

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

## **Klinische Relevanz der FOXP1-Expression beim Mammakarzinom**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Konrad Desiderato

aus Ettenheim

Hamburg 2022

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

18.07.2023

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:**

Prof. Dr. Manfred Jücker

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:**

Prof. Dr. Guido Sauter

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Das Mammakarzinom.....	5
1.1.1	Epidemiologie.....	5
1.1.2	Symptome .....	5
1.1.3	Diagnostik.....	6
1.1.4	Prognostische und prädiktive Faktoren .....	6
1.1.4.1	pTNM-Klassifikation und UICC/AJCC-Stadieneinteilung.....	6
1.1.4.2	Histologische Typisierung.....	8
1.1.4.3	Histologisches Grading.....	9
1.1.4.4	Hormonrezeptorstatus .....	10
1.1.4.5	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 .....	10
1.1.4.6	Ki-67-Labeling-Index.....	11
1.1.4.7	Intrinsische Subtypen.....	11
1.1.4.8	Molekulargenetische Faktoren .....	12
1.1.5	Therapie .....	13
1.2	Der Transkriptionsfaktor Forkhead-box P1 .....	13
1.2.1	Rolle der FOXP1-Expression beim Mammakarzinom.....	18
1.3	Fragestellung und Zielsetzung .....	23
2	Material und Methoden .....	24
2.1	Tissue Microarray .....	24
2.2	Herstellung des TMA .....	25
2.3	Zusammensetzung des TMA .....	25
2.4	Immunhistochemie .....	28
2.5	Statistik .....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Technische Aspekte .....	31
3.2	FOXP1 Expression und Tumorphänotyp .....	31
3.3	FOXP1 Expression und Prognose .....	36
3.4	FOXP1 Expression und Amplifikationen von HER2, MYC, CCND1 und MDM2.....	38

3.5	FOXP1 Expression und Deletionen an relevanten Chromosomenabschnitten .....	39
3.6	FOXP1 Expression und Tumorzellproliferation.....	40
4	Diskussion .....	44
5	Zusammenfassung.....	51
6	Abstract .....	52
7	Literaturverzeichnis .....	53
8	Anhang .....	67
	Abkürzungsverzeichnis .....	67
	Tabellenverzeichnis.....	69
	Abbildungsverzeichnis .....	70
9	Danksagung .....	71
10	Lebenslauf.....	72
11	Eidesstattliche Versicherung.....	73

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Weltweit ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau. In dieser Gruppe ist es für fast ein Viertel aller neudiagnostizierten Neoplasien verantwortlich [1]. Dabei beläuft sich die Inzidenz des invasiven Mammakarzinoms in Deutschland auf ca. 70.000. Lediglich ungefähr ein Prozent der Patienten sind männlich. Das Lebenszeitrisko einer Frau in Deutschland an Brustkrebs zu erkranken, liegt bei ca. 12 Prozent. Fast 30 Prozent der Frauen sind bei Diagnosestellung unter 55 Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt im Median bei 64 Jahren [2].

Global ist das Mammakarzinom für über 600.000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich und damit die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau weltweit. In Nordamerika sowie vielen Ländern Europas wird allerdings seit ca. 1990 ein Plateau bzw. sogar ein Rückgang der Mortalitätsraten des Mammakarzinoms vermerkt [3]. Dieser Rückgang lässt sich hauptsächlich auf die Zunahme und Verbesserung der Früherkennung sowie der Weiterentwicklung und Verfügbarkeit einer systemischen Therapie zurückführen [4].

### 1.1.2 Symptome

Als eine vom Brustdrüsengewebe ausgehende maligne Erkrankung ist das Mammakarzinom in seinem klinischen Erscheinungsbild sehr heterogen. Häufig erfolgt das Erkennen der Erstmanifestation anhand eines palpablen, schmerzlosen Knotens durch die Patientin selbst. Neben unspezifischen Symptomen wie einer B-Symptomatik können lokale Veränderungen an der Haut (Rötung, Ödeme, Inflammation, Infiltrationen) sowie an der Mamille (Inflammation, Retraktion, Sekretion) vorkommen [5, 6]. Über die Hälfte der Mammakarzinome sind im oberen äußeren Quadranten der Mamma lokalisiert [5].

Weitere Symptome können auf Grund von lymphogener sowie hämatogener Metastasierung auftreten. Befallene Lymphknoten können sich vergrößert darstellen und mit einem Lymphödem einhergehen [7]. Über eine hämatogene Streuung können osteolytische Knochenmetastasen auftreten [8]. Weitere typische Lokalisationen von Metastasen sind Lunge, Eierstöcke, Leber, Pleura und das zentrale Nervensystem [9].

### 1.1.3 Diagnostik

In Bezug auf die Früherkennung ist die Mammographie die führende apparative Diagnostik und die einzige Methode mit gesicherter Reduktion der Brustkrebsmortalität [10, 11]. Zudem werden die Brustselbstuntersuchung sowie die klinische Brustuntersuchung in der Früherkennung angewendet [12, 13]. Die Sonographie kommt besonders bei jüngeren Frauen mit dichtem Drüsengewebe als ergänzende Diagnostik zum Einsatz [14, 15].

Im diagnostischen Verlauf erfolgt zunächst die histologische Abklärung mittels Stanz-, Vakuum- oder in Ausnahmefällen offener Exzisionsbiopsie. Die histopathologische Untersuchung des Biopsats sowie im späteren Tumorresektats ist dabei essenziell zur Sicherung der Diagnose sowie zur Bestimmung wichtiger tumorbiologischer Faktoren für die weitere Therapieplanung [16, 17].

Bei Karzinomen mit erhöhtem Risiko für eine Metastasierung erfolgt ein Staging mittels bildgebender Verfahren [18, 19].

### 1.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Bei einer Vielzahl von Therapieoptionen ist eine möglichst individuelle Ermittlung des Nutzen-Risiko-Profiles beim Mammakarzinom unerlässlich. Es gibt eine Vielzahl an prognostisch und prädiktiv relevanten Faktoren [20].

Prognostische Faktoren korrelieren dabei mit dem krankheitsfreien-, oder Gesamtüberleben ohne weitere adjuvante Therapie zum Zeitpunkt der Primärbehandlung. Damit geben sie Hinweise über den natürlichen Krankheitsverlauf [21].

Dem gegenüber geben prädiktive Faktoren Aufschlüsse über das zu erwartende Ansprechen auf eine adjuvante Therapie und stellen damit therapierelevante Parameter dar [21].

#### 1.1.4.1 pTNM-Klassifikation und UICC/AJCC-Stadieneinteilung

Die TNM-Klassifikation ist eine von der „Union for International Cancer Control“ (UICC) eingeführte Systematik zur Beschreibung der anatomischen Ausbreitung von Karzinomen. Dabei wird zwischen einer klinischen- sowie pathologischen Klassifikation unterschieden. Die jeweilige Klassifikation wird mit dem entsprechenden Präfix „c“ für *clinical*, oder „p“ für *pathological* gekennzeichnet [22].

In der TNM-Klassifikation werden Tumorgröße (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) beurteilt (s. Tabelle 1).

Die Bestimmung des „pT“ erfolgt am vollständigen Primärtumor ohne makroskopisch erkennbaren Tumor am Resektionsrand. Dabei wird nur die invasive Komponente des Tumors gemessen [22].

Die pN-Klassifikation bezieht sich auf die Anzahl von Metastasen in regionären Lymphknoten. Diese werden relativ zu ihrer Lage zum Musculus pectoralis minor in drei Bereiche nach Berg eingeteilt [23]:

**Level I:** Axillär, lateral des M. pectoralis minors sowie ipsilateral Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna

**Level II:** ventral des M. pectoralis minors sowie interpektoral

**Level III:** apikal und medial des M. pectoralis minors mit den ipsilateralen infra- und supraklavikulären Lymphknoten

Bei der Beurteilung des Lymphknotenstatus sollten zumindest Lymphknoten aus Level I untersucht werden [22].

Tabelle 1: vereinfachte Übersicht pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms, adaptiert von Gospodarowicz et al. 2016 [22]

<b>pT-Status</b>	<b>Tumorgöße in maximaler Ausdehnung</b>
pT1	≤2 cm
pT2	>2 cm bis ≤5 cm
pT3	> 5 cm
pT4	jede Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
<b>pN-Status</b>	<b>Lymphknotenmetastasen</b>
Nx	nicht beurteilbar
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Mikrometastasen; 1–3 ipsilateralen Lymphknoten (LK) und/oder mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten (SLK) entlang der ipsilateralen A. mammaria interna (nicht klinisch erkennbar)
pN2	4–9 ipsilateralen axilläre Lymphknoten oder klinisch erkennbar entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	≥10 axillär <u>oder</u> infraklavikulärer <u>oder</u> ≥1 supraklavikulärer LK ipsilateral, <u>oder</u> klinisch erkennbare LK A. mammaria interna + ≥1 axilläre LK <u>oder</u> klinisch nicht erkennbarer SLK A. mammaria interna + ≥3 axilläre LK
<b>pM-Status</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M0	keine Fernmetastasen
pM1	mikroskopisch gesicherte Fernmetastasen

Aus der TNM-Klassifikation lässt sich die UICC/ American Joint Commission on Cancer (AJCC)-Klassifikation ableiten (s. Tabelle 2). Ein höheres Stadium geht dabei mit einer schlechteren Prognose einher [24].

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach UICC und AJCC, adaptiert von Gospodarowicz et al.: 2016 [22]

Stadium	T-Status	N-Status	M-Status
Stadium 0	Tis*	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T0, T1	N1mi**	M0
Stadium IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	Alle T	N3	M0
Stadium IV	Alle T	Alle N	M1

\*Tumor in situ

\*\*Mikrometastasen

#### 1.1.4.2 Histologische Typisierung

Die histologische Typisierung des invasiven Mammakarzinoms nach aktueller Klassifikation der World Health Organisation (WHO-) erfolgt zunächst anhand der präoperativ durchgeführten Stanz-/Vakuumbiopsie und beinhaltet die Bestimmung genau definierter pathomorphologischer Kriterien. Basierend auf dem jeweiligen histologischen Subtyp kann eine frühzeitige Prognoseabschätzung und Therapieplanung erfolgen [25-27].

Mit 50-80 % ist das **invasive Karzinom ohne speziellen Typ (NST)** mit Abstand der am häufigsten diagnostizierte histologische Subtyp des Mammakarzinoms. Das NST geht mit einer etwas schlechteren Prognose im Vergleich zu der Gesamtheit der Mammakarzinome einher [28].

Das **invasive lobuläre Karzinom (ILC)** macht mit 5-15 % den zweithäufigsten Tumortyp aus [28]. Im Vergleich zum NST zeigt das ILC allgemein zwar ein geringeres Progressionsrisiko in den ersten Jahren, allerdings ein schlechteres Gesamtüberleben nach 6 und 10 Jahren [29].

Deutlich seltener im Vergleich zum NST gehen das **klassische medulläre, tubuläre** und das **muzinöse Karzinom** mit guter bis sehr guter Prognose einher [28].

Eine Übersicht mit weiteren selteneren histologischen Typen des invasiven Mammakarzinoms findet sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht histologische Typen des invasiven Mammakarzinoms nach WHO Klassifikation

Histologische Typen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invasives Karzinom ohne speziellen Typ (NST) <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pleomorphes Karzinom</li> <li>○ Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen</li> <li>○ Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen</li> <li>○ Karzinom mit melanotischen Merkmalen</li> </ul> </li> <li>• Invasives lobuläres Karzinom mit weiteren Subtypen</li> <li>• Karzinom mit medullären Eigenschaften <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Medulläres Karzinom</li> <li>○ Atypisches medulläres Karzinom</li> <li>○ NST mit medullären Eigenschaften</li> </ul> </li> <li>• Kribriiformes Karzinom</li> <li>• Muzinöses Karzinom</li> <li>• Tubuläres Karzinom</li> <li>• Invasives papilläres Karzinom</li> <li>• Karzinom mit apokriner Differenzierung</li> <li>• Invasives mikropapilläres Karzinom</li> <li>• Metaplastisches Karzinom, kein spezieller Typ <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Low-grade adenosquamöses Karzinom</li> <li>○ Fibromatose-ähnliches metaplastisches Karzinom</li> <li>○ Plattenepithelkarzinom</li> <li>○ Spindelzellkarzinom</li> <li>○ Metaplastisches Karzinom mit mesenchymaler Differenzierung</li> <li>○ Chondroide Differenzierung</li> <li>○ Ossäre Differenzierung</li> <li>○ Andere mesenchymale Differenzierung</li> <li>○ Gemischtes metaplastisches Karzinom</li> <li>○ Myoepitheliales Karzinom</li> </ul> </li> <li>• Auswahl Seltener Typen: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Adenoid-zystisches Karzinom</li> <li>○ Karzinome mit neuroendokrinen Eigenschaften</li> <li>○ Karzinom mit siegelringzelliger Differenzierung</li> <li>○ Lipidreiches Karzinom</li> <li>○ Glykogenreiches klarzelliges Karzinom</li> </ul> </li> </ul>

#### 1.1.4.3 Histologisches Grading

Das histologische Grading erfolgt mit dem von Elston und Ellis modifizierte Bloom-Richardson-Grading (BRE-Graduierung) [30]. Dieses beinhaltet unterschiedliche histo- und zytologischen Kriterien. Es werden Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate semiquantitativ bewertet (s. Tabelle 4).

Anhand der Ausprägung der unterschiedlichen Kriterien wird ein Malignitätsgrad von gering bis hoch identifiziert, der mit G1-G3 angegeben wird. Eine höhere G-Gruppe geht somit mit einer schlechteren Prognose einher [30].

Tabelle 4: Kriterien des histologischen Gradings für das Mammakarzinom nach Bloom und Richardson modifiziert durch Elston und Ellis [30]

Merkmale		Kriterien	Score
Tubulusausbildung		> 75 %	1
		10–75 %	2
		< 10	3
Kernpolymorphie		gering	1
		mittelgradig	2
		stark	3
Mitoserate		0–5/10 HPF*	1
		6–11/10 HPF*	2
		> 12/10 HPF*	3
		<b>Summenscore</b>	3–9
Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3,4,5 6,7 8,9	gering mäßig hoch	G1 G2 G3	gut differenziert mäßig differenziert schlecht differenziert

\*HPF = „high power field“

#### 1.1.4.4 Hormonrezeptorstatus

Die immunhistochemische Erhebung des Östrogen- (ER) sowie Progesteronrezeptors (PR) im Tumorzellkern liefert prognostische und prädiktive Erkenntnisse. Besonders in Bezug auf eine antihormonelle Therapie ist der Hormonrezeptor (HR)-Status ein wichtiger prädiktiver Faktor (s. Kapitel 1.1.5) [31].

ER und PR gehören zu der Gruppe der Steroidrezeptoren und sind nukleäre Rezeptoren, welche nach Ligandenbindung als Transkriptionsfaktoren fungieren [32].

Der **Östrogenrezeptor** kann in einen alpha- (ER $\alpha$ ) und beta-Typen (ER $\beta$ ) unterteilt werden [33]. Während es viele Erkenntnisse über die Rolle von ER $\alpha$  bei der Tumorgenese gibt, ist die Forschung bezüglich der Rolle von ER $\beta$  erst in einem frühen Stadium. Der ER reguliert das Wachstum sowie die Differenzierung von normalen Brustepithelzellen und führt in Brustkrebszellen nach Ligandenbindung zu einem Zellwachstum [34, 35]. 70-80 % der Brustkrebszellen sind ER positiv [34].

#### 1.1.4.5 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

Der Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) ist ein transmembraner Wachstumsfaktor-Rezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität. Eine Überexpression und/oder

Amplifikation kann in ca. 15 % der Mammakarzinome nachgewiesen werden [36]. Da er die Zellproliferation stimuliert und die Apoptose hemmt, geht ein HER2 positiver (HER2+) Status mit einer eingeschränkten Prognose einher. Auf Grund von Therapieoptionen mit Angriffspunkt an dem extrazellulären Anteil oder intrazellulär an der Tyrosinkinase ist HER2 ein wichtiger prädiktiver Faktor (s. Kapitel 1.1.5) [37].

#### **1.1.4.6 Ki-67-Labeling-Index**

Das Antigen Ki-67 stellt einen Proliferationsmarker dar, der nur von sich in Proliferation befindlichen Zellen exprimiert wird. Die Bestimmung des Anteils proliferierender Zellen innerhalb eines Tumors dient dabei einer verbesserten Therapieplanung sowie Prognoseabschätzung. So stellt der Ki-67-Labeling-Index (Ki67LI) einen unabhängigen prognostischen Faktor für das krankheitsfreie- sowie Gesamtüberleben von Patient/-innen mit einem Mammakarzinom dar und dient als prädiktiver Faktor für eine Chemotherapie[38-40]. Ein Grenzwert mit der höchsten prognostischen Signifikanz ist aktuell noch nicht etabliert [38].

#### **1.1.4.7 Intrinsische Subtypen**

Das Mammakarzinom kann in vier unterschiedliche intrinsische Subtypen (luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like) eingeteilt werden. Diese beruhen auf der Analyse von Genexpressionsprofilen [41]. Da die nötigen Array-Analysen in der täglichen Routine nicht praktikabel sind, kommen in der klinischen Routine vereinfachte Verfahren zum Einsatz. So steht neben kommerziell verfügbaren Genexpressionstest wie dem PAM50 eine Einteilung mittels etablierter immunhistochemischer Marker (ER, PR, HER2, Ki67LI) zur Verfügung (s. Tabelle 5) [42-45].

Ca. 70 % der Mammakarzinome werden dem Luminal A- oder Luminal-B-Subtyp zugeordnet. Diese besitzen generell, insbesondere jedoch der Luminal-A-Subtyp, eine bessere Prognose im Vergleich zu den HER2-positiven- und Triple-negativen-Subtypen hinsichtlich Rezidivrisiko, krankheitsfreiem Intervall und Gesamtüberleben [45-48]. Des Weiteren sind sie wichtige prädiktive Faktoren für unterschiedliche systemische Therapieansätze (s. Kapitel 1.1.5) [49].

Tabelle 5: Klinisch-pathologische Definition der intrinsischen Subtypen anhand immunhistochemischer Surrogatmarker [45]

Intrinsischer Subtyp	Klinisch-pathologische Definition	ER	PR	HER2	Ki67LI
Luminal A	Luminal A-like (LA)	+	±	-	niedrig*
Luminal B	Luminal B-like (LB)	+	±	-	hoch*
HER2-enriched	HER2-positiv (non-luminal)	-	-	+	jeder Wert
	HER2-positiv (luminal)	+	±	+	jeder Wert
Basal-like	Triple-negativ (TN)	-	-	-	jeder Wert

\*Derzeit besteht kein internationaler Konsens über einen Cut-off-Wert für Ki67LI. Die deutsche Leitliniengruppe orientiert sich an einer Metaanalyse von Petrelli et al. und empfiehlt einen Cut-off-Wert von 25 % [38].

#### 1.1.4.8 Molekulargenetische Faktoren

Zu den häufigsten hereditären Karzinomen gehören jene, welche durch Mutationen im Bereich der „breast cancer associated“ Gene 1 und 2 (BRCA1 und BRCA2) hervorgerufen werden. Diese Karzinome gehen auch mit einer deutlich schlechteren Prognose einher [50].

Neben diesen gibt es eine Vielzahl an Keimbahnmutationen, die deutlich seltener vorkommen und ebenfalls ein höheres Karzinomrisiko erzeugen.

Beim Cowden-Syndrom liegt eine Mutation im „phosphatase and tensin homolog“ Gen (PTEN) auf Chromosom 10q23 vor [51]. Eine Deletion des PTEN-Gens geht beim Mammakarzinom zusätzlich mit einer schlechteren Prognose einher [52]

Auch das Li Fraumeni-Syndrom, eine Mutation im p53-Gen auf Chromosom 17p13, ist mit einem ca. 50 %igen Brustkrebsrisiko vor dem 60. Lebensjahr assoziiert [53]. Dies gilt ebenfalls für Deletionen des p53-Gens, welche zu einer deutlich schlechteren Prognose führen [54].

Das hereditäre diffuse Magenkarzinom-Syndrom mit einer Mutation des Cadherin1-Gens (CDH1) auf Chromosom 16q22 geht ebenfalls mit einem deutlich erhöhten Erkrankungslebenszeitrisiko für Brustkrebs von 50-60 % einher [55, 56]

Durch genetische Analysen spontaner Mammakarzinome sind viele prognostische Parameter identifiziert worden. So geht zum Beispiel eine Amplifikation des „mouse double minute 2 homolog“ (MDM2)-Gens durch eine Hemmung des p53-Proteins mit einer schlechteren Prognose einher [57, 58]. Auch für die Amplifikationen des „Cyclin D1“ (CCND1)-Gens sowie Deletionen auf Chromosom 8p21 und 9p21 bestehen Hinweise für eine Assoziation mit einer eingeschränkten Prognose [59-61].

