tumorzellen
- (b) mäßige Expression von AKR1C1 sowohl in den TAF als auch in den Tumorzellen
- (c) AKR1C1-negative TAF bei schwacher AKR1C1-Expression in den Tumorzellen

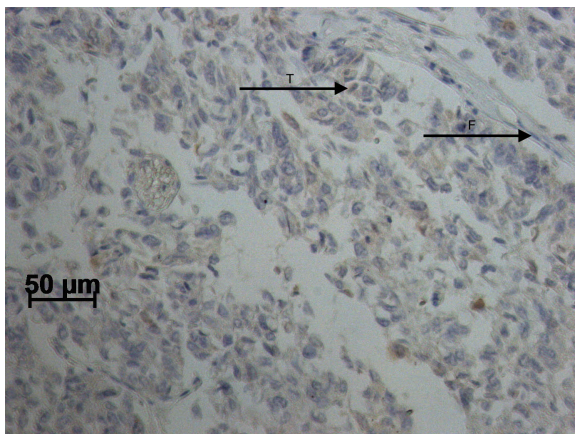
Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF



(a)



(b)



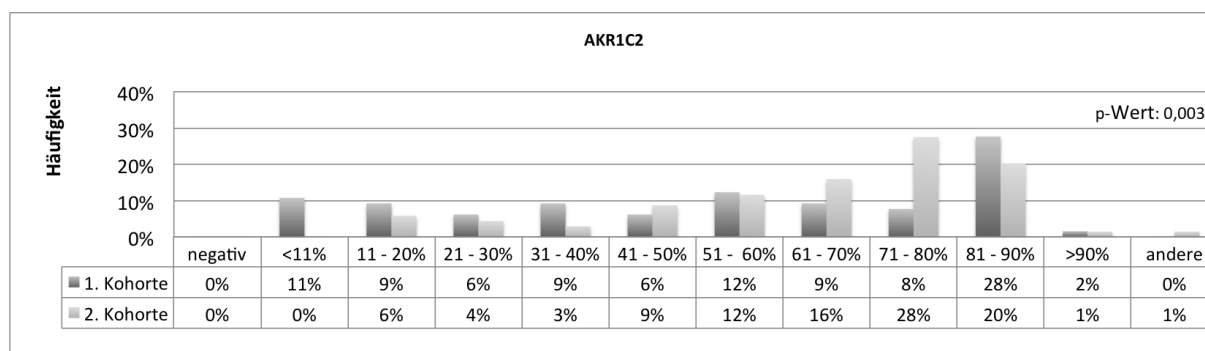
(c)

## 3.5 Immunhistochemische Färbung mit AKR1C2

### 3.5.1 Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten

In allen Proben der beiden untersuchten Kollektive fand sich eine AKR1C2-Expression in den Fibroblasten (Abbildung 3.23). Die Kohorte mit einer BRCAm zeigte eine relativ gleichmäßige geringe Proteinexpression der Fibroblasten im Bereich unter 11% bis 80%. Das Maximum der Verteilung für diese Kohorte lag mit 28% im Bereich 81 bis 90%. Die Kohorte ohne den Nachweis einer BRCAm hatte ihre maximale Verteilung im Bereich 71 bis 90% positiver Fibroblasten mit 48%. Die Unterschiede der Antikörperfärbung mit AKR1C2 erreichten eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,003. In der Gruppe des BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinoms lag eine Unterexpression vor.

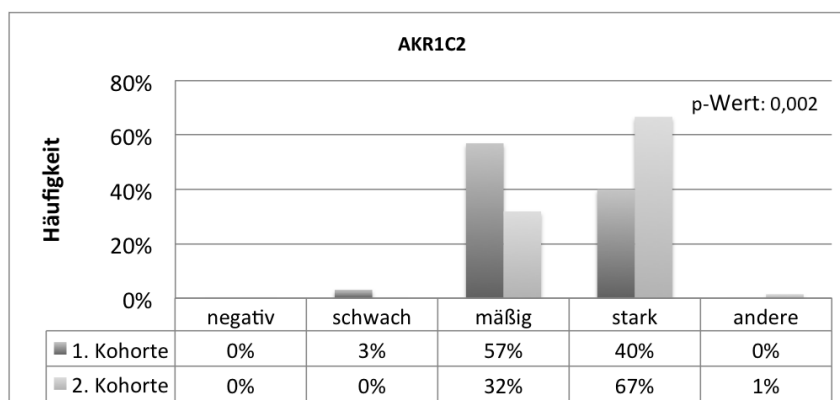
Abbildung 3.23: Proteinexpression von AKR1C2 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Die Verteilung der Intensität der AKR1C2-Expression in den Fibroblasten (Abbildung 3.24) der Kohorte 1 zeigte mit 57% am häufigsten eine mäßige Expression. Die Kohorte 2 hatte mit 71% am häufigsten eine starke Proteinexpression. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten mit einem p-Wert von 0,002 erkennen.



Abbildung 3.24: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von AKR1C2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.5.2 Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen

Die Expression von AKR1C2 in den Tumorzellen (Abbildung 3.25) hatte die maximale Ausprägung für beide Kollektive in dem Bereich 71 bis >90% mit 64% (Kohorte 1) und 88% (Kohorte 2). Die restliche Expression in den Tumorzellen verteilte sich auf den Bereich unter 11% bis 70% und war mit 36% und 9% für Kohorte 1 und 2 vernachlässigbar. Trotz der ähnlichen Verteilung der Tumorzellexpression beider Kohorten ließ der p-Wert von 0,001 einen statistisch signifikanten Unterschied erkennen. Die signifikante Diskrepanz zeichnete sich durch eine heruntergeregelte Expression von AKR1C2 positiver Tumorzellen in den Proben des BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinoms aus.

Die Intensitätsverteilung der AKR1C2-Expression (Abbildung 3.26) in den Tumorzellen lässt erkennen, dass beide Kohorten am häufigsten eine mäßige Proteinexpression aufwiesen. Diese lag bei 45% für die Kohorte 1 und 49% für die Kohorte 2. Eine starke Expression mit 29% (Kohorte 1) und 46% (Kohorte 2) ist ebenfalls zu erwähnen. Im Rahmen dieser Untersuchung zeigte sich zwischen beiden Kollektiven ein signifikanter Unterschied (p-Wert= 0,002). Dieser ist aufgrund des relativ großen Anteils einer schwachen Expression von 25% in den Tumorzellen der Mutationsträgerinnen zu erklären.

Abbildung 3.25: Proteinexpression in Tumorzellen von AKR1C2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

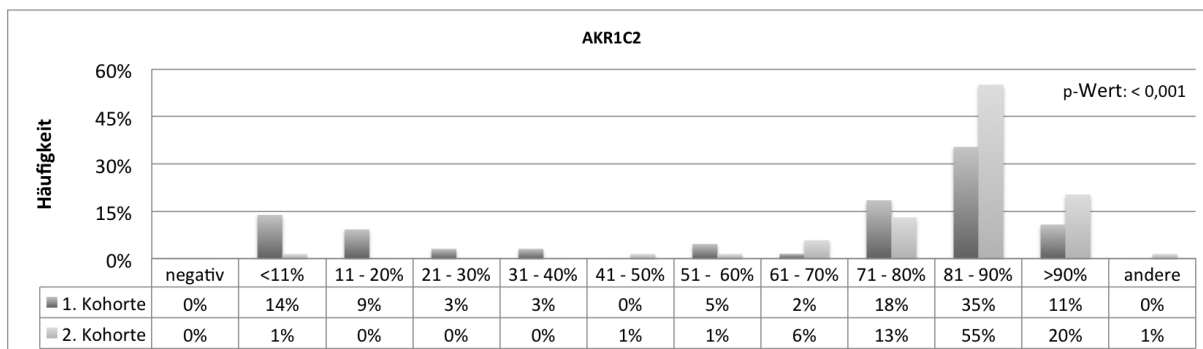
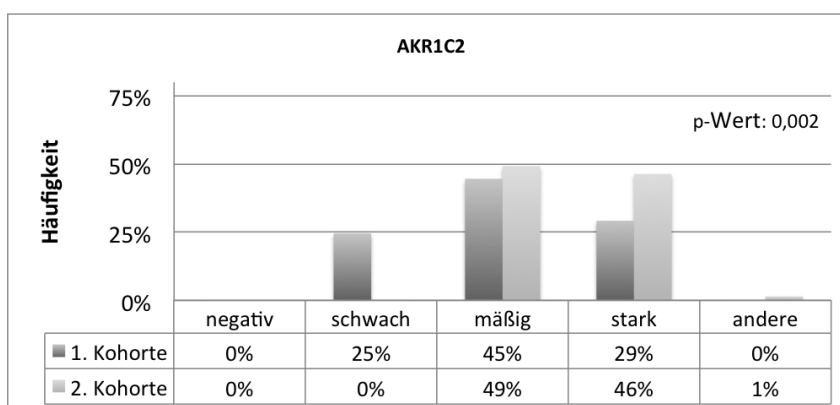


Abbildung 3.26: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von AKR1C2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.5.3 Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten

AKR1C2 erwies in beiden Kohorten am häufigsten eine partielle Expression in allen anderen Stromazellen (Abbildung 3.27). Die partielle Expression lag für die Kohorte 1 bei 92% und die für Kohorte 2 bei 93%. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kohorte 1 und 2. Der p-Wert von 0,752 bedingt diese Aussage.

Abbildung 3.27: Proteinexpression von AKR1C2 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

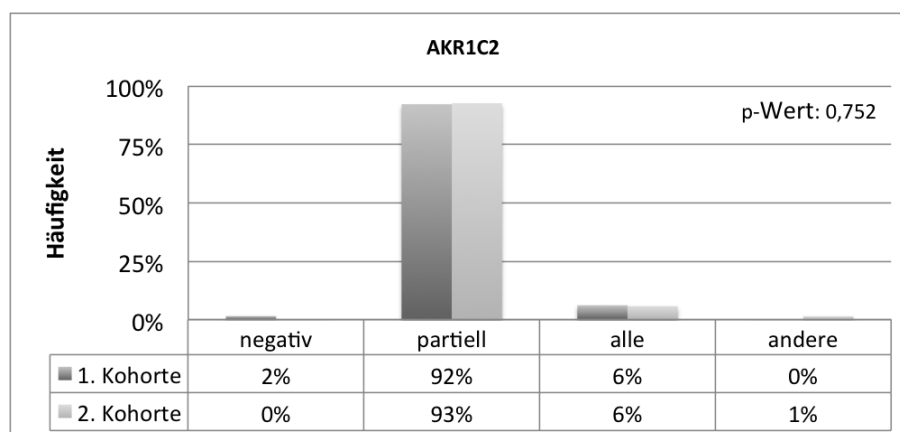
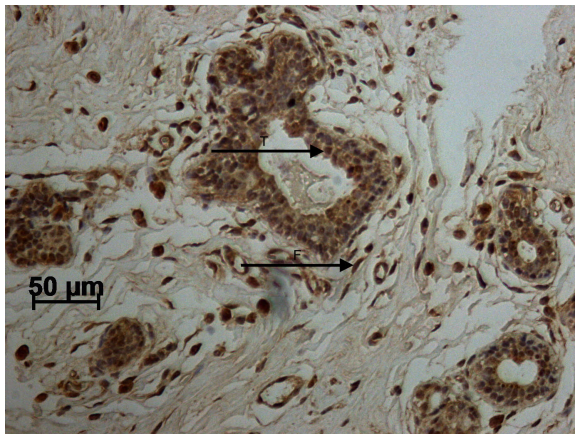


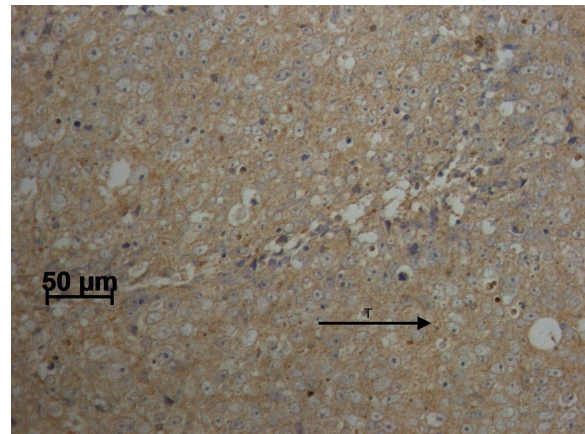
Abbildung 3.28: Überwiegend zytoplasmatische, teils nukleäre Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit AKR1C2

- (a) starke AKR1C2-Expression in den TAF, Tumorzellen sowie Endothelzellen
- (b) mäßige Expression von AKR1C2 in den Tumorzellen
- (c) schwache Expression in den TAF und Tumorzellen

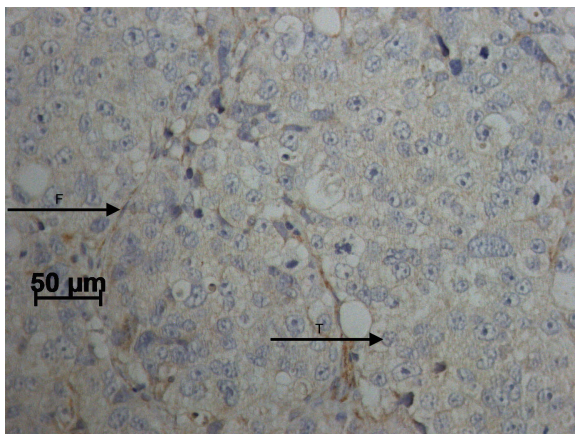
Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF



(a)



(b)



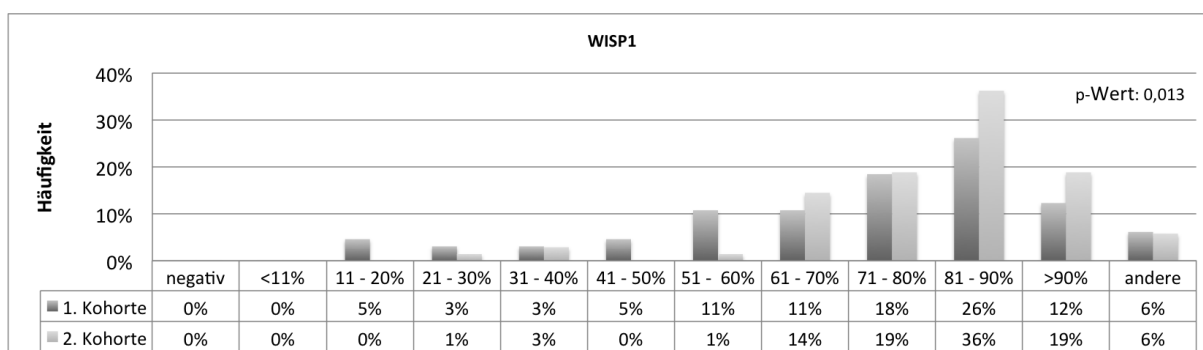
(c)

## 3.6 Immunhistochemische Färbung mit WISP1

### 3.6.1 Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten

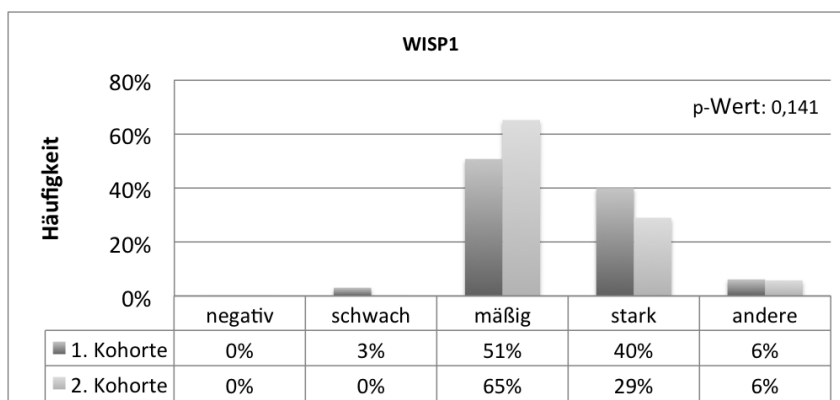
In der Abbildung 3.29 sowie 3.30 werden die Expression und die Intensität von WISP1 in den Fibroblasten dargestellt. In dem Kollektiv mit einer BRCAm zeigte sich die höchste Akkumulation der positiven Fibroblasten in dem Bereich 51 bis >90%. Für das Kollektiv mit einem sporadischen Karzinom lag diese zwischen 61 bis >90%. Die Proben des Mammakarzinoms mit einer BRCAm wiesen eine Unterexpression von WISP1 in den Fibroblasten auf. Daraus ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten mit einem p-Wert von 0,013.

Abbildung 3.29: Proteinexpression von WISP1 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Im Bezug auf die Intensität der Proteinexpression (Abbildung 3.30) für WISP1 gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Kollektiven. Der Signifikanzwert betrug 0,141. Kohorte 1 und 2 präsentierten mit 51% und 65% am häufigsten eine mäßige, gefolgt von einer starken Expression mit 40% und 29%.

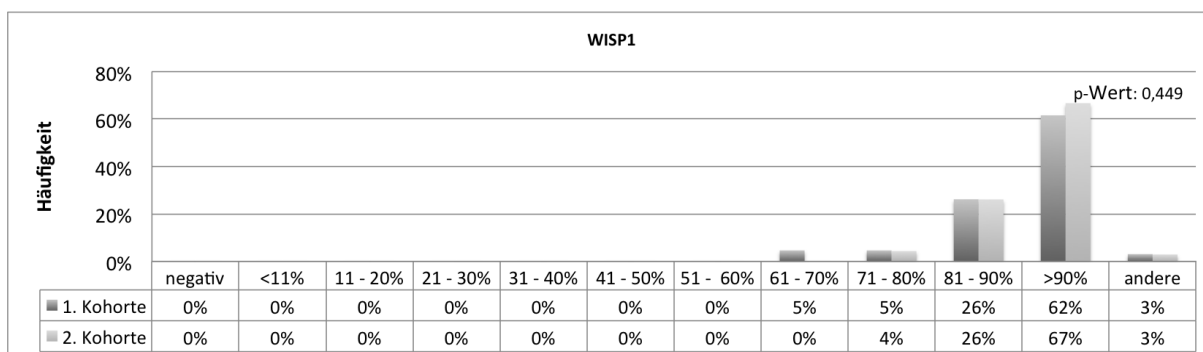
Abbildung 3.30: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von WISP1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.6.2 Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen

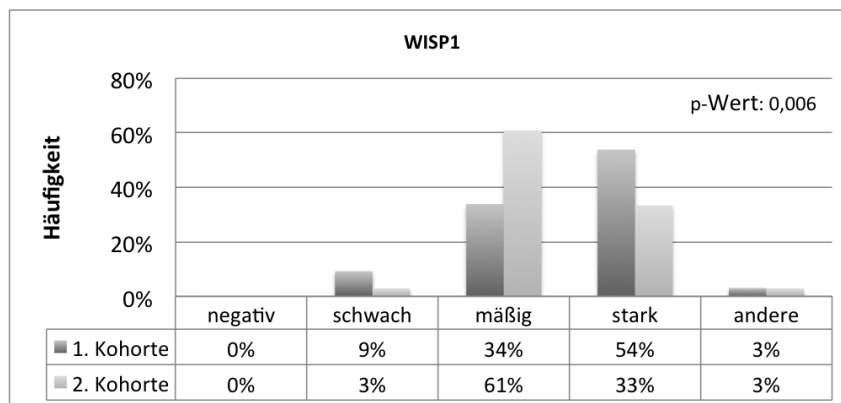
Die Expression von WISP1 in den Tumorzellen war in beiden Kollektiven annähernd identisch (Abbildung 3.31). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten, was durch den p-Wert von 0,449 belegt wurde. Für die Kohorte 1 und 2 lag die höchste Markerexpression mit 62% und 67% in dem Bereich >90% positiver Tumorzellen.

Abbildung 3.31: Proteinexpression in Tumorzellen von WISP1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Die Intensität der Proteinexpression für WISP1 in Tumorzellen wird in der Abbildung 3.32 dargestellt. Während sich in der Gruppe der Erkrankten mit einer BRCAm am häufigsten eine starke Expression mit 54%, gefolgt von einer mäßigen Expression mit 34% fand, verhielt sich die Gruppe der sporadisch Erkrankten spiegelverkehrt. Diese hatte ihre Maximalverteilung mit 61% bei einer mäßigen, gefolgt von 33% mit einer starken WISP1-Expression. Somit ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten in Bezug auf die Intensität der Proteinexpression von WISP1 in den Tumorzellen (p-Wert= 0,006).

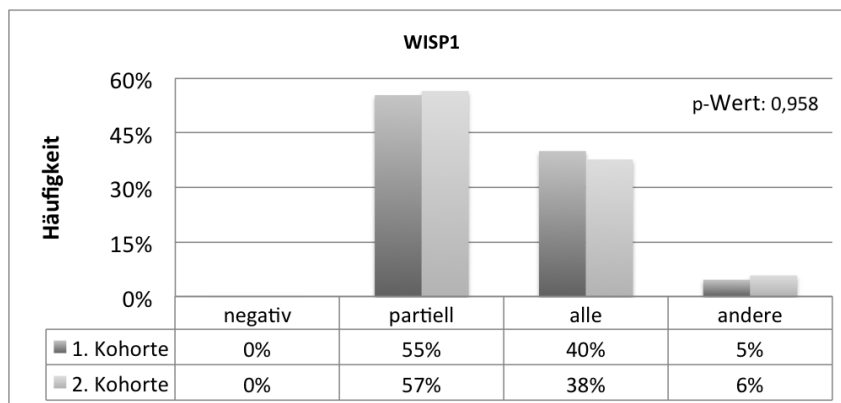
Abbildung 3.32: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von WISP1. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.6.3 Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten

In der Abbildung 3.33 wird in beiden Kollektiven eine annähernd identische WISP1-Expression in den anderen Stromakomponenten dargestellt. Es bestand kein signifikanter Unterschied. Der p-Wert lag bei 0,958. Die Kohorte 1 zeigte mit 55% eine partielle und mit 40% eine generelle Anfärbung aller Stromazellen. In der Kohorte 2 hatten 57% der Präparate eine partielle und 38% eine vollständige Expression aller Stromakomponenten.

Abbildung 3.33: Proteinexpression von WISP1 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



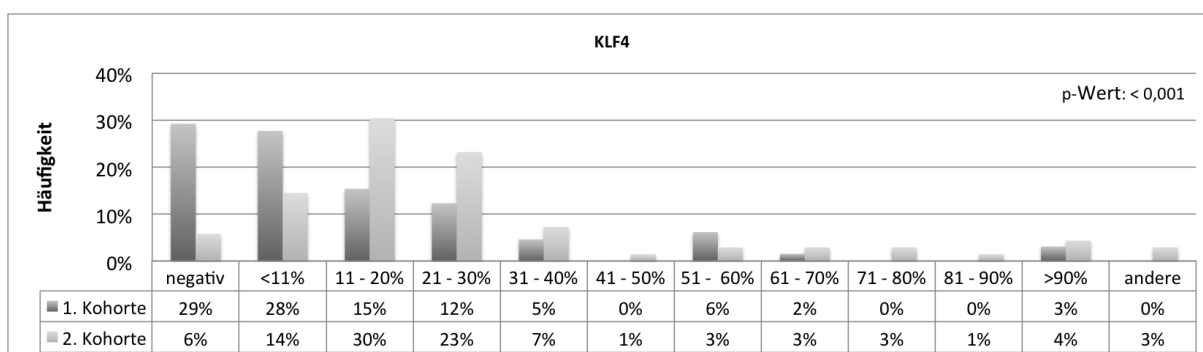


## 3.7 Immunhistochemische Färbung mit KLF4

### 3.7.1 Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten

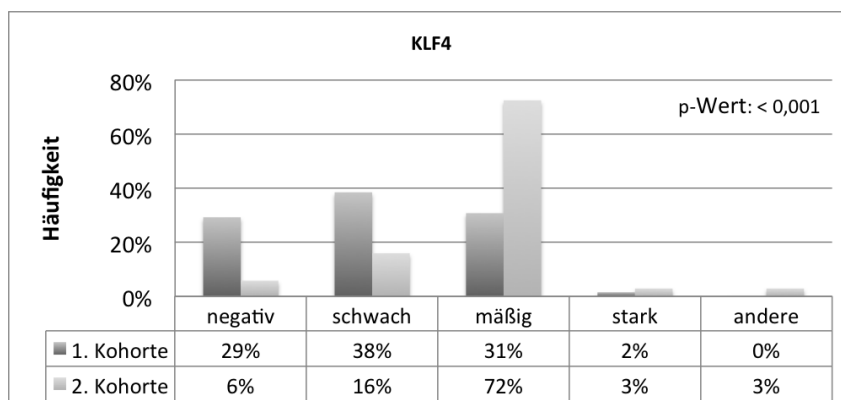
In der Abbildung 3.34 wird die Proteinexpression von KLF4 in den Fibroblasten abgebildet. 29% der Präparate der Mutationsträgerinnen wiesen keine positive Expression für KLF4 auf. Die Expression in den Fibroblasten in dem Bereich weniger als 11 bis 40% war gekennzeichnet durch abfallende Werte mit 28%, 15%, 12% und 5%. Das Cluster-Zentrum der KLF4-Expression der Proben mit einem sporadischen Karzinom lag mit 67% in dem Bereich unter 11 bis 30%. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ) zwischen den beiden Kohorten in Bezug auf die Proteinexpression von KLF4 in den Fibroblasten darstellen. Die Kohorte des BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom zeigte eine deutlich herunterregulierte Expression von KLF4 in den Fibroblasten.

Abbildung 3.34: Proteinexpression von KLF4 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Während das Kollektiv mit einer BRCAm am häufigsten eine schwache (38%) Proteinexpression von KLF4 in den Fibroblasten hatte (Abbildung 3.35), dominierte mit 72% eine mäßige Expression in der Kohorte ohne eine BRCAm. Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ).

