

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie
Kommissarischer Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Andreas K. Engel

Einsatz einer Tumor-Datenbank im Tissue-Microarray-Format zur Überprüfung prognoserelevanter Biomarker beim Mammakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Ulrike Hageleit
aus Kiel

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.02.2024**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Volkmar Müller

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Axel Niendorf

Inhaltsverzeichnis

Arbeitshypothese und Fragestellung	5
1. Einleitung	6
1.1 Mammakarzinom	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Ätiologie und Tumorgenese	6
1.1.3 Tumorbiologie und Klassifikation	8
1.1.4 Diagnostik	10
1.1.5 Therapie	11
1.2 Biomarker	13
1.2.1 Asparagin-Synthetase (ASNS)	13
1.2.2 Forkhead Box Protein M1 (FoxM1)	14
1.2.3 RacGTPase-aktivierendes Protein 1 (RacGAP1)	15
1.2.4 B-cell lymphoma 2 Protein (BCL2)	18
1.2.5 Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing Protein 5 (BIRC 5).....	20
1.2.6 Histon H3 (HH3)	21
1.2.7 Östrogenrezeptor β (ER β)	23
1.2.8 Androgenrezeptor (AR)	24
2. Material und Methoden	27
2.1 Patientenkollektiv	27
2.2 Untersuchungsgut	27
2.3 Tissue Microarray (TMA)	28
2.4 Manuelle Auszählung und digitale Bildanalyse	29
2.5 Statistische Auswertung	31
3. Ergebnisse	34
3.1 Visuelle Auszählung versus digitale Bildanalyse (HH3)	34
3.2 Konventionelle Auswertung versus digitale Bildanalyse (Ki67)	36
3.3 Auswertung der neuen Biomarker	36
4. Diskussion	46
4.1 Visuelle Auszählung versus digitale Bildanalyse	46
4.2 Auswertung der neuen Biomarker	49
4.2.1 Proliferationsmarker HH3 und Ki67 – eine Gegenüberstellung	49

4.2.2	Östrogenrezeptor β (ER β)	53
4.2.3	Rac-GTPase-aktivierendes Protein 1 (RacGAP1)	58
4.2.4	B-cell lymphoma 2 (BCL2)	61
4.2.5	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing Protein (BIRC5, Survivin)..	64
4.2.6	Forkhead Box Protein M1 (FoxM1)	67
4.2.7	Asparagin-Synthetase (ASNS)	70
4.2.8	Androgenrezeptor (AR)	72
5.	Zusammenfassung / Summary.....	76
5.1	Zusammenfassung	76
5.2	Summary	77
6.	Abkürzungsverzeichnis	78
7.	Literaturverzeichnis	84
8.	Anhang	102
9.	Danksagung.....	103
10.	Lebenslauf.....	105
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	107

Arbeitshypothese und Fragestellung

Die immunhistochemische Anfärbung von Biomarkern ist ein etablierter Bestandteil der histopathologischen Diagnostik des Mammakarzinoms. Zur Klassifizierung kommt neben pathologischen Kriterien wie Tumorgroße, Nodalstatus und Grading die immunhistochemische Markierung der Biomarker ER (Östrogenrezeptor), PR (Progesteronrezeptor), Her2 (Human epidermal growth factor receptor 2) und Ki67 (Kiel-Antigen Nr. 67) regelhaft zur Anwendung. Abhängig von der Expression dieser Marker werden die Tumore in die molekularen Subtypen Luminal A, Luminal B/Her2-negativ, Luminal B/Her2-positiv, Her2-positiv und Basal-like eingeteilt. Anhand der pathologischen Kriterien und der molekularen Klassifizierung erfolgt eine prognostische und prädiktive Beurteilung des Tumors.

Mit den Biomarkern ASNS (Asparagin-Synthetase), FoxM1 (Forkhead Box Protein M1), RacGAP1 (RacGTPase-aktivierendes Protein 1), BCL2 (B-cell lymphoma 2 Protein), BIRC5 (Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing Protein 5, Survivin), HH3 (Histon H3), ER β (Östrogenrezeptor β) und AR (Androgenrezeptor) stehen weitere Proteine zur Verfügung, deren Expression im Tumorgewebe mit Hilfe spezifischer Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Die Auswahl dieser Biomarker erfolgte anhand einer systematischen Recherche von Expertenwissen und Genexpressionsdaten sowie der Frage nach verfügbaren Antikörpern, die bereits erfolgreich zur immunhistochemischen Markierung am Gewebe eingesetzt werden. Vor dem Hintergrund existierender Studien vermuten wir eine prognostische Relevanz dieser Marker in Bezug auf das Mammakarzinom und nehmen an, dass sie Hinweise auf eine zielgerichtete Therapie geben können.

Ziel dieser Dissertation ist zu ermitteln, ob bei Patientinnen mit Mammakarzinom durch die immunhistochemische Anfärbung zusätzlicher Biomarker ein Beitrag zur prognostischen und prädiktiven Einschätzung erzielt werden kann. Ein weiteres Studienziel ist die Überprüfung, ob mittels digitaler Bildanalyse erhobene Untersuchungsergebnisse mit den Resultaten der visuellen Auszählung und der klinisch-pathologischen Beurteilung übereinstimmen. Unter Einsatz einer Tumor-Datenbank im Tissue-Microarray-Format wurde zunächst bildanalytisch die Prävalenz der einzelnen Biomarker ermittelt, die Ergebnisse statistisch erfasst und mit Hilfe ereigniszeitanalytischer Methoden ausgewertet (n = 3126). Endpunkte der Studie sind das krankheitsfreie Überleben und das relative Überleben über die Zeit (Hazard ratio). Zur Erhebung der klinischen Verlaufsdaten bekam jede Studienteilnehmerin im Verlauf der Nachbeobachtungszeit zu vier definierten Zeitpunkten einen standardisierten Fragebogen zugesandt.

1. Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau. Mit 18.479 Sterbefällen im Jahr 2021 steht Brustkrebs an fünfter Stelle der weiblichen Todesursachen in Deutschland (Destatis 2023). 17,7 % aller krebsbedingten Todesfälle sind auf Brustkrebs zurückzuführen, gefolgt von den nächsthäufig vorkommenden Karzinomen der Lunge (15,8 %) und des Darmes (10,8 %). Bezogen auf die Inzidenz stellt das Mammakarzinom die weitaus größte Gruppe dar. Mit zuletzt 71.375 Neuerkrankungen pro Jahr bei Frauen nimmt es einen prozentualen Anteil von 30,0 % der Krebsneuerkrankungen ein, es folgen mit weitem Abstand Darmkrebs (11,5 %) und Lungenkrebs (9,4 %). Gemäß den aktuellen Inzidenzraten erkrankt etwa eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, drei von zehn betroffenen Frauen sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre alt. Nur 1 % der Neuerkrankungen betreffen Männer. Eine organisierte Früherkennung und Fortschritte in der Therapie des Mammakarzinoms haben in den letzten Jahrzehnten die Überlebenschancen der betroffenen Patientinnen deutlich verbessert. Trotz einer Zunahme der Erkrankungsfälle in den vergangenen Jahren konnte eine gleichbleibende Anzahl an Sterbefällen und damit eine niedrigere Sterberate verzeichnet werden (RKI 2023). Eine Evaluation der Daten aus dem nationalen Krebsregister zeigt, dass seit Einführung des Mammographiescreenings in Deutschland (2005-2009) die Inzidenz der gemeldeten Brustkrebserkrankungen zunächst deutlich angestiegen und im Verlauf wieder moderat gesunken ist, ohne jedoch zurück auf das Ausgangsniveau zu fallen. So betrug die jährliche Inzidenz in der Altersgruppe der Frauen, die zum Screening eingeladen wurden (50-69 Jahre) vor Screeningbeginn ca. 300/100.000 Frauen (2003), erreichte einen Höchststand von ca. 420/100.000 Frauen (2008) und sank in den Folgejahren auf ca. 320/100.000 Frauen (2018). Es konnte eine Zunahme der frühzeitig diagnostizierten Mammakarzinome in niedrigen Erkrankungsstadien verzeichnet werden (Emrich und Kraywinkel 2021). Zudem wurde ein statistisch signifikanter Rückgang der Mortalität bei Brustkrebspatientinnen im Alter von 50-69 Jahren beobachtet. Die Reduktion der Sterberate betrug in der Gruppe der 50-59-jährigen Frauen 25,8 %, bei 60-69-jährigen Frauen 21,2 % (Waldmann et al. 2021).

1.1.2 Ätiologie und Tumorgenese

Bei der Ätiologie des Mammakarzinoms geht man von einer multimodalen Genese aus, die neben genetischen, epigenetischen und molekularen Faktoren auch Lebensstil- und Umweltfaktoren umfasst. Körperliche Inaktivität, Adipositas und der regelmäßige Konsum von Alkohol erhöhen das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Ein ebenfalls erhöhtes Risiko

haben Frauen mit früher Menarche und später Menopause, mit Kinderlosigkeit, Verzicht auf Stillen und einem höheren Alter zum Zeitpunkt ihrer ersten Schwangerschaft. Auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva und die Anwendung einer kombinierten Hormonersatztherapie in den Wechseljahren können das Erkrankungsrisiko steigern. Der Einfluss von endogenen wie von exogenen Hormonen auf das Mammakarzinom gilt mittlerweile als erwiesen (Harbeck et al. 2019).

Bei ungefähr 10 % aller Brustkrebserkrankungen liegt eine genetische Prädisposition zugrunde. Am häufigsten ist eine autosomal-dominant vererbte Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 (Breastcancer gene 1 und 2). Sie kodieren für Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Vielfältige Mutationen können zu einem Verlust ihrer Funktion und damit zu einem kumulierten Lebenszeitrisiko von ca. 70 % für die Entwicklung eines Mammakarzinoms führen. Mit neueren Gendiagnostikverfahren wie dem Next-Generation Sequencing können weitere Gene analysiert werden, zum Beispiel das in den aktuellen AGO guidelines als drittes Hochrisiko-Gen eingestufte PALB2 und weitere Gene wie CDH1, PTEN, TP53, STK11, ATM, CHEK2, BARD1, NF1, RAD51C oder RAD51D. Diese sind häufig mit hereditären Brustkrebssyndromen wie dem Li-Fraumeni Syndrom, Cowden Syndrom, Peutz-Jeghers Syndrom, Lynch Syndrom, der Fanconi Anämie, Neurofibromatose und anderen Syndromen assoziiert (Schütz und Thomssen 2023, Harbeck et al. 2019). Für die verschiedenen Typen von Brustkrebs konnten spezifische molekulare Alterationen nachgewiesen werden, die über unterschiedliche onkogene Signalwege den Zellzyklus beeinflussen und an der Proliferation von Tumorzellen beteiligt sind (Ellis et al. 2012).

Unabhängig von der DNA-Sequenzierung gewinnen zunehmend auch epigenetische Veränderungen bei Brustkrebs an Bedeutung. Die drei wichtigsten epigenetischen Modifikationen sind DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und eine RNA-vermittelte Stummschaltung von Genen. Eine aberrante DNA-Methylierung kann einerseits als globale Hypomethylierung, andererseits als Hypermethylierung von brustkrebspezifischen Genen wie BRCA1, RASSF1A oder Genen der Cadherin-Familie und auch als Kombination von beidem in Erscheinung treten. Posttranslationale Histon-Modifikationen sind assoziiert mit einer aggressiveren Karzinogenese und einer ungünstigeren Prognose. Gegenstand aktueller Forschung ist ihre Relevanz als Biomarker und als potenzieller Ansatzpunkt einer gezielten Tumortherapie. Die Stummschaltung von Genen betrifft vor allem die Östrogenrezeptorgene ESR1 (Östrogenrezeptor alpha kodierendes Gen) und ESR2 (Östrogenrezeptor beta kodierendes Gen), das EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) und das Tumorsuppressorgen BRCA1 (Karsli-Ceppioglu et al. 2014, Bates 2020).

Zwei Modelle stehen zur Verfügung, die zur Erklärung von Entstehung und Progression des Mammakarzinoms auf zellulärer Ebene herangezogen werden können: das klonale

Evolutionsmodell und das Krebsstammzellmodell. Beim klonalen Evolutionsmodell geht man davon aus, dass sich (einem klassisch-darwinistischen Modell entsprechend) Mutationen ansammeln, die sich genetisch und epigenetisch verändern. Unter Ausbildung eines Selektionsdruckes setzen sich schließlich die am besten angepassten Zellklone durch und proliferieren. Diese Theorie passt zu der Beobachtung, dass es in manchen Fällen unter Therapie zur Ausbildung resistenter Zellklone kommt, die unter oder nach Behandlung zu weiterem Tumorwachstum und/oder zu Rezidiven führen können. Beim Krebsstammzellmodell wird angenommen, dass nur bestimmte Vorläuferzellen, die Krebsstammzellen, die Karzinogenese initiieren und zur Progression des Tumors führen. Man vermutet, dass beide Modelle nebeneinander Bestand haben und dass es Überschneidungen gibt, indem auch Krebsstammzellen die Entwicklung eines Tumors nach klonalem Muster hervorrufen können (Greaves und Maley 2012).

1.1.3 Tumorbiologie und Klassifikation

Brustkrebs ist eine heterogene Erkrankung, die nach histologischen und molekularen Kriterien in unterschiedliche Subtypen eingeteilt wird. Die WHO-Klassifikation (World Health Organization) der Tumoren der Mamma bildet eine international anerkannte Basis für eine standardisierte Diagnostik und Nomenklatur. Die histologischen Merkmale einer Läsion stellen auch heute noch die Grundlage der Systematik dar, es werden jedoch zunehmend Erkenntnisse der molekularen Pathologie und genetische Aspekte in die Klassifikation integriert (WHO classification of tumors Editorial Board 2019).

Man unterscheidet zwischen den nichtinvasiven Tumoren und den invasiven Karzinomen. Die häufigsten nichtinvasiven Tumoren sind das ductale Carcinoma in situ (DCIS) und das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass die karzinomatös veränderten Zellen in den Epithelien der Milchgänge bzw. der Lobuli vorliegen, ohne die Basalmembran zu durchbrechen und somit nicht zu einer Metastasierung zu führen. Den zahlenmäßig größeren Anteil machen mit ca. 90 % aller Brusttumore die invasiven Mammakarzinome aus. Häufigster Tumortyp dieser Gruppe ist mit 50-80 % das invasive Mammakarzinom, kein spezieller Typ (NST). Beim invasiven Karzinom NST handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Tumoren, die keine ausreichenden Charakteristika ausbilden, um einem speziellen histologischen Typ zugeordnet werden zu können. Sie werden nach ihrem individuellen Muster (medullär, pleomorph, onkozytär, lipidreich, melanotisch u.a.) in verschiedene Subtypen differenziert. Die speziellen histologischen Typen des invasiven Mammakarzinoms werden anhand ihrer Morphologie definiert und unterscheiden sich zusätzlich durch ihre klinischen, epidemiologischen und molekularen Merkmale vom invasiven Mammakarzinom NST. Die häufigste Entität unter den speziellen Typen stellt mit 5-15 % aller Mammakarzinome das invasiv lobuläre Karzinom dar, das

durch eine kleinzellige schmalsträngige Stromainfiltration und ein dissoziiertes infiltratives Wachstum charakterisiert ist. Die WHO-Klassifikation unterscheidet insgesamt dreißig verschiedene spezielle Typen, die neben der großen Gruppe der invasiven Mammakarzinome (12 Typen) in die Gruppen der epithelial-myoepithelialen Karzinome (2 Typen), der papillären Neoplasien (4 Typen), der seltenen und Speicheldrüsen-ähnlichen Typen (6 Typen) sowie der neuroendokrinen Neoplasien (6 Typen) unterteilt werden. Beispiele für die speziellen histologischen Typen sind das tubuläre Karzinom, das kribriforme Karzinom, das muzinöse Adenokarzinom, das muzinöse Zystadenokarzinom, das invasive mikropapilläre Karzinom, das Karzinom mit apokriner Differenzierung oder das metaplastische Karzinom (WHO Classification of Tumours Editorial Board 2019, Lebeau 2021, Lebeau et al. 2014). Weitere Sonderformen sind der Morbus Paget der Mamille und das inflammatorische Mammakarzinom.

In einer bahnbrechenden Arbeit von Perou und Sørli wurden die Grundlagen für die Klassifikation phänotypisch unterschiedlicher Tumore anhand ihres Genexpressionsmusters geschaffen. Unter Verwendung von cDNA-Microarrays wurden die Genexpressionsmuster an 65 Proben menschlicher Brusttumore von 42 Brustkrebspatientinnen analysiert. Bei den unterschiedlichen Tumoren ließ sich ein charakteristisches molekulares Expressionsmuster nachweisen, das sich in mehreren Proben eines Tumors, auch vor und nach einer chemotherapeutischen Behandlung, sowie in Primärtumor und Metastase als stabil und reproduzierbar erwies (Perou et al. 2000). Auf diese Ergebnisse aufbauend führten weitere Microarray-Analysen zu der Erkenntnis, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des klinischen Verlaufs, des Rezidivrisikos, des rückfallfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens gab (Sørli et al. 2001). Es folgten klinische Studien und Meta-Analysen, die neben der klinischen auch eine therapeutische Relevanz der Unterscheidung in molekulargenetisch definierte Subgruppen zeigten (Albain et al. 2010, EBCTCG 2005). Die gewonnenen Erkenntnisse führten dazu, dass in der Konsensuskonferenz von St. Gallen 2011 eine neue Klassifikation molekularer Subtypen aufgenommen wurde, ergänzt um eine Empfehlung zur adjuvanten Therapie beim jeweiligen Subtyp. Man unterscheidet die vier intrinsischen Typen Luminal A, Luminal B, Her2-positiv und Basal-like. Beim Typ Luminal B unterscheidet man die zwei Untertypen Her2-negativ und Her2-positiv. Der Basal-like Typ zeigt in ca. 80 % eine Überschneidung mit dem immunhistologischen Typ der Triple-negativen Karzinome (TNBC), die zwar ebenfalls Östrogenrezeptor- (ER), Progesteronrezeptor- (PR) und Her2-negativ sind, sich jedoch durch ein histomorphologisch und molekulargenetisch heterogenes Erscheinungsbild vom Basal-like Subtyp unterscheiden. Dieser ist auf molekularer Ebene homogener und durch ein Genexpressionsprofil charakterisiert, das dem der basal-myoepithelialen Zelle entspricht (Goldhirsch et al. 2011).