Multigenexpressionsanalysen ermöglichen es bei einer Vielzahl relevanter Gene wichtige prognostisch und prädiktive Informationen zu gewinnen. Dank kommerzieller Signaturen wie z. B. dem Oncotype DX® kommen Multigenexpressionsanalyse in der klinischen Routine zum Einsatz [62].

### **1.1.5 Therapie**

Eine Tumorsektion stellt primär die Grundlage der Therapie bei nicht fortgeschrittenen Mammakarzinomen dar [63]. Dabei ist eine brusterhaltende Therapie mit adjuvanter Bestrahlung der Mastektomie bezüglich des Überlebens gleichwertig [64-66]. Als weitere therapeutische Optionen stehen unterschiedliche systemische Therapiemöglichkeiten zur Verfügung [67, 68]. Hierzu zählen z. B. die Chemo-, endokrine- und Antikörpertherapien sowie die Therapie mit CDK4/6-Inhibitoren [31, 69-73]. Um bei primär inoperablen Karzinomen dennoch eine Operabilität bzw. eine brusterhaltende Operation zu ermöglichen, kann eine systemische Therapie vorausgehen (neoadjuvante Therapie) [74]. Die Auswahl eines geeigneten Therapiekonzeptes erfolgt auf Grundlage der intrinsischen Subtypen sowie weiteren prognostisch und prädiktiv relevanten Faktoren. So wird beispielsweise bei positivem HR-Status eine endokrine Therapie empfohlen. Mittel der Wahl ist dabei der selektive Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen [49]. Auch die Entscheidung zur adjuvanten Chemotherapie sollte bei oft ausgeprägtem Nebenwirkungsprofil nach Risiko-Nutzen-Bewertung erfolgen. Dabei ist auf Grund der schlechteren Prognose bei fortgeschrittenem HER2 positiven-, Triple-negativen Mammakarzinomen und Tumoren vom Luminal-B-Subtyp eine Chemotherapie indiziert. Bei HER2 positiven Tumoren kommt außerdem eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab zum Einsatz [49].

Bei dem Nachweis von Fernmetastasen wird die Indikation zu einer operativen oder lokal ablativen Therapie individuell und interdisziplinär gestellt. Dabei ist die Lokalisation der Metastasen entscheidend [75].

## **1.2 Der Transkriptionsfaktor Forkhead-box P1**

Die Genexpression nimmt in der Regulation essenzieller Vorgänge der menschlichen Zelle wie der Differenzierung, der Proliferation und dem programmierten Zelltod eine zentrale Rolle ein. Über die durch externe Stimuli wie Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren und chemische Stoffe angeregte differenzielle Expression von Genen reagiert die Zelle auf ihre Umgebung. Diese Reaktion wird über eine Aktivierung von membranständigen oder zytoplasmatischen Rezeptoren, die eine Signaltransduktionskaskade auslösen, vermittelt.

Ein häufiges Ziel der Kaskade ist eine Veränderung der Expression von Transkriptionsfaktoren, welche mit ihren Transaktivierungsdomänen an spezifische DNA-Sequenzen binden oder mit dem RNA-Polymerase II-Transkriptionskomplex kommunizieren. Hierdurch erfolgt eine Hemmung bzw. Aktivierung der Genexpression spezifischer Zielgene. Auf Grund ihrer zentralen Rolle in der Tumorentwicklung sind Transkriptionsfaktoren in zunehmender Zahl als immunhistochemische Marker in der Tumordiagnostik etabliert [76].

Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist das Forkhead-box P1 (FOXP1)-Protein. Es ist einer von mindestens 43 Mitgliedern bestehenden humanen Forkhead-box (FOX)-Familie sowie einer von vier Proteinen der Subfamilie P [77]. Alle FOX-Transkriptionsfaktoren binden mittels Forkhead-Domäne an die DNA. Auf Grund der dreidimensionalen Struktur nach DNA-Bindung aus drei  $\alpha$ -Helices und zwei Schleifen wird sie auch als „winged helix“-Domäne bezeichnet (s. Abbildung 1) [78].

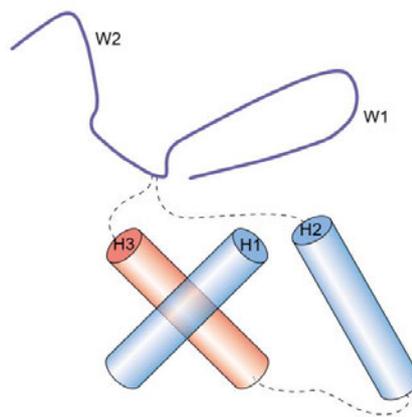


Abbildung 1: Dreidimensionale Darstellung der wichtigsten Regionen der Forkhead-Domäne  $\alpha$  Helices (H1-H3) und Schleifen (W1 und W2). Abb. aus Lehman et al 2003 [78]

Proteine der FOXP-Subfamilie unterscheiden sich von den anderen FOX-Proteinen u.a. in der namensgebenden Forkhead-Domäne durch Deletionen im Bereich der „Schleifen“-Regionen [79]. Des Weiteren besitzen FOXP-Mitglieder mit einer Zinkfinger- und einer Leucin-Zipper-Domäne eine weitere DNA-Bindungsstelle und die Möglichkeit zur Hetero- sowie Homodimerisierung. Neben der Interaktion mit anderen Proteinen konnte Li et al. nachweisen, dass FOXP1, -2 und -4 nur nach Dimerisierung eine Bindung mit der DNA eingehen können [80].

Das FOXP1-Gen liegt auf Chromosom 3p14.1 [81]. Als Transkriptionsfaktor enthält das aus 677 Aminosäuren bestehende FOXP1-Protein mehrere Transaktivierungsdomänen. Je nach Zusammensetzung der Aminosäuren in diesen Bereichen ergeben sich unterschiedliche Gruppen [82]. Funktionell wichtig sind dabei eine N-terminale glutaminreiche- und C-terminale säurereiche Domäne [83].

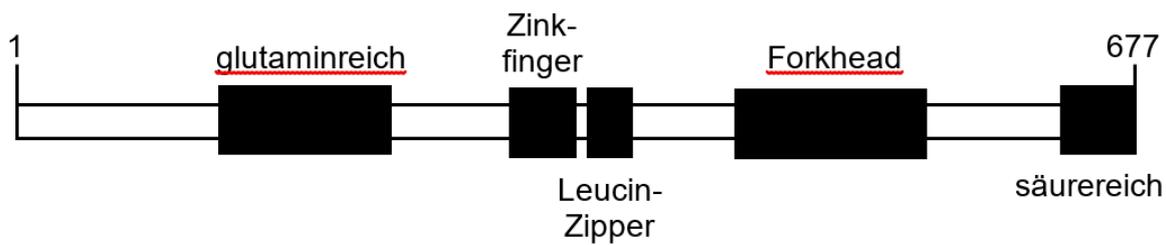


Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Domänenstrukturen von FOXP1. Mod. nach Ijichi et al. 2013 [83]

Eine Expression von FOXP1-Protein sowie -Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) kann in einer Vielzahl von humanen Normalgeweben unterschiedlichen Ursprungs wie Lunge, Brustdrüse, Gehirn, Niere, Kolon, Blut, endokrine sowie in lymphatischen Organen nachgewiesen werden. Die Expression des Proteins erfolgt allerdings in den meisten der untersuchten Gewebeproben nur in einem Teil der Zellen. Auch unterscheiden sich die Expressionsmuster bezüglich einer nukleären bzw. zytoplasmatischen Lokalisation des FOXP1-Proteins [82]. In normalem Brustgewebe dominiert eine fast ausschließlich nukleäre Lokalisation. Besonders in größeren Ductus sowie in Arealen mit epithelialer Hyperplasie zeigt sich eine starke Expression, während die Expression in eher kleinen Acini und Ductus in einigen Fällen isoliert in den Myoepithelzellen nachgewiesen wurde [84].

FOXP-Proteine nehmen eine essenzielle Rolle in der Organentwicklung, Immunantwort sowie der Tumorentwicklung ein [77, 85]. Sie übernehmen ein breites Spektrum an Funktionen im Organismus, so sind sie beispielsweise an der Entwicklung der Glandula mammaria beteiligt. Fu et al. konnte bei FOXP1 Knockout-Mäusen eine deutlich eingeschränkte duktale Morphogenese mit nur rudimentär angelegten Brustdrüsen nachweisen. Hierbei zeigte sich, dass FOXP1 in der Aktivierung von langlebigen Mammastammzellen eine wichtige Rolle spielt [86]. Auch in der B-Zell Entwicklung und Monozytendifferenzierung sowie in der Entwicklung der Lunge und des Herzens ist FOXP1 beteiligt [87-90]. Des Weiteren wird der Einfluss von FOXP1 auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems beschrieben. So wurde bei Kindern mit einer Mutation im FOXP1-Gen neben diversen Organmalformationen häufig ein eingeschränkter Intellekt, spezifische Sprachdefizite und autistische Eigenschaften beobachtet [91].

Eine Interaktion mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren wird beschrieben. So bildet FOXP1 kooperative Komplexe mit dem „nuclear factor of activated T cells 2“ (NFAT2) am Interleukin-2-Promotor in B-Zellen, während im Gewebe der Prostata ein repressiver Effekt auf Androgenrezeptor-induzierte Transkriptionsaktivitäten und in der Lunge eine Repression des

CC10- sowie humanen Surfactant Protein C-Promotor beschrieben wird [88, 92, 93]. Auch im Brustdrüsengewebe wurden bereits Interaktionen nachgewiesen (s. Kapitel 1.2.1).

Da bereits eine Assoziation von diversen Tumorerkrankungen mit einem Verlust der Heterozygotie in Chromosom 3p beobachtet wurde, wurde schon früh die Vermutung einer möglichen Funktion als Tumorsuppressor gestellt [81, 94]. Wie in Tabelle 6 aufgeführt konnte diese Hypothese bereits bei einer Vielzahl von Tumorentitäten bestätigt werden. In anderen Karzinomen fungiert FOXP1 hingegen eher als Onkogen (s. Tabelle 7).

Durch das Wissen um mögliche Interaktionen stehen Erklärungsansätze für einige Tumorentitäten zur Verfügung. Da eine chronisch erhöhte NFAT-Aktivität bei B-Zell Lymphomen besteht, wird die kooperative Wirkungsweise mit NFAT als möglicher Erklärungsansatz für die Rolle von FOXP1 als Onkogen bei diffusen B-Zell Lymphomen diskutiert [95, 96]. Beim Prostatakarzinom hingegen könnte die Interaktion mit dem Androgenrezeptor zu einer Tumorsuppression führen [97]. Auch in Bezug auf das Mammakarzinom sind Interaktionen beschrieben (s. Kapitel 1.2.1).

Tabelle 6: Übersicht Literatur über Assoziation FOXP1-Überexpression mit günstigerer Prognose und Phänotyp in diversen Tumorentitäten

Art des Karzinoms und Quellenangabe	Signifikante Korrelationen mit (nukleärer) FOXP1-Überexpression bzgl. Prognose und Phänotyp
Mammakarzinom [83, 98-103]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Längeres krankheitsfreies- und Gesamtüberleben</b></li> <li>- <b>Unter Tamoxifentherapie längeres rezidivfreies- und Gesamtüberleben</b></li> <li>- Positiver ER<math>\alpha</math>- und -<math>\beta</math>-Status</li> <li>- Positiver PR-Status</li> <li>- Kleinere Tumorgroße</li> <li>- Niedrigeres BRE Grading</li> <li>- Invasives duktales Karzinom im Vergleich zum NST</li> <li>- Verlust von FOXP1 in triple negativen Karzinom</li> </ul>
Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom [104]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Längeres 5 Jahres-Überleben</b></li> </ul>
Kolorektaleskarzinom [105]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Längeres rezidivfreies- und Gesamtüberleben</b></li> </ul>
Prostatakarzinom [106, 107]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Längeres krankheitsbezogenes Überleben</b></li> <li>- Höhere Expression im Vergleich zu Prostatanormalgewebe</li> <li>- Expression Androgenrezeptor</li> <li>- Höherer postoperativer Gleason Score</li> </ul>
Pankreaskarzinom [108]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Längeres Gesamtüberleben</b></li> <li>- Kleinere Tumorgroße</li> <li>- Neg. Lymphknotenstatus</li> <li>- Fehlende Tumorinvasion in umliegende Strukturen</li> <li>- Niedrigeres TNM-Stadium</li> </ul>
Ovarialkarzinom [109]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Längeres Gesamtüberleben</b></li> <li>- Geringere Expression in Karzinomen im Vergleich zu Ovarnormalgewebe</li> <li>- Geringere Chemotherapieresistenz</li> <li>- niedrigere nukleäre und höhere zytoplasmatische Expression in FIGO Stadium III-IV im Vergleich zu Stadium I-II</li> </ul>
Cholangiokarzinom [110]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Längeres Gesamtüberleben</b></li> <li>- Höherer Differenzierung</li> <li>- Fehlenden Lymphknotenmetastasen</li> <li>- ausbleibender Invasion umliegender Strukturen</li> <li>- Niedrigerem TNM Stadium</li> </ul>
Klarzelliges Nierenzellkarzinom [111, 112]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Niedrigeres Tumorgading</li> <li>- Wenn gleichzeitige Expression in Nukleus und Zytoplasma, oder der Zellmembran dann Korrelation mit höherem Grading</li> </ul>
Ösophaguskarzinom [113]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Längeres Gesamtüberleben</b></li> <li>- Niedrigere Expression und häufigerer Verlust von FOXP1 in Tumorgewebe als Normalgewebe, Gegenteiliges Bild für alleinige zytoplasmatische Expression</li> <li>- Geringere postoperative Rezidive</li> <li>- Weniger Fernmetastasen</li> <li>- Bei zytoplasmatischer Expression häufigere Fern- und Lymphknotenmetastasen</li> </ul>

Tabelle 7: Übersicht Literatur über Assoziation FOXP1-Überexpression mit schlechter Prognose und Phänotyp in diversen Tumorentitäten

Art des Karzinoms und Quellenangabe	Signifikante Korrelationen mit (nukleärer) FOXP1-Überexpression bzgl. Prognose und Phänotyp
MALT-Lymphom [114, 115]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Kürzeres Gesamtüberleben</b></li> <li>- Höhere postoperative Rezidivrate</li> <li>- Größere Tumorgroße</li> <li>- Polymorphologische Histologie</li> </ul>
Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom [116-124]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Kürzeres Gesamt- und rezidivfreiem Überleben</b></li> <li>- Niedrigeres 5- und 10-Jahres-Überleben</li> <li>- Höhere Rezidivrate</li> </ul>
Follikuläres Lymphom [125]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Kürzeres rezidivfreies Überleben</b></li> </ul>
Malignes Melanom [126]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Kürzeres krankheitsspezifisches und rezidivfreies Überleben</b></li> <li>- Niedrigere Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu Stromagewebe</li> <li>- Lymphknotenmetastasen</li> <li>- höherem pT-Status</li> </ul>
Hepatozelluläres Karzinom [127, 128]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Niedrigeres 5-Jahres-Gesamtüberleben</b></li> <li>- Höhere Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu peritumoralen Gewebe</li> <li>- Größere Tumorgroße</li> <li>- Serum <math>\alpha</math>-Fetoprotein</li> <li>- Höheres TNM-Stadium</li> </ul>
Glioblastome [129, 130]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Kürzeres Gesamtüberleben</b></li> <li>- Niedrigere Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe</li> </ul>

### 1.2.1 Rolle der FOXP1-Expression beim Mammakarzinom

Bereits vor der Entdeckung des Transkriptionsfaktors FOXP1 konnte eine Häufung von chromosomalen Veränderungen im Bereich der Region 3p14 bei Brustkrebszellen von Patientinnen mit Mutation im BRCA2-Gen nachgewiesen werden [131]. Somit wurde bereits bei der ersten Beschreibung des Transkriptionsfaktors durch Banham et al. seine Rolle als möglicher Tumorsuppressor beim Mammakarzinom diskutiert [82].

Bezüglich der histologischen Subtypen konnte Takagi et al. 2016 einen signifikant höheren Anteil von Karzinomen mit zytoplasmatischer Expression von FOXP1 im ILC im Vergleich zum NST Mammakarzinom identifizieren. Eine gleichzeitige Auswertung der nukleären Expression erfolgte diesbezüglich nicht [101].

Shigekawa et al. konnten darstellen, dass in Mammakarzinomen eine Expression von FOXP1 invers mit der Tumorgroße korreliert [100].

Eine Vielzahl von Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der FOXP1-Expression und dem Rezeptorstatus. So wurden positive Korrelationen mit den ER- und PR-Status gefunden [98-100]. Wie in Abbildung 3 dargestellt konnten Ijichi et al. 2012 nachweisen, dass FOXP1- sowie FOXA1-mRNA durch Estradiol in ER $\alpha$  positiven Brustkrebszellen hochreguliert wird. Die Autoren beschreiben eine durch FOXP1 stimulierte Zellproliferation sowie Zunahme der ER vermittelten Transkriptionen. Eine geringere Expression von FOXP1 wurde mit einer höheren Rezidivrate und kürzerem Gesamtüberleben bei Tamoxifen-therapierten Mammakarzinomen assoziiert [132]. Triple-negative Mammakarzinome zeigen eine signifikant geringere Expression von FOXP1 [99, 103].

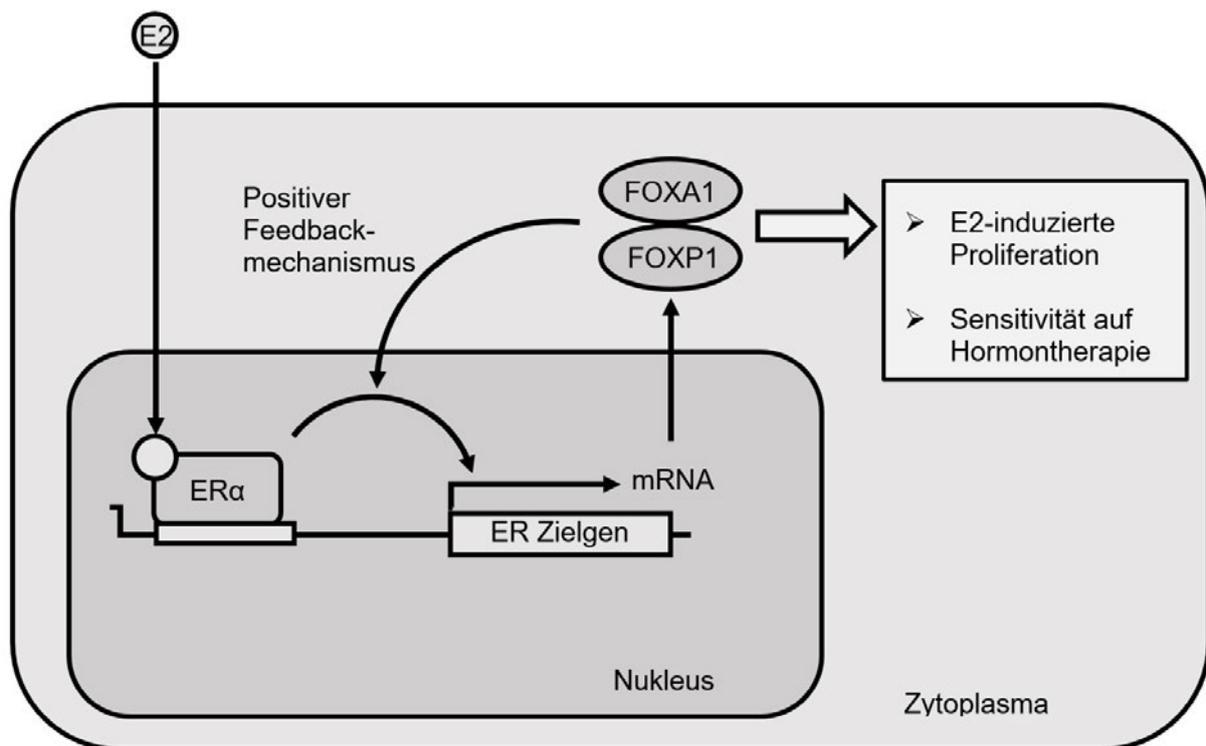


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen dem Östrogenrezeptor und FOXA1 bzw. FOXP1 mod. n. Ijichi et al. 2013[83]. Die Transkription des FOXA1- und FOXP1-Gens wird durch den aktivierten ER $\alpha$  induziert. FOXP1 und FOXA1 führen über einen positiven Feedbackmechanismus zur Induktion ER vermittelter Transkription und zu einer Estradiol (E2)-induzierten Proliferation sowie einer erhöhten Sensitivität auf eine Hormontherapie mit Tamoxifen [83].

Stephen et al. konnten außerdem eine durch den „transforming growth factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) induzierte Interaktion von FOXP1 mit den Transkriptionsfaktoren „Mothers against decapentaplegic homolog 2“ (Smad2) und „Mothers against decapentaplegic homolog 3“ (Smad3) nachweisen, welche zu einer Repression von MYC führt [133]. MYC ist ein Transkriptionsfaktor und induziert in eukaryotischen Zellen eine Progression des Zellzyklus [134]. Die Expression von MYC ist in triple-negativen Mammakarzinomen mit einem größeren

Tumordurchmesser, höherem histologischem Grading sowie Lymphknotenstatus assoziiert [135].