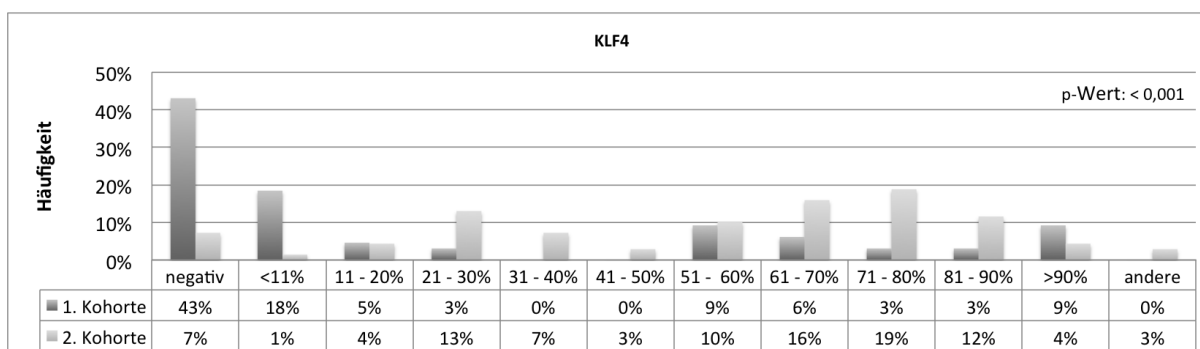
Abbildung 3.35: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von KLF4. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.7.2 Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen

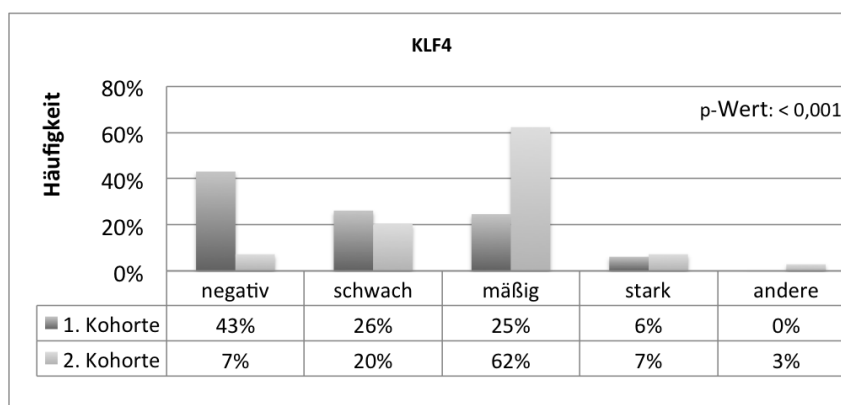
Die Auswertung der KLF4-Expression in den Tumorzellen ist in der Abbildung 3.36 wiedergegeben. In der Kohorte 1 war mit 43% am häufigsten eine negative Ausprägung für KLF4 festzustellen. In der Kohorte 2 dagegen zeigte sich die Konzentration der KLF4-Ausprägung in dem Bereich 51 bis 90% positiver Tumorzellen mit 57%. Die meisten Präparate lagen mit 19% in dem Bereich 71 bis 80%. Wie bei der KLF4-Expression in den Fibroblasten erreichten die Ergebnisse eine statistische Signifikanz ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ) aufgrund einer Unterexpression von KLF4 in den Tumorzellen des Mammakarzinoms mit einer BRCA1-/BRCA2-Mutation.

Abbildung 3.36: Proteinexpression in Tumorzellen von KLF4. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Die Intensitätsverteilung der Proteinexpression von KLF4 in den Tumorzellen ist in der Abbildung 3.37 dargestellt. In der Kohorte 1 war jeweils zu annähernd gleichen Anteilen eine schwache (26%) und eine mäßige (25%) Expression in den Tumorzellen festzustellen. Wobei in der Kohorte 2 eine mäßige Tumorexpression von KLF4 mit 62% deutlich überwogen hat, gefolgt von einer schwachen Expression mit nur 21%. Der p-Wert von  $< 0,001$  zeigte hierbei eine hohe Signifikanz zugunsten einer Unterexpression von Tumorzellen des BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinoms.

Abbildung 3.37: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von KLF4. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.7.3 Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten

Aus der Abbildung 3.38 geht hervor, dass in beiden untersuchten Kollektiven eine partielle Expression von KLF4 in anderen stromalen Komponenten am stärksten vertreten war. Für die Kohorte 1 waren es 78% und für die Kohorte 2 belief sich den Anteil auf 90%. Trotz eines sehr ähnlichen Verteilungsmusters bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in der Proteinexpression anderer Stromakomponenten für KLF4 zwischen den beiden Kohorten. Die Ergebnisse erreichten eine hohe statistische Signifikanz (p-Wert= 0,008).

Abbildung 3.38: Proteinexpression von KLF4 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

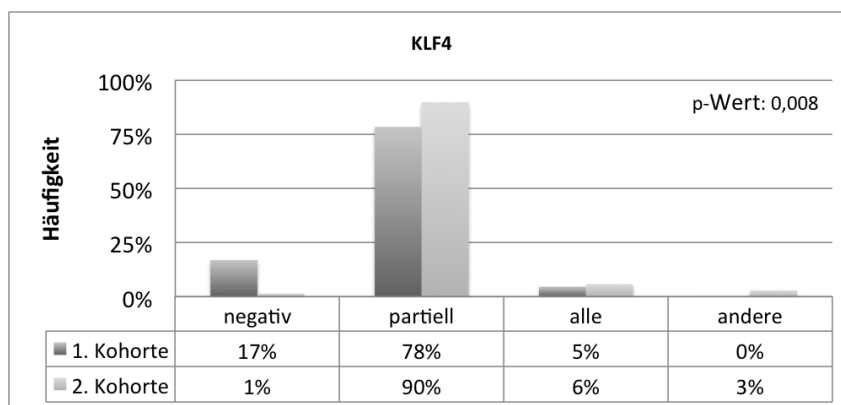
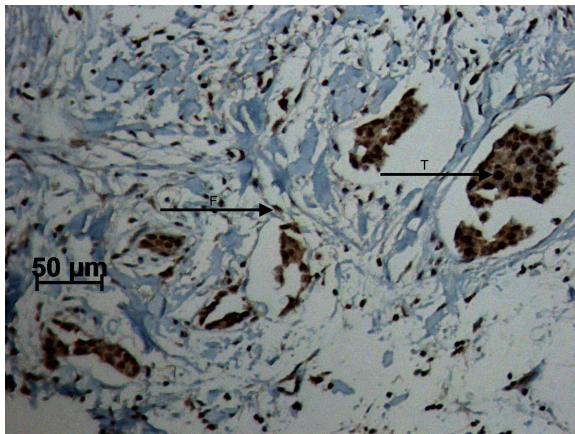


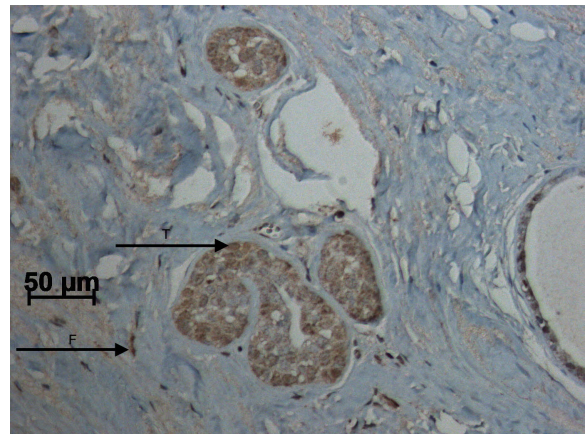
Abbildung 3.39: zytoplasmatische und nukleäre Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit KLF4

- (a) starke KLF4-Expression sowohl in den TAF als auch in den Tumorzellen
- (b) mäßige Expression von KLF4 in den TAF und Tumorzellen
- (c) KLF4-negative TAF bei schwacher KLF4-Expression in den Tumorzellen

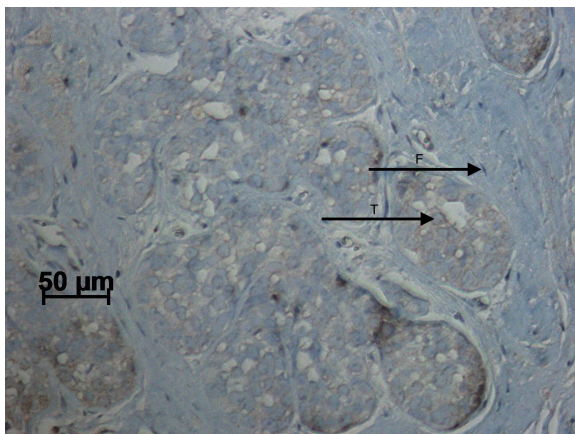
Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF



(a)



(b)



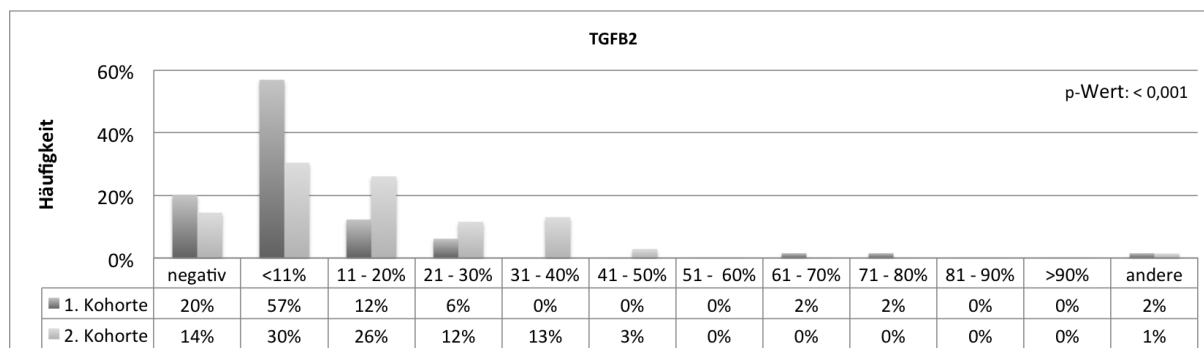
(c)

## 3.8 Immunhistochemische Färbung mit TGF $\beta$ 2

### 3.8.1 Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten

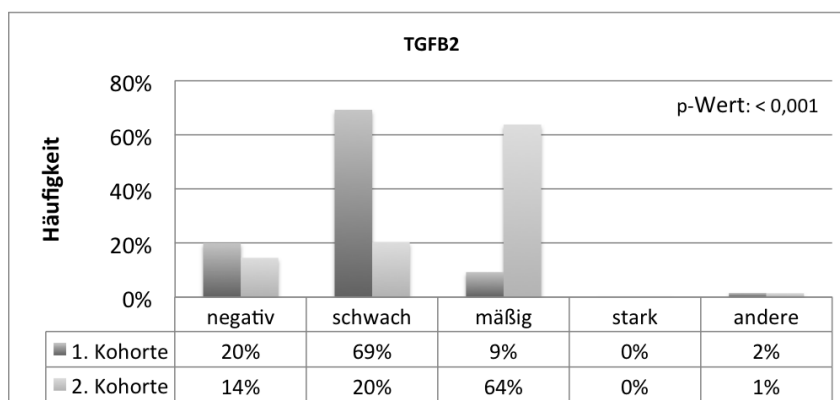
Die Auswertungen der Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 sowie deren Intensität in den Fibroblasten werden in den Abbildungen 3.40 und 3.41 beschrieben. In dem Kollektiv mit einer BRCAm zeigte sich mit 57% am häufigsten eine TGF $\beta$ 2-Expression bei weniger als 11% der Fibroblasten. Im Vergleich besaß die Kohorte 2 ebenfalls die maximale Markerexpression von TGF $\beta$ 2 positiver Fibroblasten in dem Bereich von weniger als 11%. Der Anteil betrug jedoch nur 30%. Die übrigen Proben des sporadischen Mammakarzinoms wiesen eine differentielle Expression in dem Bereich 11 bis 50% positiver Fibroblasten auf. Statistisch betrachtet ergab sich daraus ein signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,001) zwischen den beiden Kohorten, in dem sich eine Unterexpression der Fibroblasten für die Proben des Mammakarzinoms mit einer BRCAm darstellte.

Abbildung 3.40: Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Während sich in der Gruppe mit einer BRCAm überwiegend eine schwache Expression zeigte (69%), wurde in der Gruppe mit einem sporadischen Mammakarzinom am häufigsten eine mäßige TGF $\beta$ 2-Expression (64%) nachgewiesen. Die Ergebnisse erreichten eine statistische Signifikanz (p-Wert < 0,001).

Abbildung 3.41: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von TGF $\beta$ 2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.8.2 Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen

In der Abbildung 3.42 wird die Analyse der Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 in den Tumorzellen dargestellt. In dem Kollektiv mit einer BRCAM zeigte sich mit 29% eine maximale Expression in dem Bereich 71 bis 80% positiver Tumorzellen. Sonst fand sich eine annähernd gleiche Verteilung einer geringen Tumorexpression von TGF $\beta$ 2 über das gesamte beobachtete Spektrum von weniger 11 bis 90%. Dieser Bereich umfasste insgesamt 67% aller untersuchten Proben mit einer BRCAM. Für die sporadisch erkrankten Mammakarzinompatientinnen lag die maximale Ausprägung der Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 mit 62% in dem Bereich 61 bis 90%. Eine geringe Ausprägung zeigte sich in dem Bereich unter 11 bis 40% und 51 bis 60% mit Werten unter jeweils 10%. Der p-Wert von 0,285 erwies hierbei keine statistische Signifikanz.

Im Bezug auf die Intensität der Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 in den Tumorzellen war für beide Kohorten am häufigsten eine mäßige Expression festzustellen (Kohorte 1 mit 57% und Kohorte 2 mit 55%, Abbildung 3.43). Zusätzlich zeigte sich eine ausgeprägt schwache (40%) Proteinexpression in dem Kollektiv mit einer BRCAM und eine starke Expression in dem Kollektiv mit einem sporadischen Mammakarzinom (26%). Es bestand ein statistisch hoch signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,001) zwischen beiden Kollektiven, wobei eine herunterregulierte Expression von TGF $\beta$ 2 in den Tumorzellen des BRCA1-/BRCA2-positiven Mammakarzinoms festzustellen war.

Abbildung 3.42: Proteinexpression in Tumorzellen von TGF $\beta$ 2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

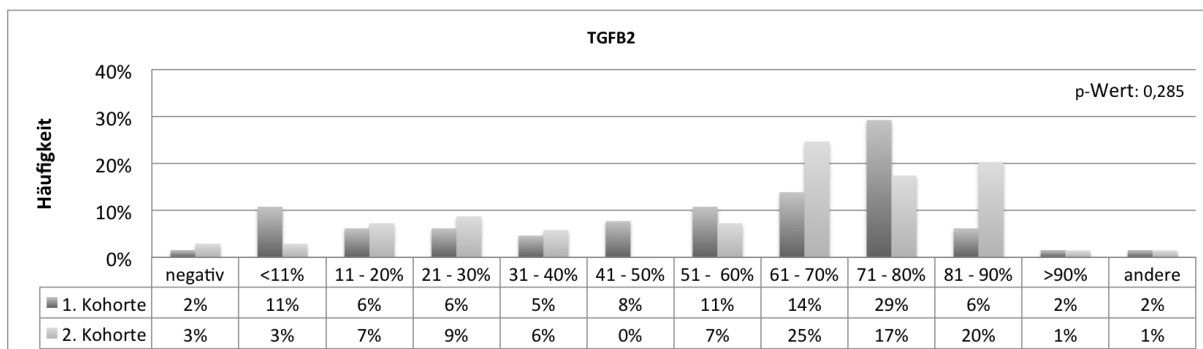
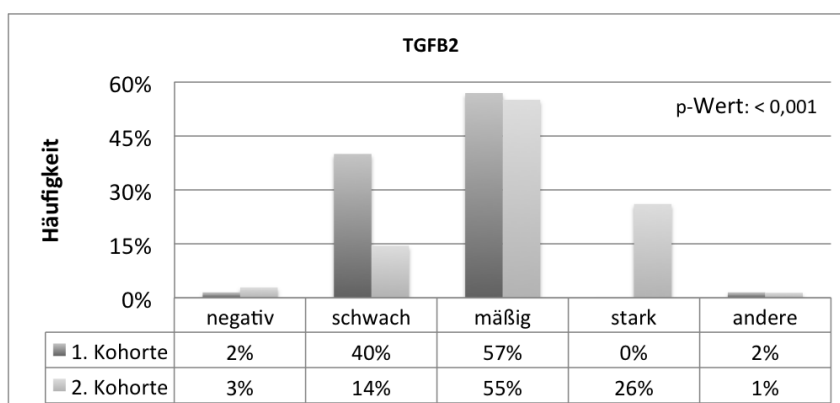


Abbildung 3.43: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von TGF $\beta$ 2. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom





### 3.8.3 Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten

Beide analysierten Kohorten wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 3.44) in der Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 in den anderen Stromakomponenten auf (p-Wert= 0,926). Die Kohorte 1 zeigte mit 94% und die Kohorte 2 mit 93% eine partielle Expression der anderen Stromakomponenten.

Abbildung 3.44: Proteinexpression von TGF $\beta$ 2 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

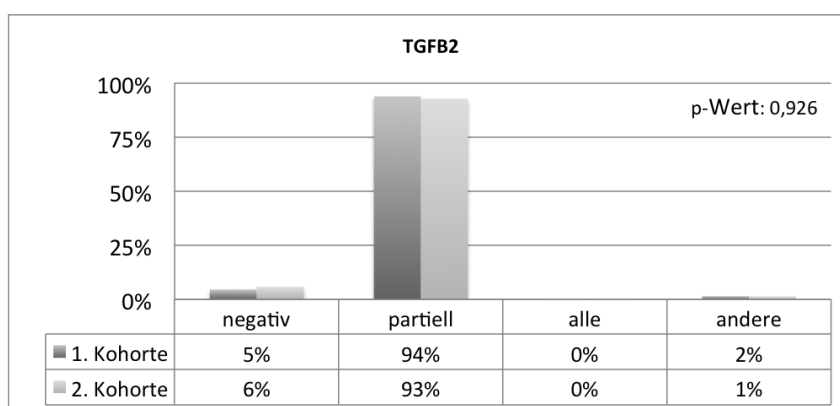
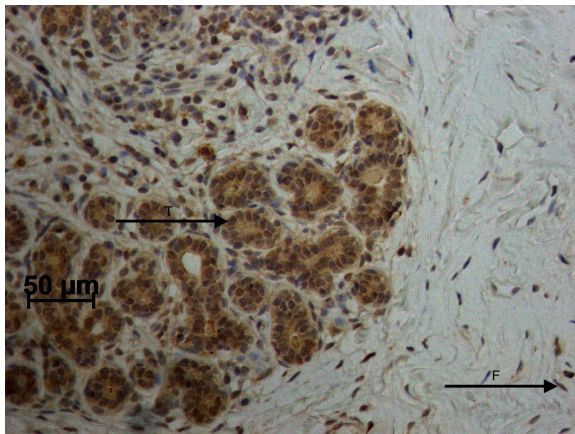


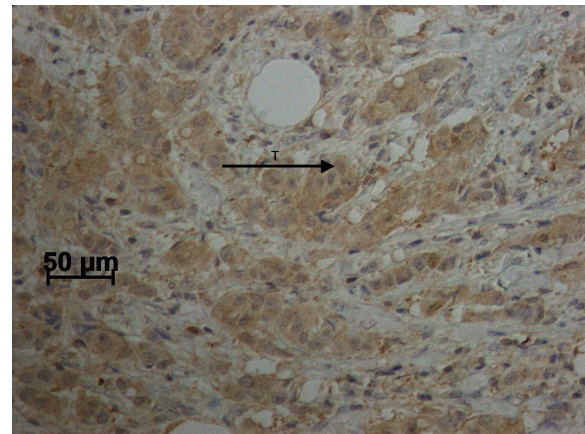
Abbildung 3.45: zytoplasmatische Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit  $\text{TGF}\beta 2$

- (a) starke Expression von  $\text{TGF}\beta 2$  in den TAF und Tumorzellen
- (b) mäßige  $\text{TGF}\beta 2$ -Expression in den Tumorzellen
- (c) schwache Expression von  $\text{TGF}\beta 2$  sowohl in den TAF als auch in den Tumorzellen

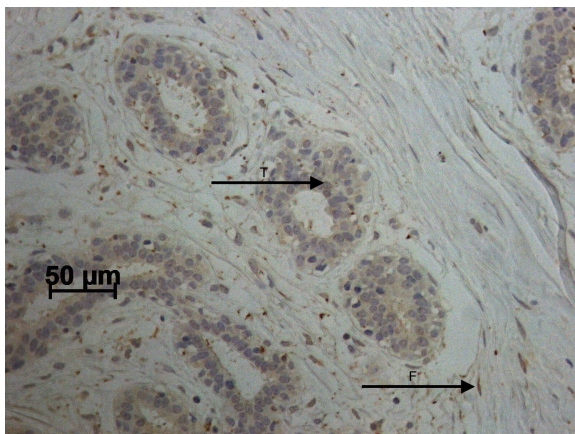
Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF



(a)



(b)



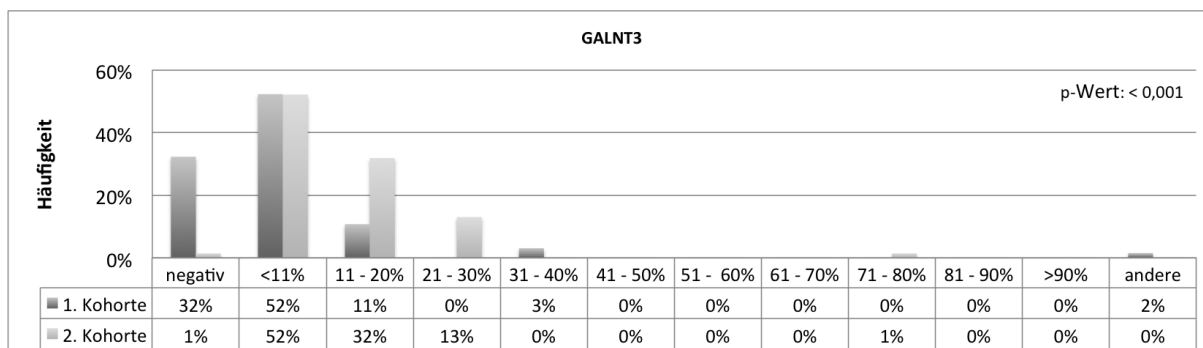
(c)

## 3.9 Immunhistochemische Färbung mit GALNT3

### 3.9.1 Analyse der Proteinexpression in den Fibroblasten

Die graphische Auswertung der GALNT3-Ausprägung in den Fibroblasten (Abbildung 3.46) zeigte in der Kohorte 1 für 32% der Präparate eine negative Ausprägung, während es in der Kohorte 2 nur 2% waren. Für beide Kollektive lag der Hauptanteil der GALNT3-Expression in dem Bereich kleiner 11% positiver Fibroblasten mit jeweils 52% der Präparate. In dem Bereich weniger 11 bis 20% lag die Markerexpression in der Kohorte 1 bei 11% und in der Kohorte 2 bei 32%. Zusätzlich besaß die Kohorte 2 in dem Bereich 21 bis 30% eine Expression von 13%. Demzufolge wurde GALNT3 beim BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom geringer exprimiert. Der Unterschied war statistisch signifikant ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ).

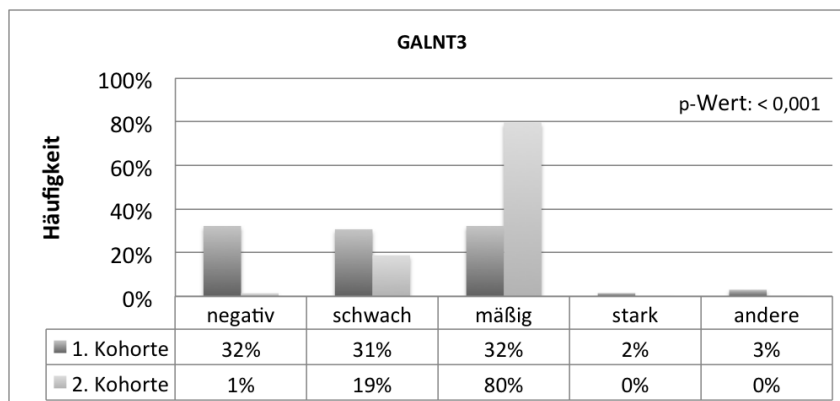
Abbildung 3.46: Proteinexpression von GALNT3 in positiven Fibroblasten. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



In der Abbildung 3.47 wird die Intensität der Proteinexpression von GALNT3 in den Fibroblasten dargestellt. Es zeigte sich eine differentielle Expression, wobei in der Kohorte 1 mit 32% und in der Kohorte 2 mit 80% sich am häufigsten eine mäßige Intensität darstellte. Eine schwache Proteinexpression fand sich zu 31% in der Kohorte 1 und zu 19% in der Kohorte 2. Der statistisch signifikante Unterschied ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ) resultierte aus einer herunterregulierten Expression von GALNT3 in den Fibroblasten des BRCA1-

/BRCA2-positiven Mammakarzinoms.

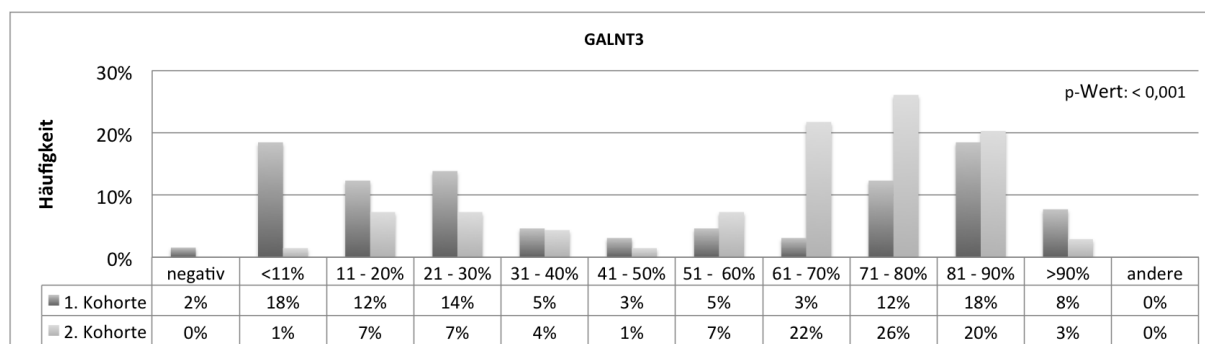
Abbildung 3.47: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Fibroblasten von GALNT3.  
1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.9.2 Analyse der Proteinexpression in den Tumorzellen

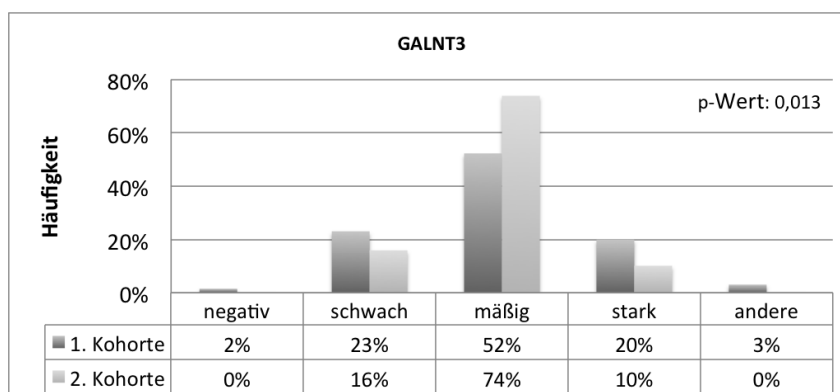
Die Konzentration der GALNT3-Expression in den Tumorzellen der Kohorte mit einem BRCA1-/BRCA2-assozierten Mammakarzinom war vor allem an den Rändern des beobachteten Spektrums vorzufinden (Abbildung 3.48). So hatten 18% der Präparate dieser Kohorte eine Ausprägung von weniger als 11%, 12% in dem Bereich unter 11 bis 20% und 14% eine Ausprägung in dem Bereich 21 bis 30%. Nach einem Plateau einer sehr geringen Expression in dem Bereich 31 bis 70% positiver Tumorzellen zeigte sich in diesem Kollektiv eine gesteigerte Expression von GALNT3 zwischen 71% und größer als 90%. Der Anteil von positiven Fibroblasten in diesem Bereich lag bei 38%. In der Kohorte mit einem sporadischen Mammakarzinom betrug die Konzentration der Markerausprägung in dem Bereich 61 bis 70%, 71 bis 80% und 81 bis 90% jeweils 22%, 26% und 20%. Die Ergebnisse erreichten eine statistische Signifikanz ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ) zugunsten einer Unterexpression von GALNT3 in den Tumorzellen des Mammakarzinoms mit einer BRCAm.