Table 1: Intrinsische Subtypen bei Mammakarzinom, nach: Konsensuskonferenz St. Gallen 2011
 ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, Her2 = Human epidermal growth factor receptor 2, Ki67 = Kiel-Antigen Nr. 67

Molekulare Subtypen			
Luminal A		ER und/oder PR positiv	Her2 negativ Ki67 niedrig
Luminal B	(Her2 negativ)	ER und/oder PR positiv	Her2 negativ Ki67 hoch
	(Her2 positiv)	ER und/oder PR positiv	Her2 positiv Ki67 niedrig oder hoch
Her2-positiv		ER und PR negativ	Her2 positiv Ki67 niedrig oder hoch
Basal-like		ER und PR negativ	Her2 negativ Ki67 niedrig oder hoch

1.1.4 Diagnostik

Im Rahmen des gesetzlichen Früherkennungsprogrammes haben Frauen in Deutschland ab einem Alter von 30 Jahren einmal im Jahr Anspruch auf eine ärztliche Tastuntersuchung der Brust. Im Alter von 50–69 Jahren erfolgt innerhalb des Mammographie-Screening-Programmes alle zwei Jahre eine Einladung zu einer Röntgenuntersuchung der Brust. Unabhängig von den Früherkennungsuntersuchungen ist es im Rahmen der kurativen Versorgung jederzeit möglich, eine Patientin einem bildgebenden Verfahren wie der Mammasonographie und der Mammographie zuzuführen. Indikation für eine intensivierete Vorsorge wäre zum Beispiel ein auffälliger Tastbefund, eine unklare Mamillensekretion, eine einseitige Mastodynie oder eine positive Familien- bzw. Eigenanamnese für Mamma- oder Ovarialkarzinom. Ergibt sich in der Diagnostik ein abklärungsbedürftiger Befund, schließt man eine histologische Diagnosesicherung mittels einer High-Speed-Stanzbiopsie an. Das histologische Ergebnis wird einem interdisziplinären Tumor-Board vorgestellt und die Patientin einer Therapie zugeführt. In manchen Fällen kann eine weiterführende Diagnostik mittels Magnetresonanztomographie (MRT) der Mamma indiziert sein, zum Beispiel bei sehr dichtem Drüsengewebe, bei lobulärer Histologie oder bei Verdacht auf ein multifokales oder multizentrisches Mammakarzinom. Bei großen Tumoren (> 5 cm), ungünstiger Histologie oder ausgeprägtem Lymphknotenbefall (> 3 befallene LK) kann die Indikation zur Untersuchung auf Metastasen gegeben sein (Harbeck und Gnant 2017). Ein prätherapeutisches Staging ist nur dann indiziert, wenn ein hohes Risiko für Fernmetastasen besteht, die Patientin Symptome für eine Metastasierung zeigt oder eine Indikation zur (neo-)adjuvanten Chemo-/Antikörpertherapie besteht. Zum Staging wird eine Computertomographie (CT) von Thorax/Abdomen und eine Skelettszintigraphie empfohlen. Je nach Befund kann eine weiterführende Diagnostik oder die Durchführung

einer Positronenemissionstomographie (FDG-PET-CT, FDG-PET-MRT) veranlasst werden (Fallenberg und Kühn 2023).

1.1.5 Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms basiert auf den zwei Säulen der lokoregionären Behandlung und der systemischen Therapie. Beide Therapieansätze sind sowohl im kurativen als auch im palliativen Konzept fest verankert. Die charakteristische histopathologische und molekulargenetische Signatur des Tumors nimmt einen entscheidenden Einfluss auf die Art der Behandlung (Harbeck et al. 2019).

Die lokoregionäre Tumorkontrolle erzielt man zum einen durch die chirurgische Intervention, die je nach Größe und Art des Tumors als brusterhaltende oder ablative Therapie erfolgt und durch ein axilläres Staging ergänzt wird. Dieses wird in der Regel in Form einer Wächterlymphknotenentfernung (Sentinel-Node-Biopsie, SLNB) durchgeführt. Im Falle einer Tumorzellinfiltration der ersten im Lymphabflussgebiet des Tumors gelegenen Lymphknoten wird die SLNB gegebenenfalls durch eine Axilladisektion komplettiert, die alternativ durch eine perkutane Radiotherapie der Axilla ersetzt werden kann. Zweite Komponente der lokalen Therapie ist die Strahlentherapie der Brust. Bei brusterhaltender Chirurgie ist eine perkutane Radiatio obligat, die in Hypofraktionierung mit intra- oder postoperativer Dosisaufsättigung des Tumorbettes (Boost) und gegebenenfalls einer Bestrahlung der Lymphabflussgebiete erfolgen sollte (Wöckel et al. 2021).

Für die systemische Behandlung des Mammakarzinoms steht ein weites Spektrum an Therapeutika zur Verfügung, die je nach Tumortyp und -stadium allein oder in Kombination mit anderen eingesetzt werden können. Ihre Anwendung erfolgt postoperativ oder als primär systemische Therapie vor Durchführung einer Operation, z. B. als neoadjuvante Chemotherapie oder als präoperative antihormonelle Therapie mit Aromatasehemmern. Es gibt große Unterschiede zwischen der Behandlung des primären Mammakarzinoms und einer Therapie des Rezidivs bzw. in der metastasierten Situation.

Zur Anwendung kommen in der primären Situation

- eine endokrine Therapie mit Tamoxifen und den nichtsteroidalen Aromataseinhibitoren Exemestan, Anastrozol und Letrozol bei hormonsensitiven Tumoren, ggf. unter Hinzunahme eines GnRH-Analogons bei prämenopausalen Patientinnen,
- eine Chemotherapie bei allen high-risk-Tumoren, triplenegativen Karzinomen, Her2-positiven und nodalpositiven Tumoren,
- eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab oder Pertuzumab bei Her2-Positivität und
- eine knochenstabilisierende Therapie mit Bisphosphonaten, die den Verlust von Knochenmasse unter der Therapie verhindern und der Prävention von Knochen- und anderen Metastasen dienen soll (Wöckel et al. 2021, Harbeck und Gnant 2017).

Zur Behandlung des rezidierten oder metastasierten Mammakarzinoms stehen zusätzliche Medikamente zur Verfügung, die man allein, in Kombination miteinander oder zusätzlich zu einer Chemotherapie einsetzen kann:

- die Antikörper Atezolizumab, Pembrolizumab, Bevacizumab und Sacituzumab,
- der Östrogenrezeptor-Downregulator Fulvestrant,
- die CDK4/6-Inhibitoren Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib,
- der mTOR-Inhibitor Everolimus,
- die PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib,
- der PI3K-Inhibitor Alpelisib und
- die Tyrosinkinaseinhibitoren Lapatinib, Neratinib oder Tucatinib (Bany-Paluchowski et al. 2023).

Ein wichtiges Kriterium für die Auswahl einer adjuvanten Therapie ist die Frage nach einer genetischen Mutation, zum Beispiel einer BRCA1/2- oder PALB2-Mutation für die Auswahl eines PARP-Inhibitors oder einer PIK3CA-Mutation für die Auswahl von Alpelisib. Die Verwendung von antibody-drug-conjugates (ADC) ist ein weiterer neuer und vielversprechender Therapieansatz in der metastasierten Situation. Mit Sacituzumab-Govitecan für das triple-negative Mammakarzinom (ASCENT-Studie) und Trastuzumab-Deruxtecan in der Gruppe der Her2-low-Karzinome (DESTINY-Breast04) haben zwei dieser ADCs im Vergleich zu verschiedenen Standard-Chemotherapien eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens gezeigt (Bardia et al. 2021, Modi et al. 2022).

Als klassische Biomarker spielen die Hormonrezeptoren ER und PR, Ki67 und der Her2-Status weiterhin eine entscheidende Rolle bei der Festlegung der Therapie. Neben diesen etablierten Markern gibt es eine Vielzahl weiterer Biomarker, deren Expression beim Mammakarzinom identifiziert wurde und die seit einigen Jahren im Rahmen von Studien untersucht werden. Da die moderne Brustkrebstherapie zunehmend individualisiert und auf die einzelne Patientin zugeschnitten wird, kann es hilfreich sein, das Spektrum der untersuchten Parameter zu erweitern und diese in die Beurteilung mit einzubeziehen. Wenn durch die Hinzunahme weiterer Biomarker eine Verbesserung der Aussage zur Prognose der Patientin und zur Prädiktion bei Anwendung einer zielgerichteten Therapie erzielt werden kann, wäre das ein weiterer Fortschritt in der Behandlung des Mammakarzinoms.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit basieren auf histologischen Präparaten von Brustkrebsgewebe im Tissue-Micro-Array-Format (TMA), an denen mittels immunhistochemischen Färbungen neben den ‚klassischen‘ Markern ER, PR, Ki-67 und Her2 die Expression der Biomarker Asparagin-Synthetase (ASNS), Forkhead Box Protein M1 (FoxM1), RacGTPase-aktivierendes Protein 1 (RacGAP 1), B-cell lymphoma 2 Protein (BCL2), Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing Protein 5 (BIRC5, Survivin), Phosphohiston H3 (PHH3), Östrogenrezeptor β (ER β) und Androgenrezeptor (AR) analysiert wurde. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

1.2 Biomarker

1.2.1 Asparagin-Synthetase (ASNS)

Asparaginsynthetase (ASNS) ist ein Enzym, das in einer Amidotransferasereaktion unter Verwendung von Adenosintriphosphat (ATP) die Umwandlung von Aspartat und Glutamin in Asparagin und Glutamat katalysiert.

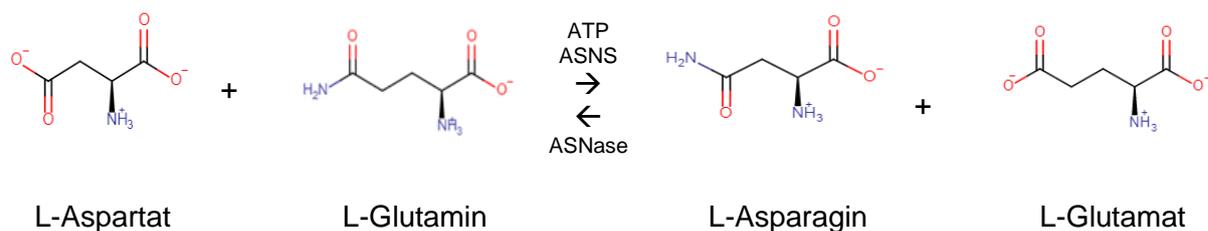


Abbildung 1: Reaktionsgleichgewicht der Amidotransferasereaktion

Es ist in unterschiedlich hoher Expression in nahezu allen menschlichen Organen vorhanden und reagiert auf zellulären Stress durch eine Erhöhung der Transkription über ein einzelnes Gen auf Chromosom 7 (Balasubramanian et al. 2013). Die höchste Proteinexpression kann immunhistochemisch mittels Antikörperreaktion im Zytosol von Pankreaszellen nachgewiesen werden, eine ebenfalls hohe Expression ist in neuronalen, lymphatischen und gastrointestinalen Geweben sowie in den Zellen der weiblichen Geschlechtsorgane zu finden (Pontén et al. 2008). ASNS spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und der Therapie von neurologischen Erkrankungen und von Krebserkrankungen (Lomelino et al. 2017).

Über eine Exom-Sequenzierung bei betroffenen Familien konnte nachgewiesen werden, dass eine autosomal rezessive Mutation im ASNS-Gen zu einer neurologischen

Entwicklungsstörung führt, die mit einer angeborenen Mikrocephalie, mit geistiger Behinderung und fortschreitender cerebraler Atrophie einhergeht (Ruzzo et al. 2013).

Seit langem ist der Einfluss der Asparaginsynthetase auf die akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindesalter bekannt, bei der eine hohe Expression von ASNS über ein vermehrtes Angebot an L-Asparagin und damit einer besseren Nährstoffversorgung die Proliferation von Tumorzellen fördert (Richards und Kilberg 2006). Das klassische Therapieregime der ALL besteht aus einer Kombination von Chemotherapie plus Infusion oder Injektion des bakteriell synthetisierten Enzyms Asparaginase (ASNase), wodurch vorhandenes L-Asparagin zu L-Aspartat umgewandelt wird und damit seine proliferationsfördernde Wirkung auf die Tumorzellen verliert (Pieters et al. 2011). Diese Therapie zeigt eine hohe Wirksamkeit. Für die 20 % der Fälle, bei denen es sich um arzneimittelresistente Leukämien handelt, wäre eine Therapie mit ASNS-Inhibitoren eine mögliche Alternative (Zhu et al. 2019).

In zellbasierten Assays erwies sich bei Verwendung einer ASNase-resistenten humanen ALL-Zelllinie (MOLT-4) das adenylierte Sulfoximin als wirksamer ASNS-Inhibitor mit einer wachstumshemmenden Wirkung auf die MOLT-Zellen (Gutierrez et al. 2006). Der Ansatz, über die Inhibition der ASNS eine Reduktion der nicht-essenziellen Aminosäure L-Asparagin hervorzurufen und damit eine Progression der Krebserkrankung zu verhindern, ist ebenfalls denkbar für weitere Karzinome, bei denen sich hohe ASNS-Spiegel als prädiktiver Marker für schlechtere Prognose und häufigeres Eintreten einer Metastasierung erwiesen haben (Chiu et al. 2020). Hier wären unter anderem das Pankreaskarzinom (Dufour et al. 2012), das Ovarialkarzinom (Lorenzi und Weinstein 2009, Lorenzi et al. 2008) oder das Mammakarzinom (Qin et al. 2020) zu nennen, das Gegenstand der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen ist.

1.2.2 Forkhead Box Protein M1 (FoxM1)



Abbildung 2: FoxM1 (Quelle: RCSB Protein Data Bank)

Das Forkhead Box Protein M1 (FoxM1) gehört zur Familie der Forkhead Transkriptionsfaktoren, die durch eine 100 Aminosäuren lange winged-helix DNA-Bindungsdomäne gekennzeichnet sind (Laoukili et al. 2007) (siehe Abbildung 2). Durch Spleißen entstehen die vier Isoformen A-D, die unterschiedliche Funktionen aufweisen. FoxM1A ist ein im Zytoplasma vorliegender

Gentranskriptionsrepressor, während FoxM1B und C als Transkriptionsaktivatoren fungieren und FoxM1D die Bildung von Metastasen fördern kann. Der Fokus der Forschung liegt auf FoxM1B, da es sich fast ausschließlich um diese Isoform handelt, die sich bei Vorliegen einer Krebserkrankung in Überexpression nachweisen lässt (Gartel 2017).

Methoden wie In-situ-Hybridisierung und immunhistochemische Anfärbung wurden in zahlreichen Studien zur Darstellung von FoxM1 verwendet, um anhand verschiedener Tumorzelllinien, transgener Mäuse und humaner Gewebeproben die Rolle des Transkriptionsfaktors zu untersuchen (Kalin et al. 2011). Durch die Regulation des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase und von der G2- zur M-Phase erfüllt FoxM1 eine wichtige Funktion zur Aufrechterhaltung einer regelrechten Mitose und Zellproliferation (Halasi und Gartel 2013). Seine Transkriptionsaktivität wird durch bi-direktionale Regulationsmechanismen beeinflusst. Wenn diese sich im Gleichgewicht befinden, kann eine normal ablaufende Mitose gewährleistet werden. So fördern cyclinabhängige Kinasen wie Cyclin1/CDK4, CyclinE/CDK2, CyclinA/CDK1, CyclinA/CDK2, CyclinB/CDK1 und weitere Faktoren wie MEK1, Ras und GSK-3 α -Inhibition über eine Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität und damit die Proliferation von Tumorzellen, während andere, auch als Tumorsuppressoren bekannte Proteine wie pRB, p21, p16, p27 und ARF sie hemmen (Song et al. 2017). Im normalen Gewebe wurde FoxM1 nur in geringer Menge nachgewiesen und war assoziiert mit einer ausgeglichenen mitotischen und proliferativen Aktivität. Bei nahezu allen Arten von Karzinomen konnte eine Überexpression von FoxM1 festgestellt werden, die eine vermehrte Proliferation von Tumorzellen zur Folge hatte (Laoukili et al. 2007). Auch für das Mammakarzinom konnte eine Überexpression von FoxM1, eine signifikante Korrelation mit dem prognostisch ungünstigen Protein Her2 und eine Verkürzung des Gesamtüberlebens bei hoher Expression gezeigt werden (Bektas et al. 2008). Aufgrund der entscheidenden Rolle des FoxM1-Signalweges bei der Karzinogenese könnte eine zielgerichtete Inaktivierung von FoxM1 im Sinne einer targeted therapy eine weitere Option bei der Behandlung des Mammakarzinoms darstellen (Wang et al. 2010).

1.2.3 RacGTPase-aktivierendes Protein 1 (RacGAP1)

RacGAP1 gehört zu den Proteinen aus der Rho-Familie der kleinen GTPasen, die grundlegende zellbiologische Prozesse eukaryoter Zellen regulieren und von etwa einem Prozent des humanen Genoms kodiert werden (Jaffe und Hall 2005). Beim Menschen konnten 22 Gene beschrieben werden, die Proteine mit einer GTPase-Domäne verschlüsseln und anhand ihrer Funktion und ihrer primären Sequenz in die fünf Unterfamilien Rho-like, Rac-like, Cdc42-like, Rnd und RhoBTB unterteilt werden. Das in der vorliegenden Studie als Biomarker analysierte RacGAP1 wird der Unterfamilie Rac-like

zugeordnet (Burrige und Wennerberg 2004). Über komplexe biochemische Interaktionen beeinflussen Rho-GTPasen neben ihrer Wirkung auf Zytoskelett und Zelladhäsion nahezu alle zellulären Aktivitäten wie Zellpolarität, Endozytose, vesikuläre Transportwege, Progression des G1-Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Migration und Gentranskription. Die GTPase wirkt dabei wie ein molekularer Schalter, durch dessen Aktivierung mehrere unterschiedliche Signaltransduktionswege koordiniert in Gang gesetzt werden können (Etienne-Manneville und Hall 2002). Die Regulation erfolgt über Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) und Guanin-Nukleotid-

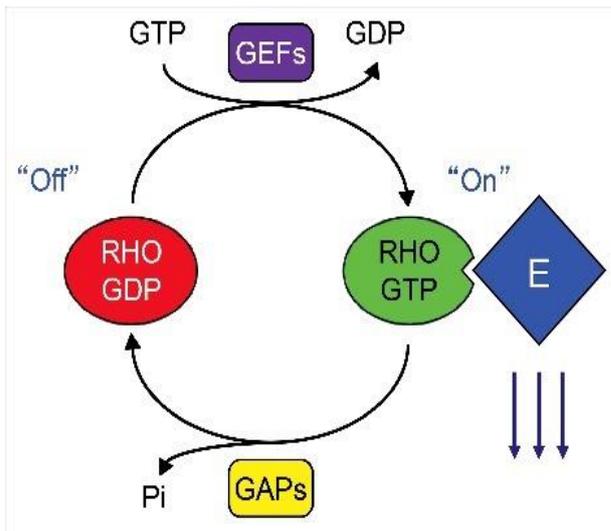


Abbildung 3: RHO GTPasen in ihrer Funktion als Regulatoren von Zellproliferation und -invasion (Quelle: Lawson und Der 2018)

Dissoziationsinhibitoren (GDIs). GEFs aktivieren Rho-GTPasen, indem sie den Austausch eines gebundenen GDP-Moleküls gegen GTP katalysieren. GAPs führen diese Proteine in einen inaktiven, GDP-gebundenen Zustand zurück, indem sie die intrinsische GTPase-Aktivität von Rho-Proteinen stimulieren. GDIs sorgen für das Vorhandensein von inaktiven GTPasen im Zytosol, die nach Bindung an die zelluläre Membran über einen Nucleotidaustausch in die aktivierte Form transferiert werden und

so als aktive Rho-GTPase ein Signal an zahlreiche Effektoren (E) senden können (s. Abbildung 3). Über diese Signalwege spielen die zur Ras-Superfamilie gehörenden Rho-GTPasen eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Zellproliferation und -invasion, die ihre Beteiligung an der Tumorgenese erklärt (Lawson und Der 2018).