Eine Vielzahl von Studien konnte des Weiteren eine signifikante Korrelation zwischen einer FOXP1 Überexpression und einem längeren rezidivfreien- sowie Gesamtüberleben zeigen [84, 99, 100].

Die intrazelluläre Lokalisation von FOXP1 findet in den meisten Studien keine vorrangige Beachtung. Häufig wurden entweder keine Angaben zur Auswertung gemacht oder ausschließlich eine nukleäre Expression beurteilt. Durch Yu et al. erfolgte eine separate Auswertung der nukleären sowie zytoplasmatischen Expression des FOXP1-Proteins an Mamma-Risikoläsionen sowie -Karzinomen. Die Autoren fanden mit zunehmender Malignität eine Zunahme der zytoplasmatischen- bei gleichzeitiger Abnahme der nukleären Expression (s. Tabelle 8). Eine verminderte zytoplasmatische Expression korrelierte signifikant mit einem längeren Gesamtüberleben sowie verminderter ER-Expression beim Mammakarzinom. Durch die erhobenen Erkenntnisse schlossen die Autoren auf eine zytoplasmatische Dislokation von FOXP1 im Rahmen der Tumorgenese [102].

Eine Untersuchung der prognostischen Bedeutung von FOXP1 RNA Expression hatte im Kollektiv der „The Cancer Genome Atlas Program“ (TCGA) Datenbank keine prognostische Bedeutung ergeben [136].

Tabelle 8: Übersicht Literatur über Assoziation der FOXP1-Über-/ Unterexpression mit Prognose und Phänotyp beim Mammakarzinom

Autor	Jahr	Anti-körper	Verdünnung	Anzahl Fälle	Vorbehandlung	Häufigkeit FOXP1-Über-/ Unterexpression	Statistische Beziehung mit FOXP1 Expression
Banham et al. [82]	2001	JC12	1:80	9 Karzinome (2 in-situ Tumoren)	k A.	mäßige-stark positive Karzinome: 33% schwach positiv: 55% negative Karzinome: 11%	-
Fox et al. [84]	2004	JC12	1:10	283 Karzinome (204 NST, 18 ILC, 20 Andere) 16 Normalgewebe	Mastektomie (n=70), Lumpektomie (n=213) Keine neoadjuvante Therapie	50% FOXP1 positive Karzinome 50% FOXP1 negative Karzinome (nukleäre Expression)	<u>Positiv:</u> ER (p=0,03), <b>krankheitsfreies Überleben</b> (p=0,03) (auch in multivariater Analyse (pT, pN, G) (p=0,03)) <u>Invers:</u> EGF (p=0,01)
Bates et al. [98]	2008	JC12	1:75	283 Karzinome (idem Fox et al.)	Mastektomie (n=70), Lumpektomie (n=213) Keine neoadjuvante Therapie	s. Fox et al.	<u>Positiv:</u> nukleärer Expression von ERβ (p=0,01)
Rayoo et al. [99]	2009	JC12	1:20	225 Karzinome (35 BRCA1, 34 BRCA2, 57 BRCA3, 99 sporadisch)	Keine neoadjuvante Therapie	FOXP1 pos. unter den familiären /sporadischen Karzinomen: 54%/ 46% (nukleäre Expression)	Höhere Expression in familiären im Vergleich zu sporadischen Karzinomen in den Gruppen <ul style="list-style-type: none"> <li>• luminaler Karzinome (p=0,021)</li> <li>• triple negativer Karzinome(p&lt;0,001)</li> </ul> <u>Gruppe der familiären Karzinome</u>  <u>Positiv:</u> ERα (p=0,038), ERβ (p=0,007), <b>krankheitsfreien Überleben</b> (p=0,025), <b>Gesamtüberleben</b> (p=0,009) (auch in multivariater Analyse (G, pT, pN, Alter, ER, HER2, familiär) (p=0,0497))  <u>Gruppe der sporadischen Karzinome</u>  höhere Expression in luminalen im Vergleich zu <ul style="list-style-type: none"> <li>• triple-negativen (unabhängig von Tumorgrad und –Größe) (p=0,044)</li> </ul>
Shigekawa et al. [100]	2011	Anti-GX5050	1:1000	113 Karzinome	Vakuumstanzbiopsie, Resektion  k A. bzgl. neoadjuvanter Therapie	Anteil FOXP1 pos. Karzinome: 67%  (nukleäre Expression)	<u>Positiv:</u> ERα (p=0,0048), PR (p=0,029), <b>rezidivfreiem Überleben unter Tamoxifentherapie</b> (p<0,001).  <u>Invers:</u> pT (p=0,014), Grading (p=0,015)

Autor	Jahr	Anti-körper	Verdünnung	Anzahl Fälle	Vorbehandlung	Häufigkeit FOXP1-Über-/Unterepression	Statistische Beziehung mit FOXP1 Expression																				
Zhou et al. [137]	2014	EPR4113	1:300	73 Karzinome von männlichen Patienten	Mastektomie (n=68), Lumpektomie (n=1), Kastration (n=1), nur Biopsie (n=4)  k A. bzgl. neoadjuvanter Therapie	Anteil FOXP1 pos. Karzinome: 71,9%  (nukleäre Expression)																					
Yan et al. [138]	2015	Kaninchen, polyklonal	1:50	1. Kohorte: 87 (52 sporadisch, 35 BRCA1)  2. Kohorte: 147 (65 sporadisch, 82 BRCA1)	k A.	FOXP1 Expression sporadisch vs. BRCA1:  1. Kohorte: 76% vs. 30% (p<0,001),  2. Kohorte: 94% vs. 52% (p<0,001)	Niedrigere Expression in BRCA1 pos. im Vergleich zu:  <b>sporadischen Karzinomen (p&lt;0,001)</b>																				
Takagi et al. [101]	2016	M4330	1:100	222 Karzinome (luminal A-like (164 ILC, 58 NST))	Resektion,  keine neoadjuvante Therapie	Anteil FOXP1 pos. Karzinome: 77%  (zytoplasmatische Expression)	Höher Expression in ILC im Vergleich zu:  • <b>NST (p=0,002)</b>																				
Yu et al. [102]	2018	JC12	k A.	83 NST + 81 Risikoläsionen (41 DCIS, 20 ADH, 20 UDH)	k A.	Expressionsmuster von FOXP1:  • nukleär (N)  • zytoplasmatisch (C)  <table border="1"> <thead> <tr> <th>FOXP1 Muster</th> <th>UDH</th> <th>ADH</th> <th>DCIS</th> <th>NST</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>C</td> <td>0%</td> <td>0%</td> <td>4,9%</td> <td>31,3%</td> </tr> <tr> <td>N</td> <td>85%</td> <td>40%</td> <td>12,2%</td> <td>10,8%</td> </tr> <tr> <td>C+N</td> <td>15%</td> <td>60%</td> <td>82,9%</td> <td>48,2%</td> </tr> </tbody> </table>	FOXP1 Muster	UDH	ADH	DCIS	NST	C	0%	0%	4,9%	31,3%	N	85%	40%	12,2%	10,8%	C+N	15%	60%	82,9%	48,2%	Signifikante Unterscheidung der Expressionsmuster zwischen NST, DCIS, ADH und UDH (p<0,001).  C-FOXP1:  • <b>invers (bei NST Karzinomen): positiver ER Status (p=0,030), Gesamtüberleben (p=0,045)</b>
FOXP1 Muster	UDH	ADH	DCIS	NST																							
C	0%	0%	4,9%	31,3%																							
N	85%	40%	12,2%	10,8%																							
C+N	15%	60%	82,9%	48,2%																							
De Silva et al. [103]	2019	D35D10 XP®	1:1000	104 Karzinome (30 luminal A, 22 luminal B, 24 HER2+, 28 triple negative)	k A.	Anteil FOXP1 pos. Karzinome (>5% pos. Nuklei): 63%	Geringere Expression in <b>triple negativen Karzinomen</b> im Vergleich zu:  • <b>ER+/HER2-</b> ,  • <b>HER2+</b>  > (p<0,001)  <b>invers: tumorinfiltrierenden Lymphozyten (p&lt;0,01), tertiären lymphoiden Strukturen (p&lt;0,05)</b>																				

### **1.3 Fragestellung und Zielsetzung**

Wie beschrieben wurde der Einfluss von FOXP1 auf die Entwicklung des Mammakarzinoms bereits in einigen Studien untersucht. Die maximale Zahl der dabei untersuchten Tumoren beträgt allerdings nur 283 und die früheren Daten sind teilweise widersprüchlich.

Um die Rolle von FOXP1 beim Mammakarzinom besser zu verstehen, wurde seine Expression in dieser Arbeit an einem großen Patientenkollektiv (>2000) genauer untersucht. Ziel war es dabei auch den Zusammenhang der Expression von FOXP1 mit prognostisch relevanten histopathologischen sowie molekularen Markern, der Tumorzellproliferation und der klinischen Prognose zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tissue Microarray

Das Tissue-Microarray (TMA)-Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von bis zu tausend verschiedenen Gewebeproben auf einem Objektträger. Die Untersuchungen können auf Protein-, DNA-, oder RNA-Ebene erfolgen. Dabei können alle relevanten in situ Methoden für histologische Studien, wie die Immunhistochemie (IHC, die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation (FISH) oder die RNA-in-situ-Hybridisation angewendet werden. Durch die Möglichkeit, eine Vielzahl von Proben gleichzeitig in einem Vorgang zu verarbeiten und auszuwerten, wird ein hohes Maß an Standardisierung der Versuchsbedingungen erreicht. Prinzipiell kann jede Art von Gewebe in einem TMA untersucht werden, wobei sich die Methode hauptsächlich im Bereich der Krebsforschung wiederfindet [139].

Vor der Herstellung des TMAs erfolgt ein pathologisches Review. Hierbei werden die zu den jeweiligen Donorblöcken passenden Hämatoxylin-Eosin (HE) -Schnitte reevaluiert und das für die Array-Konstruktion relevante Tumoreareal auf dem Objektträger markiert. Dabei ist es möglich mit definierten Farben unterschiedliche Areale zu kennzeichnen. Danach werden die Objektträger den passenden Gewebeparaffinblöcken zugeordnet [139].

Aus den passenden pathologischen Befunden werden relevante klinische und histopathologische Daten erfasst und den passenden Gewebsblöcken zugewiesen. Um auch im späteren Verlauf eine exakte Zuordnung zu gewährleisten wird die Position der einzelnen Proben auf dem TMA bereits vor dem Stanzen mit Hilfe eines mit Koordinaten beschrifteten Rasters festgelegt [139].

Wie in Abbildung 4 zu sehen erfolgt die Entnahme eines repräsentativen Gewebezylinders mittels einer 0,6 mm durchmessenden Hohlnadel aus einem Paraffinblock. Der entnommene Gewebszylinder wird daraufhin an einer fest definierten Stelle eines Paraffinempfängerblocks in ein bereits vorgefertigtes Loch eingebracht. Auf diese Weise werden hunderte von Gewebszylinder in einen einzigen Empfängerblock eingelassen. Dieser kann nun je nach Länge der Zylinder in bis zu dreihundert Schichten geschnitten werden und jeweils auf einem Objektträger platziert werden. [140]

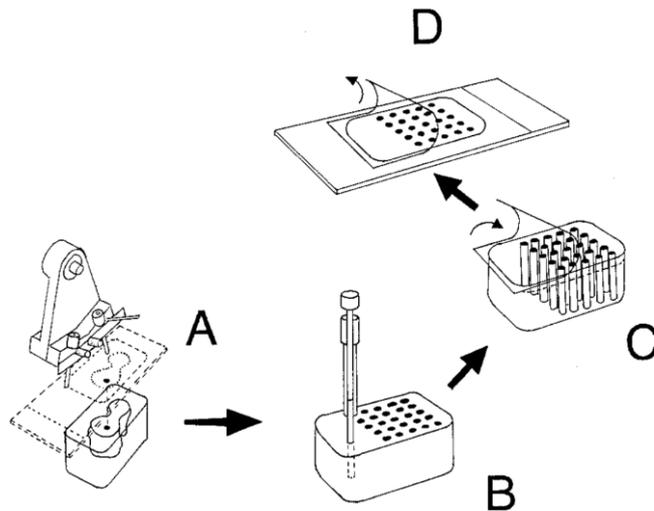


Abbildung 4: TMA Herstellungsprozess (A) Entnahme eines Gewebeszylinders aus einem vorausgewählten Areal des Donorblocks (B) Transfer des Gewebeszylinders in ein bereits vorgefertigtes Loch des Empfängerblocks (C,D) Schneiden von einzelnen Schichten und Übertragen auf Objektträger (Abb. aus Kallioniemi et al. 2001 [140])

## 2.2 Herstellung des TMA

In dieser Studie erfolgte die Entnahme der Gewebeszylinder aus repräsentativen Tumorarealen, die vorher von einem Pathologen in konventioneller HE-Färbung festgelegt wurden. Die Tumorpräparate wurden vorab in 4 %iger neutralgepufferter Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Es folgte die Herstellung von insgesamt 6 unterschiedlichen Empfängerblöcken mit jeweils zwischen 342 und 522 individuellen Proben. Die Übertragung der Gewebeszylinder erfolgte mit Hilfe eines von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie am UKE (C.+ M. Mirlacher) hergestellten semiautomatischen Arrayer.

## 2.3 Zusammensetzung des TMA

Für diese Arbeit wurden bereits existierende TMAs, mit insgesamt 2197 Primärtumoren der Mamma, verwendet [141]. Die Tumoren entstammen aus den Archiven des Instituts für Pathologie des Universitätsspitals Basel, dem Institut für klinische Pathologie in Basel und dem Triemli Spital in Zürich. Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 62 (Bereich 26–101) Jahre. Überlebensdaten wurden entweder aus dem Baseler Krebsregister bezogen oder von den behandelten Patient/-innen erhoben. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 68 Monate. Tumorausdehnung, Tumorgröße und Lymphknotenstatus wurden aus den primären Pathologieberichten übernommen. Die Bestimmung des histologischen Grades nach Elston und Ellis und den histologischen Tumortypen wurde von spezialisierten Pathologen

vorgenommen. Die vorhandenen klinischen pathologischen Informationen zu den Patienten sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Patientenkollektiv des verwendeten Tissue-Microarrays

	Auf TMA (n)
<b>Alle Tumoren</b>	2197
<b>Histologie</b>	
Kein spezieller Typ	1531
Lobuläres Karzinom	311
Medulläres Karzinom	57
K briformes Karzinom	64
Muzinöses Karzinom	69
Tubuläres Karzinom	56
Papilläres Karzinom	30
Apokrines Karzinom	15
Andere seltene Typen	43
<b>Tumorgroße</b>	
pT1	804
pT2	1015
pT3	124
pT4	242
<b>Nodalstatus</b>	
pN0	936
pN1	783
pN2	121
<b>BRE-Grad</b>	
1	539
2	839
3	646

Des Weiteren wurden für die Studie bereits vorhandene molekulare Daten verwendet. Dazu gehören Daten, die durch FISH für Amplifikationen an HER2, MYC, CCND1, MDM2 sowie Deletionen an Position 6q15, 8p21, 9p21, 10q23, 13q14, 16q22 und 17p13 erhalten wurden und IHC-Daten zur Expression von ER, PR und Ki67LI [52, 61, 141, 142]. Die nötigen Informationen zu den bereits veröffentlichten Studien sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 10: FISH-Daten aus früheren Studien

Autor/ Quelle	Jahr	Deletion/ Amplifikation/ Expression	Gen/ Chromosomabschnitt/ Protein	Anzahl Fälle	Häufigkeit-Del./ Ampl./ Expr.
Al-Kuraya et al. [143]	2004	Ampl.	HER2	1631	17,3%
Al-Kuraya et al. [143]	2004	Ampl.	CCND1	1785	20,1%
Al-Kuraya et al. [143]	2004	Ampl.	MDM2	1857	5,7%
Al-Kuraya et al. [143]	2004	Ampl.	MYC	1504	5,3%
Lebok et al. [144]	2022	Del.	6q15	1099	18%
Lebok et al. [60]	2015	Del.	8p	1248	48%
Lebok et al. [61]	2016	Del.	9p21	1089	15,3%
Lebok et al. [52]	2015	Del.	10q23	1239	19%
Graser et al. [145]	2021	Del.	16q22	1213	14,8%

Tabelle 11: IHC Daten aus früherer Studie

Autor/ Quelle	Jahr	Protein	Anzahl Fälle	Häufigkeit Expression	
Ruiz et al. [141]	2006	ER	2018	negativ	23,5%
				positiv	76,5%
Ruiz et al. [141]	2006	PR	1926	negativ	65,7%
				positiv	34,3%
Ruiz et al. [141]	2006	Ki67	1965	Ø Ki67LI: 25.6% (Bereich: 1–80%)	

Die Verwendung archivierter diagnostischer Gewebereste zur Herstellung von Gewebemikroarrays und deren Analyse zu Forschungszwecken sowie zur Analyse von Patientendaten wurden von den örtlichen Gesetzen (HmbKHG, §12,1), von der Ethikkommission Hamburg (WF-049/09 und PV3652) sowie der Ethikkommission des Universitätsklinikums Basel genehmigt. Alle Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit der Helsinki-Erklärung durchgeführt.

## 2.4 Immunhistochemie

Die TMA-Schnitte wurden in einer Prozedur und an einem Tag immungefärbt. Zunächst erfolgte die Anfertigung von 2,5 µm dicken Schnitten, welche über Nacht im Brutschrank bei 60 °C auf Objektträgern erhitzt wurden. Die fertigen Objektträger wurden zunächst dreimal fünf Minuten in einer Xylol-Lösung sowie absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und danach fünf Minuten lang in einem Dampfgerät bei 121 °C in Tris-EDTA-Citratpuffer mit einem pH-Wert von 9 einer hitzeinduzierten Antigengewinnung ausgesetzt. Danach erfolgte die zweifache Spülung mit destilliertem Wasser sowie die erneute fünfminütige Pufferung mit einem „Tris-buffered saline with Tween20“-Puffer (TBST-Puffer). Zur Reduktion der nicht-spezifischen Hintergrundfärbung wurde die endogene Peroxidase blockiert (Peroxidase-Blocking Solution (#S2023), Dako REAL, Ready-to-use). Hiernach fand eine erneute dreimalige Pufferung über fünf Minuten mit dem TBST-Puffer statt. Der FOXP1 spezifische Primärantikörper (Kaninchen polyklonal, Abcam ab16645; 1: 1350-Verdünnung) wurde 60 Minuten bei 37 °C angewendet. Der gebundene Antikörper wurde dann unter Verwendung des EnVision-Kits (Dako, Glostrup, Dänemark) gemäß den Anweisungen des Herstellers mit Chromogen (3,3'-Diaminobenzidine) sichtbar gemacht. Dazwischen wurden erneute dreimal fünfminütige Pufferungen mit dem TBST-Puffer durchgeführt. Vor dem Fixieren in aufsteigender Alkoholreihe und dem Eindecken erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun sowie dem Bläuen mit Leitungswasser.

Die Bewertung der immunhistochemischen Färbung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt [146]. Dabei wurde die Intensität anhand einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 3+ (starke Färbung) eingestuft. Wie in Tabelle 12 aufgeführt, wurde weiterhin der Anteil der positiven Tumorzellen mitbeurteilt und danach die Proben in drei Kategorien eingeteilt.

Die Lokalisation von FOXP1 in der Zelle wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt, allerdings zeigte der Großteil der Tumoren eine gleichzeitige nukleäre sowie zytoplasmatische oder alleinige zytoplasmatische Expression von FOXP1. Ein kleinerer Anteil der Tumoren wies eine ausschließlich nukleäre Expression auf.