Abbildung 3.48: Proteinexpression in Tumorzellen von GALNT3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



Die Verteilung der Intensität der Proteinexpression von GALNT3 in den Tumorzellen (Abbildung 3.49) ergab am häufigsten eine mäßige Proteinexpression von 52% in der Kohorte 1 und 74% in der Kohorte 2. Trotz einer gering schwachen sowie starken Expression von GALNT3 in beiden Kohorten lag ein statistisch signifikanter Unterschied im Bezug auf die Intensitätsverteilung zwischen beiden Kohorten vor (p-Wert= 0,013). Auch hier zeigte sich eine GALNT3-Unterexpression bei dem BRCA1-/BRCA2-assozierten Mammakarzinom.

Abbildung 3.49: Verteilung der Intensität bzgl. der Proteinexpression in Tumorzellen von GALNT3. 1.Kohorte: BRCA1-/ BRCA2-assoziertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom



### 3.9.3 Analyse der Proteinexpression in anderen Stromakomponenten

In der Abbildung 3.50 ist die Proteinexpression von GALNT3 in anderen Komponenten des Stromas wiedergegeben. Für beide Kohorten zeigte sich am häufigsten eine partielle Expression in allen anderen Stromazellen. Für die Kohorte 1 waren es 86% und für die Kohorte 2 sogar 100%. Auch hier bestand ein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert= 0,001) aufgrund einer Unterexpression von GALNT3 in Kohorte des Mammakarzinoms mit einer BRCAm.

Abbildung 3.50: Proteinexpression von GALNT3 in anderen Stromakomponenten. 1.Kohorte: BRCA1-/BRCA2-assoziiertes Mammakarzinom. 2.Kohorte: sporadisches Mammakarzinom

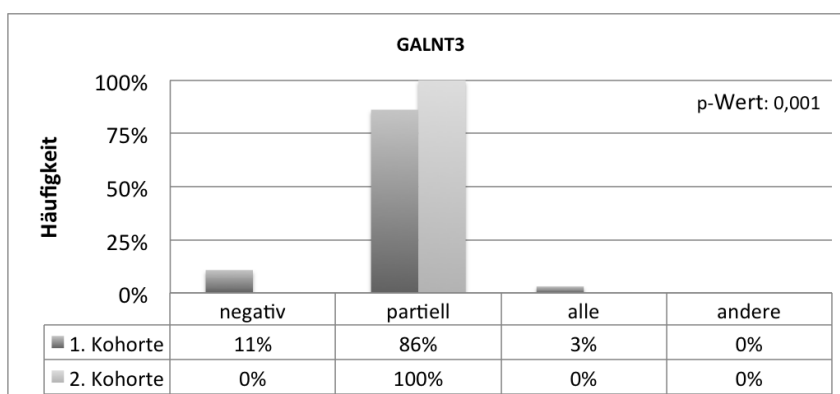
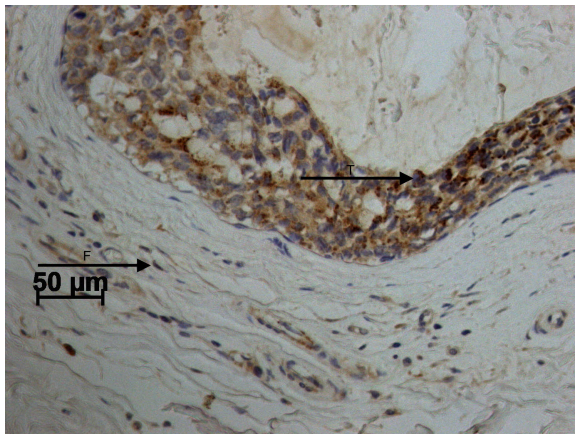


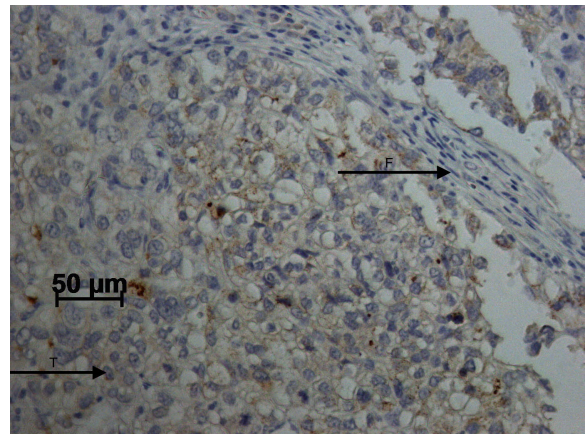
Abbildung 3.51: zytoplasmatische Ausprägung der immunhistochemischen Färbung von Tumorzellen und TAF mit GALNT3

- (a) starke GALNT3-Expression in den Tumorzellen bei mäßiger Expression in den TAF
- (b) GALNT3-negative TAF bei mäßiger Expression von GALNT3 in den Tumorzellen
- (c) schwache Expression von GALNT3 in den TAF und Tumorzellen

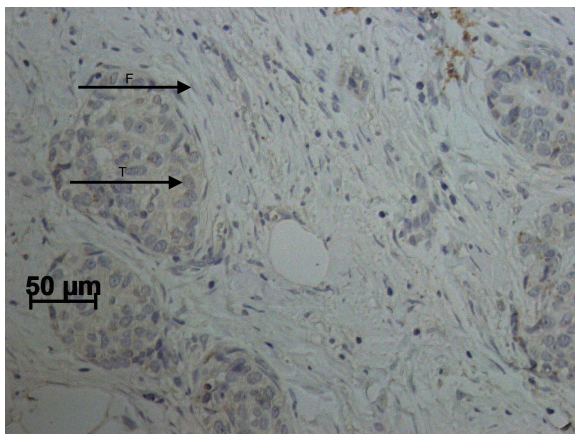
Pfeil T = Tumorzelle, Pfeil F = TAF



(a)



(b)



(c)

## 4. Diskussion

Das Mammakarzinom macht etwa 20 - 30% aller Krebserkrankungen bei Frauen in Deutschland und den westlichen industrialisierten Ländern aus [Laimito et al., 2016]. 15% aller weiblichen krebsbedingten Sterbefälle gehen auf ein Mammakarzinom zurück [Torre et al., 2015], somit ist es die häufigste Todesursache bei den Krebserkrankungen der Frau. Der Grund für den letalen Verlauf dieser Erkrankung ist das inhomogene Ansprechen auf eine generelle Therapie als Folge von unzähligen genetischen und morphologischen Variationen innerhalb der Mammakarzinomkrankung. Bis vor wenigen Jahren fokussierte sich die onkologische Forschung hauptsächlich auf die Erforschung von Tumorzellen. Seit den Arbeiten von Gabbiani [Gabbiani et al., 1971, Sappino et al., 1988] rückte der Fokus der Wissenschaft mehr und mehr auf das Tumor-assoziierte Stroma mit seinen spezifischen Eigenschaften und den charakteristischen Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF). Besonders den TAF wurde die Eigenschaft einer fördernden Tumorprogression, Invasion sowie einer erhöhten Aggressivität der Karzinomkrankung und Metastasierung mit einem daraus folgenden Therapieversagen zugesprochen [Mao et al., 2013, Bussard et al., 2016].

Im Zentrum des Interesses dieser Arbeit stand die Frage, ob es einen Unterschied in der Charakterisierung und Proteinexpression ausgewählter Marker in den stromalen Faktoren sowie Tumorzellen bei einem Mammakarzinom von BRCA1- und/oder BRCA2-Mutationsträgerinnen im Vergleich zu dem eines sporadischen Mammakarzinom gab.

Das heutige Ziel der onkologischen Forschung ist eine auf die Tumorentität abgestimmte und gezieltere Therapieoption zu entwickeln. Um dieses gezielte Ansprechen eines Tumors



zu erreichen, ist es notwendig, die Eigenschaften des Tumors und des Tumor-assoziierten Stromas mit seinen Fibroblasten zu erforschen. In den letzten Jahrzehnten gab es einen großen Fortschritt in der Behandlung der einzelnen molekularen Subtypen des Mammakarzinoms, was die Prognose einzelner Subgruppen verbesserte. So konnten Patientinnen eines Luminal A-like und Luminal B-like HER2-negativem Mammakarzinom mit einer gezielten adjuvanten Systemtherapie wie der antihormonellen Therapie behandelt werden. Zu diesen Medikamenten gehören z.B. Letrozol, Anastrozol, welche einen Aromataseinhibitor darstellen oder der Östrogenrezeptorantagonist Tamoxifen. Daraus ergab sich für diese Patientinnengruppe eine sehr gute Prognose [Schiavon and Smith, 2014, Ingle, 2013]. Bei Frauen mit einem HER2-positivem Mammakarzinom der Subgruppe Luminal B-like und Non-luminal-like hatte sich die Prognose durch die neoadjuvante Gabe von Trastuzumab und Pertuzumab in Analogie zur Chemotherapie gefolgt von der adjuvanten Gabe von Trastuzumab deutlich verbessert [Ahmed et al., 2015]. In dem Bereich der Basal-like oder triple negativen Mammakarzinome gibt es bis heute keine zusätzliche bzw. zielgerichtete adjuvante oder neoadjuvante Therapie. Sie sind zudem meist hochmaligne (G3). Die Patientinnen mit einem solchen Mammakarzinom haben eine sehr schlechte Prognose sowie eine geringe 5-Jahres-Überlebensrate. Zu diesem molekularen Subtyp gehören meist Patientinnen, die eine BRCA1- und/oder BRCA2-Mutation aufweisen [Yadav et al., 2015, de Ruijter et al., 2011]. Um die Prognose und das Langzeitüberleben dieser Patientinnen zu verbessern, muss für diese molekulare Subgruppe eine gezielte neoadjuvante und/oder adjuvante Systemtherapie etabliert werden. Aus diesem Grund fokussierte sich die vorliegende Arbeit auf die Charakterisierung stromaler Faktoren beim Mammakarzinom von BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit können ggf. weitere therapeutische Targets im genetisch stabilen Stroma identifiziert werden.

## **4.1 Diskussion über Material und Methoden**

### **4.1.1 Diskussion zur Methodik und Studiendesign**

Die vorliegende Arbeit erfolgte auf der Grundlage einer experimentellen immunhistochemischen Kohortenstudie. Die immunhistochemische Färbung wurde auf der Basis einer indirekten Zwei-Schritt-Färbemethode durchgeführt. Vorteile dieser IHC-Färbung waren schwache Hintergrundsignale, eine effiziente Verstärkung sowie eine ethisch unbedenkliche Durchführung, da keine Tierexperimente notwendig waren und zudem keine zusätzlichen Belastungen für die Patientinnen entstanden sind. Ein weiterer Vorteil bestand darin, dass immunhistochemische Färbungen mit relativ wenig Aufwand und bei vorliegendem Färbeprotokoll reproduzierbar sind. Jedoch musste berücksichtigt werden, dass die Auswertung von immunhistochemischen Färbungen unter dem Lichtmikroskop einer gewissen Subjektivität des Betrachters unterliegen und somit trotz Zweitbetrachtung durch einen erfahrenen Pathologen nur eine semiquantitative Beurteilung der Ergebnisse möglich war. Weitere Nachteile zum einen stellten der hohe Kostenaufwand für z.B. Antikörper und die zeitintensive Etablierung der immunhistochemischen Färbungen dar. Die IHC-Färbung hat in der onkologischen Forschung durch die eindeutige Identifizierung von Gewebeeigenschaften durch spezifische Antigen-Antikörper Reaktionen einen hohen Stellenwert eingenommen. Daraus ergaben sich therapeutische Ansätze und mögliche Interventionen am Patienten durch die eindeutige immunologische Identifikation von Tumoren.

### **4.1.2 Diskussion zum Patientengut, patientenbezogene Daten und Datenerfassung**

Das Patientengut, das ausschließlich von weiblichen Patientinnen stammte, wurde von drei deutschen Instituten zur Verfügung gestellt. Männer können ebenfalls an einem Mammakarzinom erkranken. Jedoch ist von einer abweichenden Karzinogenese, Ätiologie und anderen Risikofaktoren auszugehen [Doebar et al., 2017, Vermeulen et al., 2017]. Aus diesem Grund wurden männliche Patienten aus dieser Forschungsarbeit ausgeschlossen. Die

Gewebeschnitte der sporadischen Mammakarzinome mit 69 Patientinnen stammten aus dem Institut der Pathologie der Universität Kiel. Zu diesen Patientinnen lagen alle klinisch relevanten Daten wie Alter, Mutationstyp, Grading, intrinsischer Subtyp, R-, L-, V-, ER-, PR- und Her2neu-Status vor. Das Kollektiv mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom umfasste 65 Patientinnen und wurde vom Institut für Pathologie Hannover und Bonn zur Verfügung gestellt. Es war angedacht, die gleichen klinischen Daten zu den jeweiligen Patientinnen dieses Kollektivs zu erhalten, wie sie für die Kohorte aus Kiel vorlagen. Leider war das von Seiten der Institute aus Hannover und Bonn nicht möglich. Daraus resultierte bedauerlicher Weise, dass ein Vergleichen der immunhistochemischen Ergebnisse zwischen der Kohorte 1 mit einem BRCA1-/BRCA2-positiven Mammakarzinom und der Kohorte 2 des sporadischen Karzinoms in Bezug auf die klinischen Daten nicht möglich war. Bei der Datenerfassung konnte lediglich auf die von den bereitgestellten Angaben der jeweiligen pathologischen Institute zurückgegriffen werden. Eine Tumorklassifizierung im Rahmen der TNM-Klassifizierung aller Präparate wurde von den jeweiligen Pathologen der bereitgestellten Institute durchgeführt. Alle drei Institute benutzten die gleiche TNM-Klassifizierung und Differenzierungsgarde. Mit einer vollständigen Erfassung aller klinisch relevanten Daten wäre eine bessere Differenzierung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung beider Kohorten unter Berücksichtigung des jeweiligen Gratings, des histologischen Subtyp und dem Hormonrezeptorstatus möglich gewesen. Klinische Risikofaktoren wie Anzahl der Schwangerschaften, Geburten, Stillverhalten, Menarche, Menopause, Adipositas, Alkohol, Nikotin und andere Vorerkrankungen von den jeweiligen Patientinnen wurden nicht erhoben.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Bezüglich der Charakterisierung der stromalen Faktoren beim Mammakarzinom mit einer BRCA1- und/oder BRCA2-Mutation im Vergleich zu einem sporadischen Mammakarzinom wurden im Rahmen dieser experimentellen Arbeit eine Reihe von Fakten erarbeitet. Die morphologische Struktur des Stromas wurde in vielen Forschungsarbeiten als prognostischer Wegweiser bei der Erkrankung eines Mammakarzinom gesehen [Beck et al., 2011].

### 4.2.1 Diskussion der morphologischen Auswertung der untersuchten Kollektive

#### Stromaproportion

Aus dem Stromaanteil in Relation zur Tumormasse ergab sich die Tumor-Stroma-Ratio (TSR). Der etablierte Cut-off liegt bei 50%. Das bedeutet, dass der Anteil des intratumoralen Stromas über 50% im Vergleich zur Tumorzellmasse liegt. Dieses bezeichnet man als stromareich und bei weniger als 50% als stromaarm. Die Stromamenge gilt als unabhängiger prognostischer Parameter. Retrospektive Studien haben belegt, dass beim Vorliegen eines stromareichen Mammakarzinoms die Patientinnen eine kürzere rezidivfreie Zeit und zugleich ein verringertes Gesamtüberleben aufwiesen [de Kruijf et al., 2011]. In der histomorphologischen Auswertung der Kohorte mit einer BRCA-Mutation hatten 58% der Präparate einen stromareichen Tumor. Das Kollektiv des sporadischen Mammakarzinoms zeigte dagegen mit einem Anteil von 77% ein stromareiches Tumorgewebe. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Kohorten. Ohne Berücksichtigung der Überlebensdaten der Patientinnen war es unmöglich, eine Aussage über den Zusammenhang zwischen der Stromaproportion, der TSR, dem Gesamtüberleben sowie dem Rezidiv-Verhalten zu tätigen. Aufgrund der fehlenden histopathologischen Daten der Mutationsträgerinnen konnte keine Aussage über eine mögliche Korrelation einer ausgeprägten Stromaproportion (über 50%) mit einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium, einer ausgeprägten Invasionstiefe oder dem Vorliegen von Lymphknoten- und Fernmetastasen getroffen werden. Ein solcher Zusammenhang wurde bereits in Studien beschrieben

und unterstützt die Aussage, dass eine hohe Stromaproportion im Tumorgewebe mit einem schlechten Outcome assoziiert ist. Demzufolge ist die TSR als ein sinnvoller Prognosefaktor zu betrachten [Wu et al., 2016]. Das tumorangrenzende Stroma übernimmt eine aktive Rolle in der Nährstoffversorgung des Tumorparenchyms. Unter diesem Gesichtspunkt sollte das Tumor-assoziierte Stroma als ein möglicher neuer Therapieansatz und als eine alternative Interventionsmöglichkeit in der Tumorthherapie angesehen werden. Das Problem einer Therapie, die sich gegen die Tumorzellen richtet, ist die genetische Instabilität der Tumorzelle. Diese kann zu einer Therapieresistenz und folglich einem Therapieversagen führen. Stromazellen dagegen haben eine außerordentliche genetische Stabilität und zeigen kaum mutagene Veränderungen. Demzufolge ist die Entwicklung einer Therapieresistenz nicht anzunehmen. Der Vorteil einer zielgerichteten Therapie gegen die Stromazellen wäre eine kurative Behandlung ohne eine Resistenzbildung im Verlauf [Wu et al., 2016].

Das triple negative Mammakarzinom zeigte bei einem stromareichen Tumor ein 2,92 mal höheres Risiko für ein Rezidiv im Vergleich zu einem stromaarmen Tumor dieser Entität, unabhängig anderer prognostischen Parameter [de Kruijf et al., 2011]. Die TSR im Zusammenhang mit diesem Subtyp des Mammakarzinoms hat sich als ein sehr aussagekräftigen und unabhängigen Prognoseparameter bewiesen [de Kruijf et al., 2011]. Dieser sollte aufgrund der schnellen sowie einfachen und kostengünstigen Durchführung in die pathologische Routineuntersuchung aufgenommen werden. Die Bestimmung der TSR kann einen entscheidenden Beitrag zur Optimierung der Risikoabschätzung beitragen. Bis zum heutigen Tag gibt es keine Methode der Differenzierung, ob die Patientin mit einem triple negativen Mammakarzinom eine gute oder schlechte Prognose hat [Moorman et al., 2012].

Beim ER-positiven Mammakarzinom (Luminal A- und Luminal B-Subtyp) wiesen dagegen eine hohe stromale Komponente und damit eine niedrige TSR einen Zusammenhang mit einem besseren Überleben auf [Downey et al., 2014]. Aus diesem Grund sollte der ER-Status bei der Interpretation der TSR als Prognosefaktor immer zusätzlich in Betracht gezogen werden. Es ist ein weiteres Indiz dafür, dass unterschiedliche Phänotypen des Mammakarzinoms eine biologische Differenz aufweisen [Downey et al., 2014].

Bei der Bestimmung der TSR waren folgende Probleme als kritisch zu betrachten. Zum einen gab es keine Standardisierung zur TSR-Bestimmung und zum anderen keine offizielle Festlegung über den geltenden Bereich des Gewebes zur analytischen Untersuchung [Downey et al., 2015a]. Die TSR beim inflammatorischen Mammakarzinom ergab keine prognostische Aussagekraft. Daher war anzunehmen, dass das Stroma unterschiedlicher Mammakarzinomsubtypen eine abweichende Biologie aufweisen muss. Demzufolge sollte der Tumorsubtyp bei der Interpretation der TSR als Prognoseparameter berücksichtigt werden [Downey et al., 2015b].

### **Verteilungsmuster des Stromas**

Im Rahmen der morphologischen Untersuchung des Stromas konnte in allen analysierten Merkmalen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Kollektiv eines BRCA1-/2-assoziierten Mammakarzinoms und dem eines sporadischen Mammakarzinoms festgestellt werden. Das Verteilungsmuster des Stromas war in beiden Kohorten hauptsächlich verzweigt und baumartig, gefolgt von einer diffusen Verteilung. Karzinomzellen zeichnen sich durch ein abnormales Zellwachstum und deren Invasion in das umliegende Gewebe aus. Oft zeigte sich eine röhrenartige Formation der malignen Zellen, woraus sich ein verzweigtes und baumartiges bis diffuses Stroma ergab [Beck et al., 2011].

### **Zellreichtum des Stromas**

Die Fibroblasten stellen den bedeutendsten zellulären Anteil des Stromas dar und bilden die ECM. Viele dieser Zellen können ihre Lokalisation verändern, sich teilen und auf Reize reagieren. Solche Reize sind zum einen extrazelluläre Wachstumsfaktoren, die zur Mobilisation, zur Teilung, zum Fortbestehen sowie zur Entwicklung oder zu einem programmierten Zelltod führen können. Tumorzellen senden ebenfalls Signale an das Tumorstroma aus, die vor allem die Fibroblasten aktivieren und zur Progression der Tumorerkrankung führen.

In beiden untersuchten Kohorten lag am häufigsten ein mittleres Zellreichtum vor, das heißt, Kollagenfasern und Zellen waren zu ungefähr gleichen Anteilen vertreten. Gefolgt davon zeigte sich bei beiden untersuchten Kollektiven ein zellarmes und am wenigsten ein zellreiches Stroma. Es ist bekannt, dass die Fibroblasten des Stromas bei der Invasion und Progression eines Mammakarzinoms eine große Rolle spielen. Die Annahme, dass ein aggressiver Subtyp des Mammakarzinoms ein zellreiches Stroma aufweist, ist naheliegend. Neueste Studien haben jedoch belegt, dass auch die extrazelluläre Matrix wie das Kollagen I und Fibronectin das invasive Tumorstromawachstum fördern [Wang et al., 2017, Luhr et al., 2012]. Kollagen I und Fibronectin interagieren synergistisch miteinander und fördern einen dysregulierten Signalweg, welcher durch eine strukturelle und mechanische Veränderung der ECM die Progression und Invasion der Karzinomzellen erleichtert. Tumorzellen fördern durch Signale an die TAF die Sekretion von Fibronectin und VEGF. Daraus ergibt sich eine dicke sowie dichte und ausgedehnte Fibronectinmatrix, die eine gesteigerte Viskosität wie auch Steifheit aufweist und gesteigert proangiogene Signale vermittelt [Wang et al., 2017, Wang et al., 2015b, Chandler et al., 2011]. Die Kollagen I Ablagerung ist von einer fibronectinreichen Matrix abhängig und wandelt diese in eine Kollagen I-reiche Matrix um [Velling et al., 2002]. Die veränderte Wechselwirkung zwischen Fibronectin und Kollagen I während der Tumorgenese und Progression zum invasiven Tumorstromawachstum sollte in weiteren onkologischen Studien fokussiert werden. Eine Interaktion in der Fibronectin-Kollagen-I-Wechselwirkung könnte einen neuen Therapieansatz in der Tumorthherapie darstellen. Ein vermehrter Anteil an kollagenhaltigem Stroma fördert die Entstehung und Metastasierung des Mammakarzinoms [Provenzano et al., 2008].

In der Arbeit von Hasebe wurde auf die Aussagekraft der histomorphologischen Untersuchung des Tumorstromas als diagnostische Methode zur Malignitätsbestimmung des Mammakarzinoms hingewiesen. In seiner Studie wurde das Vorhandensein eines fibrotischen Fokus aus TAF und Kollagenfasern mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen sowie Organfiliae bei einem invasiv-duktalem Mammakarzinom assoziiert. Es hatte sich bestätigt, dass der fibrotische Fokus signifikant mit dem Anstieg der Tumorangiogenese in Zusammenhang stand und dieser dadurch ein bedeutendes malignes Potential aufwies [Hasebe, 2013].

## **Lymphozytäres Infiltrat**

Bereits im Jahre 1986 beschrieb Dvorak Tumore als Wunden die nie heilen und legte den Fokus seiner Forschung auf das Tumorstroma und die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) [Dvorak, 1986]. Auch Virchow (1821 - 1902) erkannte durch den Nachweis von Leukozyten im Tumor, dass es höchstwahrscheinlich einen Zusammenhang zwischen einer Entzündungsreaktion und dem Vorliegen einer Krebserkrankung gab [Plytycz and Seljelid, 2003]. Die Komplexität des Immunsystems spiegelte sich in den tumorfördernden Eigenschaften sowie den tumorhemmenden Einflüssen von Entzündungs- und Immunzellen auf die Progression der Tumorerkrankung wieder. Das wurde bereits in einer Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten belegt [Denkert et al., 2010, Menard et al., 1997, Aaltomaa et al., 1992]. Ein ausgeprägtes Vorliegen von TIL hatte vor allem bei Östrogenrezeptor-negativen und hoch proliferierenden Mammakarzinomen eine prädiktive und positive prognostische Bedeutung [Denkert et al., 2010, Bianchini et al., 2010]. Diese Kriterien trafen vor allem auf das triple negative Mammakarzinom zu. Diese Tumorentität wies überwiegend eine BRCA1- aber auch BRCA2-Mutation auf [Rody et al., 2011]. In dieser Gruppe der Mammakarzinomerkrankungen war ein hoher Anteil an TIL mit einem besseren Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie verbunden. Das wurde bereits in umfassenden klinischen Studien validiert [Loi et al., 2013]. Luminal A- Karzinome zeigten eher weniger Tumor-infiltrierende Lymphozyten, dieser intrinsischer Subtyp fand sich vor allem beim sporadischen Mammakarzinom [Hanker et al., 2013].

Beide Kollektive zeigten ein ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat in den untersuchten histologischen Präparaten. Es gab keine statistisch signifikante Diskrepanz zwischen den beiden Kohorten. Die Lymphozyten umfassen B-Zellen, T-Zellen und die natürlichen Killerzellen und gehören zu den Leukozyten. Zu ihrer Aufgabe gehört die spezifische und unspezifische Immunabwehr gegenüber Bakterien, Viren, Pilzen, Toxinen und Karzinomzellen. Die Anwesenheit von inflammatorischen Zellen ist mit einer schlechten Prognose und einer Progression in Form einer Metastasierung der Tumorerkrankung assoziiert [Beck et al., 2011, Tan et al., 2011]. Die Tumor-assoziierte Entzündungsreaktion wur-



de in Anlehnung an die “six hallmarks of cancer” von Hanahan und Weinberg [Hanahan and Weinberg, 2011] als siebtes Kennzeichen einer Krebserkrankung etabliert [Colotta et al., 2009]. Die lokale Entzündungsreaktion wurde vor allem mit soliden Tumoren in Verbindung gebracht und entstand durch die vom Tumor und den Stromazellen freigesetzten Substanzen. Fibroblasten umfassten den zellulären Hauptanteil des Stromas. Diese freigesetzten tumorfördernde Substanzen stellen einen Ansatzpunkt in der zielgerichteten Tumorthherapie dar. Durch die Elimination von TAF konnte eine Veränderung in der Tumormikroumgebung, entsprechend einer Verschiebung der Th2- zu Th1-Zellen ermittelt werden. In dessen Folge zeigten sich eine gesteigerte Produktion von IL-2 und IL-7, ein verringertes Rekrutieren von Tumor-assoziierten Makrophagen und regulatorischen T-Zellen sowie eine verringerte Tumorangiogenese und Lymphangiogenese [Liao et al., 2009]. Ebenfalls konnte die spontane Metastasierung unterdrückt und der Effekt einer Chemotherapie erhöht werden. Durch die verringerten Immunsuppressorzellen und die gesteigerten Immuneffektorzellen kam es durch die zytotoxischen T-Lymphozyten zu einem Absterben der Karzinomzellen im Primärtumor. Alle diese Erkenntnisse zeigten, dass TAF das Tumorstadium und deren Metastasierung fördern und eine zielgerichtete Therapie zu einer Verbesserung der Heilungschancen führte [Liao et al., 2009]. Die Annahme, dass in der Kohorte mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom ein stärker ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat als beim sporadischen Mammakarzinom nachzuweisen ist, hat sich nicht bestätigt.