Primär konnte ein Effekt von RacGAP1 auf das Wachstum und die Differenzierung hämatopoetischer Zellen beobachtet werden. Es folgten weitere Untersuchungen, in denen eine Überexpression von RacGAP1 beim Vorliegen von Blasenkrebs, Darmkrebs, Magenkrebs, Uterussarkom und Ovarialkarzinom nachgewiesen wurde. Dadurch wurde eine mögliche Rolle bei der Entstehung und Progression maligner Tumore vermutet (Wang et al. 2018). Diese Annahme konnte in einer großen Multiomics-Analyse verifiziert werden. An einer Vielzahl unterschiedlicher menschlicher Malignome ($n = 33$) wurde die RacGAP1-Gen- und Proteinexpression untersucht. Für alle dieser unterschiedlichen Krebsarten wurde eine Überexpression von RacGAP1 und damit verbunden eine schlechtere Prognose der Patienten festgestellt. Die Untergruppe der Patientinnen mit Mammakarzinom zeigte eine signifikante Verschlechterung des rezidiv- und metastasenfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens ($p < 0,001$) (Eid et al. 2022).

Forschungen am Mammakarzinom ergaben ebenfalls eine Korrelation zwischen der Hochregulierung von RacGAP1 und Tumorwachstum bzw. Prognose der Patientin. Lawson und Der analysierten RNA-Seq-Daten des Cancer Genome Atlas Projektes (TCGA) von 1201 menschlichen Mammatumoren verschiedener Subtypen auf die Expression aller RHO GTPase-, GEF-, GAP- und GDI-Gene. Das Ergebnis war, dass besonders die basalen Mammakarzinome (basal-like breast cancer, BLBC) eine hohe Expression an onkogenen RhoGAP-Genen aufwiesen. Daher untersuchten sie die am stärksten hochregulierten RhoGAPs ARHGAP11A und RacGAP1 in menschlichen Brustkrebs-Zelllinien und konnten bestätigen, dass entsprechend der erhöhten mRNA-Expression im Tumorgewebe auch die Proteinexpression dieser beiden GAPs in den BLBC-Zelllinien höher war als in den Zelllinien der anderen Subtypen (Lawson und Der 2018).

Eine neuere Studie beschreibt den Mechanismus, der zur Upregulation von RacGAP1 und damit zu einer schlechteren Prognose beim Mammakarzinom führt. Es konnte gezeigt werden, dass die lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) RacGAP1P, das Pseudogen von RacGAP1, im Brustkrebsgewebe überexprimiert war (Zhou et al. 2021). Pseudogene gelten als Relikte von Elterngenen, die basierend auf der Sequenzhomologie eine ähnliche biologische Funktion wie diese erfüllen können. Sie haben eine definierte Rolle im regulatorischen Netzwerk der Genexpression und sollten daher wie "echte" Gene betrachtet werden (An et al. 2017). Die Studie von Zhou et al. (2021) umfasste drei voneinander unabhängige Kohorten von Patientinnen: 1) fünf Proben von aktuell operativ gewonnenem Mammakarzinomgewebe nebst benachbartem, nicht tumorbehaftetem Gewebe 2) 25 gepaarte Proben von 2011/2012 (beide bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert) und 3) 102 formalinfixierte paraffineingebettete (FFPE) Brustkrebsgewebeproben aus dem Jahr 2008. Zusätzlich wurden weiblichen Nacktmäusen acht Brustzelllinien (normale Brustepithelzelllinie und Brustkrebszelllinien) injiziert, nach acht Wochen die Organe entnommen und histologisch untersucht. Die Analyse erfolgte für Kohorte 1 mittels Transkriptom-Microarray-Analyse, für Kohorte 2 und 3 sowie für die Zelllinien mittels quantitativer real-time-PCR (qRT-PCR). Im Ergebnis war eine eindeutige Überexpression von RacGAP1P beim Mammakarzinom nachzuweisen, die mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, dem TNM-Stadium und einer schlechteren Prognose korrelierte. Auf zellulärer Ebene wird eine kompetitive Bindung von RacGAP1P an die tumorsuppressive Mikro-RNA miR-245-5p angenommen, wodurch das freiwerdende RacGAP1 über den Drp1-Signalweg (Dynamamin-1-ähnliches Protein) die mitochondriale Spaltung fördert und damit das invasive und metastatische Potenzial von Brustkrebszellen erhöht (s. Abbildung 4). RacGAP1 hat sich als effektiver Biomarker für die Prognose von Brustkrebspatientinnen erwiesen (Zhou et al. 2021).

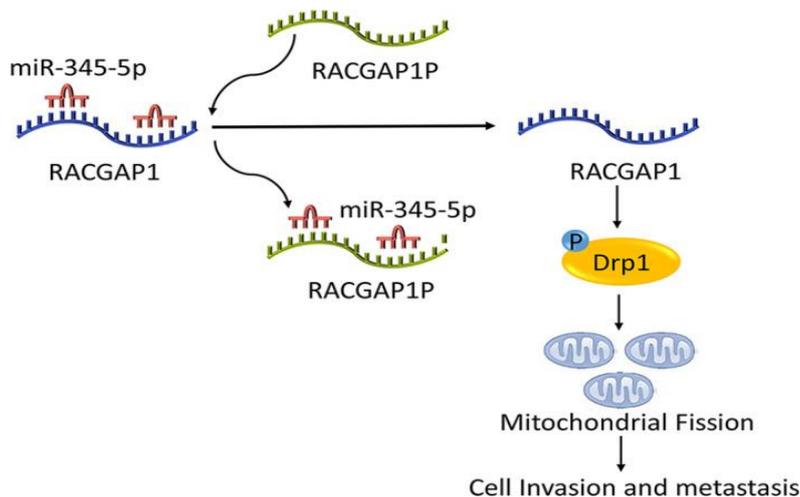


Abbildung 4: Möglicher Mechanismus von RacGAP1P bei Brustkrebsinvasion und Metastasierung (Quelle: Zhou et al. 2021)

1.2.4 B-cell lymphoma 2 Protein (BCL2)

Die Proteine der BCL2-Familie gelten als elementare Regulatoren der Apoptose. Dieser auch als kontrollierter oder programmierter Zelltod bezeichnete physiologische Prozess trägt maßgeblich zur Homöostase bei, indem er dem Organismus die Möglichkeit gibt, beschädigte oder infizierte Zellen zu eliminieren und auf diese Weise einen gesunden und funktionsfähigen Zustand aufrecht zu erhalten. Bisher wurden etwa 25 verschiedene Arten von BCL2-Proteinen identifiziert, die anhand ihrer Funktion in anti-apoptotische Proteine wie BCL2, BCLxL, BAXx, BCLw, A1, MCL1 und pro-apoptotische Proteine wie BAK, BAX, BID, BIM, BAD, PUMA, NOXA, HRK, BIK klassifiziert werden. Die pro-apoptotischen BCL-2-Proteine werden in die Untergruppen Effektorproteine (BAK, BAX) und BH3-only-Proteine unterteilt. Letztere zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Unterschied zu den übrigen Proteinen, die zwischen einer und vier BCL2-Homologiedomänen (BH1-4) enthalten, nur

eine einzige BCL2-Homologiesequenz (BH3) besitzen und als essenzielle Initiatoren des mitochondrialen apoptotischen Signalweges gelten (Chipuk et al. 2010).

Man unterscheidet zwei Hauptwege der Apoptose, den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg (s. Abbildung 5). Beim extrinsischen Weg binden apoptoseinduzierende Liganden wie Fas-Liganden, TNF α oder TRAIL an Membranrezeptoren und

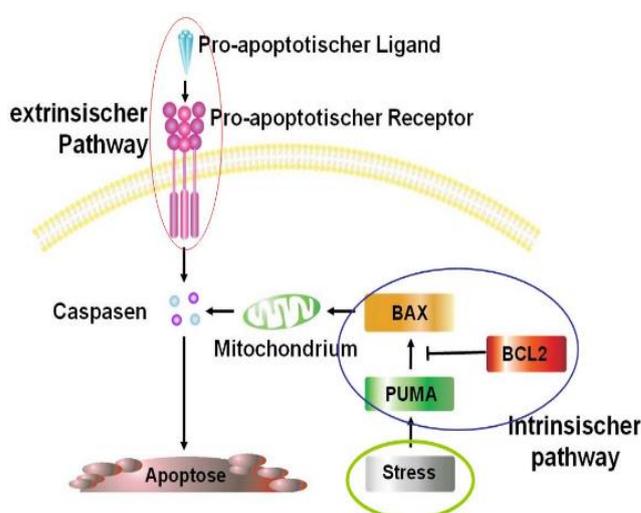


Abbildung 5: Der extrinsische und der intrinsische apoptotische Signalweg (Quelle: Courts 2013)

verursachen über die Aktivierung einer Caspase-Kaskade den Zelltod. Beim intrinsischen, über Mitochondrien regulierten Weg werden infolge von zellulärem Stress, Zellschäden oder Wachstumsfaktorenentzug pro-apoptische BCL2-Proteine aktiviert und über die Freisetzung von Faktoren wie Cytochrom c und AIF die Apoptose initiiert. Beide apoptotischen Pfade konvergieren in einem gemeinsamen Ausführungsweg, der mit der Aktivierung der exekutiven Caspasen -3, -6 und -7 beginnt und über die Aktivierung zytoplasmatischer Endonukleasen und den Abbau von Zytoskelettproteinen und PARP in der Degeneration der apoptotischen Zellen endet (Siddiqui et al. 2015).

Neben seiner Rolle bei der Apoptose ist eine weitere Funktion von BCL2 als Regulator der Zellzykluskontrolle bekannt. Untersuchungen an Zelllinien ergaben, dass BCL2 die Zellzyklusphase G0 (Ruhephase) verlängert, wodurch die Progression von G1 und der Übergang von G1- zu S-Phase verzögert wird und eine Wachstumshemmung eintritt. Die Hemmung der Apoptose wirkt onkogen, wohingegen die Förderung des Zellzyklusstillstands eine Tumorsuppression bedeutet. Beide Vorgänge sind miteinander gekoppelt und werden von den Mitgliedern der BCL2-Familie in einem komplexen und kontextabhängigen Vorgang reguliert. Es wurde beobachtet, dass einige der BCL2-Proteine einen onkogenen Effekt hatten, andere einen antionkogenen, und wieder andere konnten je nach Zelltyp und genetischem Kontext den Verlauf in die eine oder in die andere Richtung beeinflussen (Zinkel et al. 2006). Die Fragestellung, ob es sich bei der strukturell und funktionell inhomogenen Gruppe der BCL2-Proteine um Onkogene oder um Tumorsuppressoren handelt, kann also nicht abschließend beantwortet werden. Schon früh konnte in einem in-vitro-Versuch mit soliden Tumorzelllinien sowohl ein wachstumsfördernder als auch ein wachstumshemmender Effekt von BCL2 beobachtet werden, je nachdem in welchem zellulären Kontext und an welchem Zelltyp die Untersuchung durchgeführt wurde (Pietenpol et al. 1994).

Bezogen auf das Mammakarzinom existiert eine Vielzahl von Studien, in denen sich BCL2 als unabhängiger prognostischer Marker erwies, dessen Überexpression mit einer Verbesserung der Prognose korrelierte. So war in einer Meta-Analyse von 12 Studien an insgesamt 5000 Patientinnen mit invasivem Brustkrebs im Alter von ≥ 65 Jahren eine erhöhte BCL2-Expression nachzuweisen und mit einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens verbunden (Parks et al. 2021). Der Stellenwert von BCL2 als Regulator des apoptotischen Signalweges macht das Protein zu einer vielversprechenden Option für eine zielgerichtete Therapie und Chemoprävention. Der Fokus der Untersuchungen liegt derzeit auf dem BH3-Mimetikum Venetoclax, welches in der Diskussion ausführlich erläutert wird (Lok et al. 2019, Alhoshani et al. 2020, Young et al. 2022).

1.2.5 Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing Protein 5 (BIRC5, Survivin)

Neben der BCL2-Familie gibt es eine weitere Genfamilie, die maßgeblich an der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Ihre Gene codieren für die Gruppe der Inhibitor-of-Apoptosis Proteine (IAP), von denen acht verschiedene Typen beim Menschen identifiziert wurden. Ein Mitglied dieser Familie ist BIRC5, auch Survivin genannt, das mit 142 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 16,5 kDa das kleinste der Apoptoseinhibitor-Proteine ist.

Die IAPs sind durch das Vorliegen mindestens einer N-terminal gelegenen Baculovirus-IAP-Repeat-Domäne (BIR-Domäne) definiert. Diese auch als Zinkfingerdomäne bezeichnete Falte entsteht durch Bindung eines oder mehrerer Zinkionen an das Protein, wodurch eine charakteristische fingerförmige Schleifenbildung der Polypeptidkette zustande kommt. Im intrinsischen apoptotischen Signalweg sind die IAPs dem BCL2 nachgeschaltet und wirken als endogene Inhibitoren von Caspasen, welches zu einer Hemmung des programmierten Zelltodes führt (Altieri 2003).

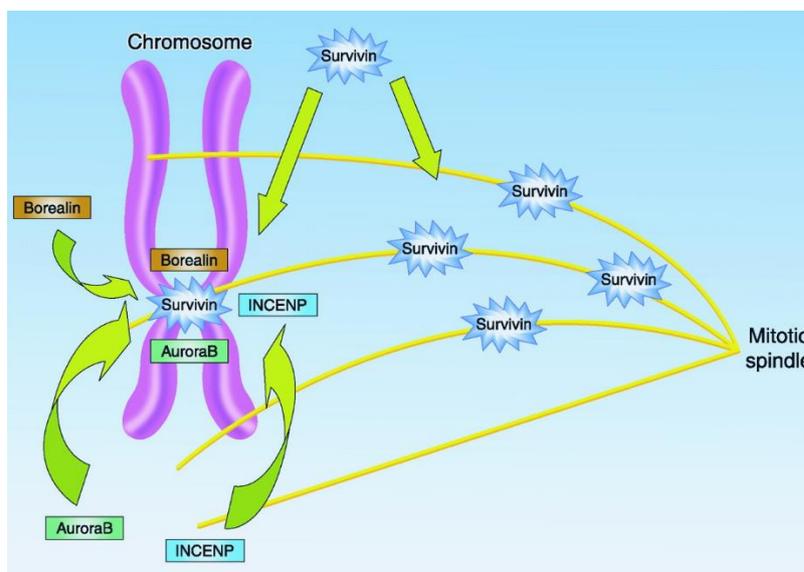


Abbildung 6: Die Bildung des chromosomalen Passagierkomplexes und die Funktion von Survivin bei der Mitose (Quelle: Mita et al. 2008)

Survivin ist ein eukaryotes Protein, das nur von aktiv proliferierenden Zellen exprimiert wird und in nahezu allen Krebsarten hochreguliert zu finden ist. Seine karzinogene Wirkung kommt über zwei verschiedene Wege zustande: die Hemmung der Apoptose und seine essenzielle Rolle bei der Zytokinese. Ohne eigene enzymatische Aktivität

geht es wie eine Art Adapterprotein während der Zellteilung in Interaktion mit anderen Proteinen. Während der Mitose bildet Survivin zusammen mit Aurora-B-Kinase, Borealin und dem inneren Zentromerprotein (INCENP) den als Hauptkontrolleur der Zellteilung bezeichneten chromosomalen Passagierkomplex (CPC) und trägt so zu einer korrekten Ausrichtung der Chromosomen vor der Trennung in der Anaphase bei (s. Abbildung 6). Über sein C-terminales spiralförmiges Ende bleibt Survivin bis zum Metaphasen-Anaphasen-Übergang an den Zentromeren gebunden, bevor es zu den Mikrotubuli und dem äquatorialen Kortex wandert und die Spaltungsebene abgrenzt. Über die Aktivierung von Kinasen und diverse andere, zum Teil noch unvollständig aufgeklärte Signalwege ist

Survivin an der Regulation zahlreicher weiterer zellulärer Prozesse wie Zellmetabolismus, Autophagie, Migration und Angiogenese beteiligt, was seine Rolle bei der Entstehung von Krebs und Metastasen plausibel macht (Wheatley und Altieri 2019).

In Bezug auf die Relevanz von Survivin als Biomarker zur Risikobewertung bei Mammakarzinompatientinnen gab es in der Vergangenheit widersprüchliche Ergebnisse. Während eine Studie eine höhere Expression von nukleärem BIRC5 als unabhängigen und günstigen prognostischen Faktor in Bezug auf das rezidivfreie Überleben (RFS) und das Gesamtüberleben (OS) ermittelte (n = 293, IHC) (Kennedy et al. 2003), konnte eine andere BIRC5 als starken und unabhängigen, prognostisch ungünstigen Marker darstellen (n = 275, RT-PCR) (Span et al. 2004). Eine neuere schwedische Studie mit einer größeren Fallzahl kam zu dem Resultat, dass eine höhere Expression von BIRC5 bei Brustkrebspatientinnen mit einer schlechteren Prognose korrelierte (n = 6503) (Oparina et al. 2021).

Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen zur Behandlung des Mammakarzinoms lieferte die Anwendung des Survivin-Suppressors Sepantroniumbromid (YM155) unter Studienbedingungen vielversprechende Hinweise, dass eine medikamentöse Aktivierung des apoptotischen Signalweges mit einer Verbesserung der Prognose und einer Verminderung der Metastasierung einhergehen könnte (Yamanaka et al. 2011). In neueren Untersuchungen werden weitere Therapieansätze überprüft (Li et al. 2019).