Tabelle 12: Auswertungskriterien für die IHC

Resultat	Intensität Färbung	Positive Tumorzellen
Negativ	0	-
Mäßig	1+	egal
	2+	≤70 %
	3+	≤30 %
Stark	2+	>70 %
	3+	>30 %

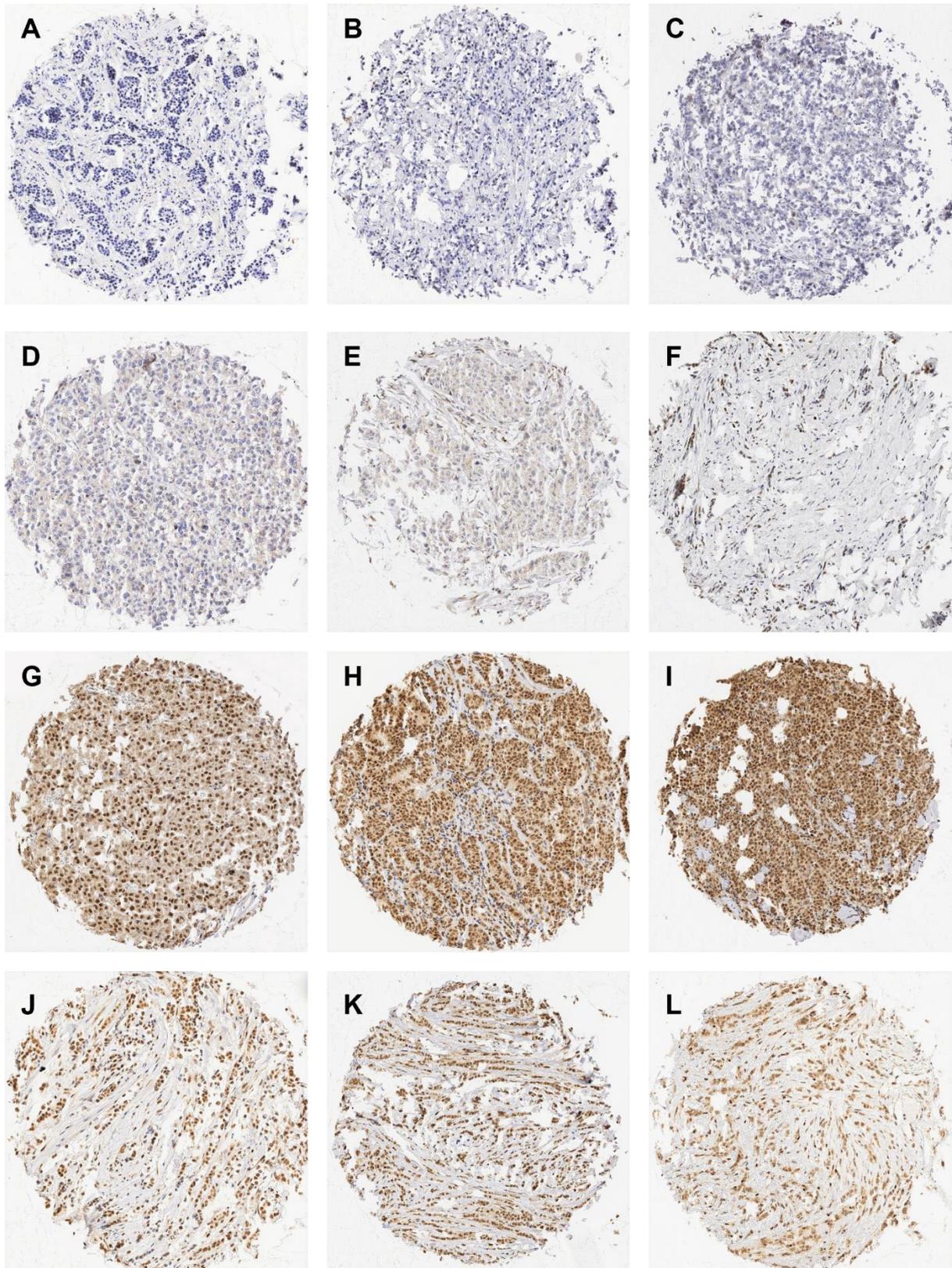


Abbildung 5: Beispiele der FOXP1 immunhistochemischen Färbung bei Mammakarzinomen mit negativer Färbung beim NST (A-C), mäßiger Färbung beim NST (D, E) sowie ILC (F) und starker Färbung beim NST (G-I) sowie ILC (J-L).

## **2.5 Statistik**

Für die statistische Analyse wurde die JMP 12.0-Software (SAS Institute Inc., NC, USA) verwendet. Kontingenztabelle und der Chi-Quadrat-Test wurden verwendet, um die Assoziation und signifikante Beziehungen zwischen der FOXP1-Expressionskategorie und definierten klinisch-pathologischen Variablen zu untersuchen. Die Varianzanalyse (Anova) und der F-Test wurden angewendet, um Assoziationen zwischen der FOXP1-Expression und der Tumorzellproliferation (gemessen anhand des Ki67LI) zu untersuchen. Anhand des Gesamtüberlebens als klinischer Endpunkt mit einem Beobachtungszeitraum von bis zu 156 Monaten wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Der Log-Rank-Test wurde angewendet, um die Signifikanz der Differenzierung zwischen Überlebensfunktionen zu testen. Die proportionale Hazard Regression nach Cox wurde durchgeführt, um die statistische Unabhängigkeit und Signifikanz zwischen pathologischen, molekularen und klinischen Variablen zu testen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Technische Aspekte

In der TMA-Analyse waren insgesamt 1744 von 2197 (79 %) Tumorproben interpretierbar. Grund für nicht auswertbare Fälle (453 Spots; 21 %) war das Fehlen von Gewebeproben oder von eindeutigem Tumorgewebe im TMA-Spot.

### 3.2 FOXP1 Expression und Tumorphänotyp

Von 1744 Tumorproben mittels IHC erfolgreich analysierten Tumoren zeigten 25 % keine, 38,1 % eine mäßige und 36,9 % eine starke Expression von FOXP1. Eine gesteigerte Expression von FOXP1 korrelierte signifikant mit einem niedrigerem pT-Stadium ( $p=0,0012$ ), geringerer Lymphknotenmetastasierung ( $p = 0,0022$ ) sowie niedrigerem BRE-Grad ( $p<0,0001$ ) (s. Tabelle 13).

Als häufigster Subtyp zeigt das NST Mammakarzinom ein Expressionsmuster mit einem hohen Anteil an mäßig gefärbten Proben (40,4 %), gefolgt von stark positiven (33,9 %) und negativen Proben (25,6 %). Im Vergleich dazu zeigen Karzinome des lobulären sowie tubulären Typs eine signifikant höhere Expression von FOXP1 ( $p<0,0001$  sowie  $p=0,0002$ ). So liegt beim zweithäufigsten Subtyp, dem lobulären Karzinom, der Anteil an stark positiven Proben bei 53,7 %, wohingegen lediglich 13,3 % der Proben FOXP1-negativ waren. Karzinome von einem medullären und apokrinen Typ zeigen hingegen eine geringere Expression und gehen mit einem häufigeren Verlust von FOXP1 einher ( $p=0,0002$  und  $p=0,0248$ ).

Tabelle 13: FOXP1 und Tumorphänotyp bei Mammakarzinomen

	FOXP1 IHC Resultate				p-Wert
	n	Negativ (%)	Mäßig positiv (%)	Stark positiv (%)	
<b>Alle Tumoren</b>	1.744	25,0	38,1	36,9	
<b>Histologie</b>					
Kein spezieller Typ (NST)	1.256	25,6	40,4	33,9	
Lobuläres Karzinom	218	13,3	33,0	53,7	<0,0001*
Medulläres Karzinom	62	54,8	25,8	19,4	0,0002*
K briforme Karzinome	59	20,3	50,8	28,8	0,4824*
Muzinöse Karzinom	46	13,0	45,7	41,3	0,1150*
Tubuläre Karzinome	41	12,2	29,3	58,5	0,0049*
Papilläre Karzinome	25	32,0	20,0	48,0	0,0929*
Apokrine Karzinome	13	61,5	23,1	15,4	0,0248*
Andere seltene Typen	21	38,1	33,3	28,6	
<b>pT-Stadium</b>					
pT1	610	19,2	38,9	42,0	0,0012
pT2	825	26,9	38,7	34,4	
pT3	99	31,3	36,4	32,3	
pT4	201	31,3	35,3	33,3	
<b>Nodalstatus</b>					
pN0	743	24,4	36,7	38,9	0,0022
pN1	623	25,0	39,0	36,0	
pN2	102	41,2	36,3	22,5	
<b>BRE-Grad</b>					
1	413	18,2	34,6	47,2	<0,0001
2	645	20,8	38,1	41,1	
3	544	35,8	39,7	24,4	

\*in Bezug auf NST

Auch in der Gruppe der NST kam es zu einer signifikanten Korrelation zwischen niedrigerem pT-Stadium ( $p=0,0007$ ), fehlenden Lymphknotenmetastasen ( $p=0,0032$ ) sowie niedrigem BRE-Grad ( $p<0,0001$ ) und einer hohen FOXP1 Expression (s. Tabelle 14). Auffällig ist ein höherer Verlust von FOXP1 bzw. niedrigerer Anteil stark positiver Tumoren in der Gruppe der Karzinome mit einem pT3-Status (40,4 %/ 22,8 %) im Vergleich zu pT4 Tumoren (30,2 %/ 30,8 %).

Tabelle 14: FOXP1 und Tumorphänotyp bei Mammakarzinomen (NST)

	FOXP1 IHC Resultate				p-Wert
	n	Negativ (%)	Mäßig positiv (%)	Stark positiv (%)	
<b>Alle NST</b>	1.256	25,6	40,4	33,9	
<b>pT-Stadium</b>					
pT1	427	18,5	42,2	39,3	<b>0,0007</b>
pT2	611	27,8	40,1	32,1	
pT3	57	40,4	36,8	22,8	
pT4	159	30,2	39,0	30,8	
<b>Nodalstatus</b>					
pN0	503	25,2	38,8	36,0	<b>0,0032</b>
pN1	477	24,3	42,3	33,3	
pN2	77	42,9	39,0	18,2	
<b>BRE-Grad</b>					
1	262	16,8	37,0	46,2	<b>&lt;0,0001</b>
2	429	23,5	40,3	36,1	
3	449	33,2	42,3	24,5	

Die Beziehung der FOXP1 Expression zu den jeweiligen Komponenten des BRE-Scores wurden auch einzeln untersucht. Hier zeigt sich sowohl in der Gesamtgruppe als auch in der Gruppe der NST ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer geringeren Expression von FOXP1 und einem höheren Scoring der glandulären Differenzierung ( $p=0,0099/ p=0,0063$ ), der Kernpolymorphie und der Mitosen (jeweils  $p<0,0001$ ) (s. Abbildung 6 und Abbildung 7).

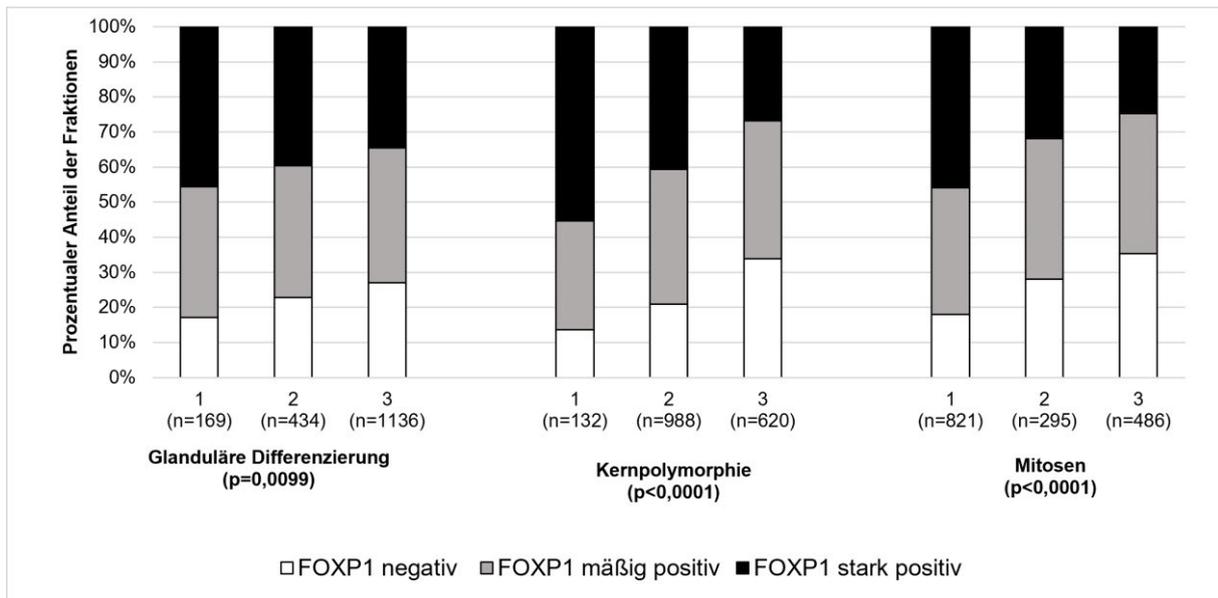


Abbildung 6: FOXP1 und Scoring einzelner Komponenten des BRE-Scores

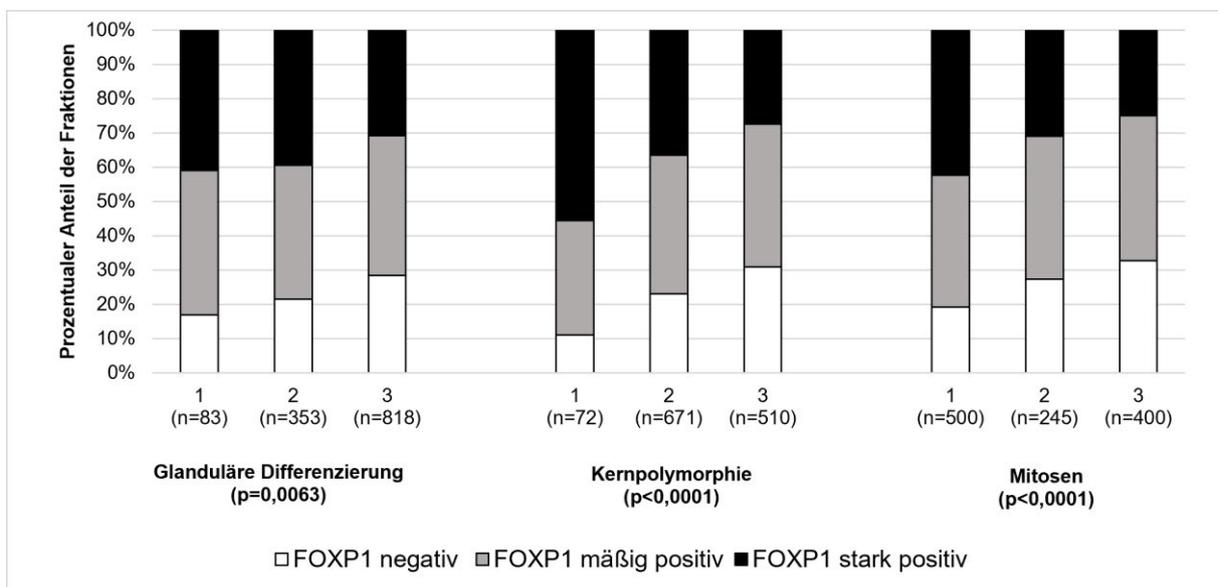


Abbildung 7: FOXP1 und Scoring einzelner Komponenten des BRE-Scores (NST)

Des Weiteren besteht eine signifikante positive Korrelation in der Gruppe der NST mit dem Rezeptor-Status (s. Abbildung 8). So korreliert eine höhere FOXP1 Expression mit einem positiven ER- und PR-Status (jeweils  $p < 0,0001$ ). Bezüglich des HER2 Status wurde keine signifikante Korrelation festgestellt.

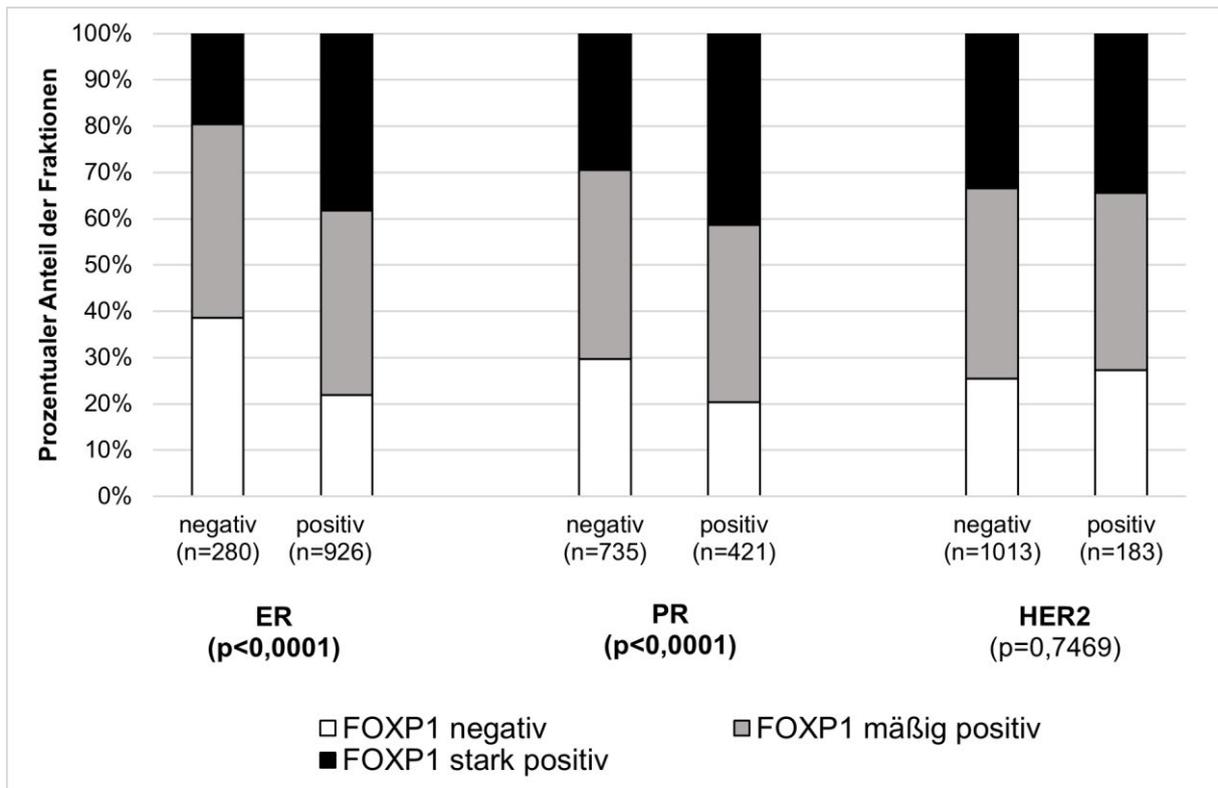


Abbildung 8: FOXP1 und ER-, PR- und HER2-Status in Mammakarzinomen (NST)

### 3.3 FOXP1 Expression und Prognose

In der Gruppe aller Karzinome (Abbildung 9a) sowie in der Gruppe der NST Mammakarzinome (Abbildung 9b) bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Verläufen mit einer schlechteren Prognose der FOXP1 negativen Karzinome (jeweils  $p < 0,0001$ ).

Um den prognostischen Wert einer verringerten FOXP1-Expression weiter zu analysieren, untersuchten wir diese in Subgruppen mit relevanten molekularen Merkmalen, die in der klinischen Routine jeweils untersucht worden sind (ER-, PR- und HER2-Status). Die Assoziation einer verringerten FOXP1-Expression mit einer verkürzten Überlebensdauer fand sich dabei insbesondere in den ER-positiven, PR-negativen und HER2-negativen Untergruppen von Mammakarzinomen (Abbildung 9).

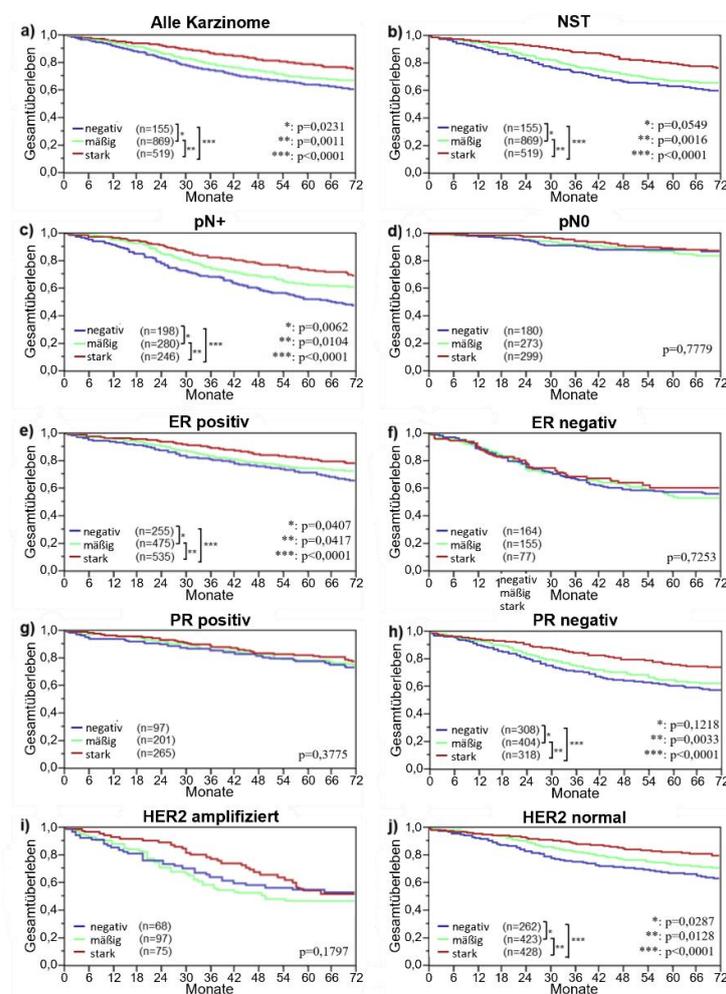


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurven mit Gesamtüberleben versus FOXP1 IHC Ergebnisse in den Gruppen (a) aller Karzinomen, (b) NST sowie in den Teilgruppen der Karzinome mit (c)  $pN \geq 1$ , (d)  $pN0$ , (e) ER positiv, (f) ER negativ, (g) PR positiv, (h) PR negativ, (i) HER2-Amplifikation sowie (j) HER2 normal

In der multivariaten Analyse erwies sich die FOXP1-Expression weder in der Gruppe aller Karzinome noch in der Gruppe der NST Mammakarzinome nicht als unabhängiger prognostischer Faktor in Abgrenzung zu pT-, pN-Status sowie BRE-Grading (Tabelle 15).