Aufgrund des gehäufteten Auftretens eines triple negativen Mammakarzinom bei BRCA1-Mutationsträgerinnen hätte man ein stärker ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat annehmen können. Aus der Arbeit von Disis und Stanton ging hervor, dass bei einem triple negativen Mammakarzinom die höchste Inzidenz einer lymphozytären Tumordinfiltration vorlag. Dagegen zeigten deren Ergebnisse beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom die geringste lymphozytäre Tumordinfiltration. Die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind am ehesten auf den Fakt zurückzuführen, dass nicht jedes Mammakarzinom mit einer BRCA-Mutation bedingt triple negativ sein muss. Ebenso kann ein sporadisches Mammakarzinom triple negativ sein. [Disis and Stanton, 2015].

### 4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit ST6GALNAC5

Die vorliegenden Ergebnisse der Antikörperfärbung mit ST6GALNAC5 wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied im Bezug auf den Anteil der Fibroblasten und Tumorzellexpression zwischen den beiden untersuchten Kohorten auf. Es zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied in der Untersuchung der Intensität der Tumorzellen sowie in den anderen untersuchten stromalen Komponenten. In der auf die Analysen aufbauenden Arbeit von Bauer et al stellte sich bereits eine gesteigerte Expression von ST6GALNAC5 in den tumorassoziierten Fibroblasten im Vergleich zu denen im gesunden Mammastroma dar [Bauer et al., 2010]. Unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage und der vorliegenden Ergebnisse scheint die Expression von ST6GALNAC5 im tumorassoziierten Stroma sowie im Tumor eine entscheidene Rolle bei der Tumorprogression und Entstehung von Metastasen vor allem im Zentralnervensystem (ZNS) einzunehmen.

Seit der Arbeit von Bos et al. war bekannt, dass ST6GALNAC5 eines der drei Gene ist, welches sich für die Entstehung von Hirnmetastasen beim Mammakarzinom verantwortlich zeigt. Experimente belegten, dass eine zerebrale Metastasierung des Mammakarzinoms erst möglich war, wenn die Tumorzellen des Primärtumors ST6GALNAC5 exprimierten. Weitere Erkenntnisse über dieses Gen im Zusammenhang mit der Entstehung von zerebralen Metastasen beim Kolonkarzinom lagen von Stremnitzer et al. vor [Stremnitzer et al., 2017].

Das von ST6GALNAC5 kodierte Enzym findet sich bei gesunden Menschen nur im Zerebrum. Wenn dieses Enzym jedoch in den Tumorzellen der Mamma gebildet wird, resultiert in den Karzinomzellen eine Oberflächenveränderung. Diese führt zu einer gesteigerten Adhäsion von gelösten und damit im Blutkreislauf zirkulierenden Tumorzellen an die Endothelzellen der zerebralen Gefäße. Dadurch erlangen diese Tumorzellen die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [Bos et al., 2009]. Zwei weitere Gene und deren Proteine spielen bei dem Prozess der Hirnmetastasierung eine Rolle. Dieses ist die Cyclooxygenase COX2 (PTGS2) und das HB-EGF [Miyamoto et al., 2006]. Beide Proteine erhöhen

die Mobilität und Invasivität der Tumorzellen in andere Organe und sind nachweislich für die Entstehung von Lungenmetastasen verantwortlich [Minn et al., 2005], wohingegen ST6GALNAC5 nur bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke mitwirkt [Bos et al., 2009]. Das ST6GALNAC5-Gen spielt ebenfalls eine Rolle in der Kontrolle der Zelladhäsion von Hela-Zellen. Experimentell wurde die Korrelation einer erhöhten ST6GALNAC5-Expression mit einem niedrigen Adhäsionsgrad nachgewiesen. Gegenätzlich zeigte sich bei einer Hemmung der ST6GALNAC5-Transkription eine gesteigerte Adhäsion. ST6GALNAC5 und deren Alpha-2,6-Sialyltransferase sind an der Biosynthese sowie der erhöhten Expression von Gangliosid GD1 $\alpha$  in Brustkrebszellen beteiligt, welches die Entstehung von Hirnmetastasen fördert [Vandermeersch et al., 2015, Drolez et al., 2016]. Die veränderte Zelloberflächenglykosylierung ist der wesentlichste Schritt in der Karzinogenese von gesunden zu neoplastischen Zellen. Das Gangliosid GD1 $\alpha$  ermöglicht die Adhäsion von Mammakarzinomzellen an die Endothelzellen der Gefäße, die die Blut-Hirn-Schranke (BHS) darstellen und ermöglicht somit das Eindringen von Mammakarzinomzellen in das Gehirn und dadurch die Bildung von Metastasen [Drolez et al., 2016].

Die experimentelle Arbeit von Drolez et al. ergab, dass ST6GALNAC5 keine Rolle in der gesteigerten Adhäsion an Gefäßen der BHS spielt und somit wohl keine Funktion in der Überwindung der BHS von Mammakarzinomzellen einnimmt. Ebenso korrelierte die Expression von ST6GALNAC5 nicht direkt mit der Menge an Gangliosid GD1 $\alpha$ . Es wird davon ausgegangen, dass eine ST6GALNAC5-Expression mit einer verringerten Wechselwirkung zwischen Mammakarzinomzellen und der BHS assoziiert ist [Drolez et al., 2016]. Die Arbeit von Bhuiyan et al. indizierte, dass ST6GALNAC5 möglicherweise gar nicht an der Synthese von Gangliosid GD1 $\alpha$  beteiligt ist [Bhuiyan et al., 2016]. Metastasen stellen die häufigste Todesursache beim Mammakarzinom dar. Eine medikamentöse Hemmung dieser Prozesse, Gene bzw. deren Proteine wäre ein bahnbrechender Erfolg und würde die Prognose sowie das Langzeitüberleben der Brustkrebspatientinnen deutlich verbessern.

Triple negative Mammakarzinome, die oft mit einer BRCA1-Mutation assoziiert sind, zeigen eine hohe Inzidenz in der Bildung von Fernmetastasen, wobei Metastasen im ZNS gehäuft vorkommen [Laimito et al., 2016].

Laimitos et al. Untersuchungen konzentrierten sich auf die Fragestellung, ob die Expression der drei Gene (PTGS2, HBEGF, ST6GALNAC5) bei Patientinnen mit einem TNBC und dem Vorliegen von ZNS-Metastasen von Patientinnen dieses Subtyps ohne ZNS-Metastasen abweicht. Heraus stellte sich, dass es kein abweichendes Expressionsmuster dieser drei Gene bei Patientinnen mit oder ohne ZNS-Metastasen gab. In den zerebralen Metastasen wurde jedoch eine genetische Veränderung gefunden, die sich im Primärtumor nur sehr selten zeigte. Zu diesen gehäuften Genen gehörten TP53, PIK3CA und GATA3 [Laimito et al., 2016].

Andere Arbeiten wiesen auf den Aspekt hin, die Rolle des Östrogenspiegels bei der Entstehung von Hirnmetastasen bei Patientinnen mit einem TNBC ebenfalls in Betracht zu ziehen. Angenommen wird, dass Androgene zu einer Aktivierung von Astrozyten im zerebralen Gewebe führen, was eine Ansiedlung von malignen Zellen des Mammakarzinoms möglich machen könnte. Astrozyten sind ein Bestandteil der BHS. Dieser Fakt würde das höhere Risiko der Entstehung von ZNS-Metastasen bei jungen Patientinnen mit einem triple negativen Mammakarzinom erklären, denn sie haben altersbedingt höhere Östrogenspiegel. Dieser Einfluss auf die Entstehung von Hirnmetastasen stellt eine mögliche Erklärung für eine identische Genexpression zwischen Patientinnen eines TNBC mit und ohne Hirnmetastasen dar [Sartorius et al., 2016, Laimito et al., 2016].

Über die Rolle des ST6GALNAC5-Gen bei der Entstehung von zerebralen Metastasen und in der Karzinogenese des Mammakarzinoms müssen noch viele Forschungsarbeiten durchgeführt werden, um dessen Funktion zweifellos zu klären.

### **4.2.3 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit GATA-3**

In der vorliegenden Arbeit wurde kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich dem Anteil der Proteinexpression sowie deren Intensität von GATA-3 zwischen dem Kollektiv mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom und einem sporadischen Mammakarzinom nachgewiesen. Bei der Betrachtung der anderen stromalen Komponenten wie

Lymphozyten, Endothelzellen und Makrophagen gab es ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Kollektiven.

Neueste Studien belegten die unabhängige prognostisch prädiktive Aussagekraft von GATA-3, die mit einem guten DFS und OS assoziiert ist. Diese zeigte sich unabhängig von Subtyp. GATA-3 besitzt die Fähigkeit, die Differenzierung von luminalen Progenitorzellen in gesunden und malignen Zellen der Brust zu fördern [Cakir et al., 2017]. Dadurch hat es eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Tumorinitiation [Asselin-Labat et al., 2011]. Die Expression von GATA-3 korreliert stark mit dem Vorliegen des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in menschlichen Brusttumoren. Studien zeigten die Wechselwirkung dieser beiden Faktoren im Rahmen einer positiven kreuzregulatorischen Schleife, was die stabile Koexpression von GATA-3 und ER $\alpha$  in menschlichen Brustkrebszellen erklärte [Eeckhoutte et al., 2007]. Niedrige GATA-3-Werte waren mit einer negativen ER-Expression verbunden [Mehra et al., 2005]. Die Luminal A- und Luminal B-like Mammakarzinome stellten die häufigsten Subtypen dar und zeigten in vielen vorherigen Studien die höchste GATA-3-Expression [Voduc et al., 2008]. GATA-3 wurde bei invasiven Mammakarzinomen, welche eine schlechte Prognose sowie ein schlechtes Outcome hatten nur gering exprimiert. Niedrige GATA-3-Werte korrelierten ebenfalls mit schlechten pathologisch prognostischen Parametern wie einem höheren Grading (G2 - G3), positiven Lymphknoten (N1-N3), einer ausgeprägten Tumorgroße und einem negativen Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron sowie einer HER2-neu Überexpression. Aus den Studienergebnissen von Mehra et al. ging eindeutig hervor, dass Mammakarzinome, die eine niedrige GATA-3-Expression aufwiesen ein signifikant kürzeres OS und DFS im Vergleich zu den Patientinnen hatten, bei denen eine hohe Expression von GATA-3 im Tumorgewebe vorlag [Mehra et al., 2005, Yoon et al., 2010].

Die Annahme, dass die in dieser Arbeit untersuchten Proben des BRCA1-/BRCA2-positiven Mammakarzinoms aufgrund der generell schlechteren Prognose und des gehäuft vorliegenden TNBC eine geringe Expression von GATA-3 aufweisen würden, hatte sich nicht bestätigt. Es wäre eventuell ein anderes Ergebnis zu erwarten gewesen,

wenn BRCA1- und BRCA2-positive Mammakarzinome getrennt untersucht worden wären. Aus dem Grund, dass Mammakarzinome mit einer BRCA1-Mutation vorwiegend TNBC sind, wogegen die Karzinome mit einer BRCA2-Mutation oft den molekularen Subtyp eines sporadischen Mammakarzinoms aufweisen. Es gibt jedoch auch Arbeiten, die die vorliegenden Studienergebnisse bestätigen. So wird GATA-3 überwiegend im luminalen Mammakarzinom aber auch im TNBC und HER2-positiven Mammakarzinom exprimiert [Cimino-Mathews et al., 2013]. Die Untersuchung von Byrne et al. belegte, dass auch bei einem primären triple negativen Mammakarzinom eine GATA-3-Expression vorlag [Byrne et al., 2017]. In den nicht luminalen Mammakarzinomen ging man von einer östrogenunabhängigen GATA-3-Expression aus [Cakir et al., 2017]. Eine ausgeprägte GATA-3-Expression bei einem ER-positiven invasiven Mammakarzinom korrelierte mit einem guten Ansprechen auf eine Hormontherapie und ein fehlendes Ansprechen auf eine Chemotherapie [Parikh et al., 2005].

In der Studie von Cakir et al. konnte das GATA-3-Gen in BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinomen nicht nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich GATA-3 in seiner Arbeit als unabhängiger prognostischer Faktor für das OS [Cakir et al., 2017].

Aus den Veröffentlichungen der letzten Jahre ging hervor, dass GATA-3 als Marker eines CUP-Syndroms (cancer of unknown primary, Krebs eines unbekannten Primärtumor) für die Detektierung von Mamma- und Urothelkarzinomen, Pankreaskarzinome, Plattenepithelkarzinome der Haut, Tumore trophoblastischen Ursprungs, Mesotheliome, Speicheldrüsentumore, Karzinome der Adnexe und vielen weiteren fungierte [Miettinen et al., 2014]. Eine Metaanalyse über den prognostischen und klinisch-pathologischen Wert von GATA-3 bei einem Mammakarzinom ergab, dass eine hohe GATA-3-Expression mit einem positiven ER und PR, niedrigem Grading und einer kleinen Tumorgroße assoziiert war. Daraus ergab sich, dass GATA-3 mit einem weniger aggressiven Phänotyp sowie einer besseren Prognose bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom assoziiert war [Guo et al., 2017]. GATA-3 stellt einen Biomarker dar, der bei einer erhöhten Expression unabhängig vom molekularen Subtyp eine Vorhersage für ein verbessertes OS und DFS bietet.

Trotz unzähliger Studien, die diese Aussage bestätigen, gibt es noch keinen standardisierten Cut-Off-Wert, der eine gute von einer schlechten Prognose abgrenzt. Um einen solchen Wert festzulegen sind noch viele Studien mit einheitlichen Untersuchungsstandards und einem großen Proben- und Patientenumfang erforderlich.

#### **4.2.4 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit AKR1C1 und AKR1C2**

Die immunhistochemische Färbung mit den zwei Aldo-Keto-Reduktasen AKR1C1 und AKR1C2 der Kohorte mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten und der eines sporadischen Mammakarzinoms ergab einen statistisch signifikanten Unterschied im Prozentsatz sowie der Intensität der jeweiligen Fibroblasten- und Tumorzellenexpression. In der Analyse der anderen Stromakomponenten beider Marker zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. AKR1C1 wurde gar nicht oder nur sehr wenig in den Fibroblasten und Tumorzellen beider Kollektive exprimiert, wobei sich die schwächste Ausprägung in den Proben mit einer BRCa fand. Die Intensität der Anfärbung war schwach bis mäßig. AKR1C2 zeigte dagegen in den Fibroblasten beider Kohorten eine Markerexpression von kaum bis sehr ausgeprägt, wobei sich der Hauptanteil in dem Bereich 51 bis 90% positiver Fibroblasten befand. Eine Unterexpression von AKR1C2 zeigte sich auch hier bei dem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom. Die Intensität in der Kohorte mit einer BRCa war größtenteils mäßig gegenüber einer starken Intensität beim sporadischen Mammakarzinom. Die Tumorzellen beider Kollektive präsentierten dagegen hauptsächlich eine ausgeprägte Expression für AKR1C2. In der Kohorte mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom wurde eine schwach bis mäßige Expression im Gegensatz zu einer mäßig bis starken beim sporadischen Mammakarzinom nachgewiesen. Die Verteilung der Intensität in der Kohorte mit einer BRCa war ebenfalls größtenteils mäßig gegenüber einer starken Intensität beim Vergleichskollektiv.

Bereits in der Vergangenheit belegten mehrere Studien eine verminderte Expression von AKR1C1 und AKR1C2 im stromalen Kompartiment beim Mammakarzinom im Vergleich

zum gesunden Brustdrüsengewebe. Vor allem zeigte sich eine deutlich niedrigere Expression dieser beider Gene in den TAF im Gegensatz zu den NF [Bauer et al., 2010]. Aufgrund des Wissens, der Bedeutung und des Einflusses von AKR1C1 und AKR1C2 im Progesteronstoffwechsels lag die Annahme nahe, dass eine verringerte Expression dieser beiden Gene im Stroma sowie möglicherweise auch im Tumor das hormonelle Gleichgewicht beim Mammakarzinom verändert.

Diese Arbeit belegte, dass AKR1C1 und AKR1C2 prozentual in einem geringeren Anteil in den Fibroblasten und Tumorzellen des Kollektivs mit einer BRCAm im Vergleich zu denen ohne eine BRCAm exprimiert wurden. Somit ist von einem unterschiedlichen Steroidhormonmetabolismus beider untersuchter Kollektive auszugehen. Der Fakt, dass ein triple negatives Mammakarzinom bei BRCA-Mutationsträgerinnen gehäuft auftritt, bestätigt diese Aussage. Eine fehlende oder verminderte Expression von AKR1C1 resultiert in einem reduzierten Abbau von Progesteron, was dadurch zu einem erhöhtem Progesteronspiegel in diesem Gewebe führt.

Laut den Ergebnissen der Arbeit von Wenners et al. korrelierte die Expression der beiden Aldo-Keto-Reduktasen in Fibroblasten und Tumorzellen mit einer günstigen Tumorbio-logie und weiteren günstigen Charakteristika wie z.B. einer kleinen Tumorgroße sowie einem negativen Lymphknotenstatus und folglich einem längeren Überleben. In deren Analyse zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der AKR1C1-Expression in den Tumorzellen mit einem verlängerten DFS und OS. Die AKR1C2-Expression in den Fibroblasten und Tumorzellen erwiesen den gleichen Zusammenhang. [Wenners et al., 2016]. Eine starke AKR1C1- und AKR1C2-Expression in den Fibroblasten und Tumorzellen zeigte jedoch keinen Zusammenhang mit dem Hormonrezeptorstatus [Wenners et al., 2016]. Das Resultat von Wenners et al. war, dass eine starke AKR1C2-Expression in den Fibroblasten sowie eine starke Expression von AKR1C1 und AKR1C2 in den Tumorzellen eine signifikante Korrelation mit einem längeren DFS und OS belegte. Im Rahmen dieser Untersuchung lagen keine Daten zum DFS und OS vor, jedoch ist bekannt, dass ein Mammakarzinom mit einer BRCA-Mutation, vor allem die mit einer BRCA1-Mutation, eine ungünstige



Tumorbiologie, einen meist positiven Lymphknotenstatus sowie eine frühzeitige Fernmetastasierung aufweisen. Demnach hat dieses Patientinnenkollektiv ein schlechteres OS und DFS. Diese Schlussfolgerung unterstützt somit die Ergebnisse von Wenners et al.

Ziel heutiger Forschungsaufträge ist die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie für alle Subtypen, einschließlich dem triple negativen Mammakarzinom. Selbst HR-positive Mammakarzinome können im Verlauf eine Resistenz gegenüber einer antihormonellen Therapie wie z.B. Tamoxifen oder den Aromatasehemmern Anastrozol, Letrozol oder Fluvestrant entwickeln [Goss and Strasser, 2002, Vilquin et al., 2013]. Bisher lag das Augenmerk vor allem auf dem Östrogenrezeptor und seinen spezifischen Signalwegen. Die neuen Erkenntnisse über AKR1C1 und AKR1C2 sollen den Fokus der Forschung zusätzlich auf die Rolle des Progesterons, dessen Rezeptor sowie deren Metaboliten und Signalwege rücken. Diese beiden Gene stellen mit ihrer Funktion in der Regulierung des Progesteronstoffwechsels ein interessantes und vielversprechendes Ziel bei der Entwicklung neuer Therapieansätze unabhängig vom klassischen HR-Treatment dar. Diese hatten bis jetzt nur eine Hemmung der Östrogenproduktion zur Folge. Ein weiterer Aspekt, der den Einfluss von Progesteron bei der Erkrankung des Mammakarzinoms ins Zentrum des Interesses rückt ist, dass Frauen, die im Laufe ihres Lebens eine kombinierte Östrogen- und Gestagen-Therapie erhalten haben, ein erhöhtes Risiko für ein invasiv lobuläres und invasiv duktales Karzinom aufwiesen [Come et al., 2005, Bradlow and Sepkovic, 2004]. Im Vergleich dazu hatten Frauen, die eine reine Östrogentherapie erhalten haben, keine erhöhte Inzidenz für ein Mammakarzinom. Dies deutet auf eine stimulierende Wirkung von Progesteron in Kombination mit Östrogen auf die Zellproliferation hin [Ji et al., 2004, Chlebowski et al., 2003].

AKR1C2 wurde eine fördernde Funktion im Metastasierungsprozess eines hepatozellulären Karzinoms zugesprochen [Li et al., 2016]. Es ist anzunehmen, dass AKR1C2 eine solche Funktion auch bei der Mammakarzinomerkrankung übernimmt und dass eine Hemmung dieses Gens zu einer Hemmung oder Verzögerung der Fernmetastasierung führt. Weitere Studien sind nötig, um diese Annahme zu beweisen. Es wurden bereits unterschiedlichste AKR1C1-Inhibitoren identifiziert: Benzodiazepine, Pyrimindinderivate, An-

thranilsäure sowie Cyclopentan, Flavone und Rutheniumkomplexe, Phytoöstrogen, Steroidcarboxylate und Phthalimid [Zeng et al., 2017, Traven et al., 2015, Stefane et al., 2009, Brozic et al., 2006].

Jedoch bedarf es noch weiterer intensiver Forschungen im Bereich der zielgerichteten Krebstherapie von AKR1C1 und AKR1C2, um mit diesem Wissen einen entschiedenen Beitrag zur Verbesserung der Tumorthherapie leisten zu können.

#### **4.2.5 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit WISP1**

Aus der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper WISP1 ging hervor, dass es einen Unterschied in dem Anteil der exprimierenden Fibroblasten zwischen der Kohorte mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten und einem sporadischen Mammakarzinom gab. Die Analyse zeigte in beiden Kohorten einen ausgeprägten Anteil an positiven Fibroblasten, welcher aber in der Kohorte des sporadischen Mammakarzinoms größer war. Im Bezug auf die Intensität der Expression in den Fibroblasten bestand kein statistisch signifikanter Unterschied. Jedoch präsentierte sich in dem Kollektiv des sporadischen Mammakarzinoms am häufigsten eine mäßige im Vergleich zu einer starken WISP1-Expression bei dem Kollektiv mit einer BRCAm. Im Gegensatz zur WISP1-Färbung der Fibroblasten lag kein Unterschied im Anteil der positiven Tumorzellen bei der Auswertung der beiden untersuchten Kohorten vor. Auch hier fand sich in allen untersuchten Tumorzellen eine Markerexpression, die sich vor allem in Bereich 81 bis größer als 90% befand. Allerdings erwies die Auswertung der Intensität der Antikörper-Färbung der Tumorzellen einen statistisch signifikanten Unterschied, wobei sich in der Kohorte mit einer BRCAm prozentual ebenfalls am häufigsten eine starke im Vergleich zu einer mäßigen Intensität beim sporadischen Mammakarzinom zeigte. Diese Ergebnisse unterstützen die Arbeit von Bauer et al., in der sich zugleich die TAF der Mammakarzinom Präparate im großen Maße mit WISP1 anfärbten [Bauer et al., 2010].

WISP1 hat viele verschiedene physiologische und pathophysiologische Funktionen auf zellulärer Ebene, welche sich stark gewebespezifisch unterscheiden. Bei der Mammakarzinomkrankung übernimmt WISP1 eine onkogene Rolle und fördert die Tumorprogression durch Proliferation, Adhäsion, Invasion sowie Metastasierung. Es korreliert folglich mit einer schlechten Prognose der erkrankten Patientinnen. WISP1 aktiviert einen antiapoptischen Signalweg und verhindert den p53-abhängigen Zelltod von Mammakarzinomzellen [Feng and Jia, 2016, You et al., 2002].

Die WISP1-mRNA-Expression war in den Mammakarzinom Präparaten im Vergleich zu dem normalem Brustgewebe erhöht. Diese erhöhten Konzentrationen waren mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet [Xie et al., 2001, Davies et al., 2007]. In der immunhistochemischen Auswertung von WISP1 konnte in beiden Kollektiven eine sehr ausgeprägte WISP1-Färbung in den Tumorzellen und etwas geringer in den Fibroblasten nachgewiesen werden. Eine negative Expression von WISP1 zeigte sich in keinem Kollektiv, was darauf schließen lässt, dass eine WISP1-Expression bei allen Subtypen des Mammakarzinoms nachweisbar ist. Es bestand die Annahme, dass aufgrund der schlechteren Prognose eines Mammakarzinoms mit einer BRCAm der Anteil der positiven Fibroblasten größer gewesen wäre. Diese Annahme wurde durch den signifikanten Unterschied zugunsten einem höheren Anteil an positiver Fibroblasten in der Kohorte des sporadischen Mammakarzinoms widerlegt. Möglicherweise spielt nicht nur der Anteil der positiven Fibroblasten und Tumorzellen eine Rolle im Bezug auf die schlechte Prognose, sondern auch die Intensität der Expression. In dem Kollektiv mit einer BRCAm und der bekanntlich schlechteren Prognose sowie schnellere Metastasierungsrate war in den Tumorzellen eine stärkere Intensität der Antikörperfärbung für WISP1 nachweisbar.

Ein besseres Verständnis der Funktion von WISP1 könnte einen Ansatz für die Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen darstellen, wovon möglicherweise alle Mammakarzinomsubtypen profitieren würden. Chiang et al. belegte einen Zusammenhang zwischen der WISP1-Expression im Mammakarzinomgewebe und dem Wachstum von Mammakarzinomzellen, deren verstärkte Migration und Invasion sowie der Induzierung des EMT. Eine WISP1-Überexpression in Xenograft-Studien erhöhte die Rate der Entstehung

von Mammakarzinomen [Chiang et al., 2015]. Dagegen besitzt WISP2 durch dessen Überstimulation eine tumorsuppressive Funktion, welche zu einer verminderten Proliferation und Invasion führt [Fritah et al., 2008, Banerjee et al., 2008]. Auch WISP3 wird eine tumorinhibitorische Funktion aufgrund der hemmenden Wirkung auf die Progression, Invasion, Migration und Metastasierung von Mammakarzinomen zugesprochen [Huang et al., 2016, Pal et al., 2012, Kleer, 2016]. Die stärkere Intensität der WISP1-Expression in Tumorzellen der BRCA1-/BRCA2- Mutationsträgerinnen unterstützt diese Aussage, da diese Mammakarzinome eine verstärkte Migration und Invasion aufweisen. Ebenso haben Frauen, die diese Mutation in sich tragen ein höheres Risiko im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken.

Ein spezifischer WISP-Rezeptor wurde bisher noch nicht identifiziert. Bekannt ist nur, dass WISP-Proteine an Multi-Liganden-Rezeptoren binden und so regulatorisch wirksam werden [Kleer, 2016]. Die Entdeckung eines solchen Rezeptors könnte durch eine Blockierung wie z.B. beim Her2/neu-Rezeptor eventuell ein großes therapeutisches Potential aufweisen. Chiang et al. zeigte in einem Tierexperiment eine mitogene Funktion von WISP1 in Rattenfibroblasten. Eine Überexpression von WISP1 in den Stromazellen des Mammakarzinoms erwies ein progressives Wachstum durch einen parakrinen Signalweg [Chiang et al., 2015, Xu et al., 2000].