1.2.6 Histon H3 (HH3)

Histone sind basische Proteine, die in eukaryoten Zellen der Verpackung und Verdichtung von DNA im Zellkern dienen. Dazu bilden jeweils zwei Moleküle der vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 ein Histon-Oktamer, das von einer 147 bp (Basenpaare) langen DNA umwickelt wird. Dieser als Nukleosom-Kernpartikel (NCP) bezeichnete Verbund bildet zusammen mit einer 20-90 bp langen Verbindungs-DNA und dem Verbindungshiston H1 das Nukleosom. Über die Verbindungs-DNA werden die Nukleosomen zu einer perlschnurartigen Kette verknüpft und bilden durch Verdichtung und spirale Aufwicklung die Chromatinfäden. In dem als DNA-Kondensation bezeichneten Vorgang werden die langen DNA-Doppelhelices um das 10.000- bis 50.000-fache verkürzt und finden so als Chromosomen im Zellkern Platz (Ray-Gallet und Almouzni 2021).

Von allen Histonen existieren mehrere Varianten, die sich geringfügig in ihrer Funktion, ihrer Stabilität, ihrer Modifikation und ihrer Interaktion mit Enzymen und anderen Proteinen unterscheiden (Talbert und Henikoff 2021). Die Bindung der DNA an Histone erfolgt über die hoch konservierten C-terminalen Histonfalten-Domänen, während die N-terminalen, für die Nukleosombildung unerheblichen Histonschwanz-Domänen frei aus dem Nukleosom herausragen. Sie sorgen für die Chromatinstabilität und sind der Ort, an dem in Form von

Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung die posttranslationale Modifikation (PTM) stattfindet (Hans und Dimitrov 2001).

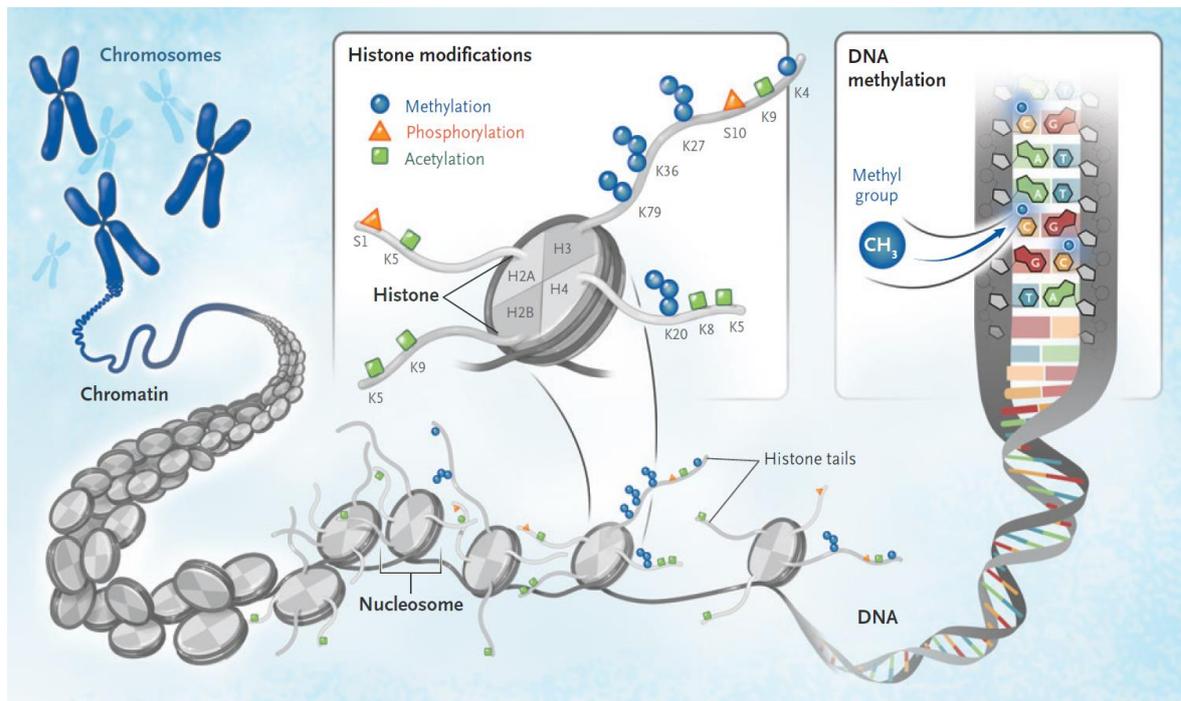


Abbildung 7: Aufbau des Chromatins, Histonmodifikation und DNA-Methylierung (Quelle: Bates 2020)

DNA-Methylierung und posttranslationale Histonmodifikation sind epigenetische Prozesse, die durch eine Veränderung der Chromatinelemente zur Entwicklung und Progression von Karzinomen beitragen können (s. Abbildung 7). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sich durch unterschiedliche Histonmodifikationen die Prognose von Brustkrebs und anderen Krebsarten vorhersagen lassen kann (Chervona und Costa 2012, Elsheikh et al. 2009). Auch unter therapeutischem Aspekt sind Histonmodifikationen aktuell von großem Interesse. Die Forschung an epigenetisch wirksamen Therapeutika hat zur Zulassung von derzeit neun Medikamenten zur Behandlung von Leukämien, Lymphomen und des myelodysplastischen Syndroms geführt, etliche weitere sind in der Entwicklung (Bates 2020).

Eine spezielle Histonmodifikation hat als Proliferationsmarker bei Mammakarzinomen in jüngster Zeit besondere Beachtung erfahren: das Phosphohiston H3 (PHH3), auch Histon H3 genannt (HH3). Es entsteht bei der PTM durch Phosphorylierung an Serin-10 und Serin-28 und spielt während Mitose und Meiose eine wichtige Rolle bei der Chromosomenkondensation und der Zellzyklusprogression (Kim et al. 2017). Durch immunhistochemische Anfärbung mit PHH3-Antikörpern lassen sich mitotisch aktive Zellen zuverlässig darstellen. Eine hohe Korrelation mit dem Mitoseindex (MI), der in der Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung ermittelt wird und neben Zellkernpolymorphie und tubulärer Differenzierung in das histologische Grading eingeht und dem

immunhistochemischen Proliferationsmarker Ki67 konnte gezeigt werden (Cui et al. 2015). Die Antikörpermarkierung von PHH3 hat den Vorteil, dass keine apoptotischen oder nekrotischen Zellen angefärbt werden, die in der Routineuntersuchung leicht mit mitotischen Zellen verwechselt werden können. Eine niedrige Interobserver-Variabilität macht PHH3 zu einem stabilen und gut reproduzierbaren Biomarker (Klintman et al. 2013).

1.2.7 Östrogenrezeptor β (ER β)

Östrogenrezeptoren (ER) sind Steroidhormonrezeptoren, die zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren (NR3A) gehören und als ligandenabhängige Transkriptionsregulatoren an verschiedensten physiologischen und pathogenetischen Prozessen beteiligt sind (Laudet et al. 1999). Lange Zeit war nur die Existenz eines einzigen, später als ER α benannten Östrogenrezeptors bekannt (Jensen et al. 1968), bis die Forschung an Gewebe von Prostata und Ovarien der Ratte einen weiteren ER, den ER β hervorbrachte (Kuiper et al. 1996). Während ER β noch keinen Einzug in die klinische Routinediagnostik gehalten hat, ist ER α ein etablierter Marker, der standardisiert in die Klassifikation des Mammakarzinoms eingeht und einen Beitrag zur Einschätzung der Prognose leistet. Anhand seines Expressionsstatus wird über Anwendung einer möglichen adjuvanten endokrinen Therapie entschieden.

Östrogenrezeptoren gehen eine ligandenabhängige Bindung mit den „estrogen response elements“ (ERE) ihrer Zielgene ein und regulieren dadurch die Transkription. ER α und ER β stimmen in einigen Bereichen ihrer sechs funktionellen Domänen (A – F) überein, der Grad an Übereinstimmung ist jedoch prozentual verschieden (s. Abbildung 8). Die N-terminale A/B-Region enthält die AF-1-Domäne (activation function 1), die über Interaktion mit anderen nukleären Proteinen für die Transkriptionsaktivität verantwortlich ist. Sie ist die Zielregion des MAP-Kinase-Regulationsweges (Mitogen aktivierte Proteinkinase) und stellt am Rezeptor eine Verknüpfung zwischen Steroidhormonen und der Signalvermittlung durch Wachstumsfaktoren her. Die AF-1-Domäne ist gering konserviert und weist mit 30 % eine geringere Übereinstimmung auf als andere Bereiche des Proteins, das bei ER α aus 595 Aminosäuren (AS) und bei ER β 1 aus 530 AS aufgebaut ist. Die hoch konservierte C-Region ermöglicht die Erkennung und Bindung von DNA und wird auch als DNA-Bindungsdomäne (DBD) bezeichnet. Die D-Region ist die Dimerisierungsregion, die eine Verbindung zwischen C- und E-Region herstellt. Die E-Region entspricht der Ligandenbindungsdomäne (LBD), die teilweise von der AF-2-Domäne am C-Terminus des Proteins überlappt wird. Über die LBD findet die Bindung des Rezeptors an seinen Liganden Östradiol statt. Dies führt zu einer Konformationsänderung der LBD und einer nachfolgenden Aktivierung des Rezeptors mit gesteigerter Transkription der Zielgene. Agonisten und Antagonisten binden an derselben Stelle im Zentrum der LBD, führen jedoch

zu unterschiedlichen Konformationsänderungen der AF-2-Domäne, was ihre gegensätzliche Wirkung erklären könnte (Mitter et al. 2005). Die Funktion der kurzen, wenig konservierten C-terminalen F-Region weist eine geringe Sequenzhomologie mit ER α auf und ist bis heute nicht vollständig geklärt (Sellitto et al. 2020).

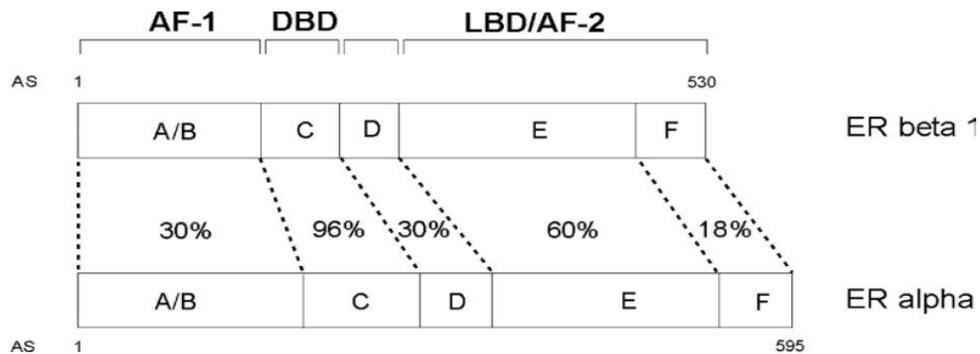


Abbildung 8: Vergleichsdarstellung der Proteinstruktur von ER β und ER α . ER β 1 besteht aus 530 Aminosäuren (AS), ER α aus 595 AS. Funktionelle Domänen A bis F sind mit dem Grad an prozentualer Übereinstimmung schematisch dargestellt. AF-1 = activation function 1; DBD = DNA-Bindungsdomäne; LBD = Ligandenbindungsdomäne; AF-2 = activation function 2 (Quelle: Mitter et al. 2005)

Es existiert eine Vielzahl von ER β -Isoformen, die in unterschiedlichem Maße in benignem und malignem Gewebe exprimiert werden und sich verschiedenartig auf die Transkription auswirken. Die ER β -Isoformen unterscheiden sich hauptsächlich am C-Terminus und sind mit den gängigen Antikörpern, die auf die N-terminale Region abzielen, immunhistochemisch nicht zu differenzieren (Mitter et al. 2005). Die Existenz verschiedener Isoformen und eine weiterhin nicht optimale Spezifität von ER β -Antikörpern könnten erklären, warum Studien zu ER β bis heute zum Teil widersprüchliche Resultate ergeben (Sellitto et al. 2020).

1.2.8 Androgenrezeptor (AR)

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor aus der Familie der Steroidhormonrezeptoren, zu der neben AR und Östrogenrezeptor (ER) auch der Progesteronrezeptor (PR), der Glukokortikoidrezeptor (GR) und der Mineralokortikoidrezeptor (MR) zählen. Sie alle gehören zur Überfamilie der Kernrezeptoren, in deren Nomenklatur der AR die systematische Bezeichnung NR3C4 trägt (Laudet et al. 1999). Der AR hat einen Einfluss auf die Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale, auf Fertilität und Leistungsfähigkeit und kann an der Entstehung von Brust- und Prostatakrebs beteiligt sein (Pietri et al. 2016). Analog zu anderen Steroidhormonrezeptoren lässt sich das 919 AS lange Protein in die sechs Abschnitte A – F und in vier funktionelle Domänen unterteilen. Die im N-terminalen

Abschnitt befindliche AF-1-Domäne spielt über eine Assoziation mit Wachstumsfaktoren und Phosphorylierung eine zentrale Rolle bei der Transkription. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist für die DNA-Erkennung und Dimerisierung verantwortlich und für die Bindung des AR an die androgen-responsiven Elemente (ARE) der Zielgene. Über eine variable Übergangsdomäne, auch hinge-Domäne genannt, wird die DBD mit der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD) verbunden. An dieser Stelle findet die Bindung des AR an die spezifischen Liganden Testosteron und Dihydrotestosteron statt. Hier ist auch die AF-2-Domäne lokalisiert, die für die volle Aktivierung des Rezeptors wichtig ist (Narayanan et al. 2018).

Ohne die Anwesenheit von Liganden befindet sich der AR in einem an Hitzeschockproteine (HSP) oder andere Chaperone gebundenen, nicht aktivierten Zustand im Zytoplasma der Zelle. Sobald Androgene oder Androgeninhibitoren im Zytoplasma vorliegen und an den AR binden, wird das HSP abgelöst und der an den Liganden gebundene AR in den Zellkern transferiert. Dort bindet die DNA-Bindungsdomäne an das androgenresponsive Element der Ziel-DNA und der Androgenrezeptor-Signalweg wird initiiert (s. Abbildung 9). Dieser auch als genomisch bezeichnete Weg wird durch Interaktion mit diversen weiteren Proteinen und Kinasen und mit nicht-genomischen Signalwegen wie zum Beispiel dem PI3K/Akt/mTor- oder dem MAPK-Signalweg reguliert (Kono et al. 2017, Sukocheva et al. 2015).

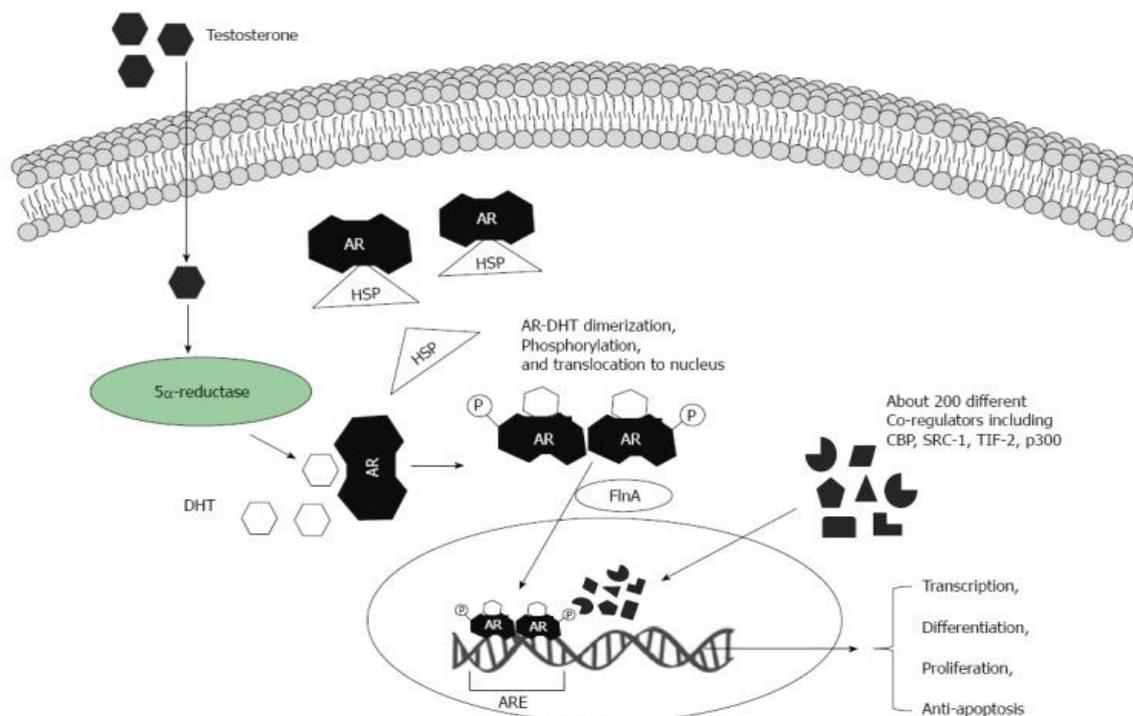


Abbildung 9: Wirkung von Androgenen über Androgenrezeptoren (Quelle: Sukocheva et al. 2015)

Der Androgenrezeptor wird bei 70-90 % aller Brustkrebsfälle nachgewiesen und variiert in seiner Expression zwischen den einzelnen Subtypen. Die Bandbreite der Ergebnisse

verschiedener Untersuchungen lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass es bis heute keinen einheitlich definierten Grenzwert für die Positivität von AR gibt. In der Regel korreliert die Expression des AR mit ER α und PR, die Prävalenz des AR ist bei ER α -positiven Mammakarzinomen höher als bei ER α -negativen (74,8 % vs. 31,8 % der Fälle). In mehreren Studien wurde erwiesen, dass das gleichzeitige Vorliegen von ER+ und AR+ zu besseren klinischen Ergebnissen führte als ER- und AR+ (Anestis et al. 2020, Kono et al. 2017). Die Patientinnen hatten eine längere Gesamtüberlebenszeit (OS) und rezidivfreies Überleben (RFS) und zeigten günstigere klinisch-pathologische Merkmale wie ein niedrigerer Tumorgrad und Nodalnegativität. Die Ursache dafür könnte sein, dass bei ER-positivem Brustkrebs der AR mit dem ER um die Bindung an die östrogen-responsiven Elemente (ERE) der DNA konkurriert und dadurch die östrogenvermittelte Transkription stört, was zur Apoptose der Krebszelle führt. Bei ER-Negativität und Fehlen eines ERE bindet der AR an das ARE, was wiederum zu Zellproliferation und Tumorwachstum führt. Dies wäre eine Erklärung für die Doppelrolle des AR als Suppressor und als Induktor der Tumorprogression (Anestis et al. 2020).