Tabelle 15: Hazard-Ratio zwischen Untergruppen des pT-, pN-Status, BRE-Gradings und des FOXP1 IHC Resultats sowie multivariate Analyse in allen Karzinomen sowie der Gruppe der NST

		Alle Karzinome (n=1332)			NST (n=950)		
		HR	p-Wert	p-Wert-gesamt	HR	p-Wert	p-Wert-gesamt
pT	2 vs 1	1,56	0,0006		1,6	0,0013	
	3 vs 2	1,01	0,945	<0,0001	0,96	0,8424	<0,0001
	4 vs 3	1,63	0,0126		1,88	0,0063	
BRE-Grad	G2 vs G1	1,4	0,0311	<0,0001	1,19	0,3534	<0,0001
	G3 vs G2	2,07	<0,0001		2,46	<0,0001	
pN	1 vs 0	2,35	<0,0001	<0,0001	2,02	<0,0001	<0,0001
	2 vs 1	2,23	<0,0001		2,49	<0,0001	
FOXP1	mäßig pos. vs. negativ	0,94	0,5903	0,4699	0,88	0,3427	0,3162
	stark pos. vs. mäßig pos.	0,91	0,4376		0,91	0,4818	

### 3.4 FOXP1 Expression und Amplifikationen von HER2, MYC, CCND1 und MDM2

Um eine mögliche Korrelation der FOXP1 Expression und der Amplifikation relevanter Gene (HER2, MYC, CCND1 und MDM2) zu untersuchen verglichen wir unsere Ergebnisse mit den bereits früher erhobenen Daten. Wie in Abbildung 10 dargestellt ist eine Amplifikation des MYC-Gens in der Gruppe der NST mit einer verminderten Expression von FOXP1 assoziiert ( $p=0,0006$ ). Dagegen zeigte sich für die Amplifikationen der Gene von HER2, CCND1 und MDM2 keine signifikante Korrelation.

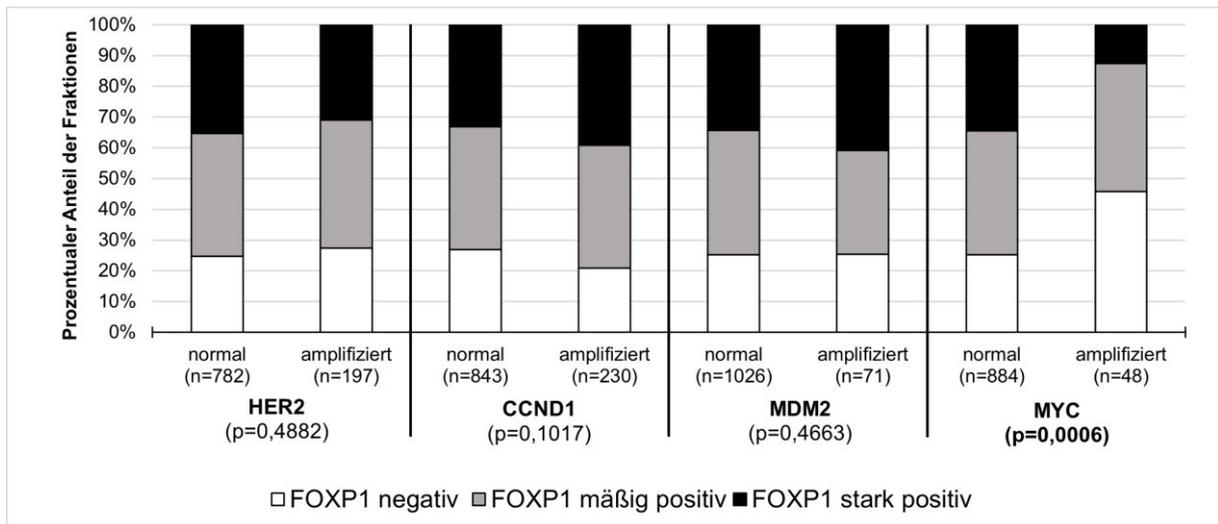


Abbildung 10: FOXP1 und Amplifikationen relevanter Gene bei Mammakarzinomen (NST)

### 3.5 FOXP1 Expression und Deletionen an relevanten Chromosomenabschnitten

Anhand bereits früher erhobener Daten wurde die Korrelation von relevanten Deletionen und der FOXP1 Expression untersucht. Unter den sieben untersuchten Deletionen weisen drei eine signifikante Korrelation mit der Intensität der FOXP1 Färbung auf (s. Abbildung 11). So ist bei einer Deletion an Position 8p21 oder 9p21 ein deutlicher Abfall der FOXP1 Expression mit einer Zunahme der FOXP1 negativen Karzinome von 22 % auf 29,8 % bzw. 22,5 % auf 31,9 % und einer Abnahme der stark positiven Karzinome von 39,8 % auf 24,5 % bzw. 35,3 % auf 23 % im Vergleich zum Normalbefund an der jeweiligen Lokalisation festzustellen ( $p < 0,0001$  bzw.  $p = 0,0164$ ). Im Falle der Deletion an Position 13q14 kommt es hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Fraktion der mäßig gefärbten FOXP1 Karzinome (44,5 % auf 16 %) bei gleichzeitiger Zunahme der negativen und der stark positiven Fraktionen (19,2 % auf 32 % bzw. 36,3 % auf 52 %,  $p = 0,0173$ ).

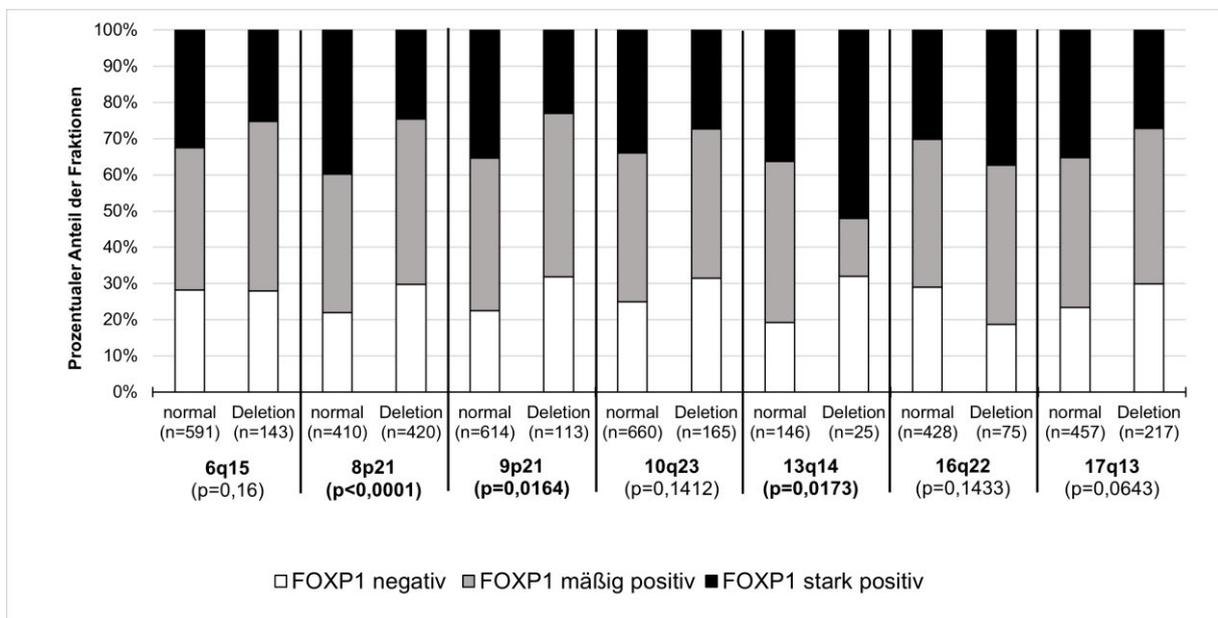


Abbildung 11: FOXP1 und Deletionen an relevanten Chromosomenabschnitten bei Mammakarzinomen (NST)

### **3.6 FOXP1 Expression und Tumorzellproliferation**

Der durchschnittliche Ki67 LI verringerte sich in der Gesamtgruppe der NST von  $31,2 \pm 0,9$  bei FOXP1-negativen Tumorarten auf  $26,8 \pm 0,8$  bei Mammakarzinomen mit starker FOXP1-Expression ( $p=0,0008$ ). Diese signifikante Korrelation galt auch für die Gesamtgruppe der lobulären Karzinome ( $p=0,0046$ ) sowie bei Karzinomen mit einem BRE-Grad von 2 ( $p=0,0046$ ), einem pT1- bis pT3-Stadium ( $p=0,0017/ p=0,0052/ p= 0,0047$ ), einem pN0- oder pN1-Stadium ( $p<0,0001/ p=0,0006$ ), einer Deletion in 8p ( $p=0,0185$ ) oder einem negativen PR-Status ( $<0,0001$ ) (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: FOXP1 und Ki67 LI in Subgruppen

	<b>FOXP1</b>	<b>n</b>	<b>Ki67LI</b>	<b>P</b>
<b>NST</b>	negativ	285	31.2±0.9	<b>0,0008</b>
	mäßig positiv	433	29.3±0.7	
	stark positiv	334	26.8±0.8	
<b>Lobuläres Karzinom</b>	negativ	27	26.9±2.3	<b>0,0046</b>
	mäßig positiv	63	21±1.5	
	stark positiv	94	18.3±1.2	
<b>Medulläres Karzinom</b>	negativ	29	41.4±3	0,1764
	mäßig positiv	13	46.9±4.5	
	stark positiv	9	52.6±5.4	
<b>BRE G1</b>	negativ	66	19.9±1.3	0,6613
	mäßig positiv	121	18.9±0.9	
	stark positiv	155	18.5±0.8	
<b>BRE G2</b>	negativ	123	27.1±1.1	<b>0,0046</b>
	mäßig positiv	214	24.9±0.8	
	stark positiv	215	22.7±0.8	
<b>BRE G3</b>	negativ	172	39.1±1.1	0,2866
	mäßig positiv	187	37.3±1.1	
	stark positiv	101	40±1.5	
<b>pT1</b>	negativ	102	28.5±1.3	<b>0,0017</b>
	mäßig positiv	203	23.4±0.9	
	stark positiv	193	22.9±1	
<b>pT2</b>	negativ	194	32.2±1.1	<b>0,0052</b>
	mäßig positiv	275	30.9±0.9	
	stark positiv	227	27.5±1	
<b>pT3</b>	negativ	31	36.7±2.9	<b>0,0047</b>
	mäßig positiv	31	30.3±2.9	
	stark positiv	26	22.2±3.2	
<b>pT4</b>	negativ	58	30.9±1.8	0,06
	mäßig positiv	60	30.4±1.8	
	stark positiv	59	25.5±1.8	
<b>pN0</b>	negativ	159	31.3±1.2	<b>&lt;0,0001</b>
	mäßig positiv	236	27.7±1	
	stark positiv	229	24±1	
<b>pN1</b>	negativ	141	32.4±1.3	<b>0,0006</b>
	mäßig positiv	209	27.9±1	
	stark positiv	179	25.9±1.1	
<b>pN2</b>	negativ	36	34±2.4	0,4541
	mäßig positiv	34	31.8±2.5	
	stark positiv	21	29.1±3.1	
<b>MYC Amplifikation</b>	negativ	28	39.6±2.7	0,8241
	mäßig positiv	25	38.5±2.9	
	stark positiv	8	36±5.1	
<b>8p Deletion</b>	negativ	152	35.7±1.2	<b>0,0185</b>
	mäßig positiv	203	32.7±1	
	stark positiv	122	30.8±1.3	
<b>9p Deletion</b>	negativ	47	39.1±2.3	0,5253
	mäßig positiv	52	35.7±2.2	
	stark positiv	33	38.2±2.7	
<b>PTEN Deletion</b>	negativ	71	41.2±1.9	0,2316
	mäßig positiv	75	39.9±1.8	
	stark positiv	50	36.3±2.2	
<b>13q Deletion</b>	negativ	10	44±4.8	0,7036
	mäßig positiv	3	44.7±8.8	
	stark positiv	14	39.2±4.1	
<b>ER negativ</b>	negativ	149	38.6±1.4	0,7517
	mäßig positiv	135	37.1±1.4	
	stark positiv	63	37.8±2.1	
<b>PR negativ</b>	negativ	284	33±0.9	<b>&lt;0.0001</b>
	mäßig positiv	364	29.9±0.8	
	stark positiv	265	26.4±1	

Bei NST Mammakarzinomen zeigte sich dies lediglich in den Subgruppen mit pT-Stadium 1 ( $p=0,009$ ), einem pN-Stadium 0 ( $p=0,0141$ ) oder einem PR negativen Status ( $p=0,0336$ ) (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: FOXP1 und Ki67 LI in Subgruppen bei Mammakarzinomen (NST)

	<b>FOXP1</b>	<b>n</b>	<b>Ki67LI</b>	<b>P</b>
<b>Alle NST</b>	negativ	285	31,2±0,9	<b>0,0008</b>
	mäßig positiv	433	29,3±0,7	
	stark positiv	334	26,8±0,8	
<b>BRE G1</b>	negativ	40	18,4±1,6	0,9839
	mäßig positiv	85	18,4±1,1	
	stark positiv	94	18,7±1	
<b>BRE G2</b>	negativ	92	27,1±1,2	0,1621
	mäßig positiv	148	26,2±0,9	
	stark positiv	127	24,3±1	
<b>BRE G3</b>	negativ	129	38,3±1,3	0,7469
	mäßig positiv	162	37,5±1,1	
	stark positiv	83	38,9±1,6	
<b>pT1</b>	negativ	68	29,3±1,6	<b>0,009</b>
	mäßig positiv	153	23,9±1,1	
	stark positiv	128	23,6±1,2	
<b>pT2</b>	negativ	149	31,1±1,2	0,2148
	mäßig positiv	210	32±1	
	stark positiv	155	29,2±1,2	
<b>pT3</b>	negativ	23	35,2±3,5	0,1631
	mäßig positiv	17	38,4±4,1	
	stark positiv	9	25±5,6	
<b>pT4</b>	negativ	43	32,3±2,1	0,251
	mäßig positiv	53	31,5±1,9	
	stark positiv	42	27,6±2,1	
<b>pN0</b>	negativ	110	31,2±1,4	<b>0,0141</b>
	mäßig positiv	167	28,8±1,1	
	stark positiv	144	25,8±1,2	
<b>pN1</b>	negativ	104	31,9±1,5	0,0558
	mäßig positiv	170	28,8±1,1	
	stark positiv	126	27,2±1,3	
<b>pN2</b>	negativ	29	34,2±2,6	0,164
	mäßig positiv	27	32±2,7	
	stark positiv	12	24,8±4,1	
<b>MYC Amplifikation</b>	negativ	22	40,4±3,2	0,8132
	mäßig positiv	18	37,3±3,5	
	stark positiv	5	39,2±6,6	
<b>8p Deletion</b>	negativ	114	34,9±1,3	0,4234
	mäßig positiv	168	32,8±1,1	
	stark positiv	80	32,6±1,6	
<b>9p Deletion</b>	negativ	35	37,4±2,7	0,7745
	mäßig positiv	43	36,9±2,4	
	stark positiv	22	39,8±3,3	
<b>PTEN Deletion</b>	negativ	47	42,7±2,2	0,0747
	mäßig positiv	62	40,4±1,9	
	stark positiv	39	35,4±2,4	
<b>13q Deletion</b>	negativ	8	49,9±4,9	0,5914
	mäßig positiv	3	44,7±7,9	
	stark positiv	10	43,2±4,3	
<b>ER negativ</b>	negativ	97	39,2±1,7	0,9068
	mäßig positiv	100	38,6±1,6	
	stark positiv	44	37,9±2,5	
<b>PR negativ</b>	negativ	201	32,8±1,1	<b>0,0336</b>
	mäßig positiv	270	31,4±0,9	
	stark positiv	179	28,7±1,1	

## 4 Diskussion

In dieser Studie fanden wir an einem Kollektiv von 2197 Mammakarzinomen 1308 Fälle (von 1744 auswertbaren Fällen (75%)) mit einer nachweisbaren Expression von FOXP1, wovon 49,2% eine starke Expression aufwiesen. Diese Daten sind im Bereich früherer Studien. 11 vorangegangene Untersuchungen hatten an Kollektiven von 9 bis 283 Mammakarzinomen Positivitätsraten von 50 bis 90 Prozent gefunden [82, 84, 98-103, 132, 137, 138]. Dabei kamen zum Teil Großschnitte sowie auch TMAs zum Einsatz. Unter Verwendung von klassischen Schnittpräparaten fanden Banham et al. eine FOXP1-Positivität in 88% von 9 Tumoren, Zhou et al. eine Positivität in 72% von 73 Tumoren, Takagi et al. eine Positivität in 77% von 222 Tumoren und De Silva et al. eine Positivität in 63% von 104 Tumoren [82, 101, 103, 137]. Unter Verwendung von TMAs hatten Fox et al. und Bates et al. eine FOXP1-Positivität in 50% von 283 Tumoren, Rayoo et al. in 50% von 225 Tumoren, Shigekawa et al. in 67% von 113 Tumoren, Ijichi et al. in 66% von 108 Tumoren, Yan et al. in 66% von 234 Tumoren und Yu et al. in 90% von 83 Tumoren gefunden [84, 98-100, 102, 132, 138]. Im Durchschnitt hatten diese Untersuchungen eine Positivitätsrate in Großschnitten von 72 Prozent und an TMAs von 60 Prozent ergeben. Die leichten Unterschiede zwischen den Studien sind teilweise auch durch inhomogene Patientenkollektive mit unterschiedlichen Einschlusskriterien zu erklären. So wurde beispielsweise in der größten Studie an Großschnitten von Takagi et al. ausschließlich Tumoren mit einem intrinsischen Subtyp von Luminal A und somit einem positiven ER-Status eingeschlossen [101]. Eine signifikante Korrelation zwischen einem positiven ER-Status und der Expression von FOXP1 wurde bereits in mehreren Studien beschrieben [98-100]. Unser Wert von 75% positiven Fällen liegt im Vergleich zu früheren Studien im oberen Durchschnittsbereich. Weitere Gründe für die diskrepanten Befunde zwischen den verschiedenen Studien dürften die Verwendung unterschiedlicher Antikörper, verschiedener Protokolle und variierender Kriterien für die Definition eines Tumors als FOXP1 positiv sein. Auch für andere häufig immunhistochemisch untersuchte Proteine haben frühere Studien erhebliche Diskrepanzen ergeben. So fanden sich beispielsweise beim Mammakarzinom immunhistochemische Positivitätsraten von 0 bis 41 Prozent für HER2, von 39 bis 100 Prozent für den ER, von 38 bis 68 Prozent für den PR und 23 bis 82 Prozent für E-cadherin [100, 101, 132, 138, 147, 148].