Xie et al. bewies in seinen Studien das WISP1 mit schlechten prognostischen Parametern wie einem fortgeschrittenen Tumorstadium, großer Tumorgöße, Lymphknotenmetastasen und einer HER2/neu-Überexpression assoziiert war [Xie et al., 2001]. Aufgrund der nicht vorliegenden klinisch-pathologischen Daten konnte in Bezug auf die untersuchten Kollektive dazu keine Aussage getätigt werden.

Es sind bereits viele Mechanismen bekannt, mittels derer WISP1 in die Karzinomgenese, Progression und Metastasierung eingreift. So wird die Proliferation durch eine Herabregulierung der Expression von p21 und p27 erhöht [Chiang et al., 2015]. Das Metastasierungspotential wird durch eine gesteigerte Motilität von Mammakarzinomzellen, eine WISP1-gesteuerte Inhibition von E-Cadherin und eine gesteigerte Expression von N-Cadherein so-

wie der Induktion der EMT verstärkt [Chiang et al., 2015, Thiery et al., 2009, Roy et al., 2014]. Patientinnen mit einer BRCA1-/BRCA2-Mutation haben im Falle einer Mammakarzinom-erkrankung ein höheres Risiko für eine Fernmetastasierung, die meist auch früher auftritt als bei Patientinnen mit einem sporadischen Mammakarzinom. Eventuell lässt sich dies auf die stärkere Intensität der WISP1-Anfärbung der Tumorzellen in diesem Patientinnenkollektiv zurückführen. Die Entstehung von Fernmetastasen ist bis heute hauptsächlich für die brustkrebsbedingten Todesfälle verantwortlich. Aus diesem Grund sollte der Fokus der heutigen Forschung vor allem auf die Entwicklung von neuen Therapieschemata zur Behandlung und Verhinderung von Metastasen beim Mammakarzinom liegen. WISP1 bietet viele Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien zur Behandlung aller Subtypen des Mammakarzinoms.

Die Arbeit von Murahovschi et al. wies eine erhöhte Produktion von WISP1 im viszeralem Fettgewebe nach und stellte einen Zusammenhang mit einer stimulierten chronischen Entzündungsreaktion sowie einer gesteigerten Insulinresistenz bei diesen Probanden fest. Eine Gewichtsreduktion hatte eine Senkung des WISP1-Spiegels im Blut zur Folge [Murahovschi et al., 2015]. Wird diese Erkenntnis auf die Erkrankung des Mammakarzinoms übertragen, ist mit einer Senkung des WISP1-Spiegels im Blut durch eine Gewichtsreduktion mit einer Reduzierung der Rate an Mammakarzinomen oder deren Progression zu rechnen. Über den Zusammenhang von Übergewicht und der Senkung des Karzinomrisikos gibt es unzählige Studien [Imayama et al., 2012, Wienecke et al., 2018, Adraskela et al., 2017].

#### **4.2.6 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit KLF4**

KLF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei unterschiedlichen Reparaturprozessen im menschlichen Körper spielt und somit einen Einfluss in der Aufrechterhaltung der DNA-Stabilität, Regulation der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose sowie Neuprogrammierung von Zellen hat [Yang et al., 2005, Wei et al., 2013, Ghaleb and Yang, 2017,

El-Karim et al., 2013].

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung von KLF4 ergab einen statistisch signifikanten Unterschied in allen untersuchten Parametern zwischen dem Kollektiv von Patientinnen mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten und denen mit einem sporadischen Mammakarzinom. Die Patientinnen mit einer BRCA-Mutation zeigten größtenteils keine oder hauptsächlich eine schwache Ausprägung einer KLF4 Expression in den Fibroblasten. Die Intensität dieser war schwach bis mäßig. In den Tumorzellen dieses Kollektives war der Anteil ohne eine KLF4-Expression noch ausgeprägter. Jedoch fanden sich einige Präparate, die einen größeren Anteil an positiven Tumorzellen für KLF4 aufwiesen. Die Intensität der Proteinexpression in den Tumorzellen war ebenfalls größtenteils schwach bis mäßig. Im Gegensatz dazu war KLF4 in den Fibroblasten sowie Tumorzellen des sporadischen Mammakarzinom deutlich überexprimiert und es zeigte sich in der Betrachtung der Intensität vor allem eine mäßige Proteinexpression. In der auf diese Studie aufbauenden Vorarbeiten von Bauer et al. wurde in den Fibroblasten des normalen Brustdrüsengewebes eine deutlich ausgeprägtere Expression von KLF4 im Vergleich zu den Tumor-assoziierten Fibroblasten nachgewiesen. In den TAF war teilweise sogar der komplette Verlust einer KLF4-Expression nachzuweisen [Bauer et al., 2010]. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit widerspiegeln die Erkenntnisse, einer negativen bis schwach ausgeprägten Markerexpression von KLF4 in den TAF beider Kollektive.

Die Expression von KLF4 im Brustgewebe hat eine entscheidende Auswirkung auf die Entstehung und Progression eines Mammakarzinoms. Song et al. zeigte, dass die positive Expressionsrate von KLF4 im Brustkrebsgewebe signifikant niedriger bzw. überwiegend negativ war als in präkanzerösem Brustgewebe [Song et al., 2017]. Eine hohe Expression von KLF4 korrelierte mit folgenden klinisch pathologischen Parametern: dem histopathologischen Typ (invasives Mammakarzinom of non special typ /NST), dem histologischen Grading (G2) und dem nicht Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (N0). Es bestand kein Zusammenhang mit dem Patientinnenalter, der Tumorgroße oder dem HR-Status [Song et al., 2017].

Vor allem das sporadische Mammakarzinom kennzeichnet sich durch das Vorliegen dieser klinisch pathologischen Parameter aus. Sie sind gehäuft vom NST, zeigen ein geringeres Grading und einen negativen Lymphknotenstatus im Vergleich zu den Mammakarzinomen mit einer BRCA1-/BRCA2-Mutation. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung der Fibroblasten- und Tumorzellexpression von KLF4 unterstützen diese Aussage. Ein junges Erkrankungsalter, großer Tumor und negativer HR-Status spielten keine Rolle bei der Expression von KLF4. Diese Faktoren sind gehäuft in dem Kollektiv mit einer BRCA1-Mutation vorzufinden und würden somit die hohe negative Expression von KLF4 erklären. Song et al. kamen zu der Schlussfolgerung, dass eine Transfektion des KLF4-Gens die Proliferation von Mammakarzinomzellen hemmen könnte, da dieses Gen negativ mit der Aggressivität des Mammakarzinoms korrelierte [Song et al., 2017].

Wie diese regulierenden intrazellulären Prozesse der Initiation und Progression von KLF4 beim Mammakarzinom genau ablaufen, muss weiter intensiv erforscht werden, um mit der Hilfe dieses Wissens neue Therapieoptionen entwickeln zu können. Durch die Hemmung der Initiation, Progression und Fernmetastasierung kann das DFS und OS unzähliger Patientinnen verbessert werden.

Viele Studien haben bereits bewiesen, dass eine starke Expression von KLF 4 mit einem besseren DFS korreliert und es somit einen günstigen Prognoseparameter darstellt [Nagata et al., 2014]. In dieser zugrunde liegenden Studie präsentierten die Proben des sporadischen Mammakarzinoms eine stärkere Expression von KLF4, welche ebenfalls eine bessere Prognose als das Kollektiv mit einer BRCAm hatte. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen demnach die bisherigen Erkenntnisse von Nagata et al.. Patientinnen mit einem TNBC und einer hohen Expression von KLF4 hatten in der Studie von Nagata et al. ein besseres DFS und OS als die Patientinnen mit einer geringen bis negativen Expression [Nagata et al., 2017]. Somit stellt KLF4 einen guten Prognoseparameter für Patientinnen mit einem TNBC dar.

Es gibt unzählige kontrovers diskutierte Arbeiten über die Funktion von KLF4 beim Mammakarzinom. In der Studie von Foster et al. wurde KLF4 eine stark onkogene Rolle

zugesprochen. In deren Untersuchungen zeigte KLF4 eine Überexpression bei einer Progression der Mammakarzinomkrankung [Foster et al., 2000]. KLF4 förderte die Progression durch die Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen [Yu et al., 2011]. Ebenso war eine nukleäre Expression von KLF4 im Mammakarzinomgewebe mit einer erhöhten Rezidivrate sowie einem tödlichem Ausgang der Erkrankung assoziiert [Pandya et al., 2004]. Im Gegensatz dazu konnten eine Reihe tumorsuppressiver Eigenschaften von KLF4 untersucht werden, wie die inhibierende Rolle auf die Entstehung von Fernmetastasen beim Mammakarzinom [Yori et al., 2011, Yori et al., 2010, Okuda et al., 2013] sowie ein längeres DFS bei einer erhöhten KLF4-Expression durch die Hemmung von Progression, Invasion und Migration von Mammakarzinomzellen [Jia et al., 2018]. Um eine Stellung zu diesen Studien nehmen zu können, müssten die Ergebnisse dieser vorliegenden Studie in Zusammenhang mit den klinisch pathologischen Parametern sowie dem DFS und OS betrachtet werden. Aufgrund der fehlenden Information war das nicht möglich.

KLF4 stellt ohne Zweifel einen sehr wichtigen Parameter in der weiteren Erforschung neuer therapeutischer Ansätze beim Mammakarzinom und auch vielen anderen Krebserkrankungen dar. Jedoch ist es noch ein langer Weg von der Grundlagenforschung bis zum einsatzfähigem Therapeutikum.

#### **4.2.7 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit $TGF\beta 2$**

Die Auswertung der beiden Mammakarzinomkollektive ergab in Bezug auf die Verteilung und Intensität der Fibroblastenfärbung mit  $TGF\beta 2$  einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Kollektiv mit einer BRCA1-/BRCA2-Mutation und dem der sporadischen Mammakarzinome. Die Präparate mit einer BRCAm wiesen zum Vergleichskollektiv häufiger keine oder eine geringere Fibroblastenexpression mit einer schwächeren Intensität auf. Im Bezug auf die anteilig gefärbten Tumorzellen mit  $TGF\beta 2$  zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven. Bei der Betrachtung der Intensität der gefärbten Tumorzellen ergab sich ein statistisch signifikanter



Unterschied, wobei die Kohorte mit einer BRCAm eine mäßig bis schwache und die des sporadischen Mammakarzinoms eine mäßig bis starke Intensität hatten.

Bauer et al. untersuchte die TGF $\beta$ 2-Expression in den TAF des Mammakarzinoms und stellte eine Überexpression im Vergleich zu den NF im gesunden Stroma fest [Bauer et al., 2010]. In der vorliegenden Studie wiesen 79% der Präparate des BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinoms und 84% der des sporadischen Mammakarzinoms eine TGF $\beta$ 2-Expression in den TAF auf.

TGF $\beta$ 2 besitzt zwei bedeutende und zugleich gegensätzliche Funktionen in der Karzinomgenese der weiblichen Mamma. Zum einen wirkt es als Inhibitor in frühen und zum anderen als Promotor in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien. Dieser Polypeptid-Wachstumsfaktor wird auch TGF $\beta$ 2-Schalter genannt [Dave et al., 2011]. In der Studie von Dave et al. wurde die Rolle von TGF $\beta$ 2 als wichtiger prädiktiver Marker für das Mammakarzinom bestätigt. Er fand heraus, dass eine hohe Expression von TGF $\beta$ 2 mit einem frühen Rezidiv im fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert war. Das traf aber nicht bei einer höheren Konzentration und einem frühen Erkrankungsstadium zu [Dave et al., 2011]. Da zu dem einem Kollektiv dieser Studie keine Erkrankungsstadien bekannt waren, kann leider kein Bezug zu den Ergebnissen von Dave et al. genommen werden.

Antiöstrogene wie Tamoxifen wirken durch die Aktivierung von TGF $\beta$ -Rezeptoren wachstumshemmend. Sie verbessern durch das reduzierte Risiko für ein Rezidiv die Prognose der Erkrankten signifikant. Für einen tumorfördernden Effekt spricht der Polymorphismus im Promoter von TGF $\beta$ 2, der zu einer gesteigerten Expression führt, welcher bei Lymphknotenmetastasen von Mammakarzinompatientinnen festgestellt wurde. Das spricht für eine Funktion bei der Invasion von Mammakarzinomzellen durch eine erhöhte Expression von TGF $\beta$ 2 [Buck and Knabbe, 2006]. Buck und Knabbe zeigten in ihrer Studie, dass der ER-Status ein wichtiger Marker für den oft beschriebenen “Switch” des TGF $\beta$ 2 vom Tumorsuppressor zum Tumorpromoter darstellt. Die TGF $\beta$ -Expression in den Fibroblasten des sporadischen Mammakarzinoms der vorliegenden Arbeit war jeweils von größerem Anteil und stärkerer Intensität als bei denen mit einer BRCAm. Das sporadische Mam-

makarzinom besitzt sehr oft einen positiven ER-Status.

Kim et al. untersuchte die Rolle von  $TGF\beta 2$  beim TNBC sowie die hemmende Wirkung von Silibinin auf die  $TGF\beta 2$ -Expression in TNBC-Zellen. Silibinin ist eine pharmakologisch aktive Substanz des Stoffkomplexes Silymarin, der aus den Knospen der Mariendistel (*Silybum marianum*) extrahiert wird [Lin et al., 2009]. Es bestand eine signifikant gesteigerte Expression von  $TGF\beta 1$  und 2 in TNBC-Zellen im Vergleich zu Mammakarzinomzellen, die einen positiven HR-Status hatten und/oder Her2/neu positiv waren [Kim et al., 2015]. Eine gesteigerte Expression war mit einer schlechteren Prognose für die Patientinnen verbunden.

In der durchgeführten immunhistochemischen Auswertung des Kollektivs mit einem BRCA-assoziierten Mammakarzinom ließ sich keine gesteigerte  $TGF\beta 2$ -Expression in den Tumorzellen sowie in den Fibroblasten nachweisen. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass es keine Unterteilung in ein BRCA1- oder BRCA2-positives Mammakarzinom gab. Vor allem Mammakarzinome mit einer BRCA1-Mutation sind triple negativ, wobei die mit einer BRCA2-Mutation oft HR und Her2/neu positiv sind.

Die Arbeit von Kim et al. erwies zudem, dass eine gesteigerte  $TGF\beta 2$ -Expression zu einer gesteigerten Expression von Fibronectin (FN) und der Matrix-Metallproteinase-2 (MMP-2) führte, was eine erhöhte Invasion und Migration der TNBC-Zellen zur Folge hatte. Ein erhöhtes  $TGF\beta 2$  hatte ebenfalls einen modulierenden Einfluss auf den Prozess des EMT, was zu einer gesteigerten Tumordinvasion und -migration des TNBC beitrug [Kim et al., 2015, Zhang et al., 2012]. Silibinin erniedrigte die  $TGF\beta 2$ - sowie die FN- und MMP-2-Expressionsrate. Das verringerte die Zellmigration, was die Entstehung von Lungenmetastasen bei einem TNBC verhinderte [Kim et al., 2016]. Silibinin stellt einen potentiellen neuen Ansatzpunkt zur medikamentösen Therapie eines TNBC durch eine Anti- $TGF\beta 2$ -Wirkung dar. Weitere Studien sind nötig, um den Nutzen dieses Medikamentes und dessen Nebenwirkungspotential für Patientinnen abschätzen zu können. Auch Singh und Settleman bestätigten den Zusammenhang einer Fehlregulation von  $TGF\beta 2$  im EMT-Prozess mit der Folge einer Tumordiversion, eines invasiven Wachstums sowie einer Fernmetastasierung von Karzinomzellen [Singh and Settleman, 2010]. Neueste Studien

belegten, dass die Induktion von dem EMT nicht nur zu einer direkten Tumorprogression führte, sondern auch zu einer Arzneimittelresistenz beitrug, die wiederum ein Fortschreiten der Erkrankung zur Folge hatte [Nakamura et al., 2015]. Klinisch interessant ist somit ein zielgerichtetes medikamentöses Einschreiten in die Hemmung der gesteigerten  $TGF\beta 2$ -Expression, um dadurch eine EMT-assoziierte Arzneimittelresistenz zu überwinden. Viele weitere Studien beschreiben verschiedene regulatorische Interaktionen mit  $TGF\beta 2$ , die zu einer gesteigerten Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung beitrugen [Liu et al., 2015, Nagpal et al., 2015, Ouhtit et al., 2013].

Bane et al. bestätigte in seiner Expressionsstudie eine höhere Expression von  $TGF\beta 2$  in BRCA1-assoziierten Mammakarzinomen als bei denen mit einer BRCA2-Mutation [Bane et al., 2009]. Eine erhöhte  $TGF\beta 2$ -Expression zeichnete eine schlechtere Prognose ab, was das reduzierte OS und DFS von Patientinnen mit einem BRCA1-assoziierten Mammakarzinom bestätigte. In weiteren Studien sollten BRCA1-/BRCA2-positive Mammakarzinome getrennt untersucht werden.

#### **4.2.8 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit GALNT3**

Über die Funktion von GALNT3 bei der Initiation, Progression und Metastasierung des Mammakarzinoms ist nicht viel bekannt. Die Analysen der GALNT3-Expression in den Fibroblasten und Tumorzellen bei BRCA1-/BRCA2-Mutationsträgerinnen und Patientinnen mit einem sporadischen Mammakarzinom dieser Studie ergaben in Bezug auf den Anteil sowie der Intensität der Expression jeweils einen statistisch signifikanten Unterschied. Die Expression in den Fibroblasten und Tumorzellen war in der Kohorte des BRCA1-/BRCA2-positiven Mammakarzinoms deutlicher schwächer ausgeprägt.

GALN-Transferasen weisen veränderte Glykosylierungen vor allem bei erblichen Erkrankungen, malignen Transformationen, der Tumorprogression sowie Metastasierung auf [Vojta et al., 2016]. Eine Mutation in GALNT12 führt zu einer malignen Transformati-

on und Störung der ionischen Wechselwirkungen sowie einer reduzierten enzymatischen Aktivität. Das wird mit dem Auftreten von einem bilateralem Mammakarzinom assoziiert [Hussain et al., 2014]. Ein bilaterales Mammakarzinom zeigt keinen klaren Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer BRCA1-/BRCA2-Mutation [Steinmann et al., 2001]. GALNT3 kodiert die GalNAc Transferase 3, das den Abbau des phosphaturischen Hormons Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23) inhibiert [Ichikawa et al., 2010]. Es ist gekennzeichnet durch eine Veränderung in der Promotor-Methylierung und Expression mit einer folglich veränderten Glykanstruktur beim Vorliegen eines Karzinoms ( wie z.B. beim Mammakarzinom, Zervixkarzinom, Melanom, hepatozelluläres Karzinom) [Vojta et al., 2016]. In diesem Zusammenhang nahm Vojta et al. an, dass der Methylierungsstatus im Promotor des GALNT3-Gen und anderer GALNT-Gene als prognostischer Marker für spezifische Tumorerkrankungen dienen könnte. In der Pilotstudie von Cavallo et al. wurden 5 Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) identifiziert, einschließlich GALNT3. Es zeigte sich eine gesteigerte GALNT3-Expression bei einer größeren Tumormasse in allen Subtypen des Mammakarzinoms. Leider kann aufgrund der fehlenden Daten zum Tumorstadium des Kollektives mit einer BRCAm kein Bezug dazu genommen werden. Nach dieser Aussage würde man in dem Kollektiv mit einer BRCAm eine größere Tumormasse und damit eine gesteigerte GALNT3-Expression annehmen. Das wurde aber durch eine deutlich ausgeprägtere GALNT3-Expression in den Tumorzellen und TAF des sporadischen Mammakarzinoms widerlegt.

Auf der Grundlage dieses Wissens von Cavallo et al. sollten weitere Forschungsarbeiten mit dem Ziel der Entwicklung eines Impfstoffes gegen diese TAAs aufbauen. So könnte die Unterdrückung einer neoplastischen Transformation erreicht werden [Cavallo et al., 2005].

Bei einem hochgradig malignen serösen Ovarialkarzinom bestand eine starke Überexpression von GALNT3 im Vergleich zum benignen Ovarialgewebe [Sheta et al., 2016]. Die GALNT3-Expression korrelierte signifikant mit einem kürzeren DFS bei Patientinnen, die an einem epithelialen Ovarialkarzinom erkrankt waren. Die Hemmung von GALNT3 führte bei dieser Tumorerkrankung zu einer Reduktion der Zellproliferation und einem Zellzyklusarrest in der S-Phase [Wang et al., 2014, Sheta et al., 2016]. Ein solches onko-

genes Potential ist auch beim Mammakarzinom anzunehmen.

Maupin et al. konnte in seinen Untersuchungen bei schlecht differenzierten Pankreaskarzinomen eine reduzierte GALNT3-Expression nachweisen. Diese Ergebnisse haben eine hohe klinische Bedeutung und liefern Anhaltspunkte für die Therapie des aggressiven und oft arzneimittelresistenten Pankreaskarzinoms [Maupin et al., 2010]. In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben sich Übereinstimmungen mit der Arbeit von Maupin. In dem Kollektiv mit einem BRCA1-/BRCA2-positiven Mammakarzinom zeigte sich ebenfalls eine reduzierte GALNT3-Expression. Mammakarzinome vor allem mit einer BRCA1-Mutation sind im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom schlechter differenziert. Bezüglich dem Einfluss von GALNT3 beim Mammakarzinom liegen nur sehr wenige Studien vor. Um die genaue Rolle von GALNT3 sowie mögliche Therapieansätze für das Mammakarzinom etablieren zu können, sind weitere Studien nötig.

## 5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist ein komplexer Organismus, in dessen Tumorzellen und dem umliegenden Stroma unzählige signifikante Interaktionen erfolgen. Diese haben einen maßgeblichen Einfluss auf den Verlauf einer Erkrankung. Vor allem die Tumor-assoziiierenden Fibroblasten (TAF) des Stromas rücken zunehmend in den Fokus der onkologischen Forschung. Sie besitzen eine ausschlaggebende Rolle bei der Initiation, Invasion, Progression und Metastasierung vieler Karzinome. Die Wechselwirkungen von Tumorzellen, Stroma und TAF nehmen einen entscheidenden Einfluss auf das Therapieansprechen, dem progressionsfreien Überleben sowie dem Gesamtüberleben bei allen Karzinomerkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Detektion möglicher Differenzen bezüglich der Expression von relevanten Antigenen zwischen Gewebeproben eines BRCA1-/BRCA2-assoziierten und denen eines sporadischen Mammakarzinoms. Diese wurden nach ihrer Stromamorphologie, der jeweiligen Antigenausprägung sowie Intensität in den TAF, Tumorzellen, sowie anderen Stromakomponenten (Lymphozyten, Endothelzellen und Makrophagen) quantifiziert. Die Untersuchungen erfolgten an Paraffinschnitten von Mammakarzinomgewebe im Rahmen einer immunhistochemischen Färbung. Die Studie umfasste 5 überexprimierte (ST6GALNAC5, GATA-3, WISP1, TGF $\beta$ 2 sowie GALNT3) und 3 unterexprimierte (AKR1C1, AKR1C2 und KLF4) Kandidatenproteine. Insgesamt wurden 134 Gewebeproben pro Antikörperfärbung evaluiert. 65 davon gehörten zu dem Kollektiv mit einer BRCA1-/BRCA2-Mutation und 69 Proben umfassten das Vergleichskollektiv mit einem sporadischen Mammakarzinom. Die zur Detektierung und Quantifizierung verwendete immunhistochemische Färbung war die indirekte Zwei-

Schritt-Methode. Der prozentuale Stromaanteil, dessen Verteilungsmuster sowie Zellreichtum und das lymphozytäre Infiltrat waren die morphologischen Charakteristika, auf deren Grundlage die mikroskopische Auswertung erfolgte.

Die morphologische Auswertung ergab in beiden Kollektiven ein stromareiches Tumoreareal und hauptsächlich ein verzweigtes/baumartiges Stromaverteilungsmuster. Außerdem erwies sich in beiden Kohorten gehäuft ein mäßiges Zellreichtum sowie ein ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen eine Diskrepanz der Fibroblastenexpression bei 6 von 8 Antikörper zwischen dem BRCA1-/BRCA2-assoziierten und dem sporadischen Mammakarzinom. Im Gegensatz dazu lag bei 7 Antikörpern ein Unterschied in der Proteinexpression der Tumorzellen beider Kohorten vor. Die Analysen ergaben eine statistische Diskrepanz zugunsten einer Unterexpression von ST6GALNAC5 bei dem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom bezüglich der Intensität der Tumorzellen sowie der Anteil der Expression in anderen Stromakomponenten. Die GATA3-Färbung erwies in Anbetracht aller untersuchten Gesichtspunkte keinen Unterschied, wobei KLF4 und GALNT3 wiederum in allen Analysen eine Unterexpression beim BRCA1-/BRCA2-positiven Mammakarzinom aufwiesen. Eine Überexpression beim Mammakarzinom mit einer BRCA1-/BRCA2-Mutation zeigte sich lediglich in der Quantifizierung der Intensität in den Tumorzellen hinsichtlich der AKR1C1- und WISP1-Färbung. Sonst präsentierte sich bei den Antikörpern AKR1C1 und AKR1C2 in allen (außer der Expression in anderen Stromakomponenten) untersuchten Merkmalen eine signifikante Unterexpression in diesem Kollektiv. WISP1 hatte zusätzlich eine herunterregelte Expression in den TAF der Gruppe mit einer Mutation. So auch TGF $\beta$ 2, das außerdem eine herunterregelte Intensität in den TAF und Tumorzellen des BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinoms zeigte.

Die hier vorliegende Arbeit belegt, dass bis auf zwei Ausnahmen immer eine Unterexpression der Kandidatenproteine in dem Kollektiv mit einem BRCA1-/BRCA2-assoziierten Mammakarzinom vorlag. Es könnte ein Hinweis auf eine unterschiedliche Reaktion der immunmodulierenden Krebstherapie im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom sein.

Es sind weitere Studien unter Einbezug des OS und DFS dringend notwendig, um einen relevanten Stellenwert dieser Unterschiede für die Prognose der beiden Kollektive machen zu können. Die Ergebnisse dieser Studie sind aufgrund des Umfanges des Patientinnenkollektivs als repräsentativ anzusehen. Eine Untersuchung in Bezug auf die jeweilige BRCA-Mutation lässt noch prägnantere Unterschiede erwarten. Die Ergebnisse unterstützen die entscheidende Rolle des Tumor-assoziierten Stromas bei der Progression, Invasion und Metastasierung. Jedoch sind noch nicht alle Fragen über deren Schlüsselrolle geklärt. Eine gezielte pharmakologische Hemmung der TAF und der Tumorzellen müsste in der Zukunft eine hohe klinische Bedeutung beigemessen werden. Dadurch könnte eine gezielte und effiziente Behandlung sowie eine Verbesserung der Prognose bei allen Krebserkrankungen erreicht werden.