Die Studienlage liefert zu jedem dieser acht Biomarker stichhaltige Hinweise für eine Relevanz beim Mammakarzinom. Für jeden Marker liegen umfangreiche Erkenntnisse zur Interaktion von Signalwegen, zu einer gegenseitigen Verstärkung oder Abschwächung und zu einem kontextabhängig ambivalenten Wirkmechanismus vor. Daraus lässt sich schließen, dass nicht die Identifikation eines einzelnen Rezeptors oder Proteins für eine Aussage zur Prognose und für die Auswahl einer Tumorthherapie ausschlaggebend ist. Vielmehr könnte der Nachweis, in welcher Konstellation einzelne Marker miteinander vorliegen und auf welche Weise sie im jeweiligen Kontext interagieren, entscheidend für die Entwicklung individualisierter Therapien sein und zu einer Verbesserung der prognostischen Einschätzung und der Prädiktion für das Ansprechen einer Therapie beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In die vorliegende Studie wurden initial 3131 Patientinnen aufgenommen, bei denen zwischen April 1997 und September 2014 ein primäres unilaterales Mammakarzinom diagnostiziert wurde. Über eine mediane Nachbeobachtungszeit von 8,58 Jahren (0,10 bis 15 Jahre) erhielten die Patientinnen jeweils in den Jahren 2008, 2011, 2015 und 2020 einen Fragebogen, in dem sie zu ihrer Behandlung und nach Ereignissen befragt wurden. Als Ereignis wurde das Auftreten von Metastasen und das Versterben einer Patientin betrachtet und in die Auswertung aufgenommen. Vor Beginn der Datenerhebung hatten alle Patientinnen ihre Einverständniserklärung abgegeben. Im Verlauf haben 5 Frauen ihre Einwilligung zur Studienteilnahme widerrufen, so dass sie aus der Analyse herausgenommen wurden und somit 3126 Fälle ausgewertet werden konnten. Vor Studienbeginn wurde das positive Votum der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg eingeholt (PV 2946).

2.2 Untersuchungsgut

Aus dieser umfangreichen Tumordatenbank der Pathologie Hamburg-West (MVZ Prof. Dr. med. A. Niendorf, Pathologie Hamburg-West GmbH, Institut für Histologie, Zytologie und molekulare Diagnostik) wurden 34 Tissue Microarrays (TMAs) mit jeweils bis zu 104 Gewebeprobe von den oben genannten 3131 Patientinnen mit Mammakarzinom hergestellt. An diesem Material wurde mittels immunhistochemischer Anfärbung die Expression der Biomarker Asparagin-Synthetase (ASNS), Forkhead Box Protein M1 (FoxM1), RacGTPase-aktivierendes Protein 1 (RacGAP 1), B-cell lymphoma 2 Protein (BCL2), Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing Protein 5 (BIRC5, Survivin), Histon H3 (HH3), Östrogenrezeptor β (ER β) und Androgen Rezeptor (AR) analysiert. Zur Anfärbung wurden die folgenden spezifischen Antikörper verwendet:

Tabelle 2: Biomarker und zur Anfärbung verwendete Antikörper

Färbung	Antikörper	Hersteller
ASNS	mouse monoclonal Asparagine synthetase (G-10)	Santa Cruz
FoxM1	mouse monoclonal FOXM1 Antikörper (G-5)	Santa Cruz
RacGAP1	mouse monoclonal RACGAP1 antibody (1G6)	Abnova
BCL2	mouse monoclonal BCL2 Oncoprotein (Clone 124)	Dako
BIRC5	mouse monoclonal Survivin Antikörper (D-8)	Santa Cruz
HH3	rabbit polyclonal Phospho-Histone H3 (PP404AA)	Biocare/Zytomed

ERβ	mouse monoclonal Anti-Estrogenreceptor beta antibody (14C8)	Abcam
AR	mouse monoclonal Androgen receptor (AR441)	Dako/Zytomed

Zusätzlich zu diesen spezifischen Antikörpermarkierungen wurde die Markierung der etablierten Biomarker ER (clone SP1), PR (SP42), Her2 (EP3) und Ki67 (K-2), eine HE-Färbung und bis zu acht weitere Anfärbungen, die nicht Bestandteil dieser Studie sind, durchgeführt. Die HE-Färbung wurde nach Standardprotokoll mit dem linearen Färbeautomaten Leica ST4040 durchgeführt.

Die Selektion der Patientinnen zur Erstellung der einzelnen TMAs erfolgte nach histopathologischen und klinischen Kriterien wie zum Beispiel Tumortyp, Grading, Tumorstadium, Nodalstatus, Alter der Patientin oder Art der Therapie. Für die meisten Auswahlkriterien lassen sich mehrere TMAs zu einer Mottogruppe zusammenfassen. Eine Mottogruppe besteht aus einer Anzahl von 2-6 TMAs, die nach einem determinierenden Hauptkriterium selektiert wurden und deren klinisch-pathologische Begleitkriterien identisch bzw. nahezu identisch oder irrelevant sind.

2.3 Tissue Microarray (TMA)

Für die Herstellung eines Objektträgers im Tissue Microarray-Format werden einer Anzahl von ca. 100 formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeblöcken, den sogenannten Donor-Blöcken, jeweils eine zylindrische Stanzbiopsie von 1,2 mm Durchmesser entnommen. Diese werden in einen vorgebohrten Paraffinblock, den Rezipienten, eingebracht. Die Anordnung der Bohrkerne in Reihen erfolgt asymmetrisch und der Abstand zwischen den Kernen ist nicht größer als der Durchmesser der Biopsie, damit sich der Untersucher bei der Durchsicht der Präparate gut orientieren kann. Vom Empfängerblock können bis zu 200 Schnitte von ca. 4 μ m Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgebracht werden. Jeder dieser Objektträger enthält Gewebe derselben Patientin an identischer Position, so dass die Lokalisation über ein Koordinatensystem erfolgen kann (Saxena und Badve 2021).

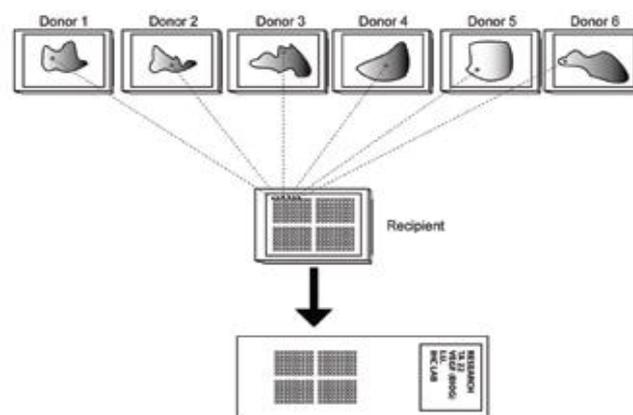


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus von Tissue Microarrays (aus: Saxena und Badve 2021)

Die sorgfältige Auswahl des aus dem Donorblock entnommenen Gewebezylinders durch einen erfahrenen Pathologen ist essenziell, um ein aussagekräftiges Studienergebnis zu erhalten. Ein großer Vorteil der TMA-Methode ist, dass eine Untersuchung der Expression eines Biomarkers an einer großen Anzahl von Fällen auf einem Objektträger durchgeführt werden kann. Da mehrere Präparate eines TMA-Blocks aus demselben Gewebeareal gefertigt werden, sind die verschiedenen Anfärbungen gut zu vergleichen und es ist möglich, weitere Anfärbungen hinzuzufügen. Die Anfärbung von TMAs ist – verglichen mit der Anfärbung einzelner größerer Gewebeproben – effizient und ressourcensparend in Bezug auf die Verwendung von Antikörpern, Chemikalien und anderen Materialien. Nachteilig könnte sein, dass aufgrund der kleinen Fläche einer Probe eine eventuell heterogene Expression eines Biomarkers innerhalb eines Tumors nicht ausreichend repräsentiert wird. Dem kann man vorbeugen, indem man mehrere Stenzen eines Tumors entnimmt oder den Durchmesser der Stanze vergrößert. Bei größeren Durchmessern besteht jedoch ein höheres Risiko, dass die Probe sich rollt oder faltet und durch schlechtere Anhaftung am Objektträger verloren geht. Ob eine vertikale Heterogenität innerhalb eines Gewebezylinders vorliegt, kann man überprüfen, indem man alle 10 – 20 Schnitte eine histologische Begutachtung vornimmt und kontrolliert, ob das Gewebe noch repräsentativ ist (Behling und Schittenhelm 2018).

Neben der in vorliegender Untersuchung durchgeführten immunhistochemischen Anfärbung von Biomarkern mit spezifischen Antikörpern kann diese Methode auch zur Erkennung von DNA, RNA, Proteinen und zur Mutationsanalyse genutzt werden. Kononen et al. erarbeiteten die technischen Voraussetzungen der TMA-Analyse und führten eine Untersuchung an 645 Mammakarzinom-Gewebeproben durch. Die 645 Gewebezylinder von 0,6 mm Durchmesser wurden im Abstand von 0,1 mm in einen Paraffinblock eingebracht, mit dem Mikrotom in 8 µm dünne Sektionen geschnitten und auf jeweils einen Objektträger aufgebracht. Aus einem TMA-Block konnten bis zu 200 Präparate hergestellt werden. Diese wurden mit den Methoden der Immunhistochemie (monoklonale Antikörper auf p53, ER, ERBB2-Antigen), der FISH-Diagnostik (Fluoreszenz in situ Hybridisierung, Untersuchung auf CCND1, MYC, ERBB2, MYBL2, Mikrodeletion 20q13 und 17q23) und der mRNA in situ Hybridisierung (ERBB2-mRNA) untersucht (Kononen et al. 1998).

Zur Auswertung der TMAs kann eine digitale Bildanalyse angewendet werden, die in der vorliegenden Studie mit der manuellen Auszählung eines Biomarkers verglichen wird.

2.4 Manuelle Auszählung und digitale Bildanalyse

Die manuelle Auszählung bzw. Analyse der Expression des Biomarkers Histon H3 an immunhistochemisch gefärbten Schnitten sowohl am Lichtmikroskop als auch auf eingescannten Slides mittels des Programmes CaseViewer (Version: 2.3, 3DHISTECH

Ltd.) stellt den praktischen Teil meiner Doktorarbeit dar. Mit der exemplarischen Auszählung eines von acht Biomarkern sollte überprüft werden, ob die manuelle Auszählung und die digitale Bildanalyse zu einem vergleichbaren Ergebnis kommen.

Mittels polyklonalem HH3-Antikörper (Kaninchen) der Firma Zytomed wurde eine komplette Serie von 34 TMAs eingefärbt. Auf jeden Objektträger waren bis zu 104 einzelne Spots aufgebracht, so dass abzüglich der unvollständigen Objektträger ca. 3100 Spots von je 1,1 mm² Fläche von mir einzeln durchgemustert wurden. Bei Positivität für Histon H3 zeigte sich eine intensive bräunliche bis braun-gelbliche nukleäre Anfärbung, die es von färbebedingten Artefakten zu unterscheiden galt. Das Ergebnis der Auszählung wurde in Form einer Matrix dargestellt, um eine direkte Vergleichbarkeit mit der digitalen Bildanalyse zu ermöglichen. Digital wie manuell wurde die Anzahl der positiven Nuklei über die gesamte Fläche jedes einzelnen Spots ermittelt. Für die manuelle und die digitale Analyse wurden dieselben Objektträger verwendet.

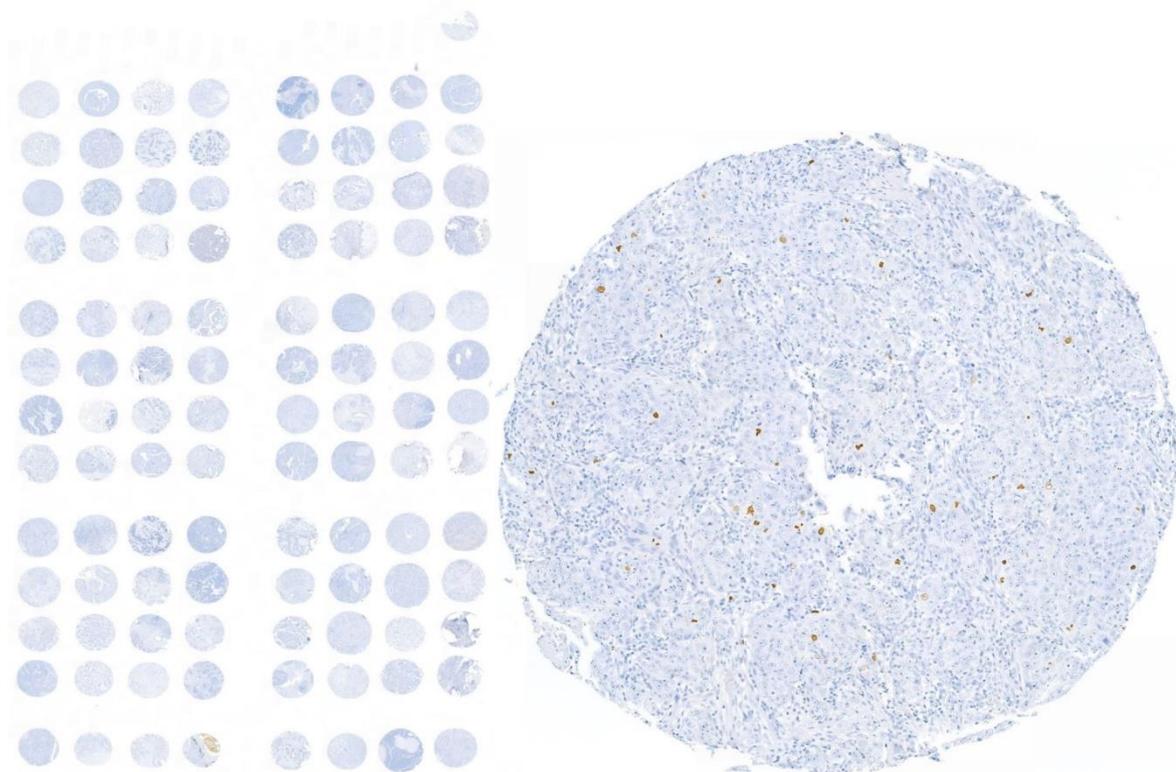


Abbildung 11: Beispiel-TMA und einzelner Spot mit immunhistochemischer Anfärbung des Biomarkers Histon H3. Zu erkennen sind einzelne braun angefärbte positive Zellkerne.

Zur digitalen Bildanalyse wurde eine innovative IT-gestützte Methode angewendet, mit welcher der umfangreiche Datensatz der immunhistochemisch angefärbten Objektträger quantitativ, objektiv und effizient ausgewertet wurde. Die Objektträger wurden in 40-facher

Vergrößerung mit einem Hochdurchsatz-Scanner digitalisiert und zu einem Bild zusammengefügt (Panoramic 1000 Flash IV Scanner mit Zeiss Plan Achromat 40x Objektiv, 3DHISTECH). Der digitale Scanner speicherte die Daten im MIRAX-Format (.mrxs), von dort wurden sie mit der Open-Source-Software QuPath geöffnet, exportiert und in eine TIFF-Datei (.tiff) konvertiert. Die Auflösung der Bilder lag bei 0,249 µm pro Pixel. Erster Schritt bei der Analyse der digitalisierten mikroskopischen Bilder war ein Farbfaltungsprozess, bei dem - ähnlich der Macenko-Methode - der Rot-Grün-Blau (RGB)-Intensitätsraum des Bildes in den Farbraum der mit Haematoxylin gefärbten Kerne (blau) und des spezifischen Signals der mit einem 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Chromogen visualisierten Rezeptorsonden (braun) transformiert wurde (Macenko et al. 2009). Der Farbraum der verwendete Anfärbungen (Blau-Braun) ist der zur Auswertung der digitalisierten Bilder optimale Farbraum. Die vorherrschenden Färbefarben wurden empirisch durch eine Eigenvektoranalyse der Kovarianzmatrix der Farben im untersuchten Bild geschätzt und das native RGB-Bild in den Farbraum transferiert, der von den braunen und blauen Anfärbungen aufgespannt wurde. Nach der Farbdekonvolution wurden die Kanäle der positiven (braun) und negativen (blau) Fleckintensitäten für die weitere Analyse verwendet. Mit Hilfe des StarDist-Modells wurden die positiven und die negativen Zellkerne innerhalb der jeweiligen Kanäle segmentiert. Zur Segmentierung der Zellkerne wurde beim StarDist-Modell das maschinelle Lernen mit einem neuronalen Konvolutionsnetzwerk angewendet (Schmidt et al. 2018). Die Anzahl der durch Auszählung ermittelten und als positiv bzw. negativ eingestuften Zellkerne wurde zur Stratifizierung der Patientenkollektive verwendet (Department of Soft Matter Physics, Universität Leipzig, Arbeitsgruppe Prof. Dr. J.A. Käs / Pablo Gottheil, M. Sc.).

2.5 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Department of Soft Matter Physics, Universität Leipzig, Arbeitsgruppe Prof. Dr. J.A. Käs. In einem mehrere Monate andauernden Prozess mit regelmäßig stattfindenden Videokonferenzen habe ich mit aktiver und kontinuierlicher Mitarbeit zur Erstellung der Daten beigetragen.

Zur statistischen Analyse der Daten wurden die folgenden Verfahren verwendet:

Korrelationskoeffizient nach Pearson

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson stellt ein Maß für die lineare Korrelation zwischen zwei Datensätzen dar. Er beschreibt das Verhältnis zwischen der Kovarianz zweier Variablen dividiert durch das Produkt ihrer Standardabweichungen. Die Berechnung erfolgte über den MATLAB-Funktion *corrcoeff*.

Bland-Altman-Diagramm

Das Bland-Altman-Diagramm dient dem Vergleich zweier Messmethoden bei der Messung eines Parameters. Dazu wird die Differenz der mit Methode X und Methode Y ermittelten Messungen ($X - Y$) auf der y-Achse gegen den Mittelwert der beiden Methoden $((X + Y) / 2)$ auf der x-Achse aufgetragen. Als Übereinstimmungsgrenzen des 95%igen Konfidenzintervalls werden die positive und die negative 1,96fache Standardabweichung der Differenzen angegeben.

Kaplan-Meier-Schätzer

Der Kaplan-Meier-Schätzer stellt ein nichtparametrisches statistisches Verfahren zur Überlebenszeitanalyse dar. Aus dem Untersuchungsgut werden zwei Gruppen gebildet, die sich anhand einer bestimmten Variablen (z. B. Therapie vs. keine Therapie) unterscheiden und deren Überlebensdaten miteinander verglichen werden. Die Methode hat den Vorteil, dass bei Ausscheiden von Probanden aus einer Studie diese Drop Outs als zensierte Fälle berücksichtigt werden können. Die graphische Darstellung erfolgt in Form einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve, bei der die kumulierte Überlebensrate (y-Achse) über der Zeit (x-Achse) aufgetragen wird und eine monoton fallende Kurve ergibt. Um das Ergebnis einer Kaplan-Meier-Analyse statistisch auswerten zu können wendet man einen Signifikanztest wie z. B. den Log-Rank-Test an.