Unsere Daten zeigen eine signifikante Assoziation zwischen einer Expression von FOXP1 und einem günstigen histologischen Phänotyp und einer guten Prognose. Auch dieser Befund passt im Wesentlichen zu den Ergebnissen der Mehrzahl der durchgeführten Studien zu FOXP1 beim Mammakarzinom. Signifikante Zusammenhänge zwischen einer erhöhten FOXP1 Expression und einer günstigen Patientenprognose waren von Fox et al. an 283 Tumoren, von Rayoo et al an 126 Tumoren und von Shigekawa et al. sowie Ijichi et al. an 113

Tumoren gefunden worden [84, 99, 100, 132]. Die Untersuchungen von Yan et al. an 234 Tumoren, Takagi et al. an 222 Tumoren und De Silva et al. an 104 Tumoren hatten immerhin signifikante Zusammenhänge zwischen einer hohen FOXP1-Expression und histopathologischen und molekularen Parametern ergeben, welche typischerweise mit günstigerer Prognose assoziiert sind, wie beispielsweise einem günstigeren intrinsischen Subtyp oder fehlender hereditärer Mutation [101, 103, 138]. Banham et al an 9 Tumoren und Zhou et al an 73 Tumoren hatten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der FOXP1-Expression und klinisch-pathologischen Malignitätsparametern gefunden [82, 137]. Lediglich die Studie von Yu et al. hatte einen gegenläufigen Befund gezeigt. In dieser Studie an 83 Tumoren war eine hohe zytoplasmatische FOXP1-Expression mit einem kürzeren Gesamtüberleben sowie einem negativen ER-Status assoziiert [102]. Auf Grund der alleinigen Beurteilung der Assoziation der zytoplasmatischen Expression auf die Prognose lassen sich diese Befunde allerdings nur schlecht vergleichen. Interessanterweise hatten die im Rahmen des „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) und „International Cancer Genome Consortium“ (ICGC) gesammelten RNA-Expressionsdaten an 1075 Mammakarzinomen keine signifikante Assoziation zwischen FOXP1 und der Patientenprognose ergeben [136]. Eine mögliche Ursache für die diskrepanten Befunde zwischen immunhistochemischen- und RNA-Expressionsdaten könnte darin liegen, dass nur die immunhistochemische Analyse eine selektive Evaluation von Tumorzellen erlaubt, während RNA-Analysen unweigerlich auch die RNA aller tumorassoziierten Stroma- und Entzündungszellen sowie vom Tumor umwachsenen Normalstrukturen beinhaltet.

Studien zur prognostischen Bedeutung der FOXP1-Expressionen in Tumoren waren auch bei mindestens 13 anderen Tumorarten durchgeführt worden (s. Tabelle 18)

Tabelle 18: Übersicht FOXP1 und Prognose in Tumortypen

Tumortyp	Anzahl Studien mit/ ohne Korrelation zwischen FOXP1 Expression und Prognose mit Quellenangabe		
	Gute Prognose	Schlechte Prognose	Ohne Korrelation zur Prognose
<b>Mammakarzinom</b>	4 [84, 99, 100, 132]	1 [149]	
<b>Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom</b>	1 [104]		
<b>Kolorektaleskarzinom</b>	1 [105]		
<b>Pankreaskarzinom</b>	1 [150]		
<b>Ovarialkarzinom</b>	1 [109]		
<b>Ösophaguskarzinom</b>	1 [113]		
<b>Cholangiokarzinom</b>	1 [110]		
<b>Malignes Melanom</b>	1 [126]		
<b>Prostatakarzinom</b>	1 [151]		
<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>		1 [127]	
<b>Glioblastom</b>		1 [152]	
<b>Lymphome</b>		13 [114-125, 153-156]	4 [157-160]
<b>Endometriumkarzinom</b>			1 [161]
<b>Klarzelliges Nierenzellkarzinom</b>			2 [111, 112]

Die Tabelle zeigt, dass in der überwiegenden Mehrzahl der Tumoren die meisten Studien auf eine günstige Prognose in FOXP1 positiven Tumoren hinwiesen, dass aber auch tumorspezifische Unterschiede bestehen. Beispielsweise fanden sich bei Lymphomen sowie beim hepatozellulären Karzinom und beim Glioblastom in mehreren Studien Assoziationen zwischen hoher FOXP1 Expression und ungünstiger Prognose. Diese Daten zeigen, dass die tumorbiologische Funktion von FOXP1 offenbar vom Gewebe oder zellspezifischen Expressionsverhalten anderer Gene abhängig ist. Grundsätzlich passt dies gut zur Rolle von Transkriptionsfaktoren, welche alle eine Vielzahl verschiedener Gene beeinflussen und typischerweise auch mit anderen regulierenden Proteinen interagieren. Auch für die biologisch relevante Rolle der FOXP1-Expression beim Mammakarzinom gibt es beschriebene Interaktionen, die FOXP1 als Tumorsuppressor allerdings auch als Onkoprotein beschreiben. So zeigt FOXP1 insofern eine enge Interaktion mit dem ER, dass FOXP1 zusammen mit FOXA1 über einen positiven Feedbackmechanismus zu einer Induktion von ER-vermittelten Transkriptionen führt. Dies führt einerseits zu einer E2 vermittelten Proliferation, andererseits zu einer Erhöhung der Sensibilität auf eine Tamoxifen-Therapie [83]. Gleichzeitig bildet FOXP1

mit dem DNA-Demethylierungs-Enzym „Ten-Eleven Translocation-2“ (TET2) einen Chromatin-Komplex, welcher eine Demethylierung der Gene „Östrogenrezeptor 1“ (ESR1), GATA3 und FOXA1 vermittelt [162]. Kong et al. zeigten, dass für die Funktion des ER auf die Tumorzelle die Expression aller drei Proteine notwendig sind [163]. Auch eine Repression von C-MYC durch FOXP1 wird beschrieben [133]. Die Expression von MYC ist beim Mammakarzinom mit einem größeren Tumordurchmesser, höherem histologischen Grading sowie Lymphknotenmetastasen assoziiert [135]. Durch die Repression von der langen „nicht-kodierenden RNA“ (lncRNA) „CLRN1 antisense RNA 1“ (CLRN1-AS1) durch FOXP1 wird eine Inaktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs beschrieben, was zu einem Abbau und Inaktivierung von  $\beta$ -Catenin führt [164]. Aktiviertes  $\beta$ -Catenin ist mit einer schlechteren Prognose beim Mammakarzinom assoziiert [165, 166]. Dahingegen beschrieben beispielsweise Chiang et al. eine Methylierung des FOXP1 Promoters durch die „Protein arginine N-methyltransferase 5“ (PRMT5), was zu einem erhöhten Tumorstadium in vitro sowie in vivo führte [167]. Des Weiteren wird eine Repression von NFAT1 durch FOXP1 mit einer resultierenden erhöhten Tumorzell-Motilität beim Mammakarzinom assoziiert [168].

Das in dieser Studie untersuchte Mammakarzinom Kollektiv war in zahlreichen früheren Projekten verwendet worden, sodass zu diesem Tumorkollektiv auch eine molekulare Datenbank existierte. Eine derartige molekulare Datenbank erlaubt eine in silico Analyse von funktionellen Interaktionen. So fand sich in unserer Studie die erwartete signifikante Korrelation mit der Expression von ER, welche auf Grund von der bereits in früheren Studien erhobenen signifikanten Korrelationen zwischen den Expressionen sowie bereits beschriebenem positiven Feedbackmechanismus zu erwarten gewesen war [83, 84, 98-100, 103, 163]. Die signifikante Assoziation zwischen FOXP1 und einer niedrigeren Tumorstadiumsgeschwindigkeit (Ki67LI) passt gut zur Funktion von FOXP1 als Tumorsuppressor. FOXP1 aktiviert mehrere Gene, die das Zellwachstum hemmen können. Der Vergleich mit vier verschiedenen Amplifikationen (Cyclin D1, MDM2, HER2 und C-MYC) ergab einen hochsignifikanten Zusammenhang mit der C-MYC Amplifikation, aber nicht mit den drei anderen Amplifikationen. Dieser Befund passt zur Annahme einer funktionellen Interaktion von FOXP1 und C-MYC. Tatsächlich gibt es bekannte Interaktionen zwischen C-MYC und FOXP1. Stephen et al. zeigten, dass FOXP1 zusammen mit dem TGF- $\beta$  eine von Smad2 und Smad3 vermittelte Repression von C-MYC induziert [133]. Der Vergleich mit sieben verschiedenen Deletionen hatte für Deletionen von 8p21 und 9p21 einen signifikanten Zusammenhang zwischen geringer FOXP1-Expression und dem Vorliegen dieser Deletionen ergeben, während Tumoren mit 13q14 Deletion signifikant höhere FOXP1-Expressionsraten aufwiesen. Die Ursache für diese statistisch signifikanten Beziehungen ist nicht bekannt. Auf den Chromosomenabschnitten 9p21, 8p und 13q14 liegen aber Gene, welche direkt oder

indirekt mit FOXP1 interagieren könnten. Dazu gehören die Gene „Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A“ (CDKN2A auf 9p21, Gen „CUB and Sushi multiple domains 1“ (CSMD1) auf 8p23, „Deleted in Liver Cancer 1“ (DLC1) auf 8p22, „Mitochondrialer Tumorsuppressor 1“ (MTUS1) auf 8p22, „Leucine zipper putative tumor suppressor 1“ (LZTS1) auf 8p21, „Neuregulin 1“ (NRG1) auf 8p12, „Ecto-NOX Disulfide-thiol Exchanger 1“ (ENOX1) auf 13q14.11 und RB1 auf 13q14.2. Das Gen CDKN2A codiert für den Tumorsuppressor p16, welcher den Zellzyklusprogress aufhält, indem er beim Übergang von der G1- zur S-Phase die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) 4 und 6 hemmt und somit die Phosphorylierung des RB1 - Proteins verhindert [169]. Mutationen in RB1 sind häufiger in metastasierten Mammakarzinomen nachzuweisen und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert [170]. CSMD1 ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Verlust beim Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [171]. DLC1 inhibiert das Tumorzellwachstum und ist beim Mammakarzinom mit einer geringeren Malignität assoziiert [172, 173]. Der Tumorsuppressor ATIP3 wird durch MTUS1 kodiert, wobei eine niedrigere Expression in Mammakarzinomzellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [174]. Auch LZTS1 zeigte eine inverse Korrelation mit einer schlechten Prognose [175]. Eine höhere Rate an Methylierung des NRG1-Gens fand sich in Brustkrebszellen, sodass auch dieses ein mögliches Tumorsuppressorgen darstellt [176].

Unsere Studie ist mit 1744 erfolgreich untersuchten Tumoren die mit Abstand größte Studie zu FOXP1 beim Mammakarzinom. Die 11 früher durchgeführten Studien hatten insgesamt 1454 Tumoren untersucht, also 16,6% weniger als in unserer Studie. Die Durchführung einer derart großen Studie ist grundsätzlich nur mit der TMA-Methode unter vernünftigen Kosten durchführbar. Die gleichzeitige Färbung von bis zu 600 Tumoren auf einem Objektträger führt zu einer bis zu 600fachen Reduktion der Reagenzien. Auch die Arbeitszeit für die Färbung der Schnitte wird um einen ähnlichen Faktor vermindert. Die TMA-Methode hat viele weitere Vorteile. Neben den Kosten steht die Geschwindigkeit der Studiendurchführung und das hohe Ausmaß der Standardisierung im Vordergrund. Da alle Schnitte an einem Tag geschnitten und an einem anderen Tag gefärbt werden können, ist auch die wichtige Schnittlagerungszeit (Zeit zwischen Herstellung eines Schnittes und seiner immunhistochemischen Färbung) in einer Studie komplett standardisiert. Wären 1744 Großschnitte hergestellt und immunhistochemisch gefärbt worden, wäre eine derartige Standardisierung eine logistische Herausforderung. Bereits eine Lagerung von Schnitten über zwei Wochen führt für viele Antikörper zu einer deutlichen Verminderung der Immunreaktivität [177]. Der am meisten diskutierte Nachteil der TMA-Methode ist die Limitierung der Untersuchung auf einen 0,6mm messenden Gewebespot, wobei befürchtet wurde, dass die Limitierung eine ungenügende Repräsentativität der in einer Studie untersuchten Teilmenge eines Tumors für den gesamten Tumor ergibt. Studien haben allerdings gezeigt, dass alle etablierten molekularen

Prognosemarker auch an TMA-Studien als prognoserelevant gefunden wurden [178-186]. Die einzige Studie weltweit, die mehr als 500 Tumoren sowohl an einem Großschnitt als auch an TMAs, hergestellt aus den korrespondierenden Tumorblock, auf prognostische Marker untersuchte, war von Torhorst et al. 2001 [182]. Torhorst hatte mit seinem Team mehr als 500 Mammakarzinome auf die Expression von ER, PR und p53 untersucht und dabei für ER und PR weitgehend identische Befunde an TMAs und Großschnitten gefunden. Zu p53 fanden die Untersucher allerdings mehr als 40% positive Fälle an Großschnitten aber jeweils nur knapp mehr als 20% positive Fälle an vier verschiedenen TMAs. Wären diese Befunde ohne die Berücksichtigung klinischer Verlaufsdaten interpretiert worden, so hätten die Untersucher wohl gefolgert, dass die Hälfte der p53 positiven Befunde an TMAs -wegen eingeschränkter Repräsentativität- nicht identifiziert werden konnten. Der Vergleich mit klinischen Verlaufsdaten ergab aber für alle vier Datensätze der TMA-Untersuchungen eine hochsignifikante Assoziation zwischen p53-Positivität und ungünstiger Prognose, während die Großschnitt p53 Befunde nicht mit der Patientenprognose assoziiert waren. Die Autoren folgerten nun aus ihren Daten, dass an Großschnitten entweder Färbeartefakte oder biologisch irrelevante fokale Befunde zu einer Überinterpretation des p53-Status geführt hatten. Tatsächlich ist bei Großschnittuntersuchungen der „Großschnitt“ typischerweise ganz unterschiedlich groß und enthält ganz unterschiedliche Mengen an Tumor, welche von einem kleinen fokalen Tumorherd (<1mm) bis zu einem 1,5cm mal 3cm großen Tumoreal reichen kann. Auch TMA-Studien, welche untersucht haben, ob ein, zwei, drei, vier oder mehr Gewebespots aus einem einzigen Tumor repräsentativ für einen Tumor sein könnten, kamen alle zu dem Schluss, dass die Positivitätsrate für alle Biomarker mit der Menge des untersuchenden Gewebes zunimmt. Die Daten der Torhorst-Untersuchung machen deutlich, dass diese Zunahme der positiven Fälle nicht unbedingt zu einer besseren Einschätzung der klinisch relevanten molekularen Charakteristika eines Tumors führt. Schließlich wäre es auch plausibel anzunehmen, dass die biologisch relevantesten Veränderungen eines Tumors wohl in der ganzen Tumormasse oder einem großen Anteil der Tumormasse vorkommen. Die Standardisierung der pro Patienten untersuchten Gewebemenge auf ein Fragment von 0,6mm Durchmesser sorgt auf alle Fälle dafür, dass von allen Tumoren einer Studie die gleiche Gewebemenge zur Untersuchung gelangt, sodass für jeden Fall/ Patienten identische Chancen für die Identifikation fokaler Alterationen und identische Risiken für Färbeartefakte vorliegen.

Das Potential von TMAs für Großstudien wurde am UKE insbesondere beim Prostatakarzinom gezeigt, wo mehr als 17000 Tumoren mit klinischen Verlaufsdaten in ein TMA-Format gebracht wurden. Studien an diesem UKE-Prostata-TMA haben die prognostische Bedeutung von dutzenden von molekularen Parametern beschrieben[187-192]. Ein besonderer Aspekt dieser Prostatakarzinomstudien war die separate Untersuchung von molekular definierten

Tumorgruppen auf die prognostische Bedeutung der evaluierten Parameter. Die beim Prostatakarzinom häufigste molekulare Veränderung ist die TMPRSS2:ERG-Translokation, welche in 50% der Prostatakarzinome vorkommt und zu einer Neoexpression des Transkriptionsfaktors ERG führt. Die ERG Expression ist per se nicht prognoserelevant beim Prostatakarzinom, führt aber zu veränderten Expressionsniveaus von mindestens 1600 Genen, welche direkt oder indirekt von ERG beeinflusst werden. Viele Prognosemarker haben in den UKE-Studien ihre prognostische Bedeutung entweder ausschließlich [193-200] oder überwiegend [201-205] in ERG negativen Tumoren entfaltet, während einige andere molekulare Prognoseparameter ihre prognostische Bedeutung entweder ausschließlich [206-209] oder überwiegend [190, 210, 211] in ERG positiven Tumoren zeigten. Diese Daten zeigen die grundsätzliche Möglichkeit, dass molekulare Prognoseparameter eventuell ihren Einfluss nur in molekular definierten Subgruppen entfalten könnten. Bei anderen Tumorarten wie beispielsweise beim Mammakarzinom sind subtypspezifische Prognoseparameter nicht bekannt. Die häufig eingesetzten RNA basierten Prognoseparameter wie EndoPredict®, Oncotype DX®, MammaPrint® wurden in Kollektiven als Prognosemarker etabliert, wo keine molekularen Subgruppen separat analysiert wurden [62, 212-214]. Die in dieser Studie gezeigten unterschiedlichen prognostischen Einflüsse der FOXP1-Expression in Tumoren mit unterschiedlichen ER, PR und HER2 Status macht aber deutlich, dass auch beim Mammakarzinom mit derartigen Phänomenen zu rechnen ist.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie, dass eine erhöhte FOXP1-Expression beim Mammakarzinom mit einer günstigeren Prognose assoziiert ist. Da die prognostische Bedeutung der FOXP1-Expression nicht unabhängig von etablierten Prognosemarkern ist, dürfte der Analyse von FOXP1 als Einzelparameter keine klinische Bedeutung zukommen. Studien werden aber zu zeigen haben, ob möglicherweise die Kombination der FOXP1-Expressionsmessung mit anderen immunhistochemisch bestimmaren Prognosemarkern klinische Relevanz erlangen können. Durch die Mehrfarben-Immunhistochemie, welche es ermöglicht mehr als 50 Antikörper gleichzeitig an einem Gewebeschnitt zu evaluieren, ist es heute möglich die prognostische Aussagekraft einer Vielzahl von Markern gleichzeitig zu untersuchen[215-219]. Durch die Möglichkeit -im Gegensatz zu heute üblichen RNA-Analysen- die Untersuchung auf Tumorzellen zu beschränken, wäre von solchen Ansätzen eine deutliche Verbesserung der diagnostischen Präzision zu erwarten. Da die prognostische Bedeutung molekularer Veränderungen offensichtlich auch von anderen gleichzeitig in der Tumorzelle vorliegenden molekularen Veränderungen abhängen, werden zukünftige optimierte Prognoseparametern möglicherweise nicht mehr einfache Scores, gebildet aus der Summe der Werte der einzelnen Parameter, enthalten, sondern die individuellen Kombinationen der Marker unter Mithilfe von künstlicher Intelligenz kumulativ zu einer prognostischen Aussage nutzen.

## 5 Zusammenfassung

Zur Klärung der klinischen Bedeutung der Forkhead-box P1 (FOXP1) Expression beim Mammakarzinom und der Beziehung zu anderen molekularen Parametern wurden 1744 Mammakarzinome in einem TMA-Format immunhistochemisch auf die Expression von FOXP1 untersucht. Eine Positivität fand sich in 75% der Tumoren, wobei 38,1% mäßig und 36,9% stark positiv waren. Die FOXP1 Positivitätsrate war abhängig vom histologischen Tumortyp. So waren 86,7% der lobulären (ILC), aber nur 74,4% von Karzinomen vom nicht speziellen Typ (NST) FOXP1 positiv ( $p < 0,0001$ ). In der größten Untergruppe der Mammakarzinome NST war die FOXP1-Positivität assoziiert mit einem niedrigem pT-Stadium ( $p = 0,0007$ ), einem niedrigem Malignitätsgrad ( $p < 0,0001$ ), fehlender Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,0032$ ) und einer günstigeren Patientenprognose ( $p < 0,0001$ ). In der multivariaten Analyse war die prognostische Bedeutung aber nicht unabhängig von pT, pN und dem BRE Grad. Eine hohe FOXP1-Expression war auch mit einer ER-Positivität ( $p < 0,0001$ ), einer PR-Positivität ( $p < 0,0001$ ), einer Amplifikation von C-MYC ( $p = 0,0006$ ), einer Deletion auf dem Chromosomenabschnitt 13q14 ( $p = 0,0173$ ) sowie dem Fehlen einer Deletion auf den Chromosomenabschnitten 8p21 und 9p21 ( $p < 0,0001$  und  $p = 0,0164$ ) assoziiert. Eine separate Untersuchung von Tumoren mit unterschiedlichen ER, PR und HER2 Status ergab, dass die prognostische Bedeutung von FOXP1 ausschließlich in ER positiven ( $p < 0,0001$ ), aber nicht in ER negativen ( $p = 0,7253$ ), in PR negativen ( $p < 0,0001$ ), aber nicht in PR positiven ( $p = 0,3775$ ) und HER2 negativen ( $p < 0,0001$ ), aber nicht in HER2 positiven ( $p = 0,1797$ ) Tumoren nachweisbar war. Damit zeigen die Daten der Studien, dass eine immunhistochemisch nachweisbare FOXP1-Positivität beim Mammakarzinom mit günstiger Prognose assoziiert ist, die prognostische Bedeutung aber zu schwach ist, um diagnostisch zu nutzen. Die Limitierung der FOXP1-Prognoserelevanz als molekular definierte Subgruppe passt zur komplexen Interaktion des Proteins mit anderen molekularen Faktoren.