# Literaturverzeichnis

- [Aaltomaa et al., 1992] Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Kosma, V. M., Marin, S., Alhava, E., and Syrjänen, K. (1992). Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 28A(4-5):859–864.
- [Addicks et al., 2013] Addicks, K., Knoche, H., Themann, H., and Müller, K. (2013). *Histologie und Histopathologie: Kurzlehrbuch für medizinisch-technische Assistenten*. Springer Berlin Heidelberg.
- [Adraskela et al., 2017] Adraskela, K., Veisaki, E., Koutsilieris, M., and Philippou, A. (2017). Physical Exercise Positively Influences Breast Cancer Evolution. *Clin. Breast Cancer*, 17(6):408–417.
- [Ahmed et al., 2015] Ahmed, S., Sami, A., and Xiang, J. (2015). HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer*, 22(2):101–116.
- [Allinen et al., 2004] Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W. R., and Polyak, K. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, 6(1):17–32.
- [Antoniou et al., 2003] Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H.,

- Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O. P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D. G., and Easton, D. F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am. J. Hum. Genet.*, 72(5):1117–1130.
- [Arendt et al., 2010] Arendt, L. M., Rudnick, J. A., Keller, P. J., and Kuperwasser, C. (2010). Stroma in breast development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(1):11 – 18. Tumor-Stroma Interactions Flower Development.
- [Arun et al., 2015] Arun, B., Akar, U., Gutierrez-Barrera, A. M., Hortobagyi, G. N., and Ozpolat, B. (2015). The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 47(1):262–268.
- [Asch-Kendrick and Cimino-Mathews, 2016] Asch-Kendrick, R. and Cimino-Mathews, A. (2016). The role of GATA3 in breast carcinomas: a review. *Hum. Pathol.*, 48:37–47.
- [Asselin-Labat et al., 2011] Asselin-Labat, M. L., Sutherland, K. D., Vaillant, F., Gyorki, D. E., Wu, D., Holroyd, S., Breslin, K., Ward, T., Shi, W., Bath, M. L., Deb, S., Fox, S. B., Smyth, G. K., Lindeman, G. J., and Visvader, J. E. (2011). Gata-3 negatively regulates the tumor-initiating capacity of mammary luminal progenitor cells and targets the putative tumor suppressor caspase-14. *Mol. Cell. Biol.*, 31(22):4609–4622.
- [Bane et al., 2009] Bane, A. L., Pinnaduwa, D., Colby, S., Reedijk, M., Egan, S. E., Bull, S. B., O’Malley, F. P., and Andrulis, I. L. (2009). Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 117(1):183–191.
- [Banerjee et al., 2008] Banerjee, S., Dhar, G., Haque, I., Kambhampati, S., Mehta, S., Sengupta, K., Tawfik, O., Phillips, T. A., and Banerjee, S. K. (2008). CCN5/WISP-2 expression in breast adenocarcinoma is associated with less frequent progression

of the disease and suppresses the invasive phenotypes of tumor cells. *Cancer Res.*, 68(18):7606–7612.

- [Barnes et al., 2016] Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Fiebig, J., Jordan, S., Kraywinkel, K., Niemann, H., Nowossadeck, E., Poethko-Müller, C., Prütz, F., Rattay, P., Schönfeld, I., Starker, A., Wienecke, A., Wolf, U., Castell, S., Delere, Y., Grabow, D., Kaatsch, P., Multmeier, J., Spix, C., and Tenckhoff, B. (2016). *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Robert Koch-Institut, Berlin.
- [Bauer et al., 2010] Bauer, M., Su, G., Casper, C., He, R., Rehrauer, W., and Friedl, A. (2010). Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene*, 29(12):1732–1740.
- [Beck et al., 2011] Beck, A. H., Sangoi, A. R., Leung, S., Marinelli, R. J., Nielsen, T. O., van de Vijver, M. J., West, R. B., van de Rijn, M., and Koller, D. (2011). Systematic analysis of breast cancer morphology uncovers stromal features associated with survival. *Sci Transl Med*, 3(108):108ra113.
- [Bell et al., 2002] Bell, D. W., Erban, J., Sgroi, D. C., and Haber, D. A. (2002). Selective loss of heterozygosity in multiple breast cancers from a carrier of mutations in both BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res.*, 62(10):2741–2743.
- [Bellack and Hersen, 1998] Bellack, A. and Hersen, M. (1998). *Comprehensive Clinical Psychology: Assessment*. Comprehensive Clinical Psychology. Pergamon.
- [Berschneider and Konigshoff, 2011] Berschneider, B. and Konigshoff, M. (2011). WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1): a novel mediator linking development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 43(3):306–309.
- [Bertz et al., 2010] Bertz, J., Dahm, S., Haberland, J., Kraywinkel, K., Kurth, B.-M., and Wolf, U. (2010). *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Robert Koch-Institut, Berlin.

- [Bhowmick et al., 2004] Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., and Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015):332–337.
- [Bhuiyan et al., 2016] Bhuiyan, R. H., Kondo, Y., Yamaguchi, T., Tokuda, N., Ohkawa, Y., Hashimoto, N., Ohmi, Y., Yamauchi, Y., Furukawa, K., Okajima, T., and Furukawa, K. (2016). Expression analysis of 0-series gangliosides in human cancer cell lines with monoclonal antibodies generated using knockout mice of ganglioside synthase genes. *Glycobiology*, 26(9):984–998.
- [Bianchini et al., 2010] Bianchini, G., Qi, Y., Alvarez, R. H., Iwamoto, T., Coutant, C., Ibrahim, N. K., Valero, V., Cristofanilli, M., Green, M. C., Radvanyi, L., Hatzis, C., Hortobagyi, G. N., Andre, F., Gianni, L., Symmans, W. F., and Puztai, L. (2010). Molecular anatomy of breast cancer stroma and its prognostic value in estrogen receptor-positive and -negative cancers. *J. Clin. Oncol.*, 28(28):4316–4323.
- [Binai et al., 2010] Binai, N., Damert, A., Carra, G., Steckelbroeck, S., Löwer, J., and Löwer, R. (2010). Expression of estrogen receptor alpha increases leptin-induced STAT3 activity in breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, 240-8:55–66.
- [Boenisch and Henne, 2003] Boenisch, M. and Henne, C. (2003). *Handbuch immunchemische Färbemethoden*. Hamburg : DakoCytomation, Hamburg, 3. auflage edition.
- [Bos et al., 2009] Bos, P. D., Zhang, X. H., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R. R., Nguyen, D. X., Minn, A. J., van de Vijver, M. J., Gerald, W. L., Foekens, J. A., and Massague, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, 459(7249):1005–1009.
- [Bradlow and Sepkovic, 2004] Bradlow, H. L. and Sepkovic, D. W. (2004). Steroids as procarcinogenic agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1028:216–232.
- [Brozic et al., 2006] Brozic, P., Smuc, T., Gobec, S., and Rizner, T. L. (2006). Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 259(1-2):30–42.

- [Buck and Knabbe, 2006] Buck, M. B. and Knabbe, C. (2006). TGF-beta signaling in breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1089:119–126.
- [Bussard et al., 2016] Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C., and Marini, F. C. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.*, 18(1):84.
- [Byrne et al., 2017] Byrne, D. J., Deb, S., Takano, E. A., and Fox, S. B. (2017). GATA3 expression in triple-negative breast cancers. *Histopathology*, 71(1):63–71.
- [Byrnes et al., 2008] Byrnes, G. B., Southey, M. C., and Hopper, J. L. (2008). Are the so-called low penetrance breast cancer genes, ATM, BRIP1, PALB2 and CHEK2, high risk for women with strong family histories? *Breast Cancer Res.*, 10(3):208.
- [Byrski et al., 2010] Byrski, T., Gronwald, J., Huzarski, T., Grzybowska, E., Budryk, M., Stawicka, M., Mierzwa, T., Szwiec, M., Wisniowski, R., Siolek, M., Dent, R., Lubinski, J., and Narod, S. (2010). Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 28(3):375–379.
- [Cakir et al., 2017] Cakir, A., Isik Gonul, I., Ekinci, O., Cetin, B., Benekli, M., and Uluoglu, O. (2017). GATA3 expression and its relationship with clinicopathological parameters in invasive breast carcinomas. *Pathol. Res. Pract.*, 213(3):227–234.
- [Calaf and Hei, 2000] Calaf, G. and Hei, T. a. (2000). Establishment of a radiation- and estrogen-induced breast cancer model. *Carcinogenesis*, 21(4):769–76.
- [Cavallo et al., 2005] Cavallo, F., Astolfi, A., Iezzi, M., Cordero, F., Lollini, P. L., Forni, G., and Calogero, R. (2005). An integrated approach of immunogenomics and bioinformatics to identify new Tumor Associated Antigens (TAA) for mammary cancer immunological prevention. *BMC Bioinformatics*, 6 Suppl 4:S7.
- [Cavanagh and Rogers, 2015] Cavanagh, H. and Rogers, K. M. (2015). The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. *Hered Cancer Clin Pract*, 13(1):16.

- [Chandler et al., 2011] Chandler, E. M., Saunders, M. P., Yoon, C. J., Gourdon, D., and Fischbach, C. (2011). Adipose progenitor cells increase fibronectin matrix strain and unfolding in breast tumors. *Phys Biol*, 8(1):015008.
- [Chang et al., 2004] Chang, H. Y., Sneddon, J. B., Alizadeh, A. A., Sood, R., West, R. B., Montgomery, K., Chi, J. T., van de Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P. O. (2004). Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol.*, 2(2):E7.
- [Chen et al., 2001] Chen, X., Johns, D. C., Geiman, D. E., Marban, E., Dang, D. T., Hamlin, G., Sun, R., and Yang, V. W. (2001). Krüppel-like factor 4 (gut-enriched Krüppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 276(32):30423–30428.
- [Chiang et al., 2015] Chiang, K. C., Yeh, C. N., Chung, L. C., Feng, T. H., Sun, C. C., Chen, M. F., Jan, Y. Y., Yeh, T. S., Chen, S. C., and Juang, H. H. (2015). WNT-1 inducible signaling pathway protein-1 enhances growth and tumorigenesis in human breast cancer. *Sci Rep*, 5:8686.
- [Chlebowski et al., 2003] Chlebowski, R. T., Hendrix, S. L., Langer, R. D., Stefanick, M. L., Gass, M., Lane, D., Rodabough, R. J., Gilligan, M. A., Cyr, M. G., Thomson, C. A., Khandekar, J., Petrovitch, H., and McTiernan, A. (2003). Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women’s Health Initiative Randomized Trial. *JAMA*, 289(24):3243–3253.
- [Choi et al., 2006] Choi, B. J., Cho, Y. G., Song, J. W., Kim, C. J., Kim, S. Y., Nam, S. W., Yoo, N. J., Lee, J. Y., and Park, W. S. (2006). Altered expression of the KLF4 in colorectal cancers. *Pathol. Res. Pract.*, 202(8):585–589.
- [Cimino-Mathews et al., 2013] Cimino-Mathews, A., Subhawong, A. P., Illei, P. B., Sharma, R., Halushka, M. K., Vang, R., Fetting, J. H., Park, B. H., and Argani, P. (2013). GATA3 expression in breast carcinoma: utility in triple-negative, sarcomatoid, and metastatic carcinomas. *Hum. Pathol.*, 44(7):1341–1349.

- [Colotta et al., 2009] Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7):1073–1081.
- [Come et al., 2005] Come, S. E., Buzdar, A. U., Ingle, J. N., Arteaga, C. L., Brodie, A. M., Colditz, G. A., Johnston, S. R., Kristensen, V. N., Lønning, P. E., McDonnell, D. P., Osborne, C. K., Russo, J., Santen, R. J., Yee, D., and Hart, C. S. (2005). Proceedings of the Fourth International Conference on Recent Advances and Future Directions in Endocrine Manipulation of Breast Cancer: conference summary statement. *Clin. Cancer Res.*, 11(2 Pt 2):861s–4s.
- [Comen, 2012] Comen, E. A. (2012). Tracking the seed and tending the soil: evolving concepts in metastatic breast cancer. *Discov Med*, 14(75):97–104.
- [Couch et al., 2001] Couch, F. J., Cerhan, J. R., Vierkant, R. A., Grabrick, D. M., Therneau, T. M., Pankratz, V. S., Hartmann, L. C., Olson, J. E., Vachon, C. M., and Sellers, T. A. (2001). Cigarette smoking increases risk for breast cancer in high-risk breast cancer families. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10(4):327–332.
- [Crisp et al., 1998] Crisp, T., Clegg, E., Cooper, R., Wood, W., Anderson, D., Baetcke, K., Hoffmann, J., Morrow, M., Rodier, D., Schaeffer, J., Touart, L., Zeeman, M., and Patel, Y. (1998). Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental health perspectives*, 106-1:11–56.
- [Dave et al., 2011] Dave, H., Trivedi, S., Shah, M., and Shukla, S. (2011). Transforming growth factor beta 2: a predictive marker for breast cancer. *Indian J. Exp. Biol.*, 49(11):879–887.
- [Davies et al., 2007] Davies, S. R., Watkins, G., Mansel, R. E., and Jiang, W. G. (2007). Differential expression and prognostic implications of the CCN family members WISP-1, WISP-2, and WISP-3 in human breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 14(6):1909–1918.
- [de Kruijf et al., 2011] de Kruijf, E. M., van Nes, J. G., van de Velde, C. J., Putter, H., Smit, V. T., Liefers, G. J., Kuppen, P. J., Tollenaar, R. A., and Mesker, W. E. (2011).

- Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 125(3):687–696.
- [de Ruijter et al., 2011] de Ruijter, T. C., Veeck, J., de Hoon, J. P., van Engeland, M., and Tjan-Heijnen, V. C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 137(2):183–192.
- [De Waard, 1975] De Waard, F. (1975). Breast cancer incidence and nutritional status with particular reference to body weight and height. *Cancer research*, 35(11 Pt. 2):3351–6.
- [Denkert et al., 2010] Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B. M., Kormor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., von Torne, C., Weichert, W., Engels, K., Solbach, C., Schrader, I., Dietel, M., and von Minckwitz, G. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 28(1):105–113.
- [Dennis et al., 2011] Dennis, J., Krewski, D., Cote, F. S., Fafard, E., Little, J., and Ghadirian, P. (2011). Breast cancer risk in relation to alcohol consumption and BRCA gene mutations—a case-only study of gene-environment interaction. *Breast J*, 17(5):477–484.
- [Dent et al., 2007] Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.*, 13(15 Pt 1):4429–4434.
- [DeSantis et al., 2014] DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., and Jemal, A. (2014). Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 64(1):52–62.
- [Diagnostics, 2008] Diagnostics, A. M. (2008). *Bond-max , Vollautomat für immunhistochemische Färbungen*. A. Menarini Diagnostics Deutschland, eine Division der Berlin-Chemie AG, Berlin, rev. 01, 2008/03 edition.



- [Disis and Stanton, 2015] Disis, M. L. and Stanton, S. E. (2015). Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, pages 25–30.
- [Doebar et al., 2017] Doebar, S. C., Slaets, L., Cardoso, F., Giordano, S. H., Bartlett, J. M., Tryfonidis, K., Dijkstra, N. H., Schroder, C. P., van Asperen, C. J., Linderholm, B., Benstead, K., Dinjens, W. N., van Marion, R., van Diest, P. J., Martens, J. W., and van Deurzen, C. H. (2017). Male breast cancer precursor lesions: analysis of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program. *Mod. Pathol.*, 30(4):509–518.
- [Downey et al., 2015a] Downey, C. L., Simpkins, S. A., Holliday, D. L., Jones, J. L., Jordan, L. B., Kulka, J., Hanby, A. M., and Speirs, V. (2015a). Reponse to: comment on, 'Tumour-stroma ratio (TSR) in oestrogen-positive breast cancer patients'. *Br. J. Cancer*, 112(11):1833–1834.
- [Downey et al., 2014] Downey, C. L., Simpkins, S. A., White, J., Holliday, D. L., Jones, J. L., Jordan, L. B., Kulka, J., Pollock, S., Rajan, S. S., Thygesen, H. H., Hanby, A. M., and Speirs, V. (2014). The prognostic significance of tumour-stroma ratio in oestrogen receptor-positive breast cancer. *Br. J. Cancer*, 110(7):1744–1747.
- [Downey et al., 2015b] Downey, C. L., Thygesen, H. H., Sharma, N., and Shaaban, A. M. (2015b). Prognostic significance of tumour stroma ratio in inflammatory breast cancer. *Springerplus*, 4:68.
- [Drolez et al., 2016] Drolez, A., Vandenhaute, E., Delannoy, C. P., Dewald, J. H., Gosselet, F., Cecchelli, R., Julien, S., Dehouck, M. P., Delannoy, P., and Mysiorek, C. (2016). ST6GALNAC5 Expression Decreases the Interactions between Breast Cancer Cells and the Human Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci*, 17(8).
- [Dvorak, 1986] Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 315(26):1650–1659.

- [Easton et al., 1999] Easton, D., Thompson, D., McGuffog, L., Haites, N., Schofield, A., Scott, R. J., King, M. C., Schubert, E., Bignon, Y., Stratton, M., Ford, D., Peto, J., Eeles, R., Ponder, B., Gayther, S., Chang-Claude, J., Weber, B. H., Hamann, U., Benitez, J., Osorio, A., Eerola, H., Nevanlinna, H., Lynch, H. T., Narod, S., Goldgar, D., Lenoir, G., Arason, A., Barkardottir, R., Egilsson, V., Eyfjord, J., Tulinus, H., Bishop, D. T., Borg, A., Loman, N., Johannsson, O., Olsson, H., Tonin, P., Foulkes, W., Ghadirian, P., Mes-Masson, A. M., Weber, B., Devilee, P., Vasen, H., Cornelisse, C. J., Meijers-Heijboer, H., Klijn, J. G., Narod, S., Brunet, J. S., Moslehi, R., Neuhausen, S., and Cannon-Albright, L. (1999). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(15):1310–1316.
- [Eekhout et al., 2007] Eekhout, J., Keeton, E. K., Lupien, M., Krum, S. A., Carroll, J. S., and Brown, M. (2007). Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Cancer Res.*, 67(13):6477–6483.
- [Eisinger et al., 1996] Eisinger, F., Stoppa-Lyonnet, D., Longy, M., Kerangueven, F., Noguchi, T., Bailly, C., Vincent-Salomon, A., Jacquemier, J., Birnbaum, D., and Sobol, H. (1996). Germ line mutation at BRCA1 affects the histoprognostic grade in hereditary breast cancer. *Cancer Res.*, 56(3):471–474.
- [El-Karim et al., 2013] El-Karim, E. A., Hagos, E. G., Ghaleb, A. M., Yu, B., and Yang, V. W. (2013). Krüppel-like factor 4 regulates genetic stability in mouse embryonic fibroblasts. *Molecular Cancer*, 12(1):89.
- [Feng and Jia, 2016] Feng, M. and Jia, S. (2016). Dual effect of WISP-1 in diverse pathological processes. *Chin. J. Cancer Res.*, 28(6):553–560.
- [Fisher et al., 2002] Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., Jeong, J. H., and Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 347(16):1233–1241.

- [Foster et al., 2000] Foster, K. W., Frost, A. R., McKie-Bell, P., Lin, C. Y., Engler, J. A., Grizzle, W. E., and Ruppert, J. M. (2000). Increase of GKLf messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res.*, 60(22):6488–6495.
- [Fritah et al., 2008] Fritah, A., Saucier, C., De Wever, O., Bracke, M., Bieche, I., Lidereau, R., Gespach, C., Drouot, S., Redeuilh, G., and Sabbah, M. (2008). Role of WISP-2/CCN5 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, 28(3):1114–1123.
- [Gabbiani et al., 1971] Gabbiani, G., Ryan, G. B., and Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27(5):549–550.
- [Ghafouri-Fard et al., 2015] Ghafouri-Fard, S., Abbasi, F., Azizi, F., Javaheri, M., Mehdizadeh, M., and Setoodeh, A. (2015). Hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome (HHS): report of two cases with a recurrent mutation and review of the literature. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 28(1-2):231–235.
- [Ghaleb and Yang, 2017] Ghaleb, A. M. and Yang, V. W. (2017). Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*, 611:27–37.
- [Goss and Strasser, 2002] Goss, P. E. and Strasser, K. (2002). Tamoxifen resistant and refractory breast cancer: the value of aromatase inhibitors. *Drugs*, 62(6):957–966.
- [Gray et al., 2017] Gray, J. M., Rasanayagam, S., Engel, C., and Rizzo, J. (2017). State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. *Environ Health*, 16(1):94.
- [Guo et al., 2017] Guo, Y., Yu, P., Liu, Z., Maimaiti, Y., Chen, C., Zhang, Y., Yin, X., Wang, S., Liu, C., and Huang, T. (2017). Prognostic and clinicopathological value of GATA binding protein 3 in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 12(4):e0174843.

- [Gurbuz and Chiquet-Ehrismann, 2015] Gurbuz, I. and Chiquet-Ehrismann, R. (2015). CCN4/WISP1 (WNT1 inducible signaling pathway protein 1): a focus on its role in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 62:142–146.
- [Hall et al., 1990] Hall, J., Lee, M., Newman, B., Morrow, J., Anderson, L., Huey, B., and King, M. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4988):1684–9.
- [Hanahan and Weinberg, 2011] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–674.
- [Hanker et al., 2013] Hanker, L. C., Rody, A., Holtrich, U., Pusztai, L., Ruckhaeberle, E., Liedtke, C., Ahr, A., Heinrich, T. M., Sanger, N., Becker, S., and Karn, T. (2013). Prognostic evaluation of the B cell/IL-8 metagene in different intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res. Treat.*, 137(2):407–416.
- [Hartmann et al., 2005] Hartmann, L. C., Sellers, T. A., Frost, M. H., Lingle, W. L., Degnim, A. C., Ghosh, K., Vierkant, R. A., Maloney, S. D., Pankratz, V. S., Hillman, D. W., Suman, V. J., Johnson, J., Blake, C., Tlsty, T., Vachon, C. M., Melton, L. J., and Visscher, D. W. (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 353(3):229–237.
- [Harvie et al., 2015] Harvie, M., Howell, A., and Evans, D. G. (2015). Can diet and lifestyle prevent breast cancer: what is the evidence? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, pages 66–73.
- [Hasebe, 2013] Hasebe, T. (2013). Tumor-stromal interactions in breast tumor progression—significance of histological heterogeneity of tumor-stromal fibroblasts. *Expert Opin. Ther. Targets*, 17(4):449–460.
- [Hashmi et al., 2019] Hashmi, A. A., Hashmi, K. A., Irfan, M., Khan, S. M., Edhi, M. M., Ali, J. P., Hashmi, S. K., Asif, H., Faridi, N., and Khan, A. (2019). Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes*, 12(1):605.

- [Hawsawi et al., 2008] Hawsawi, N. M., Ghebeh, H., Hendrayani, S. F., Tulbah, A., Al-Eid, M., Al-Tweigeri, T., Ajarim, D., Alaiya, A., Dermime, S., and Aboussekhra, A. (2008). Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes. *Cancer Res.*, 68(8):2717–2725.
- [Heinzeller and Büsing, 2001] Heinzeller, T. and Büsing, C. (2001). *Histologie und Histopathologie für den Einstieg*. Thieme, Stuttgart, 1.aufgabe edition.
- [Henderson, 2012] Henderson, B. R. (2012). The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations. *Scientifica (Cairo)*, 2012:796808.
- [Heywang-Köbrunner and Schreer, 2015] Heywang-Köbrunner, S. and Schreer, I. (2015). *Bildgebende Mammadiagnostik: Untersuchungstechnik, Befundmuster, Differenzialdiagnose und Interventionen*. Thieme, Stuttgart, 3. vollst. überarb. auflage edition.
- [Hiraga et al., 2006] Hiraga, T., Myoui, A., Choi, M. E., Yoshikawa, H., and Yoneda, T. (2006). Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res.*, 66(4):2067–2073.
- [Hollestelle et al., 2010] Hollestelle, A., Wasielewski, M., Martens, J. W., and Schutte, M. (2010). Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 20(3):268–276.
- [Honrado et al., 2005] Honrado, E., Benitez, J., and Palacios, J. (2005). The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod. Pathol.*, 18(10):1305–1320.
- [Houlston and Peto, 2004] Houlston, R. and Peto, J. (2004). The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene*, 23(38):6471–6.
- [Hu and Polyak, 2008a] Hu, M. and Polyak, K. (2008a). Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 18(1):27–34.

- [Hu and Polyak, 2008b] Hu, M. and Polyak, K. (2008b). Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 44(18):2760–2765.
- [Hu et al., 2009] Hu, W., Hofstetter, W. L., Li, H., Zhou, Y., He, Y., Pataer, A., Wang, L., Xie, K., Swisher, S. G., and Fang, B. (2009). Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 15(18):5688–5695.
- [Huang and Huang, 2005] Huang, S. S. and Huang, J. S. (2005). TGF-beta control of cell proliferation. *J. Cell. Biochem.*, 96(3):447–462.
- [Huang et al., 2016] Huang, W., Martin, E. E., Burman, B., Gonzalez, M. E., and Kleer, C. G. (2016). The matricellular protein CCN6 (WISP3) decreases Notch1 and suppresses breast cancer initiating cells. *Oncotarget*, 7(18):25180–25193.
- [Hussain et al., 2014] Hussain, M. R., Nasir, J., and Al-Aama, J. Y. (2014). Clinically significant missense variants in human GALNT3, GALNT8, GALNT12, and GALNT13 genes: intriguing in silico findings. *J. Cell. Biochem.*, 115(2):313–327.
- [Ichikawa et al., 2010] Ichikawa, S., Baujat, G., Seyahi, A., Garoufali, A. G., Imel, E. A., Padgett, L. R., Austin, A. M., Sorenson, A. H., Pejin, Z., Topouchian, V., Quartier, P., Cormier-Daire, V., Dechaux, M., Malandrinou, F. C. h., Singhellakis, P. N., Le Merrer, M., and Econs, M. J. (2010). Clinical variability of familial tumoral calcinosis caused by novel GALNT3 mutations. *Am. J. Med. Genet. A*, 152A(4):896–903.
- [Imayama et al., 2012] Imayama, I., Ulrich, C. M., Alfano, C. M., Wang, C., Xiao, L., Wener, M. H., Campbell, K. L., Duggan, C., Foster-Schubert, K. E., Kong, A., Mason, C. E., Wang, C. Y., Blackburn, G. L., Bain, C. E., Thompson, H. J., and McTiernan, A. (2012). Effects of a caloric restriction weight loss diet and exercise on inflammatory biomarkers in overweight/obese postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Cancer Res.*, 72(9):2314–2326.
- [Ingle, 2013] Ingle, J. N. (2013). Pharmacogenomics of endocrine therapy in breast cancer. *J. Hum. Genet.*, 58(6):306–312.

- [Iversen et al., 2017] Iversen, L., Sivasubramaniam, S., Lee, A. J., Fielding, S., and Hanaford, P. C. (2017). Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners’ Oral Contraception Study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 216(6):1–580.
- [Ji et al., 2004] Ji, Q., Aoyama, C., Nien, Y. D., Liu, P. I., Chen, P. K., Chang, L., Stanczyk, F. Z., and Stolz, A. (2004). Selective loss of AKR1C1 and AKR1C2 in breast cancer and their potential effect on progesterone signaling. *Cancer Res.*, 64(20):7610–7617.
- [Jia et al., 2018] Jia, Y., Zhou, J., Luo, X., Chen, M., Chen, Y., Wang, J., Xiong, H., Ying, X., Hu, W., Zhao, W., Deng, W., and Wang, L. (2018). KLF4 overcomes tamoxifen resistance by suppressing MAPK signaling pathway and predicts good prognosis in breast cancer. *Cell. Signal.*, 42:165–175.
- [Jun and Lau, 2011] Jun, J. I. and Lau, L. F. (2011). Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10(12):945–963.
- [Kalluri and Zeisberg, 2006] Kalluri, R. and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 6(5):392–401.
- [Kaufman et al., 2007] Kaufman, M., Jato, I., and Petit, J. (2007). *Atlas der Brustchirurgie*. Springer, Springer Berlin Heidelberg, 1.aufgabe edition.
- [Kaufmann et al., 2013] Kaufmann, M., Costa, S., and Scharl, A. (2013). *Die Gynäkologie*. Springer, Springer Berlin Heidelberg, 3. vollst. überarb. u. erw. aufl. edition.
- [Kiechle et al., 2016] Kiechle, M., Engel, C., Berling, A., Hebestreit, K., Bischoff, S. C., Dukatz, R., Siniatchkin, M., Pfeifer, K., Grill, S., Yahiaoui-Doktor, M., Kirsch, E., Niederberger, U., Enders, U., Löffler, M., Meindl, A., Rhiem, K., Schmutzler, R., Erickson, N., and Halle, M. (2016). Effects of lifestyle intervention in BRCA1/2 mutation carriers on nutrition, BMI, and physical fitness (LIBRE study): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 17:368.