Log-Rank-Test

Der Log-Rank-Test ist ein Hypothesentest, bei dem eine Nullhypothese (beide Gruppen haben eine identische Verteilungskurve) einer Alternativhypothese (beide Gruppen haben unterschiedliche Verteilungskurven) gegenübergestellt wird. Durch die Berechnung wird ein Wert für die Signifikanz (p) der Analyse ermittelt. Ist der p -Wert kleiner als das Signifikanzniveau von 5 %, kann die Nullhypothese verworfen werden, d.h. es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Wie beim Kaplan-Meier-Schätzer kann beim Log-Rank-Test nur der Effekt einer einzelnen Variablen auf die Prognose bewertet werden. Möchte man diese Einschränkung umgehen und mehrere Variablen in die Analyse einbeziehen, muss ein komplexeres Berechnungsverfahren wie das Cox-Regressionsmodell angewendet werden.

Cox-Regressionsmodell

Das Cox-Modell, auch Cox proportional hazards model genannt, ist ein multivariates Regressionsverfahren zur Analyse von Überlebensdaten. Es definiert das Risiko (Hazard) eines Individuums bezogen auf dessen Basis-Risiko und schätzt den Einfluss mehrerer unabhängiger Variablen auf die Dauer bis zum Eintreten eines Ereignisses

(Überlebenszeitanalyse). Die Hazard ratio gibt das relative Risiko über die Zeit unter Berücksichtigung des Konfidenzintervalls an. Der Regressionskoeffizient b dient der Beurteilung, in welchem Maß jede einzelne der Variablen in das Modell eingeht. Das Signifikanzniveau dieser multivariaten Analyse wird mit Hilfe des likelihood-ratio-Tests ermittelt, der (analog zum Log-rank-Test für eine Variable) als Hypothesentest zur Anwendung am Modell mit mehreren Variablen den p-Wert berechnet. Zur Analyse wurde die MATLAB-Funktion *coxphfit* verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Visuelle Auszählung versus digitale Bildanalyse: Überprüfung der Übereinstimmung für die neuen Biomarker am Beispiel von Histon H3

Die visuelle Beurteilung der immunhistochemischen Färbereaktion des Biomarkers Histon H3 (HH3) am Lichtmikroskop sowie an eingescannten gefärbten Objektträgern wurde der bildanalytischen Auswertung desselben Biomarkers gegenübergestellt (s. Kapitel 2.4). Um zu ermitteln, ob eine Korrelation zwischen den mit Hilfe unterschiedlicher Analyseverfahren erhobenen Ergebnissen besteht, erfolgte die Berechnung des empirischen Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Wie die Abbildung zeigt, konnte eine starke Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,73$ ($p < 10^{-10}$) ermittelt werden. Die lineare Regression ergibt eine Steigung der Regressionsgeraden von 0,99, die Gerade schneidet die y-Achse bei $n = 3$ positiven Nuklei. Der Algorithmus der digitalen Bildanalyse ermittelte die Anzahl positiver Nuklei pro TMA-Core im Durchschnitt um 3 positive Nuklei höher als die manuelle Auszählung.

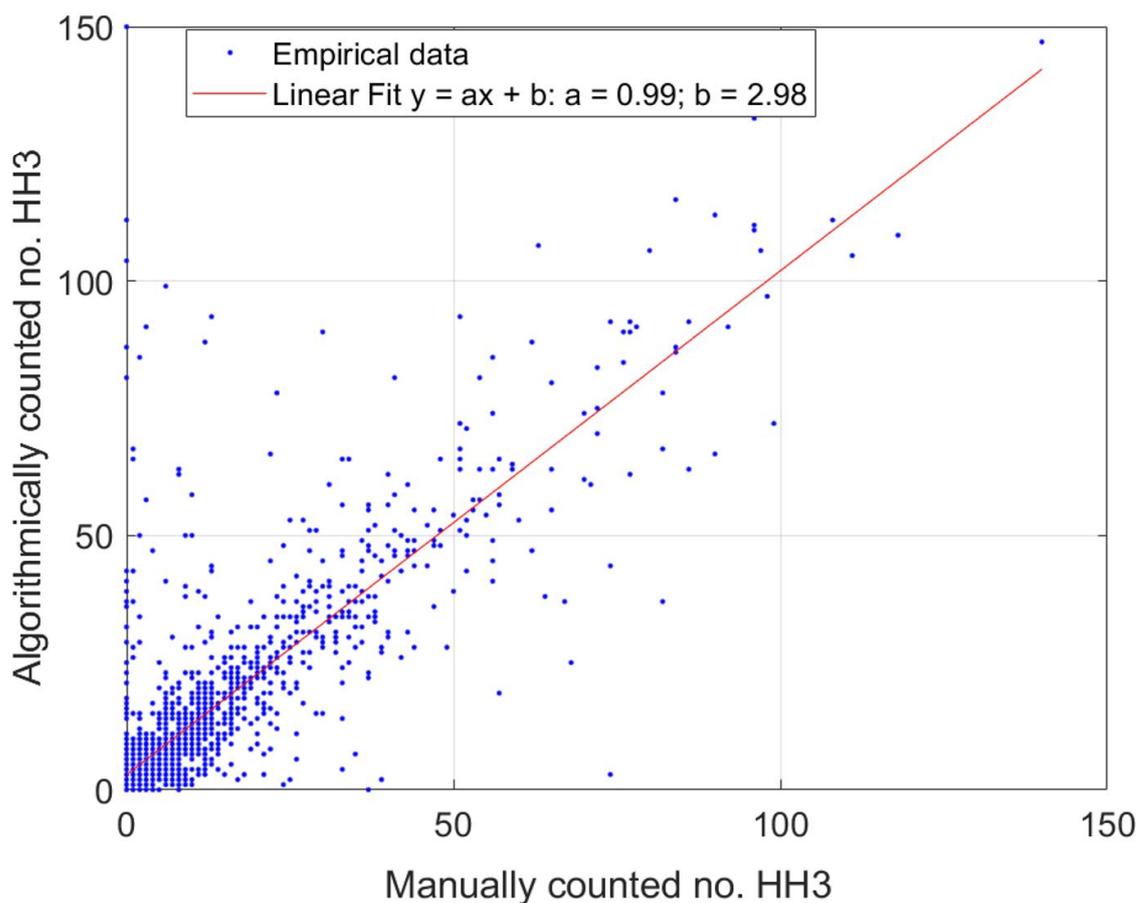


Abb. 12: Histon H3: Korrelation von visueller Antikörperzählung (x-Achse) und digitaler Bildanalyse (y-Achse).
 a = Steigung der Geraden, b = y-Achsenabschnitt, x = Wert auf der x-Achse, y = Wert auf der y-Achse

Das Bland-Altman-Diagramm veranschaulicht den Vergleich der beiden unterschiedlichen Messmethoden. Mit X wird die durch Digitale Bildanalyse (DIA) ermittelte Anzahl positiver Nuklei und mit Y die mittels Visueller Analyse (VA) ermittelte Anzahl positiver Nuklei angegeben. Die Differenz der beiden Messungen (y-Achse) wird gegen den Mittelwert der mit den beiden verschiedenen Methoden durchgeführten Messungen (x-Achse) aufgetragen. Bei einem Mittelwert (mean) von $\Delta = 2,90$ und einer Standardabweichung von $\sigma = 14,36$ zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Messmethoden. Für die Übereinstimmungsgrenzen des 95%igen Konfidenzintervalls werden die positive und die negative 1,96fache Standardabweichung der Differenzen graphisch dargestellt.

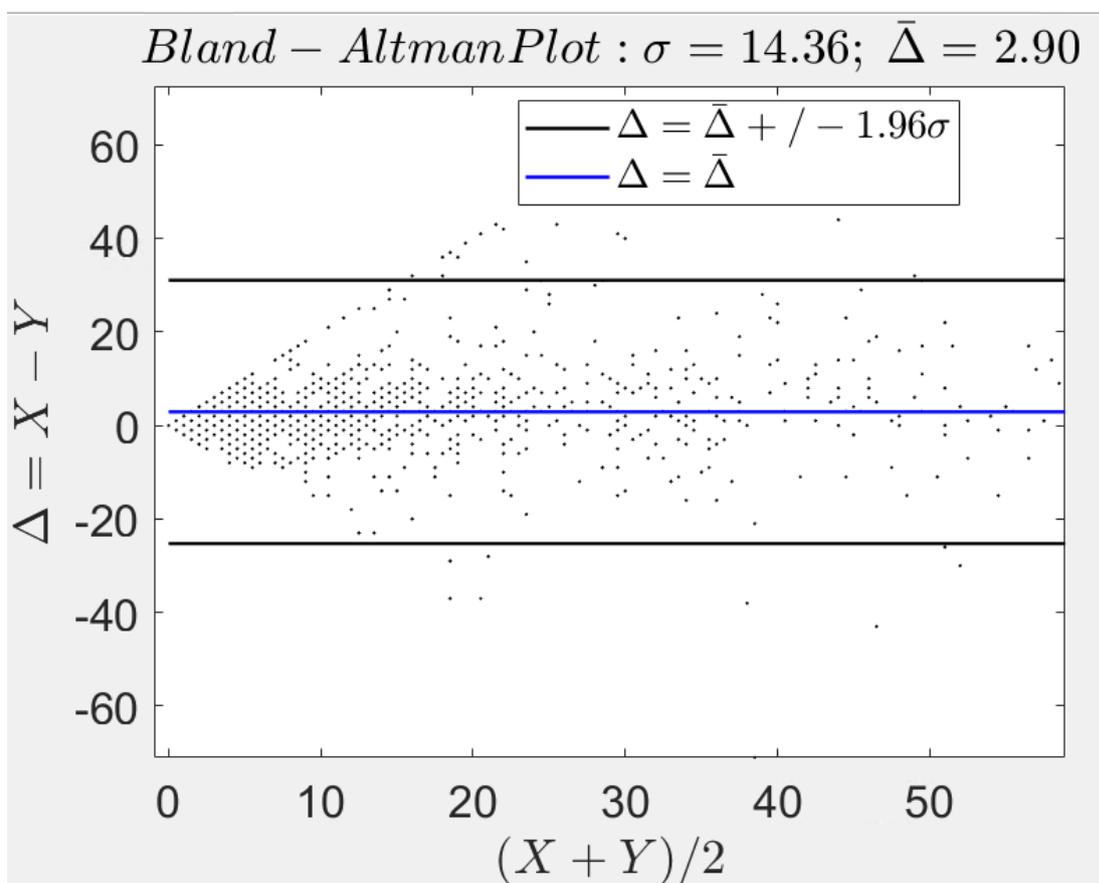


Abb. 13: Histon H3: Bland-Altman-Diagramm zum Methodenvergleich der visuellen Analyse (VA) mit der digitalen Bildanalyse (DIA), X = Anzahl positiver Nuklei, ermittelt durch DIA, Y = Anzahl positiver Nuklei, ermittelt durch VA.

3.2 Konventionelle Auswertung versus digitale Bildanalyse: Überprüfung der Übereinstimmung für die Routineparameter am Beispiel von Ki67

Für die Routineparameter ER, PR, Her2 und Ki67 erfolgte anhand von Ki67 eine exemplarische Überprüfung, ob die digitale Bildanalyse ein äquivalentes Ergebnis zur klinischen Beurteilung durch den Pathologen erbringt. Für die klinisch-pathologische Bewertung wurde die Anzahl der Ki67 positiv angefärbten Tumorzellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Tumorzellen in Prozent auf der x-Achse aufgetragen und der Anzahl der durch bildanalytischen Algorithmus ermittelten Ki67-positiven Zellen im Verhältnis zur Anzahl der Ki67-negativen Zellen auf der y-Achse gegenübergestellt. Die Kurve zeigt eine eindeutig positive Korrelation ($n = 353$).

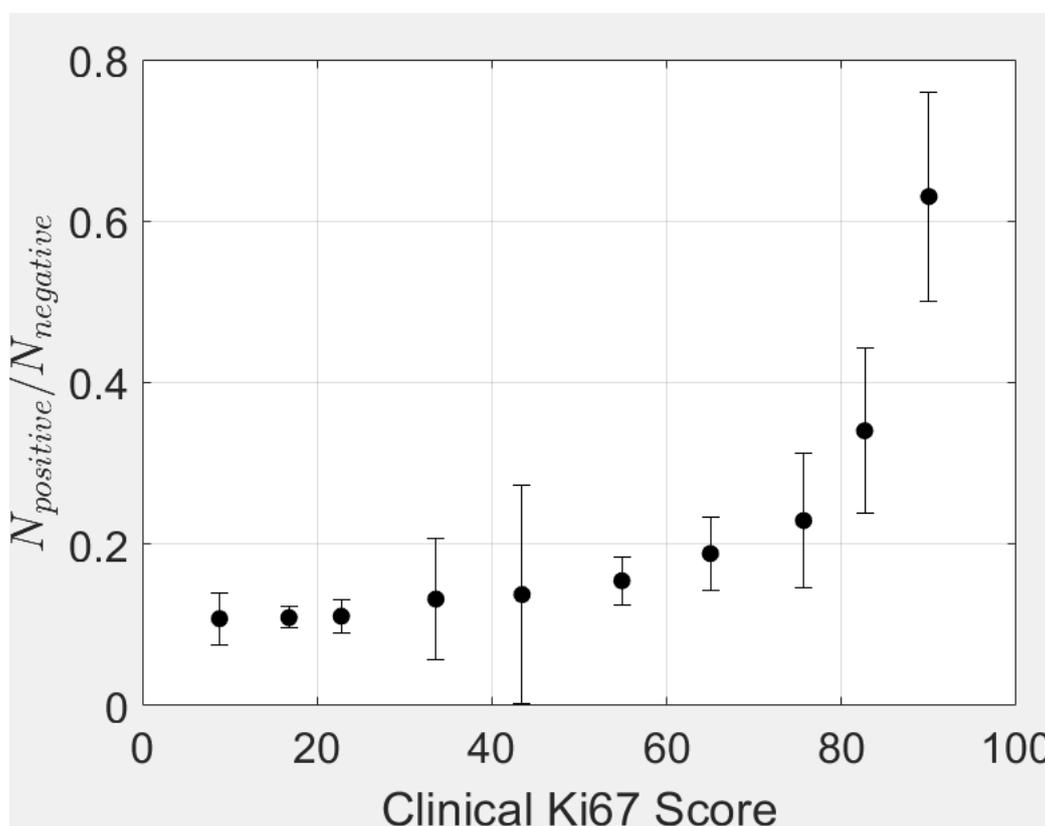


Abb. 14: Ki67: Korrelation der klinischen Beurteilung von Ki67 mit Angabe der positiven Tumorzellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Tumorzellen in Prozent (x-Achse) zu digitaler Bildanalyse (y-Achse). Die Balken entsprechen dem 95%igen Konfidenzintervall.

3.3 Auswertung der neuen Biomarker

Basierend auf der Beobachtung, dass die digitale Bildanalyse vergleichbare Ergebnisse erbrachte wie die analoge Auswertung, wurde die Expression der neuen Biomarker ASNS, FoxM1, RacGAP1, BCL2, BIRC5, HH3, ER β und AR mittels digitaler Bildanalyse bestimmt.

Zusätzlich wurden die konventionellen Biomarker ER α , PR, Her2 und Ki67 nach dem gleichen Verfahren analysiert.

Es wurden sechs Gruppen aus jeweils mehreren TMAs gebildet, die anhand charakteristischer Kriterien spezifiziert wurden (s. Kapitel 2.2). Zur Definition der Gruppen wurden ausschließlich Fälle von Mammakarzinom des nicht speziellen Typs verwendet (NST, Alter \leq 70 Jahre, Nodalstatus N0), so dass weitere Fälle vom z. B. lobulären, tubulären oder muzinösen Typ oder die Gruppe der G3-Tumoren zwar zunächst berechnet, aber nicht in die vorliegende Auswertung mit einbezogen wurden (s. Anhang, Tabelle Motto-TMAs). Anhand des übereinstimmenden Kriteriums der Östrogenrezeptorpositivität werden die Gruppen A1 bis A4 zur Gruppe A zusammengefasst und von der Gruppe B (Östrogenrezeptor negativ) abgegrenzt.

Folgende Gruppen wurden für die Auswertung erstellt:

Gruppe A1 – TMA 1-3: **G2**, pT1b / pT1c / pT2, N0, ER+

Gruppe A2 – TMA 5-8: Therapie ausschließlich mit **Tamoxifen**, G2, \leq pT2, ER+

Gruppe A3 – TMA 11-14: **G1**, pT1b / pT1c, N0, ER+

Gruppe A4 – TMA 25-29: **Kohorte**, ohne spezifizierendes Kriterium, ER+

Gruppe A – Gesamtheit der Gruppen A1, A2, A3 und A4, **ER+**

Gruppe B – TMA 4 und 32-34: **TNBC**, **ER-** / PR- / Her2-

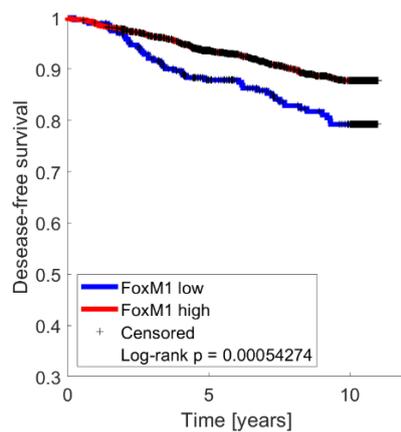
Anhand eines Schwellenwertes wurde jede dieser Gruppen in eine Fraktion mit klinisch gutem Verlauf und eine mit klinisch schlechtem Verlauf dichotomisiert. Dazu wurde im gesamten Kollektiv (Gruppe A+B) der Schwellenwert ermittelt, der im log-rank-Test zur signifikantesten Separierung der Risikogruppen führte und dieser auf die einzelnen Subgruppen angewendet. Zu den Ereignissen, die einen schlechten Verlauf charakterisieren, zählten die Metastasierung des Mammakarzinoms und der Tod der Patientin („events“). „At risk“ bezieht die Anzahl der Studienteilnehmerinnen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt (0, 5, 10 Jahre) noch leben und in die Auswertung eingehen. Patientinnen, die aus anderen Gründen als Tod oder Metastase aus der Studie ausscheiden (z. B. keine weitere Studienteilnahme), gehen als zensiert („censored“) in die Auswertung ein und werden einem „+“ in der Kurve markiert. Als Endpunkt wurde das krankheitsfreie Überleben (Disease-free survival, DFS) definiert.