## 6 Abstract

To clarify the clinical significance of forkhead-box P1 (FOXP1) expression in breast cancer and its relationship to other molecular parameters, 1744 breast cancers were analyzed immunohistochemically in a TMA format for expression of FOXP1. A positivity was found in 75% of the tumors with 38.1% being moderately positive and 36.9% being strongly positive. The FOXP1 positivity rate was dependent on the histological tumor type. Thus, 86.7% of lobular (ILC) and 74.4% of non-specific type (NST) carcinomas were FOXP1 positive ( $p < 0.0001$ ). In the largest subset of breast cancer NST, FOXP1 positivity was associated with a low pT stage ( $p = 0.0007$ ), a low grade of malignancy ( $p < 0.0001$ ), no lymph node metastases ( $p = 0.0032$ ), and a more favorable prognosis ( $p < 0.0001$ ). In the multivariate analysis, however, the prognostic significance was not independent of pT, pN and BRE grade. High FOXP1 expression was also associated with ER positivity ( $p < 0.0001$ ), PR positivity ( $p < 0.0001$ ), amplification of C-MYC ( $p = 0.0006$ ), deletion on the chromosome segment 13q14 ( $p = 0.0173$ ) and the absence of a deletion on chromosome segments 8p21 and 9p21 ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0164$ ). A separate examination of tumors with different ER, PR and HER2 status showed that the prognostic significance of FOXP1 was exclusively in ER positive ( $p < 0.0001$ ), but not in ER negative ( $p = 0.7253$ ), in PR negative ( $p < 0.0001$ ), but not in PR positive ( $p = 0.3775$ ) and HER2 negative ( $p < 0.0001$ ), but not in HER2 positive ( $p = 0.1797$ ). The data show that immunohistochemically detectable FOXP1 positivity in breast cancer is associated with a favorable prognosis, but the prognostic significance is too weak to be used diagnostically. The limitation of FOXP1 prognostic relevance as a molecularly defined subgroup fits the complex interaction of the protein with other molecular factors.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Berlin, R.K.-I.H.u.d.G.d.e.K.i.D.e.V.H., *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 2019. **12. Ausgabe**.
3. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
4. Althuis, M.D., et al., *Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997*. Int J Epidemiol, 2005. **34**(2): p. 405-12.
5. Aigner, K.R., et al., *Brustkrebs (Mammakarzinom)- Symptome*, in *Onkologie Basiswissen*, K.R. Aigner and F.O. Stephens, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 136.
6. Aigner, K.R., et al., *Brustkrebs (Mammakarzinom)*, in *Onkologie Basiswissen*, K.R. Aigner and F.O. Stephens, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 136-137.
7. Heuts, E.M., et al., *Internal mammary lymph drainage and sentinel node biopsy in breast cancer - A study on 1008 patients*. Eur J Surg Oncol, 2009. **35**(3): p. 252-7.
8. Kuchuk, I., et al., *Incidence, consequences and treatment of bone metastases in breast cancer patients-Experience from a single cancer centre*. J Bone Oncol, 2013. **2**(4): p. 137-44.
9. Aigner, K.R., et al., *Brustkrebs (Mammakarzinom)- Adjuvante Chemotherapie*, in *Onkologie Basiswissen*, K.R. Aigner and F.O. Stephens, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 142-143.
10. Broeders, M., et al., *The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies*. J Med Screen, 2012. **19 Suppl 1**: p. 14-25.
11. Myers, E.R., et al., *Benefits and Harms of Breast Cancer Screening: A Systematic Review*. Jama, 2015. **314**(15): p. 1615-34.
12. Chiarelli, A.M., et al., *The contribution of clinical breast examination to the accuracy of breast screening*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(18): p. 1236-43.
13. van Keimpema, M., et al., *FOXP1 directly represses transcription of proapoptotic genes and cooperates with NF- $\kappa$ B to promote survival of human B cells.*, in *Blood*. 2014, The American Society of Hematology. p. 3431-40.
14. Schaefer, F.K., et al., *Influence of additional breast ultrasound on cancer detection in a cohort study for quality assurance in breast diagnosis--analysis of 102,577 diagnostic procedures*. Eur Radiol, 2010. **20**(5): p. 1085-92.
15. Ohuchi, N., et al., *Sensitivity and specificity of mammography and adjunctive ultrasonography to screen for breast cancer in the Japan Strategic Anti-cancer Randomized Trial (J-START): a randomised controlled trial*. Lancet, 2016. **387**(10016): p. 341-348.

16. Elkin, E.B., et al., *Desire for information and involvement in treatment decisions: elderly cancer patients' preferences and their physicians' perceptions*. J Clin Oncol, 2007. **25**(33): p. 5275-80.
17. Dahabreh, I.J., et al., *AHRQ Comparative Effectiveness Reviews, in Core Needle and Open Surgical Biopsy for Diagnosis of Breast Lesions: An Update to the 2009 Report*. 2014, Agency for Healthcare Research and Quality (US): Rockville (MD).
18. Barrett, T., et al., *Radiological staging in breast cancer: which asymptomatic patients to image and how*. Br J Cancer, 2009. **101**(9): p. 1522-8.
19. Brennan, M.E. and N. Houssami, *Evaluation of the evidence on staging imaging for detection of asymptomatic distant metastases in newly diagnosed breast cancer*. Breast, 2012. **21**(2): p. 112-23.
20. Bilimoria, M.M. and M. Morrow, *The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies*. CA Cancer J Clin, 1995. **45**(5): p. 263-78.
21. Müller, V. and F. Jänicke, *Prognostische und prädiktive Faktoren bei Patientinnen mit Mammakarzinom*, in *Management des Mammakarzinoms*. 2006, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 183-198.
22. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2017: John Wiley & Sons.
23. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2011: John Wiley & Sons.
24. Uehiro, N., et al., *Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer*. Breast Cancer, 2014. **21**(6): p. 748-53.
25. Fisher, E.R., et al., *Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients*. Cancer, 1990. **65**(9 Suppl): p. 2121-8.
26. Louwman, M.W., et al., *Uncommon breast tumors in perspective: incidence, treatment and survival in the Netherlands*. Int J Cancer, 2007. **121**(1): p. 127-35.
27. Cserni, G., *Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time*. Pathologica, 2020. **112**(1): p. 25-41.
28. Lebeau, A., et al., *Invasive Mammakarzinome: Die aktuelle WHO-Klassifikation*. Der Pathologe, 2014. **35**(1): p. 7-17.
29. Pestalozzi, B.C., et al., *Distinct Clinical and Prognostic Features of Infiltrating Lobular Carcinoma of the Breast: Combined Results of 15 International Breast Cancer Study Group Clinical Trials*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(18): p. 3006-3014.
30. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
31. Davies, C., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
32. Pakdel, F., *Molecular Pathways of Estrogen Receptor Action*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
33. Paterni, I., et al., *Estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ): subtype-selective ligands and clinical potential*. Steroids, 2014. **90**: p. 13-29.

34. Keen, J.C. and N.E. Davidson, *The biology of breast carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(S3): p. 825-833.
35. Clarke, R.B., *Steroid receptors and proliferation in the human breast*. Steroids, 2003. **68**(10-13): p. 789-794.
36. Wolff, A.C., et al., *Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update*. Arch Pathol Lab Med, 2014. **138**(2): p. 241-56.
37. Verma, S., et al., *Optimizing the management of HER2-positive early breast cancer: the clinical reality*. Curr Oncol, 2010. **17**(4): p. 20-33.
38. Petrelli, F., et al., *Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **153**(3): p. 477-91.
39. Inwald, E.C., et al., *Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **139**(2): p. 539-52.
40. Nitz, U., et al., *Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression*. Ann Oncol, 2014. **25**(8): p. 1551-7.
41. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
42. Bastien, R.R., et al., *PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers*. BMC Med Genomics, 2012. **5**: p. 44.
43. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
44. Prat, A. and J.S. Parker, *Standardized versus research-based PAM50 intrinsic subtyping of breast cancer*. Clin Transl Oncol, 2020. **22**(6): p. 953-955.
45. Harbeck, N. and M. Gnant, *Breast cancer*. Lancet, 2017. **389**(10074): p. 1134-1150.
46. Voduc, K.D., et al., *Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse*. J Clin Oncol, 2010. **28**(10): p. 1684-91.
47. Parker, J.S., et al., *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes*. J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1160-7.
48. Lowery, A.J., et al., *Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(3): p. 831-41.
49. Harbeck, N., et al., *Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions*. Cancer Treat Rev, 2010. **36**(8): p. 584-94.
50. Baretta, Z., et al., *Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(40): p. e4975.
51. Yehia, L., J. Ngeow, and C. Eng, *PTEN-opathies: from biological insights to evidence-based precision medicine*. J Clin Invest, 2019. **129**(2): p. 452-464.
52. Lebok, P., et al., *Partial PTEN deletion is linked to poor prognosis in breast cancer*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 963.

53. McBride, K.A., et al., *Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(5): p. 260-71.
54. Li, J.P., et al., *Association of p53 expression with poor prognosis in patients with triple-negative breast invasive ductal carcinoma*. Medicine (Baltimore), 2019. **98**(18): p. e15449.
55. Hansford, S., et al., *Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond*. JAMA Oncol, 2015. **1**(1): p. 23-32.
56. Ping, Z., et al., *ERBB2 mutation is associated with a worse prognosis in patients with CDH1 altered invasive lobular cancer of the breast*. Oncotarget, 2016. **7**(49): p. 80655-80663.
57. Haupt, S., et al., *The role of MDM2 and MDM4 in breast cancer development and prevention*. J Mol Cell Biol, 2017. **9**(1): p. 53-61.
58. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
59. Roy, P.G., et al., *High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer*. Int J Cancer, 2010. **127**(2): p. 355-60.
60. Lebok, P., et al., *8p deletion is strongly linked to poor prognosis in breast cancer*. Cancer Biol Ther, 2015. **16**(7): p. 1080-7.
61. Lebok, P., et al., *p16 overexpression and 9p21 deletion are linked to unfavorable tumor phenotype in breast cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(49): p. 81322-81331.
62. Cardoso, F., et al., *70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(8): p. 717-29.
63. Moran, M.S., et al., *Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer*. J Clin Oncol, 2014. **32**(14): p. 1507-15.
64. Veronesi, U., et al., *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(16): p. 1227-32.
65. Fisher, B., et al., *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, 2002. **347**(16): p. 1233-41.
66. Kunkler, I.H., et al., *Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(3): p. 266-73.
67. Clarke, M., et al., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2087-106.
68. Darby, S., et al., *Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9804): p. 1707-16.
69. Turner, N.C., et al., *Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Advanced Breast Cancer*. N Engl J Med, 2018. **379**(20): p. 1926-1936.

70. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.* Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
71. Moja, L., et al., *Trastuzumab containing regimens for early breast cancer.* Cochrane Database Syst Rev, 2012. **2012**(4): p. Cd006243.
72. Fisher, B., et al., *Tamoxifen and chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer.* J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(22): p. 1673-82.
73. Cuzick, J., et al., *Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial.* Lancet Oncol, 2010. **11**(12): p. 1135-41.
74. Kaufmann, M., et al., *Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update.* J Clin Oncol, 2006. **24**(12): p. 1940-9.
75. Cardoso, F., et al., *4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4) dagger.* Ann Oncol, 2018. **29**(8): p. 1634-1657.
76. Moll, R., *Transkriptionsfaktoren in der Tumordiagnostik.* Der Pathologe, 2018. **39**(2): p. 285-290.
77. Katoh, M. and M. Katoh, *Human FOX gene family (Review)*, in *International Journal of Oncology*. 2004, Spandidos Publications. p. 1495-1500.
78. Lehmann, O.J., et al., *Fox's in development and disease.* Trends Genet, 2003. **19**(6): p. 339-44.
79. Li, C. and P.W. Tucker, *DNA-binding properties and secondary structural model of the hepatocyte nuclear factor 3/fork head domain.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(24): p. 11583-11587.
80. Li, S., J. Weidenfeld, and E.E. Morrisey, *Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(2): p. 809-22.
81. Zabarovsky, E.R., M.I. Lerman, and J.D. Minna, *Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers.* Oncogene, 2002. **21**(45): p. 6915-6935.
82. Banham, A.H., et al., *The FOXP1 Winged Helix Transcription Factor Is a Novel Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 3p 1*, in *CANCER RESEARCH*. 2001. p. 8820-8829.
83. Ijichi, N., et al., *FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer*, in *Vitamins & Hormones*. 2013, Elsevier. p. 203-212.
84. Fox, S.B., et al., *Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with estrogen receptor alpha and improved survival in primary human breast carcinomas.*, in *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004. p. 3521-7.
85. Carlsson, P. and M. Mahlapuu, *Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism.* Developmental biology, 2002. **250**(1): p. 1-23.
86. Fu, N.Y., et al., *Foxp1 Is Indispensable for Ductal Morphogenesis and Controls the Exit of Mammary Stem Cells from Quiescence.* Dev Cell, 2018. **47**(5): p. 629-644 e8.

87. Hu, H., et al., *Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development*, in *Nature Immunology*. 2006, Nature Publishing Group. p. 819-826.
88. Shu, W., et al., *Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors.*, in *The Journal of biological chemistry*. 2001, American Society for Biochemistry and Molecular Biology. p. 27488-97.
89. Shi, C., et al., *Integrin engagement regulates monocyte differentiation through the forkhead transcription factor Foxp1*. *The Journal of clinical investigation*, 2004. **114**(3): p. 408-418.
90. Wang, B., et al., *Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation*. *Development*, 2004. **131**(18): p. 4477-4487.
91. Meerschaut, I., et al., *FOXP1-related intellectual disability syndrome: a recognisable entity*. *J Med Genet*, 2017. **54**(9): p. 613-623.
92. Takayama, K., et al., *FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **374**(2): p. 388-93.
93. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. *Cell*, 2006. **126**(2): p. 375-387.
94. Huebner, K., *Tumor suppressors on 3p: a neoclassic quartet*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(26): p. 14763-14765.
95. Bucher, P., et al., *Targeting chronic NFAT activation with calcineurin inhibitors in diffuse large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2020. **135**(2): p. 121-132.
96. Koon, H.B., et al., *FOXP1: a potential therapeutic target in cancer*, in *Expert opinion on therapeutic targets*. 2007, NIH Public Access. p. 955.
97. Takayama, K.-I., et al., *Integrative Analysis of FOXP1 Function Reveals a Tumor-Suppressive Effect in Prostate Cancer*. 2012.
98. Bates, G.J., et al., *Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with that of estrogen receptor $\beta$  in primary invasive breast carcinomas*, in *Breast Cancer Research and Treatment*. 2008, Springer US. p. 453-459.
99. Rayoo, M., et al., *Expression of the forkhead box transcription factor FOXP1 is associated with oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and improved survival in familial breast cancers*. 2009.
100. Shigekawa, T., et al., *FOXP1, an Estrogen-Inducible Transcription Factor, Modulates Cell Proliferation in Breast Cancer Cells and 5-Year Recurrence-Free Survival of Patients with Tamoxifen-Treated Breast Cancer*, in *Hormones and Cancer*. 2011, Springer-Verlag. p. 286-297.
101. Takagi, M., et al., *Intratumoral estrogen production and actions in luminal A type invasive lobular and ductal carcinomas*, in *Breast Cancer Research and Treatment*. 2016, Springer US. p. 45-55.
102. Yu, B.-H., et al., *Cytoplasmic FOXP1 expression is correlated with ER and calpain II expression and predicts a poor outcome in breast cancer.*, in *Diagnostic pathology*. 2018, BioMed Central. p. 36.

103. De Silva, P., et al., *FOXP1 negatively regulates tumor infiltrating lymphocyte migration in human breast cancer*. EBioMedicine, 2019. **39**: p. 226-238.
104. Feng, J., et al., *High expression of FoxP1 is associated with improved survival in patients with non-small cell lung cancer*. Am J Clin Pathol, 2012. **138**(2): p. 230-5.
105. De Smedt, L., et al., *Expression of FOXP1 and Colorectal Cancer Prognosis*. Laboratory Medicine, 2015. **46**(4): p. 299-311.
106. Banham, A.H., et al., *Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated both with hypoxia inducible factors (HIFs) and the Androgen receptor in prostate cancer but is not directly regulated by Androgens or hypoxia*, in *The Prostate*. 2007, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1091-1098.
107. Takayama, K.-I., et al., *Integrative Analysis of FOXP1 Function Reveals a Tumor-Suppressive Effect in Prostate Cancer*, in *Molecular Endocrinology*. 2014, The Endocrine Society. p. 2012-2024.
108. Luo, X., et al., *The clinicopathological significance of forkhead box P1 and forkhead box O3a in pancreatic ductal adenocarcinomas*. Tumour Biol, 2017. **39**(5): p. 1010428317699129.
109. Hu, Z., et al., *Expression of FOXP1 in epithelial ovarian cancer (EOC) and its correlation with chemotherapy resistance and prognosis*. Tumour Biol, 2015. **36**(9): p. 7269-75.
110. He, J., et al., *Expression of FOXP1 and FOXO3a in extrahepatic cholangiocarcinoma and the implications in clinicopathological significance and prognosis*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 2955-2965.
111. Toma, M.I., et al., *Expression of the Forkhead transcription factor FOXP1 is associated with tumor grade and Ki67 expression in clear cell renal cell carcinoma*. Cancer Invest, 2011. **29**(2): p. 123-9.
112. Wan, L., et al., *Expression and significance of FOXP1, HIF-1a and VEGF in renal clear cell carcinoma.*, in *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*. p. 188-95.
113. Wei, Q., et al., *Expression and prognostic value of FOXP1 in esophageal squamous cell carcinoma*. Pathology - Research and Practice, 2019. **215**(12): p. 152645.
114. Han, S.-I., et al., *FOXP1 Expression Predicts Polymorphic Histology and Poor Prognosis in Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphomas*, in *Digestive Surgery*. 2009. p. 156-162.
115. Zhai, L., et al., *Expression of PIK3CA and FOXP1 in gastric and intestinal non-Hodgkin's lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type*, in *Tumor Biology*. 2011. p. 913-920.
116. Barrans, S.L., et al., *Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome*, in *Blood*. 2004. p. 2933-2935.
117. Banham, A.H., et al., *Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma.*, in *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005, American Association for Cancer Research. p. 1065-72.

118. Kodama, K., et al., *Primary cutaneous large B-cell lymphomas: clinicopathologic features, classification, and prognostic factors in a large series of patients*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2491-2497.
119. Adams, H., et al., *New time-dependent approach to analyse the prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in colon cancer and diffuse large B-cell lymphoma*. *J Clin Pathol*, 2009. **62**(11): p. 986-97.
120. Hoeller, S., et al., *FOXP1 protein overexpression is associated with inferior outcome in nodal diffuse large B-cell lymphomas with non-germinal centre phenotype, independent of gains and structural aberrations at 3p14.1*, in *Histopathology*. 2010. p. 73-80.
121. Hu, C.-R., et al., *Both FOXP1 and p65 expression are adverse risk factors in diffuse large B-cell lymphoma: A retrospective study in China*, in *Acta Histochemica*. 2013. p. 137-143.
122. Bellas, C., et al., *Immunohistochemical and molecular characteristics with prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98169.
123. Tzankov, A., et al., *Multiparameter analysis of homogeneously R-CHOP-treated diffuse large B cell lymphomas identifies CD5 and FOXP1 as relevant prognostic biomarkers: report of the prospective SAKK 38/07 study*, in *Journal of Hematology & Oncology*. 2015, BioMed Central. p. 70.
124. Petrakis, G., et al., *Expression of the activation markers Blimp1, Foxp1 and pStat3 in extranodal diffuse large B-cell lymphomas*. *Histol Histopathol*, 2017. **32**(8): p. 825-834.
125. Mottok, A., et al., *FOXP1 expression is a prognostic biomarker in follicular lymphoma treated with rituximab and chemotherapy.*, in *Blood*. 2018, The American Society of Hematology. p. 226-235.
126. Donizy, P., et al., *Upregulation of FOXP1 is a new independent unfavorable prognosticator and a specific predictor of lymphatic dissemination in cutaneous melanoma patients*. *Onco Targets Ther*, 2018. **11**: p. 1413-1422.
127. Zhang, Y., et al., *Prognostic significance of FOXP1 as an oncogene in hepatocellular carcinoma*. *J Clin Pathol*, 2012. **65**(6): p. 528-33.
128. Li, F., et al., *FOXP1 and SPINK1 reflect the risk of cirrhosis progression to HCC with HBV infection*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015. **72**: p. 103-108.
129. Xue, L., S. Yue, and J. Zhang, *FOXP1 has a low expression in human gliomas and its overexpression inhibits proliferation, invasion and migration of human glioma U251 cells*. *Mol Med Rep*, 2014. **10**(1): p. 467-472.
130. Gomez, G.G., et al., *Suppression of microRNA-9 by mutant EGFR signaling upregulates FOXP1 to enhance glioblastoma tumorigenicity*. *Cancer Res*, 2014. **74**(5): p. 1429-39.
131. Bergthorsson, J.T., et al., *Chromosome imbalance at the 3p14 region in human breast tumours: high frequency in patients with inherited predisposition due to BRCA2*. *Eur J Cancer*, 1998. **34**(1): p. 142-7.
132. Ijichi, N., et al., *Association of Double-Positive FOXA1 and FOXP1 Immunoreactivities with Favorable Prognosis of Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients*, in *Hormones and Cancer*. 2012, Springer-Verlag. p. 147-159.
133. Stephen, T.L., et al., *Transforming growth factor  $\beta$ -mediated suppression of antitumor T cells requires FoxP1 transcription factor expression*. *Immunity*, 2014. **41**(3): p. 427-439.