- [Kim et al., 2005] Kim, J. B., Stein, R., and O'Hare, M. J. (2005). Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumourigenesis. *Tumour Biol.*, 26(4):173–185.
- [Kim et al., 2016] Kim, S., Han, J., Jeon, M., You, D., Lee, J., Kim, H. J., Bae, S., Nam, S. J., and Lee, J. E. (2016). Silibinin inhibits triple negative breast cancer cell motility by suppressing TGF- $\hat{I}2$  expression. *Tumour Biol.*, 37(8):11397–11407.
- [Kim et al., 2015] Kim, S., Lee, J., Jeon, M., Nam, S. J., and Lee, J. E. (2015). Elevated TGF- $\hat{I}1$  and - $\hat{I}2$  expression accelerates the epithelial to mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells. *Cytokine*, 75(1):151–158.
- [Kim et al., 2001] Kim, T. Y., Kim, W. I., Smith, R. E., and Kay, E. P. (2001). Differential activity of TGF-beta2 on the expression of p27Kip1 and Cdk4 in actively cycling and contact inhibited rabbit corneal endothelial cells. *Mol. Vis.*, 7:261–270.
- [Kingsley, 1994] Kingsley, D. M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.*, 8(2):133–146.
- [Kleer, 2016] Kleer, C. G. (2016). Dual roles of CCN proteins in breast cancer progression. *J Cell Commun Signal*, 10(3):217–222.
- [Knabbe et al., 1996] Knabbe, C., Kopp, A., Hilgers, W., Lang, D., Muller, V., Zugmaier, G., and Jonat, W. (1996). Regulation and role of TGF beta production in breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 784:263–276.
- [Koboldt et al., 2012] Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H. J., Coope, R. J., Dhalla, N., Guin, R., Hirst, C., Hirst, M., Holt, R. A., Lee, D., Li, H. I., Mayo, M., Moore, R. A., Mungall, A. J., Pleasance, E., Robertson, A., Schein, J. E., Shafiei, A., Sipahimalani, P., Slobodan, J. R., Stoll, D., Tam, A., Thiessen, N., Varhol, R. J., Wye, N., Zeng, T., Zhao, Y., Birol, I., Jones,



S. J., Marra, M. A., Cherniack, A. D., Saksena, G., Onofrio, R. C., Pho, N. H., Carter, S. L., Schumacher, S. E., Tabak, B., Hernandez, B., Gentry, J., Nguyen, H., Crenshaw, A., Ardlie, K., Beroukhim, R., Winckler, W., Getz, G., Gabriel, S. B., Meyerson, M., Chin, L., Park, P. J., Kucherlapati, R., Hoadley, K. A., Auman, J., Fan, C., Turman, Y. J., Shi, Y., Li, L., Topal, M. D., He, X., Chao, H. H., Prat, A., Silva, G. O., Iglesia, M. D., Zhao, W., Usary, J., Berg, J. S., Adams, M., Booker, J., Wu, J., Gulabani, A., Bodenheimer, T., Hoyle, A. P., Simons, J. V., Soloway, M. G., Mose, L. E., Jefferys, S. R., Balu, S., Parker, J. S., Hayes, D., Perou, C. M., Malik, S., Mahurkar, S., Shen, H., Weisenberger, D. J., Triche, T., Lai, P. H., Bootwalla, M. S., Maglinte, D. T., Berman, B. P., Van Den Berg, D. J., Baylin, S. B., Laird, P. W., Creighton, C. J., Donehower, L. A., Getz, G., Noble, M., Voet, D., Saksena, G., Gehlenborg, N., DiCara, D., Zhang, J., Zhang, H., Wu, C. J., Liu, S. Y., Lawrence, M. S., Zou, L., Sivachenko, A., Lin, P., Stojanov, P., Jing, R., Cho, J., Sinha, R., Park, R. W., Nazaire, M. D., Robinson, J., Thorvaldsdottir, H., Mesirov, J., Park, P. J., Chin, L., Reynolds, S., Kreisberg, R. B., Bernard, B., Bressler, R., Erkkila, T., Lin, J., Thorsson, V., Zhang, W., Shmulevich, I., Ciriello, G., Weinhold, N., Schultz, N., Gao, J., Cerami, E., Gross, B., Jacobsen, A., Sinha, R., Aksoy, B., Antipin, Y., Reva, B., Shen, R., Taylor, B. S., Ladanyi, M., Sander, C., Anur, P., Spellman, P. T., Lu, Y., Liu, W., Verhaak, R. R., Mills, G. B., Akbani, R., Zhang, N., Broom, B. M., Casasent, T. D., Wakefield, C., Unruh, A. K., Baggerly, K., Coombes, K., Weinstein, J. N., Haussler, D., Benz, C. C., Stuart, J. M., Benz, S. C., Zhu, J., Szeto, C. C., Scott, G. K., Yau, C., Paull, E. O., Carlin, D., Wong, C., Sokolov, A., Thusberg, J., Mooney, S., Ng, S., Goldstein, T. C., Ellrott, K., Grifford, M., Wilks, C., Ma, S., Craft, B., Yan, C., Hu, Y., Meerzaman, D., Gastier-Foster, J. M., Bowen, J., Ramirez, N. C., Black, A. D., Pyatt, R. E., White, P., Zmuda, E. J., Frick, J., Lichtenberg, T. M., Brookens, R., George, M. M., Gerken, M. A., Harper, H. A., Leraas, K. M., Wise, L. J., Tabler, T. R., McAllister, C., Barr, T., Hart-Kothari, M., Tarvin, K., Saller, C., Sandusky, G., Mitchell, C., Iacocca, M. V., Brown, J., Rabeno, B., Czerwinski, C., Petrelli, N., Dolzhansky, O., Abramov, M., Voronina, O., Potapova, O., Marks, J. R., Suchorska, W. M., Murawa, D., Kycler, W., Ibbs, M., Korski, K., Spychała, A., Murawa, P., Brzeziński, J. J., Perz, H., ?a?niak, R., Teresiak, M., Tatka,

H., Leporowska, E., Bogusz-Czerniewicz, M., Malicki, J., Mackiewicz, A., Wiznerowicz, M., Le, X. V., Kohl, B., Nguyen, V. T., Thorp, R., Nguyen, V. B., Sussman, H., Bui, D. P., Hajek, R., Nguyen, P. H., Tran, V. T., Huynh, Q. T., Khan, K. Z., Penny, R., Mallery, D., Curley, E., Shelton, C., Yena, P., Ingle, J. N., Couch, F. J., Lingle, W. L., King, T. A., Gonzalez-Angulo, A. M., Mills, G. B., Dyer, M. D., Liu, S., Meng, X., Patangan, M., Waldman, F., Stoppler, H., Rathmell, W., Thorne, L., Huang, M., Boice, L., Hill, A., Morrison, C., Gaudioso, C., Bshara, W., Daily, K., Egea, S. C., Pegram, M., Gomez-Fernandez, C., Dhir, R., Bhargava, R., Brufsky, A., Shriver, C. D., Hooke, J. A., Campbell, J. L., Mural, R. J., Hu, H., Somiari, S., Larson, C., Deyarmin, B., Kvecher, L., Kovatich, A. J., Ellis, M. J., King, T. A., Hu, H., Couch, F. J., Mural, R. J., Stricker, T., White, K., Olopade, O., Ingle, J. N., Luo, C., Chen, Y., Marks, J. R., Waldman, F., Wiznerowicz, M., Bose, R., Chang, L. W., Beck, A. H., Gonzalez-Angulo, A. M., Pihl, T., Jensen, M., Sfeir, R., Kahn, A., Chu, A., Kothiyal, P., Wang, Z., Snyder, E., Pontius, J., Ayala, B., Backus, M., Walton, J., Baboud, J., Berton, D., Nicholls, M., Srinivasan, D., Raman, R., Girshik, S., Kigonya, P., Alonso, S., Sanbhadti, R., Barletta, S., Pot, D., Sheth, M., Demchok, J. A., Shaw, K. R., Yang, L., Eley, G., Ferguson, M. L., Tarnuzzer, R. W., Zhang, J., Dillon, L. A., Buetow, K., Fielding, P., Ozenberger, B. A., Guyer, M. S., Sofia, H. J., and Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418):61–70.

[Koukourakis et al., 2006] Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L., and Sivridis, E. (2006). Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.*, 66(2):632–637.

[Kreienberg et al., 2012] Kreienberg, R., Albert, U., Follmann, M., Kopp, I., Kühn, T., Wöckel, A., and Zemmler, T. (2012). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Zuckerschwedt, München.

[Kuchenbaecker et al., 2017] Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K. A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M. J., Jervis, S., Van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou,

- A. C., , and Olsson, H. (2017). Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for *brca1* and *brca2* mutation carriers. 317(23):2402–2416.
- [Kunze, 1994] Kunze, U. (1994). Mammakarzinom: Epidemiologie und risikofaktoren. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 9(2):38–40.
- [Lafarge et al., 2001] Lafarge, S., Sylvain, V., Ferrara, M., and Bignon, Y. J. (2001). Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene*, 20(45):6597–6606.
- [Laimito et al., 2016] Laimito, K. R., Gamez-Pozo, A., Sepulveda, J., Manso, L., Lopez-Vacas, R., Pascual, T., Fresno Vara, J. A., and Ciruelos, E. (2016). Characterisation of the triple negative breast cancer phenotype associated with the development of central nervous system metastases. *Ecancermedicalscience*, 10:632.
- [Lakhani, 1999] Lakhani, S. R. (1999). The pathology of familial breast cancer: Morphological aspects. *Breast Cancer Res.*, 1(1):31–35.
- [Lakhani et al., 1998] Lakhani, S. R., Jacquemier, J., Sloane, J. P., Gusterson, B. A., Anderson, T. J., van de Vijver, M. J., Farid, L. M., Venter, D., Antoniou, A., Storfer-Isser, A., Smyth, E., Steel, C. M., Haites, N., Scott, R. J., Goldgar, D., Neuhausen, S., Daly, P. A., Ormiston, W., McManus, R., Scherneck, S., Ponder, B. A., Ford, D., Peto, J., Stoppa-Lyonnet, D., Bignon, Y. J., Struwing, J. P., Spurr, N. K., Bishop, D. T., Klijn, J. G., Devilee, P., Cornelisse, C. J., Lasset, C., Lenoir, G., Barkardottir, R. B., Egilsson, V., Hamann, U., Chang-Claude, J., Sobol, H., Weber, B., Stratton, M. R., and Easton, D. F. (1998). Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(15):1138–1145.
- [Lakhtakia, 2014] Lakhtakia, R. (2014). A Brief History of Breast Cancer: Part I: Surgical domination reinvented. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 14(2):166–169.
- [Lawrence, 1996] Lawrence, D. A. (1996). Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur. Cytokine Netw.*, 7(3):363–374.

- [Lewis et al., 2004] Lewis, M. J., Wiebe, J. P., and Heathcote, J. G. (2004). Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer*, 4:27.
- [Li et al., 2016] Li, C., Wu, X., Zhang, W., Li, J., Liu, H., Hao, M., Wang, J., Zhang, H., Yang, G., Hao, M., Sheng, S., Sun, Y., Long, J., Li, J., Zhuang, F., Hu, C., Li, L., and Zheng, J. (2016). High-Content Functional Screening of AEG-1 and AKR1C2 for the Promotion of Metastasis in Liver Cancer. *J Biomol Screen*, 21(1):101–107.
- [Li et al., 2007] Li, H., Fan, X., and Houghton, J. (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J. Cell. Biochem.*, 101(4):805–815.
- [Liao et al., 2009] Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., and Reisfeld, R. A. (2009). Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS ONE*, 4(11):e7965.
- [Lin et al., 2009] Lin, C. J., Sukarieh, R., and Pelletier, J. (2009). Silibinin inhibits translation initiation: implications for anticancer therapy. *Mol. Cancer Ther.*, 8(6):1606–1612.
- [Lips et al., 2013] Lips, E. H., Mulder, L., Oonk, A., van der Kolk, L. E., Hogervorst, F. B., Imholz, A. L., Wesseling, J., Rodenhuis, S., and Nederlof, P. M. (2013). Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br. J. Cancer*, 108(10):2172–2177.
- [Liu et al., 2012] Liu, H., Shi, J., Wilkerson, M. L., and Lin, F. (2012). Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues: a useful immunomarker for breast and urothelial carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.*, 138(1):57–64.
- [Liu et al., 2015] Liu, S., Jin, K., Hui, Y., Fu, J., Jie, C., Feng, S., Reisman, D., Wang, Q., Fan, D., Sukumar, S., and Chen, H. (2015). HOXB7 promotes malignant progression by activating the TGF $\beta$ 2 signaling pathway. *Cancer Res.*, 75(4):709–719.

- [Livraghi and Garber, 2015] Livraghi, L. and Garber, J. E. (2015). PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Med*, 13:188.
- [Llombart-Cussac et al., 2015] Llombart-Cussac, A., Bermejo, B., Villanueva, C., Delaloge, S., Morales, S., Balmana, J., Amillano, K., Bonnefoi, H., Casas, A., Manso, L., Roche, H., Gonzalez-Santiago, S., Gavila, J., Sanchez-Rovira, P., Di Cosimo, S., Harbeck, N., Charpentier, E., Garcia-Ribas, I., Radosevic-Robin, N., Aura, C., and Baselga, J. (2015). SOLTI NeoPARP: a phase II randomized study of two schedules of iniparib plus paclitaxel versus paclitaxel alone as neoadjuvant therapy in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 154(2):351–357.
- [Loi et al., 2013] Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J. P., Hitre, E., de Azambuja, E., Quinaux, E., Di Leo, A., Michiels, S., Piccart, M. J., and Sotiriou, C. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J. Clin. Oncol.*, 31(7):860–867.
- [Lord and Ashworth, 2013] Lord, C. J. and Ashworth, A. (2013). Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. *Nat. Med.*, 19(11):1381–1388.
- [Lovett et al., 2017] Lovett, J. L., Chima, M. A., Wexler, J. K., Arslanian, K. J., Friedman, A. B., Yousif, C. B., and Strassmann, B. I. (2017). Oral contraceptives cause evolutionarily novel increases in hormone exposure: A risk factor for breast cancer. *Evol Med Public Health*, 2017(1):97–108.
- [Ludwig et al., 1997] Ludwig, T., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., and Efstratiadis, A. (1997). Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes Dev.*, 11(10):1226–1241.
- [Luhr et al., 2012] Luhr, I., Friedl, A., Overath, T., Tholey, A., Kunze, T., Hilpert, F., Sebens, S., Arnold, N., Rosel, F., Oberg, H. H., Maass, N., Mundhenke, C., Jonat, W.,

- and Bauer, M. (2012). Mammary fibroblasts regulate morphogenesis of normal and tumorigenic breast epithelial cells by mechanical and paracrine signals. *Cancer Lett.*, 325(2):175–188.
- [Lüllmann-Rauch, 2011] Lüllmann-Rauch, R. (2011). *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag.
- [Maass, 1994] Maass, H. (1994). Breast cancer. *Der Gynäkologe*, 27(1).
- [Mao et al., 2013] Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., and Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 32(1-2):303–315.
- [Marcus et al., 1997] Marcus, J. N., Watson, P., Page, D. L., Narod, S. A., Tonin, P., Lenoir, G. M., Serova, O., and Lynch, H. T. (1997). BRCA2 hereditary breast cancer pathophenotype. *Breast Cancer Res. Treat.*, 44(3):275–277.
- [Maupin et al., 2010] Maupin, K. A., Sinha, A., Eugster, E., Miller, J., Ross, J., Paulino, V., Keshamouni, V. G., Tran, N., Berens, M., Webb, C., and Haab, B. B. (2010). Glycogene expression alterations associated with pancreatic cancer epithelial-mesenchymal transition in complementary model systems. *PLoS ONE*, 5(9):e13002.
- [Mavaddat et al., 2013] Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., Evans, D. G., Izatt, L., Eeles, R. A., Adlard, J., Davidson, R., Eccles, D., Cole, T., Cook, J., Brewer, C., Tischkowitz, M., Douglas, F., Hodgson, S., Walker, L., Porteous, M. E., Morrison, P. J., Side, L. E., Kennedy, M. J., Houghton, C., Donaldson, A., Rogers, M. T., Dorkins, H., Miedzybrodzka, Z., Gregory, H., Eason, J., Barwell, J., McCann, E., Murray, A., Antoniou, A. C., Easton, D. F., Easton, D. F., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Fineberg, E., Platte, R., Miedzybrodzka, Z., Gregory, H., Morrison, P., Jeffers, L., Cole, T., Hoffman, J., Donaldson, A., James, M., Tischkowitz, M., Paterson, J., Taylor, A., Murray, A., Rogers, M. T., McCann, E., Kennedy, M., Barton, D., Porteous, M., Drummond, S., Brewer, C., Kivuva, E., Searle, A., Goodman, S., Hill, K., Davidson, R., Murday, V., Bradshaw, N., Snadden, L., Longmuir, M., Watt, C.,

- Gibson, S., Haque, E., Tobias, E., Duncan, A., Izatt, L., Jacobs, C., Langman, C., Brady, A., Dorkins, H., Melville, A., Randhawa, K., Barwell, J., Adlard, J., Serra-Feliu, G., Ellis, I., Houghton, C., Evans, D., Lalloo, F., Taylor, J., Side, L., Male, A., Berlin, C., Eason, J., Collier, R., Douglas, F., Claber, O., Jobson, I., Walker, L., McLeod, D., Halliday, D., Durell, S., Stayner, B., Eeles, R. A., Shanley, S., Rahman, N., Houlston, R., Bancroft, E., Page, E., Ardern-Jones, A., Kohut, K., Wiggins, J., Castro, E., Killick, E., Martin, S., Rea, G., Kulkarni, A., Cook, J., Quarrell, O., Bardsley, C., Hodgson, S., Goff, S., Brice, G., Winchester, L., Eddy, C., Tripathi, V., Attard, V., Lehmann, A., Eccles, D., Lucassen, A., Crawford, G., McBride, D., and Smalley, S. (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J. Natl. Cancer Inst.*, 105(11):812–822.
- [Mehra et al., 2005] Mehra, R., Varambally, S., Ding, L., Shen, R., Sabel, M. S., Ghosh, D., Chinnaiyan, A. M., and Kleer, C. G. (2005). Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res.*, 65(24):11259–11264.
- [Meindl et al., 2011] Meindl, A., Ditsch, N., Kast, K., Rhiem, K., and Schmutzler, R. K. (2011). Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts. *Dtsch Arztebl Int*, 108(19):323–330.
- [Meindl et al., 2010] Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., Ramser, J., Honisch, E., Kubisch, C., Wichmann, H. E., Kast, K., Deissler, H., Engel, C., Muller-Myhsok, B., Neveling, K., Kiechle, M., Mathew, C. G., Schindler, D., Schmutzler, R. K., and Hanenberg, H. (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat. Genet.*, 42(5):410–414.
- [Menard et al., 1997] Menard, S., Tomasic, G., Casalini, P., Balsari, A., Pilotti, S., Cascinelli, N., Salvadori, B., Colnaghi, M. I., and Rilke, F. (1997). Lymphoid infiltration as a prognostic variable for early-onset breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 3(5):817–819.

- [Mersch et al., 2015] Mersch, J., Jackson, M. A., Park, M., Nebgen, D., Peterson, S. K., Singletary, C., Arun, B. K., and Litton, J. K. (2015). Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer*, 121(2):269–275.
- [Miettinen et al., 2014] Miettinen, M., McCue, P. A., Sarlomo-Rikala, M., Rys, J., Czapiewski, P., Wazny, K., Langfort, R., Waloszczyk, P., Biernat, W., Lasota, J., and Wang, Z. (2014). GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am. J. Surg. Pathol.*, 38(1):13–22.
- [Miki et al., 1994] Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., and Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182):66–71.
- [Mimoto et al., 2017] Mimoto, R., Imawari, Y., Hirooka, S., Takeyama, H., and Yoshida, K. (2017). Impairment of DYRK2 augments stem-like traits by promoting KLF4 expression in breast cancer. *Oncogene*, 36(13):1862–1872.
- [Minn et al., 2005] Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L., and Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436(7050):518–524.
- [Miyamoto et al., 2006] Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Kawarabayashi, T., and Mekada, E. (2006). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci.*, 97(5):341–347.
- [Moorman et al., 2012] Moorman, A. M., Vink, R., Heijmans, H. J., van der Palen, J., and Kouwenhoven, E. A. (2012). The prognostic value of tumour-stroma ratio in triple-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, 38(4):307–313.
- [Murahovschi et al., 2015] Murahovschi, V., Pivovarova, O., Ilkavets, I., Dmitrieva, R. M., Docke, S., Keyhani-Nejad, F., Gogebakan, O., Osterhoff, M., Kemper, M., Hornemann, S., Markova, M., Kloting, N., Stockmann, M., Weickert, M. O., Lamounier-Zepter, V.,



- Neuhaus, P., Konradi, A., Dooley, S., von Loeffelholz, C., Bluher, M., Pfeiffer, A. F., and Rudovich, N. (2015). WISP1 is a novel adipokine linked to inflammation in obesity. *Diabetes*, 64(3):856–866.
- [Nagata et al., 2014] Nagata, T., Shimada, Y., Sekine, S., Hori, R., Matsui, K., Okumura, T., Sawada, S., Fukuoka, J., and Tsukada, K. (2014). Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer*, 21(1):96–101.
- [Nagata et al., 2017] Nagata, T., Shimada, Y., Sekine, S., Moriyama, M., Hashimoto, I., Matsui, K., Okumura, T., Hori, T., Imura, J., and Tsukada, K. (2017). Klf4 and nanog are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*, 24(2):326–335.
- [Nagpal et al., 2015] Nagpal, N., Ahmad, H. M., Chameettachal, S., Sundar, D., Ghosh, S., and Kulshreshtha, R. (2015). HIF-inducible miR-191 promotes migration in breast cancer through complex regulation of TGF $\beta$ 2-signaling in hypoxic microenvironment. *Sci Rep*, 5:9650.
- [Nakamura et al., 2015] Nakamura, T., Shinriki, S., Jono, H., Guo, J., Ueda, M., Hayashi, M., Yamashita, S., Zijlstra, A., Nakayama, H., Hiraki, A., Shinohara, M., and Ando, Y. (2015). Intrinsic TGF- $\beta$ 2-triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. *Oncotarget*, 6(2):1008–1019.
- [Nekolla, 2004] Nekolla, E. (2004). *Epidemiologie des strahleninduzierten Mammakarzinoms*. PhD thesis.
- [Nelson and Bissell, 2006] Nelson, C. M. and Bissell, M. J. (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22:287–309.
- [Ohnishi et al., 2003] Ohnishi, S., Ohnami, S., Laub, F., Aoki, K., Suzuki, K., Kanai, Y., Haga, K., Asaka, M., Ramirez, F., and Yoshida, T. (2003). Downregulation and

growth inhibitory effect of epithelial-type Krüppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308(2):251–256.

[Okuda et al., 2013] Okuda, H., Xing, F., Pandey, P. R., Sharma, S., Watabe, M., Pai, S. K., Mo, Y. Y., Iizumi-Gairani, M., Hirota, S., Liu, Y., Wu, K., Pochampally, R., and Watabe, K. (2013). miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer Res.*, 73(4):1434–1444.

[Olver, 2016] Olver, I. N. (2016). Prevention of breast cancer. *Med. J. Aust.*, 205(10):475–479.

[Ordóñez, 2013] Ordóñez, N. G. (2013). Value of GATA3 immunostaining in tumor diagnosis: a review. *Adv Anat Pathol*, 20(5):352–360.

[O’Sullivan Coyne et al., 2015] O’Sullivan Coyne, G., Chen, A., and Kummar, S. (2015). Delivering on the promise: poly ADP ribose polymerase inhibition as targeted anticancer therapy. *Curr Opin Oncol*, 27(6):475–481.

[Ouhtit et al., 2013] Ouhtit, A., Madani, S., Gupta, I., Shanmuganathan, S., Abdraboh, M. E., Al-Riyami, H., Al-Farsi, Y. M., and Raj, M. H. (2013). TGF-Î2: A Novel Target of CD44-Promoted Breast Cancer Invasion. *J Cancer*, 4(7):566–572.

[Paget and Paget, 1989] Paget, S. and Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.*, 8(2):98–101.

[Pal et al., 2012] Pal, A., Huang, W., Li, X., Toy, K. A., Nikolovska-Coleska, Z., and Kleer, C. G. (2012). Ccn6 modulates BMP signaling via the Smad-independent TAK1/p38 pathway, acting to suppress metastasis of breast cancer. *Cancer Res.*, 72(18):4818–4828.

[Pandya et al., 2004] Pandya, A. Y., Talley, L. I., Frost, A. R., Fitzgerald, T. J., Trivedi, V., Chakravarthy, M., Chhieng, D. C., Grizzle, W. E., Engler, J. A., Krontiras, H., Bland, K. I., LoBuglio, A. F., Lobo-Ruppert, S. M., and Ruppert, J. M. (2004). Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10(8):2709–2719.