Zur Überlebenszeitanalyse wurde ein Signifikanztest (Log-Rank-Test) verwendet, die graphische Darstellung erfolgte in Form von Kaplan-Meier-Kurven (s. Kap. II, Abs. 5).

Im Folgenden sind die Log-Rank p-Werte der einzelnen Biomarker für alle Gruppen und die Kaplan-Meier-Kurven für die Biomarker/Gruppen mit signifikantem Ergebnis dargestellt.

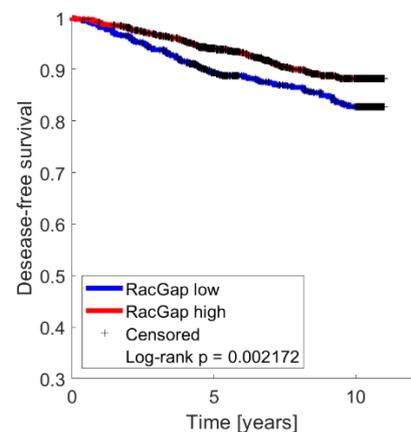
Tabelle 3: Auswertung Biomarker nach TMA-Gruppen, Beobachtungszeitraum 10 Jahre. Rot = besserer klinischer Verlauf der hoch rezeptorpositiven Gruppe, Blau = besserer klinischer Verlauf der niedrig rezeptorpositiven Gruppe, Schwarz = kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen, Fett (und gleichfarbig hinterlegt) = signifikante p-Werte

Gruppe	A1	A2	A3	A4	A (A1-A4)	B	Alle (A+B)
	Log rank p=						
ASNS	0.3065	0.9336	0.5407	0.2828	0.0799	0.8847	0.1038
FoxM1	0.8774	0.9356	0.929	0.59	0.4082	0.7302	0.0005
RacGAP1	0.9127	0.7155	0.6379	0.0571	0.0593	0.1461	0.0022
BCL2	0.0053	0.6245	0.8241	0.2336	0.0073	0.2319	<0,001
BIRC5	0.9347	0.0489	0.8984	0.2138	0.0175	0.3003	0.0024
HH3	0.647	0.2967	0.9374	0.073	0.6362	0.9864	0.0014
ERβ	0.1124	0.0961	0.9076	0.0143	0.0002	0.4568	<0,001
AR	0.8582	0.6862	0.3789	0.7023	0.8834	0.4078	0.5448
ERα	0.595	0.9523	0.2675	0.6126	0.6762	0.1133	0.0015
PR	0.6859	0.7932	0.938	0.0072	0.0136	0.3094	<0,001
Her2	0.4748	0.7914	0.7764	0.9208	0.1977	0.99	0.0011
Ki76	0.958	0.8934	0.7483	0.0094	0.0062	0.1574	0.0011



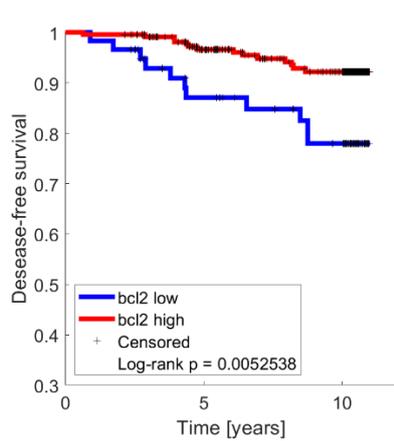
At Risk (events)	0	5	10
FoxM1 low	272 (46)	189 (15)	122 (0)
FoxM1 high	1540 (153)	1195 (60)	695 (0)

Abb. 15: FoxM1, alle Fälle



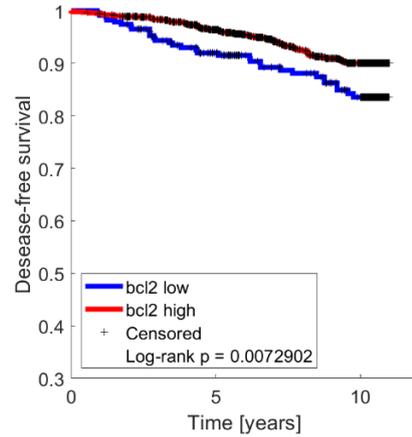
At Risk (events)	0	5	10
RacGap low	596 (87)	431 (26)	299 (0)
RacGap high	1220 (114)	935 (47)	503 (0)

Abb. 16: RacGAP1, alle Fälle



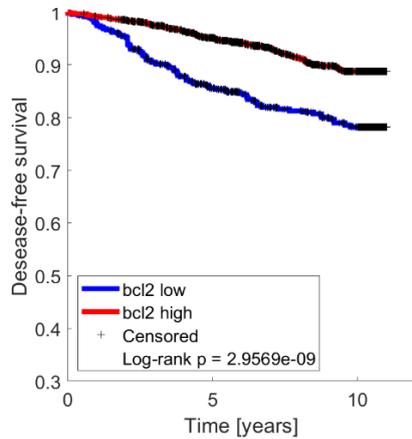
At Risk (events)		0	5	10
bcl2 low	59 (11)	44 (4)	33 (0)	
bcl2 high	226 (14)	184 (7)	125 (0)	

Abb. 17: BCL2, Gruppe A1



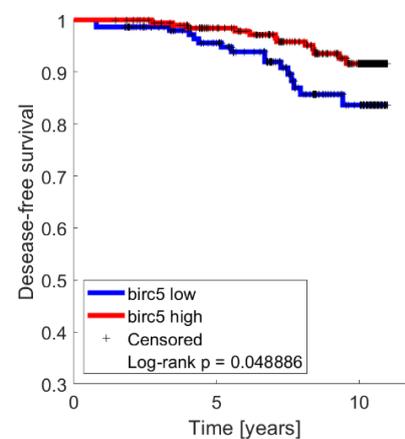
At Risk (events)		0	5	10
bcl2 low	233 (32)	187 (14)	119 (0)	
bcl2 high	1142 (87)	926 (48)	531 (0)	

Abb. 18: BCL2, Gruppe A



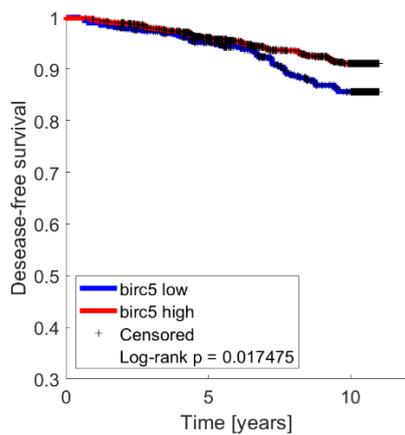
At Risk (events)		0	5	10
bcl2 low	476 (89)	340 (24)	211 (0)	
bcl2 high	1289 (112)	1014 (53)	565 (0)	

Abb. 19: BCL2, alle Fälle



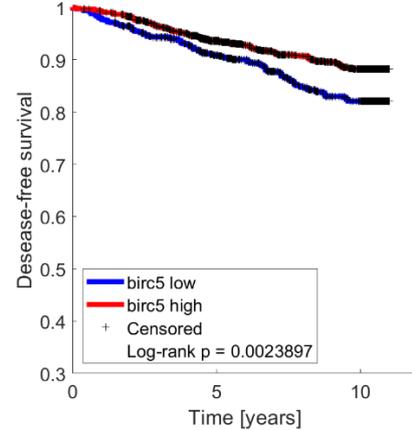
At Risk (events)		0	5	10
birc5 low	155 (16)	117 (10)	39 (0)	
birc5 high	205 (12)	169 (9)	81 (0)	

Abb. 20: BIRC5, Gruppe A2



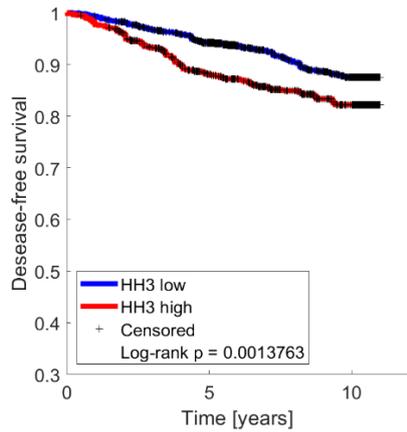
At Risk (events)		0	5	10
birc5 low	456 (50)	374 (29)	211 (0)	
birc5 high	948 (66)	735 (31)	451 (0)	

Abb. 21: BIRC5, Gruppe A



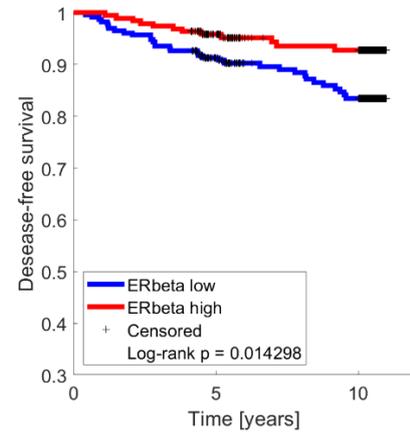
At Risk (events)		0	5	10
birc5 low	611 (88)	466 (35)	259 (0)	
birc5 high	1182 (112)	881 (41)	524 (0)	

Abb. 22: BIRC5, alle Fälle



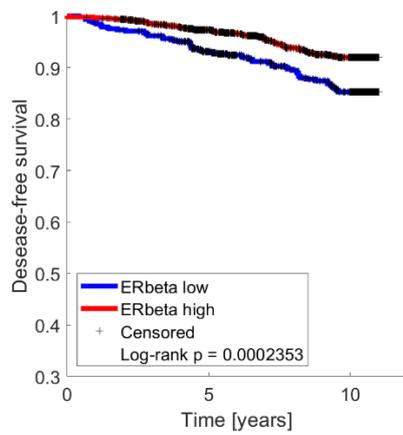
At Risk (events)	0	5	10
HH3 low	911 (90)	728 (40)	433 (0)
HH3 high	563 (84)	405 (21)	212 (0)

Abb. 23: HH3, alle Fälle



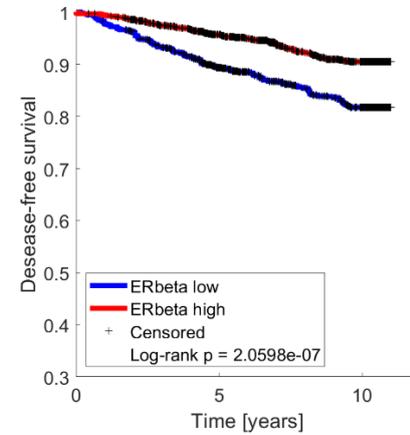
At Risk (events)	0	5	10
ERbeta low	232 (33)	177 (13)	135 (0)
ERbeta high	195 (12)	154 (4)	113 (0)

Abb. 24: ERβ, Gruppe A4



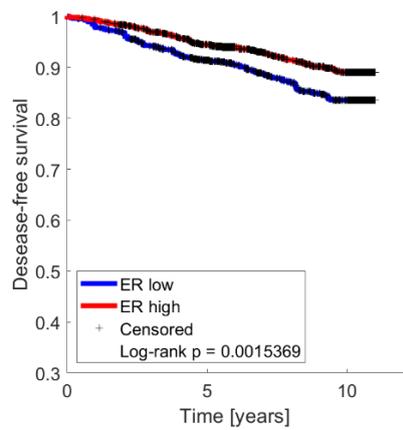
At Risk (events)	0	5	10
ERbeta low	525 (63)	414 (28)	262 (0)
ERbeta high	947 (57)	760 (33)	435 (0)

Abb. 25: ERβ, Gruppe A



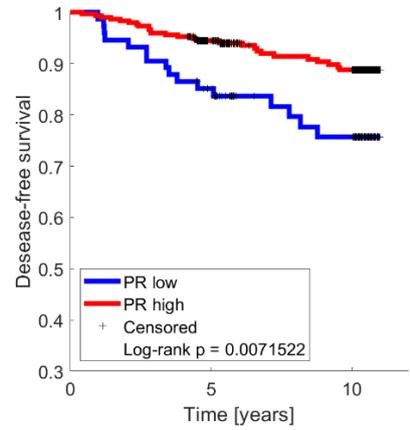
At Risk (events)	0	5	10
ERbeta low	781 (119)	572 (39)	353 (0)
ERbeta high	1077 (80)	843 (37)	473 (0)

Abb. 26: ERβ, alle Fälle



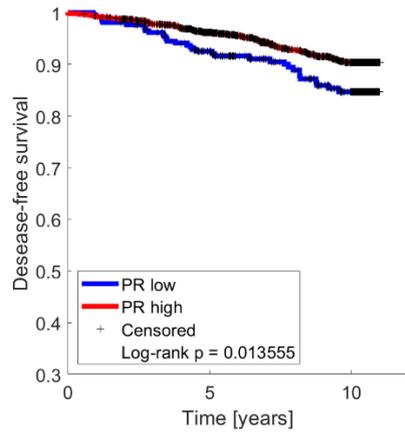
At Risk (events)	0	5	10
ER low	760 (103)	577 (40)	344 (0)
ER high	1051 (91)	808 (36)	477 (0)

Abb. 27: ERα, alle Fälle



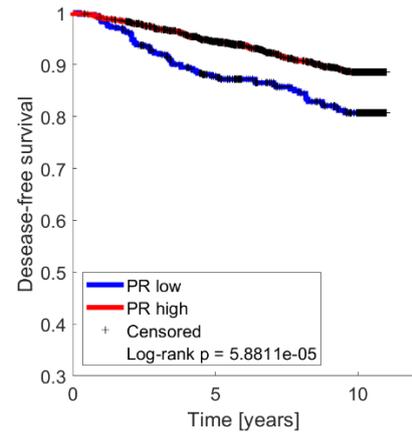
At Risk (events)	0	5	10
PR low	74 (16)	58 (5)	38 (0)
PR high	293 (27)	222 (11)	167 (0)

Abb. 28: PR, Gruppe A4



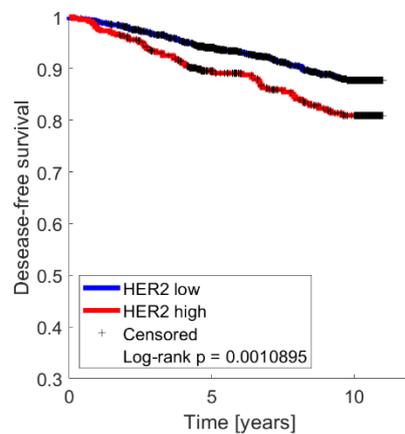
At Risk (events)	0	5	10
PR low	262 (33)	214 (14)	122 (0)
PR high	1163 (86)	922 (44)	551 (0)

Abb. 29: PR, Gruppe A



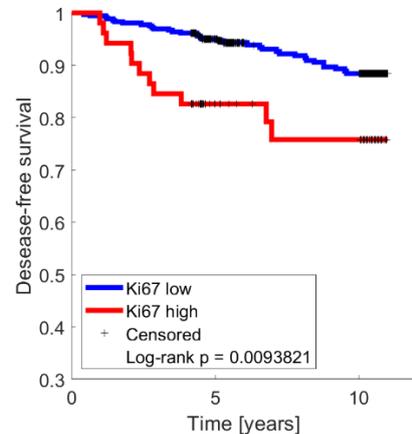
At Risk (events)	0	5	10
PR low	391 (64)	291 (18)	166 (0)
PR high	1365 (124)	1054 (53)	616 (0)

Abb. 30: PR, alle Fälle



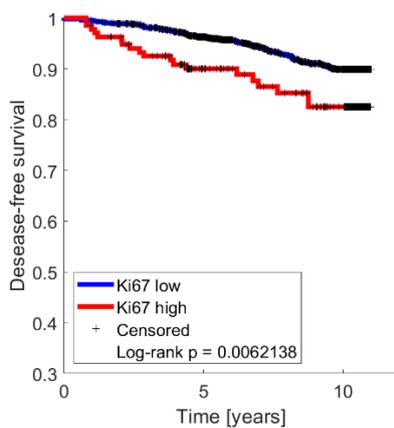
At Risk (events)	0	5	10
HER2 low	1460 (142)	1157 (60)	656 (0)
HER2 high	369 (57)	240 (20)	160 (0)

Abb. 31: Her2, alle Fälle



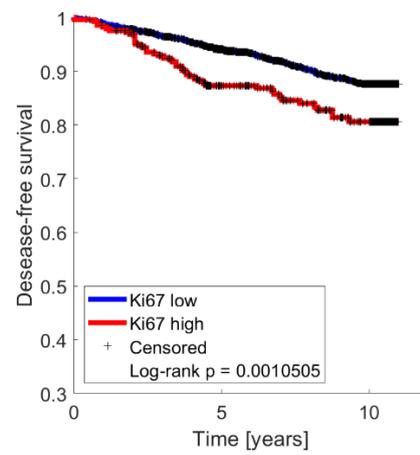
At Risk (events)	0	5	10
Ki67 low	365 (34)	289 (16)	212 (0)
Ki67 high	52 (11)	27 (2)	22 (0)

Abb. 32: Ki67, Gruppe A4



At Risk (events)	0	5	10
Ki67 low	1373 (106)	1108 (58)	663 (0)
Ki67 high	136 (19)	86 (6)	49 (0)

Abb. 33: Ki67, Gruppe A



At Risk (events)	0	5	10
Ki67 low	1594 (157)	1244 (68)	736 (0)
Ki67 high	290 (45)	186 (11)	97 (0)

Abb. 34: Ki67, alle Fälle

Die tabellarische Darstellung der Ergebnisse zeigt, dass die Patientinnen mit einer höheren Expression der neuen Biomarker (rot) ein tendenziell längeres krankheitsfreies Überleben (DFS) aufweisen als die Patientinnen mit einer niedrigeren Expression (blau). Eine signifikante Verlängerung des DFS ist dabei überwiegend in der Grundgesamtheit (alle Fälle, Gruppen A+B) festzustellen und betrifft die Biomarker FoxM1 ($p = 0,0005$, $n = 1812$), RacGAP1 ($p = 0,0022$, $n = 1816$), BCL2 ($p < 0,001$, $n = 1765$), BIRC5 ($p = 0,0024$, $n = 1793$) und ER β ($p < 0,001$, $n = 1857$). Drei dieser Biomarker zeigen zusätzlich in jeweils zwei Untergruppen eine signifikante Verlängerung des DFS bei höherer Expression. Für BCL2 sind es die Gruppen A1 ($p = 0,0053$, $n = 285$) und A ($p = 0,0073$, $n = 1375$), für BIRC5 die Gruppen A2 ($p = 0,0489$, $n = 360$) und A ($p = 0,0175$, $n = 1404$) und für ER β die Gruppen A4 ($p = 0,0143$, $n = 427$) und A ($p = 0,0002$, $n = 1472$). Histon H3 ist der einzige Biomarker, bei dem eine niedrigere Expression (blau) in der Gesamtheit aller Fälle (Gruppen A+B) mit einer signifikanten Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens einhergeht ($p = 0,0014$, $n = 1474$). Die Analyse der Biomarker ASNS und AR ergab weder in der Grundgesamtheit noch in einzelnen Untergruppen einen signifikanten Unterschied im klinischen Verlauf zwischen den hoch und den niedrig rezeptorpositiven Tumoren. In Gruppe B (TNBC) ließ sich bei keinem der analysierten Biomarker ein signifikanter Unterschied des DFS für die Patientinnen mit niedriger versus hoher Expression feststellen.