134. Yagi, K., et al., *c-myc is a downstream target of the Smad pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 854-61.
135. Cui, J. and H. Jiang, *Prediction of postoperative survival of triple-negative breast cancer based on nomogram model combined with expression of HIF-1 $\alpha$  and c-myc*. Medicine (Baltimore), 2019. **98**(40): p. e17370.
136. *Expression of FOXP1 in breast cancer - The Human Protein Atlas*. 2022; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000114861-FOXP1/pathology/breast+cancer>.
137. Zhou, R., et al., *Male breast carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical characterization study*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(10): p. 6852-61.
138. Yan, M., et al., *Comparative microRNA profiling of sporadic and BRCA1 associated basal-like breast cancers*, in *BMC Cancer*. 2015, BioMed Central.
139. Dancau, A.M., et al., *Tissue microarrays*. Methods Mol Biol, 2010. **576**: p. 49-60.
140. Kallioniemi, O.-P., et al., *Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer*. Human Molecular Genetics, 2001. **10**(7): p. 657-662.
141. Ruiz, C., et al., *Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2190-4.
142. Al Kuraya, K., R. Simon, and G. Sauter, *Tissue microarrays for high-throughput molecular pathology*. Ann Saudi Med, 2004. **24**(3): p. 169-74.
143. Al-Kuraya, K., et al., *Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8534-40.
144. Lebok, P., et al., *6q deletion is frequent but unrelated to patient prognosis in breast cancer*. Breast Cancer, 2022. **29**(2): p. 216-223.
145. Graser, M.M., *Prävalenz und klinische Signifikanz der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom*. 2021, Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.
146. Simon, R., M. Mirlacher, and G. Sauter, *Immunohistochemical analysis of tissue microarrays*. Methods Mol Biol, 2010. **664**: p. 113-26.
147. Ali, A.H., et al., *Correlation between E-cadherin and hormone receptor status among breast cancer patients*. Age (years), 2020. **47**: p. 12.585.
148. Grabenstetter, A., et al., *E-cadherin immunohistochemical expression in invasive lobular carcinoma of the breast: correlation with morphology and CDH1 somatic alterations*. Hum Pathol, 2020. **102**: p. 44-53.
149. Yu, B.H., et al., *Cytoplasmic FOXP1 expression is correlated with ER and calpain II expression and predicts a poor outcome in breast cancer*. Diagn Pathol, 2018. **13**(1): p. 36.
150. Luo, X., et al., *The clinicopathological significance of forkhead box P1 and forkhead box O3a in pancreatic ductal adenocarcinomas*, in *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017. p. 1010428317699129.
151. Takayama, K.-i., et al., *Integrative Analysis of FOXP1 Function Reveals a Tumor-Suppressive Effect in Prostate Cancer*. Molecular Endocrinology, 2014. **28**(12): p. 2012-2024.

152. Gomez, G.G., et al., *Suppression of microRNA-9 by mutant EGFR signaling upregulates FOXP1 to enhance glioblastoma tumorigenicity.*, in *Cancer research*. 2014, NIH Public Access. p. 1429-39.
153. Sagaert, X., et al., *Forkhead Box Protein P1 Expression in Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphomas Predicts Poor Prognosis and Transformation to Diffuse Large B-Cell Lymphoma*, in *Journal of Clinical Oncology*. 2006. p. 2490-2497.
154. Yu, B., et al., *FOXP1 expression and its clinicopathologic significance in nodal and extranodal diffuse large B-cell lymphoma*, in *Annals of Hematology*. 2011. p. 701-708.
155. He, M., et al., *Prognostic significance of miR-34a and its target proteins of FOXP1, p53, and BCL2 in gastric MALT lymphoma and DLBCL*, in *Gastric Cancer*. 2014. p. 431-441.
156. Wong, K.K., et al., *Reciprocal expression of the endocytic protein HIP1R and its repressor FOXP1 predicts outcome in R-CHOP-treated diffuse large B-cell lymphoma patients*, in *Leukemia*. 2014. p. 362-372.
157. Hans, C.P., et al., *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. *Blood*, 2004. **103**(1): p. 275-82.
158. Nyman, H., et al., *Bcl-2 but not FOXP1, is an adverse risk factor in immunochemotherapy-treated non-germinal center diffuse large B-cell lymphomas*, in *European Journal of Haematology*. 2009. p. 364-372.
159. Jiang, W., et al., *Expression of FOXP1 in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma suggests a large tumor cell transformation and predicts a poorer prognosis in the positive thyroid patients*. *Med Oncol*, 2012. **29**(5): p. 3352-9.
160. Deng, L., et al., *Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma displays distinct clinical and biological features for treatment failure in rituximab era: a report from the International PTL Consortium*. *Leukemia*, 2016. **30**(2): p. 361-72.
161. Giatromanolaki, A., et al., *Loss of expression and nuclear/cytoplasmic localization of the FOXP1 forkhead transcription factor are common events in early endometrial cancer: relationship with estrogen receptors and HIF-1 $\alpha$  expression*, in *Modern Pathology*. 2006. p. 9-16.
162. Kim, M.R., et al., *TET2 directs mammary luminal cell differentiation and endocrine response*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 4642.
163. Kong, S.L., et al., *Cellular reprogramming by the conjoint action of ER $\alpha$ , FOXA1, and GATA3 to a ligand-inducible growth state*. *Mol Syst Biol*, 2011. **7**: p. 526.
164. Wang, C., et al., *FOXP1-induced lncRNA CLRNI-AS1 acts as a tumor suppressor in pituitary prolactinoma by repressing the autophagy via inactivating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(7): p. 499.
165. Lin, S.Y., et al., *Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4262-6.
166. Khramtsov, A.I., et al., *Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(6): p. 2911-20.
167. Chiang, K., et al., *PRMT5 is a critical regulator of breast cancer stem cell function via histone methylation and FOXP1 expression*. *Cell reports*, 2017. **21**(12): p. 3498-3513.

168. Halacli, S.O. and A.L. Dogan, *FOXP1 regulation via the PI3K/Akt/p70S6K signaling pathway in breast cancer cells*, in *Oncology Letters*. 2015. p. 1482-1488.
169. Li, J., M.J. Poi, and M.D. Tsai, *Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer*. *Biochemistry*, 2011. **50**(25): p. 5566-82.
170. Bertucci, F., et al., *Genomic characterization of metastatic breast cancers*. *Nature*, 2019. **569**(7757): p. 560-564.
171. Kamal, M., et al., *Loss of CSMD1 expression is associated with high tumour grade and poor survival in invasive ductal breast carcinoma*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. **121**(3): p. 555-63.
172. Yuan, B.Z., et al., *DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and in vivo tumorigenicity*. *Oncogene*, 2003. **22**(3): p. 445-50.
173. Guan, C.N., et al., *DLC-1 expression levels in breast cancer assessed by qRT-PCR are negatively associated with malignancy*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012. **13**(4): p. 1231-3.
174. Rodrigues-Ferreira, S., et al., *8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7239.
175. Lovat, F., et al., *LZTS1 downregulation confers paclitaxel resistance and is associated with worse prognosis in breast cancer*. *Oncotarget*, 2014. **5**(4): p. 970-7.
176. Chua, Y.L., et al., *The NRG1 gene is frequently silenced by methylation in breast cancers and is a strong candidate for the 8p tumour suppressor gene*. *Oncogene*, 2009. **28**(46): p. 4041-52.
177. Mirlacher, M. and R. Simon, *Recipient block TMA technique*. *Methods Mol Biol*, 2010. **664**: p. 37-44.
178. Hedvat, C.V., et al., *Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma*. *Human pathology*, 2002. **33**(10): p. 968-974.
179. Ginestier, C., et al., *Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA microarrays in the study of breast tumor markers*. *The American journal of pathology*, 2002. **161**(4): p. 1223-1233.
180. Camp, R.L., L.A. Charette, and D.L. Rimm, *Validation of Tissue Microarray Technology in Breast Carcinoma*. *Laboratory Investigation*, 2000. **80**(12): p. 1943-1949.
181. Nocito, A., et al., *Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade*. *The Journal of pathology*, 2001. **194**(3): p. 349-357.
182. Torhorst, J., et al., *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(6): p. 2249-56.
183. Hoos, A., et al., *Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors*. *The American journal of pathology*, 2001. **158**(4): p. 1245-1251.
184. Rubin, M.A., et al., *Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis*. *The American journal of surgical pathology*, 2002. **26**(3): p. 312-319.

185. Engellau, J., et al., *Tissue microarray technique in soft tissue sarcoma: immunohistochemical Ki-67 expression in malignant fibrous histiocytoma*. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2001. **9**(4): p. 358-363.
186. Fernebro, E., et al., *Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer*. Archives of pathology & laboratory medicine, 2002. **126**(6): p. 702-705.
187. Kluth, M., et al., *Deletion of 18q is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(52): p. 86339-86349.
188. Kluth, M., et al., *Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer*. Int J Cancer, 2014. **135**(6): p. 1369-80.
189. Krohn, A., et al., *Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer*. Am J Pathol, 2012. **181**(2): p. 401-12.
190. Tsourlakis, M.C., et al.,  *$\beta$ III-tubulin overexpression is an independent predictor of prostate cancer progression tightly linked to ERG fusion status and PTEN deletion*. The American journal of pathology, 2014. **184**(3): p. 609-617.
191. Grupp, K., et al., *High lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 expression independently predicts high risk for biochemical recurrence in prostate cancers*. Mol Oncol, 2013. **7**(6): p. 1001-11.
192. Burdelski, C., et al., *Reduced AZGP1 expression is an independent predictor of early PSA recurrence and associated with ERG-fusion positive and PTEN deleted prostate cancers*. Int J Cancer, 2016. **138**(5): p. 1199-206.
193. Burdelski, C., et al., *p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer*. Tumor Biology, 2016. **37**(9): p. 12655-12663.
194. Heumann, A., et al., *Up regulation and nuclear translocation of Y-box binding protein 1 (YB-1) is linked to poor prognosis in ERG-negative prostate cancer*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-10.
195. Grupp, K., et al., *The prognostic impact of high Nijmegen breakage syndrome (NBS1) gene expression in ERG-negative prostate cancers lacking PTEN deletion is driven by KPNA2 expression*. International journal of cancer, 2014. **135**(6): p. 1399-1407.
196. Burkhardt, L., et al., *CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer*. Cancer research, 2013. **73**(9): p. 2795-2805.
197. Melling, N., et al., *High-level  $\gamma$ -glutamyl-hydrolase (GGH) expression is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(2): p. 286.
198. Juhnke, M., et al., *Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) overexpression is an independent prognostic marker in prostate cancer without TMPRSS2: ERG fusion*. Molecular Carcinogenesis, 2017. **56**(9): p. 2135-2145.
199. Heumann, A., et al., *High BCAR1 expression is associated with early PSA recurrence in ERG negative prostate cancer*. BMC cancer, 2018. **18**(1): p. 1-10.
200. Spethmann, T., et al., *Opposing prognostic relevance of junction plakoglobin in distinct prostate cancer patient subsets*. Molecular Oncology, 2021. **15**(7): p. 1956.
201. Bonk, S., et al., *Reduced KLK2 expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in ERG-negative prostate cancer*. The Prostate, 2020. **80**(13): p. 1097-1107.

202. Kluth, M., et al., *Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2: ERG fusions*. Modern pathology, 2013. **26**(7): p. 975-983.
203. Grupp, K., et al., *Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence*. Modern Pathology, 2013. **26**(5): p. 733-742.
204. Poos, A.M., et al., *PITX1 Is a Regulator of TERT Expression in Prostate Cancer with Prognostic Power*. Cancers, 2022. **14**(5): p. 1267.
205. Möller, K., et al., *Chromosome 5 harbors two independent deletion hotspots at 5q13 and 5q21 that characterize biologically different subsets of aggressive prostate cancer*. International Journal of Cancer, 2021. **148**(3): p. 748-758.
206. Burdelski, C., et al., *The prognostic value of SUMO1/Sentrin specific peptidase 1 (SENPI) in prostate cancer is limited to ERG-fusion positive tumors lacking PTEN deletion*. BMC cancer, 2015. **15**(1): p. 1-13.
207. Krohn, A., et al., *Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers*. The Journal of pathology, 2013. **231**(1): p. 130-141.
208. Müller, J., et al., *Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers*. International journal of cancer, 2013. **132**(6): p. 1333-1340.
209. Kind, S., et al., *Claudin-1 upregulation is associated with favorable tumor features and a reduced risk for biochemical recurrence in ERG-positive prostate cancer*. World Journal of Urology, 2020. **38**(9): p. 2185-2196.
210. Grupp, K., et al., *High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and PTEN deletions*. European journal of cancer, 2014. **50**(4): p. 852-861.
211. Grupp, K., et al., *Expression of DNA ligase IV is linked to poor prognosis and characterizes a subset of prostate cancers harboring TMPRSS2: ERG fusion and PTEN deletion*. Oncology reports, 2015. **34**(3): p. 1211-1220.
212. Filipits, M., et al., *A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(18): p. 6012-20.
213. Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2817-26.
214. Albanell, J., et al., *Pooled analysis of prospective European studies assessing the impact of using the 21-gene Recurrence Score assay on clinical decision making in women with oestrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative early-stage breast cancer*. Eur J Cancer, 2016. **66**: p. 104-13.
215. Van Der Loos, C.M., *Chromogens in multiple immunohistochemical staining used for visual assessment and spectral imaging: the colorful future*. Journal of Histotechnology, 2010. **33**(1): p. 31-40.
216. Bogusz, A.M., et al., *Quantitative Immunofluorescence Reveals the Signature of Active B-cell Receptor Signaling in Diffuse Large B-cell Lymphoma* *IF Analysis of BCR Signaling in DLBCL*. Clinical Cancer Research, 2012. **18**(22): p. 6122-6135.

217. Mason, D.Y., K. Micklem, and M. Jones, *Double immunofluorescence labelling of routinely processed paraffin sections*. The Journal of pathology, 2000. **191**(4): p. 452-461.
218. Setiadi, A.F., et al., *Quantitative, architectural analysis of immune cell subsets in tumor-draining lymph nodes from breast cancer patients and healthy lymph nodes*. PloS one, 2010. **5**(8): p. e12420.
219. Huang, W., K. Henrick, and S. Drew, *A colorful future of quantitative pathology: validation of Vectra technology using chromogenic multiplexed immunohistochemistry and prostate tissue microarrays*. Human pathology, 2013. **44**(1): p. 29-38.

## 8 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

AJCC	<i>American Joint Commission on Cancer</i>
BRCA1	„breast cancer associated“ Gen 1
BRCA2	„breast cancer associated“ Gen 2
BRE	<i>Bloom-Richardson-Elston</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDH1	<i>Cadherin1-Gen</i>
CDK4/6	<i>Cyclin-abhängige Kinase 4/6</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A</i>
CLRN1-AS1	<i>CLRN1 antisense RNA 1</i>
DLC1	<i>Deleted in Liver Cancer 1</i>
E2	<i>Estradiol</i>
ENOX1	<i>Ecto-NOX Disulfide-thiol Exchanger 1</i>
ER	<i>Östrogenrezeptor</i>
ER $\alpha$	<i>Östrogenrezeptor alpha</i>
ER $\beta$	<i>Östrogenrezeptor betha</i>
ESR1	<i>Östrogenrezeptor 1</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FISH	<i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation</i>
FOX	<i>Forkhead-box</i>
FOXP1	<i>Forkhead-box P1</i>
HE	<i>Hematoxylin-Eosin</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HPF	<i>High power field</i>
HR	<i>Hormonrezeptor</i>
ICGC	<i>International Cancer Genome Consortium</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
ILC	<i>invasives lobuläres Karzinom</i>
Ki67LI	<i>Ki-67- Labeling-Index</i>
LA	<i>Luminal A-like</i>
LB	<i>Luminal B-like</i>
LK	<i>Lymphknoten</i>
lncRNA	<i>lange nicht-kodierende RNA</i>
LZTS1	<i>Leucine zipper putative tumor suppressor 1</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>

mRNA .....	<i>Boten-Ribonukleinsäure</i>
MTUS1.....	<i>Mitochondrialer Tumorsuppressor 1</i>
NFAT2 .....	<i>nuclear factor of activated T cells 2</i>
NRG1.....	<i>Neuregulin 1</i>
NST.....	<i>Karzinom ohne speziellen Typ</i>
PR.....	<i>Progesteronrezeptor</i>
PRMT5.....	<i>Protein arginine N-methyltransferase 5</i>
PTEN .....	<i>„phosphatase and tensin homolog“ Gen</i>
SLK.....	<i>Sentinel-Lymphknoten</i>
Smad2 .....	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2</i>
Smad3 .....	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
TBST-Puffer.....	<i>Tris-buffered saline with Tween20-Puffer</i>
TCGA.....	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TET2 .....	<i>Ten-Eleven Translocation-2</i>
TGF- $\beta$ .....	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TMA .....	<i>Tissue Microarray</i>
TN .....	<i>Triple-negativ</i>
UICC .....	<i>Union for International Cancer Control</i>
WHO .....	<i>World Health Organisation</i>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: vereinfachte Übersicht pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms .....	7
Tabelle 2: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach UICC und AJCC .....	8
Tabelle 3: Übersicht histologische Typen des invasiven Mammakarzinoms nach WHO Klassifikation.....	9
Tabelle 4: Kriterien des histologischen Gradings für das Mammakarzinom nach Bloom und Richardson modifiziert durch Elston und Ellis .....	10
Tabelle 5: Klinisch-pathologische Definition der intrinsischen Subtypen anhand immunhistochemischer Surrogatmarker .....	12
Tabelle 6: Übersicht Literatur über Assoziation FOXP1-Überexpression mit günstigerer Prognose und Phänotyp in diversen Tumorentitäten .....	17
Tabelle 7: Übersicht Literatur über Assoziation FOXP1-Überexpression mit schlechter Prognose und Phänotyp in diversen Tumorentitäten .....	18
Tabelle 8: Übersicht Literatur über Assoziation der FOXP1-Über-/ Unterexpression mit Prognose und Phänotyp beim Mammakarzinom .....	21
Tabelle 9: Patientenkollektiv des verwendeten Tissue-Microarrays .....	26
Tabelle 10: FISH-Daten aus früheren Studien .....	27
Tabelle 11: IHC Daten aus früherer Studie .....	27
Tabelle 12: Auswertungskriterien für die IHC .....	28
Tabelle 13: FOXP1 und Tumorphänotyp bei Mammakarzinomen .....	32
Tabelle 14: FOXP1 und Tumorphänotyp bei Mammakarzinomen (NST) .....	33
Tabelle 15: Hazard-Ratio zwischen Untergruppen des pT-, pN-Status, BRE-Gradings und des FOXP1 IHC Resultats sowie multivariate Analyse in allen Karzinomen sowie der Gruppe der NST.....	37
Tabelle 16: FOXP1 und Ki67 LI in Subgruppen .....	41
Tabelle 17: FOXP1 und Ki67 LI in Subgruppen bei Mammakarzinomen (NST) .....	43
Tabelle 18: Übersicht FOXP1 und Prognose in Tumortypen .....	46

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dreidimensionale Darstellung der wichtigsten Regionen der Forkhead-Domäne .....	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Domänenstrukturen von FOXP1 ...	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen dem Östrogenrezeptor und FOXA1 bzw. FOXP1 .....	19
Abbildung 4: TMA Herstellungsprozess.....	25
Abbildung 5: Beispiele der FOXP1 immunhistochemischen Färbung .....	29
Abbildung 6: FOXP1 und Scoring einzelner Komponenten des BRE-Scores .....	34
Abbildung 7: FOXP1 und Scoring einzelner Komponenten des BRE-Scores (NST) .....	34
Abbildung 8: FOXP1 und ER-, PR- und HER2-Status in Mammakarzinomen (NST) .....	35
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurven mit Gesamtüberleben versus FOXP1 IHC Ergebnisse ..	36
Abbildung 10: FOXP1 und Amplifikationen relevanter Gene bei Mammakarzinomen (NST)	38
Abbildung 11: FOXP1 und Deletionen an relevanten Chromosomenabschnitten bei Mammakarzinomen (NST).....	39

## 9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Guido Sauter, PD Dr. Eike Burandt, Prof. Dr. Ronald Simon und Dr. Martina Kluth für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt auch Christina Möller-Koop, Janett Lüttgens und Karin Breitmeyer, die mir über die Jahre allzeit als Ansprechpartnerinnen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, guten Freunden und langjährigen Weggefährten, insbesondere auch meiner Freundin Priska Kleinbercher und meinen guten Freunden Niklas Schenker und Carina Straßen, für die liebevolle emotionale Unterstützung und Begleitung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

10 Lebenslauf

[Redacted]

## 11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: *Konrad Desiderato* .....