- [Parikh et al., 2005] Parikh, P., Palazzo, J. P., Rose, L. J., Daskalakis, C., and Weigel, R. J. (2005). GATA-3 expression as a predictor of hormone response in breast cancer. *J. Am. Coll. Surg.*, 200(5):705–710.
- [Pennica et al., 1998] Pennica, D., Swanson, T. A., Welsh, J. W., Roy, M. A., Lawrence, D. A., Lee, J., Brush, J., Taneyhill, L. A., Deuel, B., Lew, M., Watanabe, C., Cohen, R. L., Melhem, M. F., Finley, G. G., Quirke, P., Goddard, A. D., Hillan, K. J., Gurney, A. L., Botstein, D., and Levine, A. J. (1998). WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(25):14717–14722.
- [Penning and Byrns, 2009] Penning, T. M. and Byrns, M. C. (2009). Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1155:33–42.
- [Pijpe et al., 2012] Pijpe, A., Andrieu, N., Easton, D. F., Kesminiene, A., Cardis, E., Nogues, C., Gauthier-Villars, M., Lasset, C., Fricker, J. P., Peock, S., Frost, D., Evans, D. G., Eeles, R. A., Paterson, J., Manders, P., van Asperen, C. J., Ausems, M. G., Meijers-Heijboer, H., Thierry-Chef, I., Hauptmann, M., Goldgar, D., Rookus, M. A., van Leeuwen, F. E., Nogues, C., Fourme, E., Lidereau, R., Stevens, D., Stoppa-Lyonnet, D., Gauthier-Villars, M., Chompret, A., Nogues, C., Fricker, J. P., Berthet, P., Luporsi, E., Lasset, C., Bonadona, V., Gauducheau, R., de Sienne, C., Lortholary, A., Frenay, M., Faivre, L., Sobol, H., Huiart, L., Longy, M., Nguyen, T. D., Gladieff, L., Guimbaud, R., Gesta, P., Vennin, P., Adenis, C., Chevrier, A., Rossi, A., Perrin, J., Bignon, Y. J., Limacher, J. M., Dugast, C., Croulancy, P., Demange, L., Zattara-Cannoni, H., Dreyfus, H., Noruzinia, M., Venat-Bouvet, L., Peock, S., Cook, M., Frost, D., Oliver, C., Gregory, H., Cole, T., Burgess, L., Paterson, J., Rogers, M., Hughes, L., Brewer, C., Davidson, R., Bradshaw, N., Izatt, L., Pichert, G., Langman, C., Chu, C., Miller, J., Evans, G., Lalloo, F., Shenton, A., Side, L., Bancroft, E., Page, E., Castro, E., Houlston, R., Rahman, N., Shanley, S., Cook, J., Baxter, L., Hodgson, S., Goff, S., Eccles, D., Evans, G., Lalloo, F., Bancroft, E., Verhoef, S., Pijpe, A., Brohet, R., Hogervorst, F., van 't Veer, L., van Leeuwen, F., Rookus, M., Collee, M., van den Ouweland, A., Kriege,

- M., Schutte, M., Hooning, M., Seynaeve, C., Tollenaar, R., van Asperen, C., Wijnen, J., Devilee, P., Ligtenberg, M., Ausems, M., van der Luijt, R., Aalfs, C., van Os, T., Meijers-Heijboer, H., Gille, H., Gomez-Garcia, E., Blok, R., Oosterwijk, J., van der Hout, A., Vasen, H., and van Leeuwen, I. (2012). Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of BRCA1/2 mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). *BMJ*, 345:e5660.
- [Plytycz and Seljelid, 2003] Plytycz, B. and Seljelid, R. (2003). From inflammation to sickness: historical perspective. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 51(2):105–109.
- [Polyak and Kalluri, 2010] Polyak, K. and Kalluri, R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(11):a003244.
- [Provenzano et al., 2008] Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Knittel, J. G., Yan, L., Rueden, C. T., White, J. G., and Keely, P. J. (2008). Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med*, 6:11.
- [Quante et al., 2011] Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., Baik, G. H., Shibata, W., DiPrete, B., Betz, K. S., Friedman, R., Varro, A., Tycko, B., and Wang, T. C. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, 19(2):257 – 272.
- [Quinn et al., 2003] Quinn, J. E., Kennedy, R. D., Mullan, P. B., Gilmore, P. M., Carty, M., Johnston, P. G., and Harkin, D. P. (2003). BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 63(19):6221–6228.
- [Radisky et al., 2007] Radisky, D. C., Kenny, P. A., and Bissell, M. J. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J. Cell. Biochem.*, 101(4):830–839.
- [Reid et al., 2008] Reid, L. J., Shakya, R., Modi, A. P., Lokshin, M., Cheng, J. T., Jasin, M., Baer, R., and Ludwig, T. (2008). E3 ligase activity of BRCA1 is not essential for

- mammalian cell viability or homology-directed repair of double-strand DNA breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(52):20876–20881.
- [Rios and Puhalla, 2011] Rios, J. and Puhalla, S. (2011). PARP inhibitors in breast cancer: BRCA and beyond. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 25(11):1014–1025.
- [Roberts, 1998] Roberts, A. B. (1998). Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*, 24(2-3):111–119.
- [Rody et al., 2011] Rody, A., Karn, T., Liedtke, C., Pusztai, L., Ruckhaeberle, E., Hanker, L., Gaetje, R., Solbach, C., Ahr, A., Metzler, D., Schmidt, M., Muller, V., Holtrich, U., and Kaufmann, M. (2011). A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 13(5):R97.
- [Ronnov-Jessen et al., 1996] Ronnov-Jessen, L., Petersen, O. W., and Bissell, M. J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.*, 76(1):69–125.
- [Ronnov-Jessen et al., 1995] Ronnov-Jessen, L., Petersen, O. W., Koteliansky, V. E., and Bissell, M. J. (1995). The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 95(2):859–873.
- [Rosen and Pishvaian, 2014] Rosen, E. M. and Pishvaian, M. J. (2014). Targeting the BRCA1/2 tumor suppressors. *Curr Drug Targets*, 15(1):17–31.
- [Roth-Ganter and Fischer, 2002] Roth-Ganter, G. and Fischer, U. (2002). *Mammographie-Handbuch für die tägliche Praxis: Ein Technik-, Einstellungs- und Qualitätsleitfaden für Radiologen, Gynäkologen und MTRA*. 1.aufage edition.
- [Roy et al., 2014] Roy, S. S., Gonugunta, V. K., Bandyopadhyay, A., Rao, M. K., Goodall, G. J., Sun, L. Z., Tekmal, R. R., and Vadlamudi, R. K. (2014). Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and metastasis of breast cancer. *Oncogene*, 33(28):3707–3716.

- [Salhab et al., 2010] Salhab, M., Bismohun, S., and Mokbel, K. (2010). Risk-reducing strategies for women carrying BRCA1/2 mutations with a focus on prophylactic surgery. *BMC Womens Health*, 10:28.
- [Sappino et al., 1988] Sappino, A. P., Skalli, O., Jackson, B., Schurch, W., and Gabbiani, G. (1988). Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int. J. Cancer*, 41(5):707–712.
- [Sartorius et al., 2016] Sartorius, C. A., Hanna, C. T., Gril, B., Cruz, H., Serkova, N. J., Huber, K. M., Kabos, P., Schedin, T. B., Borges, V. F., Steeg, P. S., and Cittelly, D. M. (2016). Estrogen promotes the brain metastatic colonization of triple negative breast cancer cells via an astrocyte-mediated paracrine mechanism. *Oncogene*, 35(22):2881–2892.
- [Schiavon and Smith, 2014] Schiavon, G. and Smith, I. E. (2014). Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 16(2):206.
- [Schlegel et al., 2003] Schlegel, U., Weller, M., and Westphal, M. (2003). *Neuroonkologie*. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 2.aufage edition.
- [Schneider et al., 2014] Schneider, A. P., Zainer, C. M., Kubat, C. K., Mullen, N. K., and Windisch, A. K. (2014). The breast cancer epidemic: 10 facts. *Linacre Q*, 81(3):244–277.
- [Schor and Schor, 2001] Schor, S. L. and Schor, A. M. (2001). Phenotypic and genetic alterations in mammary stroma: implications for tumour progression. *Breast Cancer Res.*, 3(6):373–379.
- [Schreiber and Carstensen, 1983] Schreiber, H. and Carstensen, G. (1983). *Chirurgie im Wandel der Zeit 1945-1983. Chirurgie des Mammakarzinoms*. Springer, Berlin, 1.aufage edition.
- [Shah et al., 2014] Shah, R., Rosso, K., and Nathanson, S. D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*, 5(3):283–298.

- [Sheta et al., 2016] Sheta, R., Woo, C. M., Roux-Dalvai, F., Fournier, F., Bourassa, S., Droit, A., Bertozzi, C. R., and Bachvarov, D. (2016). A metabolic labeling approach for glycoproteomic analysis reveals altered glycoprotein expression upon GALNT3 knock-down in ovarian cancer cells. *J Proteomics*, 145:91–102.
- [Shields et al., 1996] Shields, J. M., Christy, R. J., and Yang, V. W. (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J. Biol. Chem.*, 271(33):20009–20017.
- [Shimoda et al., 2010] Shimoda, M., Mellody, K. T., and Orimo, A. (2010). Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 21(1):19–25.
- [Simon and Zhang, 2008] Simon, R. and Zhang, X. (2008). On the dynamics of breast tumor development in women carrying germline BRCA1 and BRCA2 mutations. *Int. J. Cancer*, 122(8):1916–1917.
- [Singh and Settleman, 2010] Singh, A. and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34):4741–4751.
- [Singletary, 2003] Singletary, S. (2003). Rating the risk factors for breast cancer, in: *Annals of surgery. A monthly Review of Surgical Science Since 1985*, 237-4:474–482.
- [Smigal et al., 2006] Smigal, C., Jemal, A., Ward, E., Cokkinides, V., Smith, R., Howe, H. L., and Thun, M. (2006). Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin*, v56(3):168–183.
- [Song et al., 2017] Song, X., Xing, Y. M., Wu, W., Cheng, G. H., Xiao, F., Jin, G., Liu, Y., and Zhao, X. (2017). Expression of Krüppel-like factor 4 in breast cancer tissues and its effects on the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Exp Ther Med*, 13(5):2463–2467.

- [Soyal et al., 2002] Soyal, S., Ismail, P. M., Li, J., Mulac-Jericevic, B., Conneely, O. M., and Lydon, J. P. (2002). Progesterone’s role in mammary gland development and tumorigenesis as disclosed by experimental mouse genetics. *Breast Cancer Res.*, 4(5):191–196.
- [Stefane et al., 2009] Stefane, B., Brozic, P., Vehovc, M., Rizner, T. L., and Gobec, S. (2009). New cyclopentane derivatives as inhibitors of steroid metabolizing enzymes AKR1C1 and AKR1C3. *Eur J Med Chem*, 44(6):2563–2571.
- [Steinmann et al., 2001] Steinmann, D., Bremer, M., Rades, D., Skawran, B., Siebrands, C., Karstens, J. H., and Dork, T. (2001). Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes in patients with bilateral breast cancer. *Br. J. Cancer*, 85(6):850–858.
- [Sternlicht et al., 2006] Sternlicht, M. D., Kouros-Mehr, H., Lu, P., and Werb, Z. (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation*, 74(7):365–381.
- [Stremitzer et al., 2017] Stremitzer, S., Berghoff, A. S., Volz, N. B., Zhang, W., Yang, D., Stintzing, S., Ning, Y., Sunakawa, Y., Yamauchi, S., Sebio, A., Matsusaka, S., Okazaki, S., Hanna, D., Parekh, A., Mendez, A., Berger, M. D., El-Khoueiry, R., Birner, P., Preusser, M., and Lenz, H. J. (2017). Genetic variants associated with colorectal brain metastases susceptibility and survival. *Pharmacogenomics J.*, 17(1):29–35.
- [Sun et al., 2017] Sun, X. J., Zuo, K., Tang, S. X., Lu, H. F., Shui, R. H., Yu, B. H., Xu, X. L., Cheng, Y. F., Tu, X. Y., Bi, R., and Yang, W. T. (2017). [Correlation between androgen receptor expression and surrogate molecular subtypes in invasive breast carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 46(7):476–480.
- [Tan et al., 2009] Tan, A. R., Alexe, G., and Reiss, M. (2009). Transforming growth factor-beta signaling: emerging stem cell target in metastatic breast cancer? *Breast Cancer Res. Treat.*, 115(3):453–495.
- [Tan et al., 2011] Tan, W., Zhang, W., Strasner, A., Grivennikov, S., Cheng, J. Q., Hoffman, R. M., and Karin, M. (2011). Tumour-infiltrating regulatory T cells sti-



mulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*, 470(7335):548–553.

- [Tavtigian et al., 1996] Tavtigian, S. V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., Belanger, C., Bell, R., Berry, S., Bogden, R., Chen, Q., Davis, T., Dumont, M., Frye, C., Hattier, T., Jammulapati, S., Janecki, T., Jiang, P., Kehrer, R., Leblanc, J. F., Mitchell, J. T., McArthur-Morrison, J., Nguyen, K., Peng, Y., Samson, C., Schroeder, M., Snyder, S. C., Steele, L., Stringfellow, M., Stroup, C., Swedlund, B., Swense, J., Teng, D., Thomas, A., Tran, T., Tranchant, M., Weaver-Feldhaus, J., Wong, A. K., Shizuya, H., Eyfjord, J. E., Cannon-Albright, L., Tranchant, M., Labrie, F., Skolnick, M. H., Weber, B., Kamb, A., and Goldgar, D. E. (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat. Genet.*, 12(3):333–337.
- [Telli et al., 2015] Telli, M. L., Jensen, K. C., Vinayak, S., Kurian, A. W., Lipson, J. A., Flaherty, P. J., Timms, K., Abkevich, V., Schackmann, E. A., Wapnir, I. L., Carlson, R. W., Chang, P. J., Sparano, J. A., Head, B., Goldstein, L. J., Haley, B., Dakhil, S. R., Reid, J. E., Hartman, A. R., Manola, J., and Ford, J. M. (2015). Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. *J. Clin. Oncol.*, 33(17):1895–1901.
- [Thiery et al., 2009] Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5):871–890.
- [Thompson and Easton, 2002] Thompson, D. and Easton, D. F. (2002). Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94(18):1358–1365.
- [Tiefenbacher et al., 2003] Tiefenbacher, U., Scheda, A., Melchert, F., and Wenz, F. (2003). Radiotherapie der mamma beibrusterhaltender operation. *Der Onkologe*, 9(9):1023–1033.

- [Tischkowitz and Foulkes, 2006] Tischkowitz, M. D. and Foulkes, W. D. (2006). The basal phenotype of BRCA1-related breast cancer: past, present and future. *Cell Cycle*, 5(9):963–967.
- [Torre et al., 2015] Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2):87–108.
- [Traven et al., 2015] Traven, K., Sinreih, M., Stojan, J., Ser?en, S., Kljun, J., Bezen?ek, J., Stanovnik, B., Turel, I., and Ri?ner, T. L. (2015). Ruthenium complexes as inhibitors of the aldo-keto reductases AKR1C1-1C3. *Chem. Biol. Interact.*, 234:349–359.
- [Tyulkina et al., 2016] Tyulkina, D. V., Pleshkan, V. V., Alekseenko, I. V., Kopantseva, M. R., and Sverdlov, E. D. (2016). Expression of the FAP gene in non-fibroblast human cell lines. Development of cancer-associated fibroblast models. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 470(1):319–321.
- [Vachon et al., 2001] Vachon, C., Cerhan, J., Vierkant, R., and Sellers, T. (2001). Investigation of an interaction of alcohol intake and family history on breast cancer risk in the Minnesota Breast Cancer Family Study. *Cancer*, 127:92–94.
- [Vandermeersch et al., 2015] Vandermeersch, S., Vanbeselaere, J., Delannoy, C. P., Drolez, A., Mysiorek, C., Guerardel, Y., Delannoy, P., and Julien, S. (2015). Accumulation of GD1I Ganglioside in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Expressing ST6GalNAc V. *Molecules*, 20(4):6913–6924.
- [Vaughan et al., 2000] Vaughan, M. B., Howard, E. W., and Tomasek, J. J. (2000). Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp. Cell Res.*, 257(1):180–189.
- [Velling et al., 2002] Velling, T., Risteli, J., Wennerberg, K., Mosher, D. F., and Johansson, S. (2002). Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J. Biol. Chem.*, 277(40):37377–37381.

- [Vermeulen et al., 2017] Vermeulen, M. A., Slaets, L., Cardoso, F., Giordano, S. H., Tryfonidis, K., van Diest, P. J., Dijkstra, N. H., Schroder, C. P., van Asperen, C. J., Linderholm, B., Benstead, K., Foekens, R., Martens, J. W. M., Bartlett, J. M. S., and van Deurzen, C. H. M. (2017). Pathological characterisation of male breast cancer: Results of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program. *Eur. J. Cancer*, 82:219–227.
- [Vetter et al., 2017] Vetter, M., Fokas, S., Biskup, E., Schmid, T., Schwab, F., Schoetzau, A., Guth, U., Rochlitz, C., and Zanetti-Dallenbach, R. (2017). Efficacy of adjuvant chemotherapy with carboplatin for early triple negative breast cancer: a single center experience. *Oncotarget*, 8(43):75617–75626.
- [Vilquin et al., 2013] Vilquin, P., Villedieu, M., Grisard, E., Ben Larbi, S., Ghayad, S. E., Heudel, P. E., Bachelot, T., Corbo, L., Treilleux, I., Vendrell, J. A., and Cohen, P. A. (2013). Molecular characterization of anastrozole resistance in breast cancer: pivotal role of the Akt/mTOR pathway in the emergence of de novo or acquired resistance and importance of combining the allosteric Akt inhibitor MK-2206 with an aromatase inhibitor. *Int. J. Cancer*, 133(7):1589–1602.
- [Voduc et al., 2008] Voduc, D., Cheang, M., and Nielsen, T. (2008). GATA-3 expression in breast cancer has a strong association with estrogen receptor but lacks independent prognostic value. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17(2):365–373.
- [Vojta et al., 2016] Vojta, A., Samar?ija, I., Bo?kor, L., and Zoldo?, V. (2016). Glycogenes change expression in cancer through aberrant methylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1860(8):1776–1785.
- [Vrba and Futscher, 2017] Vrba, L. and Futscher, B. W. (2017). Epigenetic Silencing of MORT Is an Early Event in Cancer and Is Associated with Luminal, Receptor Positive Breast Tumor Subtypes. *J Breast Cancer*, 20(2):198–202.
- [Wang, 2012] Wang, B. (2012). BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell Biosci*, 2(1):6.

- [Wang et al., 2015a] Wang, B., Zhao, M. Z., Cui, N. P., Lin, D. D., Zhang, A. Y., Qin, Y., Liu, C. Y., Yan, W. T., Shi, J. H., and Chen, B. P. (2015a). Krüppel-like factor 4 induces apoptosis and inhibits tumorigenic progression in SK-BR-3 breast cancer cells. *FEBS Open Bio*, 5:147–154.
- [Wang et al., 2015b] Wang, K., Andresen Eguiluz, R. C., Wu, F., Seo, B. R., Fischbach, C., and Gourdon, D. (2015b). Stiffening and unfolding of early deposited-fibronectin increase proangiogenic factor secretion by breast cancer-associated stromal cells. *Biomaterials*, 54:63–71.
- [Wang et al., 2017] Wang, K., Wu, F., Seo, B. R., Fischbach, C., Chen, W., Hsu, L., and Gourdon, D. (2017). Breast cancer cells alter the dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions. *Matrix Biol.*, 60-61:86–95.
- [Wang et al., 2016] Wang, Y., Kraiss, J. J., Bernhardt, A. J., Nicolas, E., Cai, K. Q., Harrell, M. I., Kim, H. H., George, E., Swisher, E. M., Simpkins, F., and Johnson, N. (2016). RING domain-deficient BRCA1 promotes PARP inhibitor and platinum resistance. *J. Clin. Invest.*, 126(8):3145–3157.
- [Wang et al., 2014] Wang, Z. Q., Bachvarova, M., Morin, C., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M. C., Sebastianelli, A., and Bachvarov, D. (2014). Role of the polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in ovarian cancer progression: possible implications in abnormal mucin O-glycosylation. *Oncotarget*, 5(2):544–560.
- [Wei et al., 2005] Wei, D., Gong, W., Kanai, M., Schlunk, C., Wang, L., Yao, J. C., Wu, T. T., Huang, S., and Xie, K. (2005). Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res.*, 65(7):2746–2754.
- [Wei et al., 2013] Wei, Z., Gao, F., Kim, S., Yang, H., Lyu, J., An, W., Wang, K., and Lu, W. (2013). Klf4 organizes long-range chromosomal interactions with the oct4 locus in reprogramming and pluripotency. *Cell Stem Cell*, 13(1):36–47.

- [Weir, 1986] Weir, D. M. D. M. (1986). *Handbook of experimental immunology*. Oxford ; Boston : Blackwell Scientific Publications, 4th ed edition. Previous ed.: 1978.
- [Weizmann Institute of Science, 2016] Weizmann Institute of Science (2016). WISP1 Gene (Protein Coding). <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WISP1>. zuletzt abgerufen am 13. Januar 2018.
- [Weizmann Institute of Science, 2017] Weizmann Institute of Science (2017). GALNT3 Gene (Protein Coding). <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GALNT3>. zuletzt abgerufen am 13. Januar 2018.
- [Welsh et al., 2000] Welsh, P. L., Owens, K. N., and King, M. C. (2000). Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.*, 16(2):69–74.
- [Wenners et al., 2016] Wenners, A., Hartmann, F., Jochens, A., Roemer, A. M., Alkatout, I., Klapper, W., van Mackelenbergh, M., Mundhenke, C., Jonat, W., and Bauer, M. (2016). Stromal markers AKR1C1 and AKR1C2 are prognostic factors in primary human breast cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, 21(3):548–556.
- [Wienecke et al., 2018] Wienecke, A., Neuhauser, H., Kraywinkel, K., and Barnes, B. (2018). Cancers Potentially Preventable through Excess Weight Reduction in Germany in 2010. *Obes Facts*, 11(5):400–412.
- [Wooster et al., 1995] Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378(6559):789–792.
- [Wu et al., 2016] Wu, J., Liang, C., Chen, M., and Su, W. (2016). Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(42):68954–68965.
- [Xie et al., 2001] Xie, D., Nakachi, K., Wang, H., Elashoff, R., and Koeffler, H. P. (2001). Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res.*, 61(24):8917–8923.

- [Xu et al., 2000] Xu, L., Corcoran, R. B., Welsh, J. W., Pennica, D., and Levine, A. J. (2000). WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev.*, 14(5):585–595.
- [Yadav et al., 2015] Yadav, B. S., Chanana, P., and Jhamb, S. (2015). Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol*, 6(6):252–263.
- [Yagi et al., 2011] Yagi, R., Zhu, J., and Paul, W. E. (2011). An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int. Immunol.*, 23(7):415–420.
- [Yan et al., 2015] Yan, M., Shield-Artin, K., Byrne, D., Deb, S., Waddell, N., Haviv, I., and Fox, S. B. (2015). Comparative microRNA profiling of sporadic and BRCA1 associated basal-like breast cancers. *BMC Cancer*, 15:506.
- [Yang et al., 2005] Yang, Y., Goldstein, B. G., Chao, H. H., and Katz, J. P. (2005). KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, 4(11):1216–1221.
- [Yoon et al., 2003] Yoon, H. S., Chen, X., and Yang, V. W. (2003). Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.*, 278(4):2101–2105.
- [Yoon et al., 2010] Yoon, N. K., Maresh, E. L., Shen, D., Elshimali, Y., Apple, S., Horvath, S., Mah, V., Bose, S., Chia, D., Chang, H. R., and Goodglick, L. (2010). Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum. Pathol.*, 41(12):1794–1801.
- [Yori et al., 2010] Yori, J. L., Johnson, E., Zhou, G., Jain, M. K., and Keri, R. A. (2010). Kruppel-like factor 4 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression. *J. Biol. Chem.*, 285(22):16854–16863.
- [Yori et al., 2011] Yori, J. L., Seachrist, D. D., Johnson, E., Lozada, K. L., Abdul-Karim, F. W., Chodosh, L. A., Schiemann, W. P., and Keri, R. A. (2011). Krüppel-like factor

- 4 inhibits tumorigenic progression and metastasis in a mouse model of breast cancer. *Neoplasia*, 13(7):601–610.
- [Yoshida and Miki, 2004] Yoshida, K. and Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.*, 95(11):866–871.
- [You et al., 2002] You, Z., Saims, D., Chen, S., Zhang, Z., Guttridge, D. C., Guan, K. L., MacDougald, O. A., Brown, A. M., Evan, G., Kitajewski, J., and Wang, C. Y. (2002). Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J. Cell Biol.*, 157(3):429–440.
- [Yu et al., 2011] Yu, F., Li, J., Chen, H., Fu, J., Ray, S., Huang, S., Zheng, H., and Ai, W. (2011). Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene*, 30(18):2161–2172.
- [Zeisberg et al., 2000] Zeisberg, M., Strutz, F., and Muller, G. A. (2000). Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J. Nephrol.*, 13 Suppl 3:S111–120.
- [Zeng et al., 2017] Zeng, C. M., Chang, L. L., Ying, M. D., Cao, J., He, Q. J., Zhu, H., and Yang, B. (2017). Aldo-Keto Reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Front Pharmacol*, 8:119.
- [Zhang et al., 2012] Zhang, J., Liang, Q., Lei, Y., Yao, M., Li, L., Gao, X., Feng, J., Zhang, Y., Gao, H., Liu, D. X., Lu, J., and Huang, B. (2012). SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression. *Cancer Res.*, 72(17):4597–4608.
- [Zhou et al., 2017] Zhou, H., Liu, Y., Zhu, R., Ding, F., Wan, Y., Li, Y., and Liu, Z. (2017). FBXO32 suppresses breast cancer tumorigenesis through targeting KLF4 to proteasomal degradation. *Oncogene*, 36(23):3312–3321.
- [Ziegler et al., 1993] Ziegler, R. G., Hoover, R. N., Pike, M. C., Hildesheim, A., Nomura, A. M., West, D. W., Wu-Williams, A. H., Kolonel, L. N., Horn-Ross, P. L., Rosenthal,

J. F., and Hyer, M. B. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85(22):1819–1827.



# Veröffentlichung

Posterveröffentlichung auf der 13. Jahrestagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe e.V. am 21.06.2019 in Jena mit dem Titel:

Charakterisierung stromaler Faktoren beim Mammakarzinom von BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom

Abstract: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0039-1692092>

Volltext HTML: [http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0039-](http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0039-1692092)

1692092 Volltext PDF: [http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-](http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-0039-1692092.pdf)

0039-1692092.pdf

## 6. Danksagung

Mein tiefer Dank gilt unseren Patientinnen für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in unsere tägliche Arbeit und in unserer Forschungsprojekte. Ohne dieses Vertrauen wären wir nicht da, wo wir heute sind.

Große Dankbarkeit und Anerkennung richte ich an PD Dr. med. Maret Bauer, für ihre unermüdliche und intensive Betreuung während meiner experimentellen Forschungsarbeit. Für ihre Geduld, ihre hohe fachliche Kompetenz und ihren immensen Zeitaufwand danke ich ihr von ganzem Herzen.

Ein besonderes Wort des Dankes gebührt Sigrid Hamann, Mitarbeiterin des Onkologischen Labors der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe in Kiel. Ihre gewissenhafte und geduldige Einführung sowie Hilfestellung bei der Etablierung der immunhistochemischen Färbungen, ihr fachliches und persönliches Engagement während des langen Prozesses der Fertigstellung dieser Arbeit, haben wesentlich zum Erfolg meiner Forschung beigetragen. Ich bedanke mich beim ganzen Team des onkologischen Labors für die sehr herzliche und familiäre Atmosphäre und immerwährende Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. Maass danke ich dafür, dass diese Dissertation an seinem Institut ermöglicht wurde.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. Katharina Tiemann für die Nutzung der Färbautomaten in ihrem Institut für Hämatopathologie in Hamburg, sowie für ihre Unterstützung bei der mikroskopischen Auswertung und Prüfung meiner histologischen Ergebnisse

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinem Partner Martin bedanken. Seine Hinweise bei der Durchführung der statistischen Analysen, seine große Geduld und Beharrlichkeit sowie seine unermüdliche Motivation haben mich stets an den Erfolg dieser Arbeit glauben lassen

Ich danke meinen Eltern für ihre grenzenlose Liebe und den festen Rückhalt bei der Verwirklichung meines tiefen Wunsches, Medizin zu studieren. Sie haben immer an mich geglaubt, mich bestärkt und mich stets in allem unterstützt. Ohne eure Liebe, euer Vertrauen und eure Fürsorge wäre dieser Weg schwer möglich gewesen.

An meinen Bruder Franz - Danke, dass du da bist.

## 7. Lebenslauf