Betrachtet man zum Vergleich die synoptische Darstellung der konventionellen Biomarker, zeigt sich für die Grundgesamtheit aller Fälle (Gruppen A+B) eine signifikante Verlängerung des DFS bei Vorliegen einer höheren Expression von ER α ($p = 0,0015$, $n = 1811$) und PR ($p < 0,001$, $n = 1756$) und einer niedrigeren Expression von Her2 ($p = 0,0011$, $n = 1829$) und Ki67 ($p = 0,0011$, $n = 1884$). Bei PR und Ki67 ist dieser Effekt zusätzlich in den Untergruppen A4 und A nachzuweisen. Es ergeben sich signifikante Ergebnisse für ein längeres DFS bei höherer Expression von PR in Gruppe A4 ($p = 0,0072$, $n = 367$) sowie in Gruppe A ($p = 0,0136$, $n = 1425$) und bei geringerer Expression von Ki67 in Gruppe A4 ($p = 0,0094$, $n = 417$) sowie in Gruppe A ($p = 0,0062$, $n = 1509$).

Zusätzlich zur univariaten Analyse der einzelnen Biomarker wurde mithilfe eines multivariaten Modells untersucht, ob die Betrachtung der neuen Biomarker einzeln und in ihrer Gesamtheit eine prognostische Relevanz für den Krankheitsverlauf der an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen hat. In das multivariate Modell gingen zusätzlich zu dem entsprechenden Biomarker der histologische Grad, der Lymphknotenstatus, die Tumorgroße und das Alter der Patientin mit ein. Zum Vergleich wurde auch der Block der konventionellen Biomarker einer multivariaten Analyse unterzogen. Die Berechnung erfolgte für die Gruppe A der östrogenrezeptorpositiven Tumoren, die Gruppe B der östrogenrezeptornegativen Tumoren und für das gesamte Kollektiv (Gruppe A+B). Als

Hazard wurde die Wahrscheinlichkeit betrachtet, mit der das Ereignis „Tod oder Metastasierung“ innerhalb des definierten Zeitraumes von 10 Jahren eintritt. Mit einer Multivariablen Cox-Regressionsanalyse wurde das relative Risiko über die Zeit, die Hazard Ratio berechnet und der jeweilige p-Wert bestimmt (likelihood-ratio-test).

Tabellen 4a.-b.: Multivariable Cox-Regressionsanalyse Gruppe A mit Angabe von Coeff. b (Regressionskoeffizient b), SE(b) (Standardfehler), Hazard ratio, lower CI (untere Grenze des Konfidenzintervalls), upper CI (obere Grenze des Konfidenzintervalls), p-Wert

4a. Gruppe A – neue Biomarker (BM)

	Coefficient b	SE(b)	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI	p-Value
ASNS	0,06	0,17	1,06	0,76	1,47	0,7218
FoxM1	-0,12	0,18	0,88	0,63	1,25	0,4858
RacGap1	-0,07	0,16	0,94	0,68	1,29	0,6829
BCL2	0,1	0,19	1,1	0,76	1,6	0,5993
BIRC5	-0,23	0,15	0,79	0,59	1,07	0,1322
HH3	0,23	0,19	1,26	0,87	1,83	0,2245
ERβ	-0,59	0,18	0,55	0,39	0,78	0,0008
AR	0,12	0,16	1,13	0,82	1,56	0,4578

p-Wert des kompletten Modells (likelihood-ratio-test) $p = 0,01$

4b. Gruppe A – konventionelle BM

	Coefficient b	SE(b)	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI	p-Value
ERα	-0,03	0,16	0,97	0,71	1,31	0,8342
PR	-0,44	0,16	0,65	0,47	0,88	0,006
Her2	0,14	0,21	1,15	0,77	1,73	0,501
Ki67	0,33	0,16	1,39	1,01	1,92	0,0446

p-Wert des kompletten Modells (likelihood-ratio-test) $p = 0,0155$

Tabellen 5a.-b.: Multivariable Cox-Regressionsanalyse Gruppe B mit Angabe von Coeff. b (Regressionskoeffizient b), SE(b) (Standardfehler), Hazard ratio, lower CI (untere Grenze des Konfidenzintervalls), upper CI (obere Grenze des Konfidenzintervalls), p-Wert

5a. Gruppe B – neue BM

	Coefficient b	SE(b)	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI	p-Value
ASNS	0,24	0,29	1,28	0,72	2,25	0,3999
FoxM1	0,02	0,26	1,02	0,61	1,69	0,9508
RacGap1	-0,56	0,23	0,57	0,36	0,89	0,0136
BCL2	-0,37	0,22	0,69	0,45	1,07	0,0976
BIRC5	-0,16	0,22	0,85	0,56	1,3	0,4554
HH3	0,14	0,23	1,15	0,73	1,82	0,5476
ERβ	-0,21	0,28	0,81	0,47	1,4	0,4534
AR	0,16	0,22	1,17	0,76	1,79	0,4682

p-Wert des kompletten Modells (likelihood-ratio-test) $p = 0,1262$

5b. Gruppe B – konventionelle BM

	Coefficient b	SE(b)	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI	p-Value
ER α	-0,37	0,32	0,69	0,37	1,29	0,2428
PR	-0,2	0,25	0,82	0,51	1,33	0,4186
Her2	0,32	0,24	1,37	0,86	2,18	0,1839
Ki67	-0,11	0,22	0,89	0,58	1,38	0,613

p-Wert des kompletten Modells (likelihood-ratio-test) $p = 0,3896$

Tabellen 6a.-b.: Multivariable Cox-Regressionsanalyse Gruppe A+B mit Angabe von Coeff. b (Regressionskoeffizient b), SE(b) (Standardfehler), Hazard ratio, lower CI (untere Grenze des Konfidenzintervalls), upper CI (obere Grenze des Konfidenzintervalls), p-Wert

6a. Gruppe A+B – neue BM

	Coefficient b	SE(b)	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI	p-Value
ASNS	0,15	0,14	1,16	0,88	1,53	0,282
FoxM1	-0,18	0,14	0,84	0,63	1,11	0,212
RacGap1	-0,21	0,13	0,81	0,63	1,05	0,1058
BCL2	-0,19	0,14	0,82	0,63	1,08	0,1548
BIRC5	-0,23	0,12	0,8	0,62	1,02	0,0683
HH3	0,51	0,13	1,67	1,3	2,16	0,0001
ER β	-0,57	0,15	0,56	0,42	0,75	0,0001
AR	0,15	0,13	1,17	0,9	1,51	0,2402

p-Wert des kompletten Modells (likelihood-ratio-test) $p < 0,0001$

6b. Gruppe A+B – konventionelle BM

	Coefficient b	SE(b)	Hazard ratio	Lower CI	Upper CI	p-Value
ER	-0,3	0,13	0,74	0,57	0,95	0,018
PR	-0,45	0,13	0,64	0,5	0,82	0,0005
Her2	0,4	0,14	1,5	1,13	1,98	0,0047
Ki67	0,34	0,13	1,4	1,09	1,81	0,0084

p-Wert des kompletten Modells (likelihood-ratio-test) $p < 0,0001$

In **Gruppe A** der östrogenrezeptorpositiven Tumoren weist von den neuen Biomarkern der Parameter ER β mit einer Hazard ratio von 0,55 den größten Effekt und als einziger ein signifikantes Ergebnis auf ($p = 0,0008$, $n = 1472$). Mit einem Regressionskoeffizienten von -0,59 ist ER β der Faktor, der am stärksten in das Modell eingeht und die Signifikanz des gesamten Modells maßgeblich beeinflusst (likelihood-ratio-test $p = 0,01$, $n = 741$).

Im Block der konventionellen BM ist es der Progesteronrezeptor, der bei einer Hazard ratio von 0,65 das am höchsten signifikante Ergebnis erkennen lässt ($p = 0,006$, Coeff. $b = -0,44$, $n = 1425$) und damit den stärksten Einfluss auf das gesamte Modell ausübt (likelihood-ratio-test $p = 0,0155$, $n = 741$). Für Ki67 lässt sich bei einer Hazard ratio von 1,39 ein ebenfalls signifikantes Ergebnis feststellen ($p = 0,0446$, Coeff. $b = 0,33$, $n = 1509$).

In **Gruppe B** der östrogenrezeptornegativen Tumoren ist im Block der neuen Biomarker ausschließlich für RacGAP1 mit einer Hazard Ratio von 0,57 ein signifikantes Ergebnis zu beobachten ($p = 0,0136$, Coeff. $b = -0,56$, $n = 394$). Die Cox-Regressionsanalyse des gesamten Modells der neuen BM erweist sich jedoch nicht als signifikant (likelihood-ratio-test $p = 0,1262$). Auch für die konventionellen Biomarker ist im multivariaten Modell kein signifikantes Ergebnis zu beobachten (likelihood-ratio-test $p = 0,3896$, $n = 304$).

In der Grundgesamtheit **Gruppe A+B** zeigte sich im Block der neuen Biomarker ein hochsignifikantes Ergebnis für Histon H3 mit einer Hazard ratio von 1,67 ($p = 0,0001$, Coeff. $b = 0,51$, $n = 1474$) und für ER β mit einer Hazard ratio von 0,56 ($p = 0,0001$, Coeff. $b = -0,57$, $n = 1858$, Likelihood-ratio $p < 0,0001$).

Im Block der konventionellen BM ist für jeden einzelnen BM und damit auch für das gesamte Modell ein signifikantes Ergebnis zu beobachten (likelihood-ratio-test $p < 0,0001$).

Mit einer Heat map kann die Hazard ratio für die Gruppen A, B und A+B anschaulich visualisiert werden. Auf der Farbskala wird rot definiert als Hazard ratio high (> 1) und blau als Hazard ratio low (< 1). Je intensiver das Rot, desto höher ist die Hazard ratio und desto schlechter ist eine hohe Expression des Biomarkers für die Prognose der Patientin. Je intensiver das Blau, desto niedriger ist die Hazard ratio und desto besser ist prognostisch eine hohe Expression des entsprechenden Markers.

Tabelle 7: Heat map für die Hazard ratio der Gruppen A, B und A+B

Gruppe	A	B	A+B
	Hazard ratio=		
ASNS	1,06	1,28	1,16
FoxM1	0,88	1,02	0,84
RacGap1	0,94	0,57	0,81
BCL2	1,1	0,69	0,82
BIRC5	0,79	0,85	0,8
HH3	1,26	1,15	1,67
ER β	0,55	0,81	0,56
AR	1,13	1,17	1,17
ER α	0,97	0,69	0,74
PR	0,65	0,82	0,64
Her2	1,15	1,37	1,5
Ki67	1,39	0,89	1,4

4. Diskussion

4.1 Visuelle Auszählung versus digitale Bildanalyse

In der vorliegenden Studie wurde für den Biomarker Histon H3 eine starke Korrelation zwischen visueller Auszählung (VA) und digitaler Bildanalyse (DIA) ermittelt. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,73$ ($p < 10^{-10}$) und eine Steigung der Regressionsgeraden von 0,99 (Abb. 12). Das Bland-Altman-Diagramm stellt bei einem Mittelwert (mean) von $\Delta = 2,90$ und einer Standardabweichung von $\sigma = 14,36$ eine gute Übereinstimmung der Messmethoden dar (Abb. 13). Diese Beobachtung bestätigt das Ergebnis früherer Untersuchungen. So konnten zum Beispiel Dessauvage et al. in einer Studie mit $n = 36$ Fällen von invasivem Brustkrebs zeigen, dass die manuelle Auszählung von immunhistochemisch angefärbtem Phosphohiston H3 durch mehrere Pathologen mit der Digitalen Bildanalyse (Aperio ScanScope AT, Leica Biosystems) eine starke und signifikante Korrelation aufwies. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman betrug 0,83 ($p < 0,0001$). Im Schnitt wurde hier eine 2,3fach höhere Anzahl positiver Nuklei ermittelt (Dessauvage et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden 3126 Fälle von invasivem Mammakarzinom aus der Tumordatenbank der Pathologie Hamburg-West analysiert. Anhand dieser deutlich höheren Fallzahl ließ sich eine starke und signifikante Korrelation von manueller Auszählung und digitaler Bildanalyse am Beispiel von Histon H3 verifizieren. Eine schwedische Studie überprüfte anhand der etablierten Biomarker ER, PR, Her2 und Ki67 die Übereinstimmung von manueller und digitaler Bildanalyse und analysierte die Kongruenz des immunhistochemisch ermittelten intrinsischen Subtyps mit dem Ergebnis des Genexpressionstests PAM50 (Prosigna®). An $n = 436$ Fällen von Mamakarzinom wurde bei einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 28 Jahren an paraffineingebettetem Brustkrebsgewebe und an TMAs eine immunhistochemische Anfärbung sowie eine RNA-basierte Genexpressionsanalyse von 50 Genen durchgeführt. Bezogen auf die Prognose der Gesamtmortalität konnte unter Anwendung einer Cox-Regressionsanalyse und Bestimmung der Hazard ratio eine Übereinstimmung von VA und DIA beobachtet werden. Beim Vergleich der Konkordanz mit dem PAM50-Genexpressionsassay war die digitale Bildanalyse der manuellen Auswertung überlegen, die Cohens κ -Übereinstimmung der DIA übertraf die der VA um 2,2–5,5 Prozentpunkte (Stålhammar et al. 2016).

Für den Proliferationsmarker Ki67 wurde in einer Studie von Zhong et al. die Übereinstimmung von visueller und automatisierter digitaler Analyse bei der Beurteilung des Ki67-Labeling-Index überprüft. An $n = 155$ Fällen von invasivem Brustkrebs wurden jeweils zwei zu analysierende Tumorbereiche ausgewählt und von fünf unabhängigen Pathologen zum einen der Hotspot-Score (Areale besonders intensiver Anfärbung auf

Ki67), zum anderen der Durchschnittsscore (drei zufällig ausgewählte Areale) per VA und per DIA ermittelt. Für die gesamte Kohorte war eine sehr gute Übereinstimmung zwischen VA und DIA sowohl für den Hot-spot-Score ($p < 0,0001$, Intraklassen-Korrelationskoeffizient (ICC) 0,957; 95 % Konfidenzintervall (KI) 0,942-0,968) als auch für den Durchschnittsscore ($p < 0,0001$, ICC 0,974; 95 % KI 0,964-0,981) festzustellen (Zhong et al. 2016).

Unsere eigene Analyse für Ki67 an 353 Patientinnen bestätigte diese Beobachtung (Abb. 14). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die klinische Ki67-Bestimmung an whole slide-Präparaten erhoben wurde und der digitale Algorithmus die Proben im TMA-Format analysierte, ist eine eindeutig positive Korrelation zu ermitteln. Eine gewisse Unsicherheit der x-Achse besteht darin, dass der Ki67-Score in der vorliegenden Tumordatenbank nicht einheitlich dokumentiert wurde (z. B. $< 10\%$, 10, 20, 30 %, $< 30\%$, $> 30\%$, $> 50\%$, 50, 70, 90 %). Befunde mit einem sehr hohen Wert für Ki67 werden bei der pathologischen Beurteilung deutlich seltener erhoben als Befunde mit einem Ki67 im Bereich von 0-30 %. Eine geringere Anzahl an Messwerten führt zu einem Anstieg der statistischen Unsicherheit. Dies findet in unseren Ergebnissen seinen Ausdruck in den größeren Konfidenzintervallen der Bereiche, für die eine geringere Anzahl an Werten vorlag.

Das Kernprotein Ki67 gilt hinsichtlich der Reproduzierbarkeit als schwierig zu messender Parameter. In einem Ringversuch wurden TMAs von 100 Brustkrebsfällen in acht verschiedenen Laboren untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Jeweils ein Satz der Proben wurde von einem Zentrallabor gefärbt, ein weiterer vor Ort von dem jeweiligen an den Versuch angeschlossenen Labor. Dort wurden die TMAs mehrfach von verschiedenen Pathologen an unterschiedlichen Tagen analysiert. Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors erwies sich als hoch (ICC = 0,94; 95 % KI = 0,93 bis 0,97), während sie beim Vergleich zwischen den verschiedenen Laboren nur moderat (zentrale Färbung: ICC = 0,71; 95 % KI = 0,47 bis 0,78) bzw. mittelmäßig (lokale Färbung: ICC = 0,59; 95 % KI = 0,37 bis 0,68) war. Dieses Ergebnis verdeutlichte die Schwierigkeit, die Ki67-Werte objektiv miteinander zu vergleichen, cut-offs verbindlich festzulegen und für die Entscheidungsfindung und Prognoseeinschätzung von Karzinomen zu verwenden (Polley et al. 2013). Da Ki67 sich bei konstanten Bedingungen als einer der robustesten Biomarker gezeigt hat, der immunhistochemisch gemessen werden kann, wurden Bestrebungen zur Standardisierung und Qualitätssicherung unternommen und im Jahr 2010 das Expertengremium "International Ki67 in Breast Cancer Working Group" (IKWG) gegründet. Die Arbeitsgruppe befand Ki67 als wichtigen Marker zur Einschätzung der zellulären Proliferation für die Therapieentscheidung und erarbeitete Empfehlungen zur Normierung der Bereiche Präanalytik und Analytik, Auswertung und Beurteilung sowie zur Verarbeitung der Daten (Dowsett et al. 2011). In einer nachfolgenden Studie konnten Polley et al. zeigen, dass sich die Inter-Observer-Reproduzierbarkeit bei der Ermittlung des Ki67-Index deutlich

verbessern ließ, wenn die im Gewebe-Mikroarray-Format bereitgestellten Proben zentral gefärbt und die Untersucher vor der Analyse an einem standardisierten Trainings- und Testset geschult wurden. Eine Verbesserung der Intraklassenkorrelation von 0,71 (95 % KI = 0,54-0,86) ohne Schulung auf 0,92 (95 % KI = 0,88-0,96) nach Training wurde deutlich (Polley et al. 2015). Die Empfehlungen der IKWG, die auf eine Standardisierung der visuellen Analyse von Ki67 abzielen, werden inzwischen international weitestgehend umgesetzt. In einer internationalen multizentrischen Studie, bei der 30 Proben maligner Brusttumore an 14 Labore in sechs Ländern geschickt wurden, überprüfte man die Inter-Observer-Übereinstimmung zwischen verschiedenen, nicht standardisierten automatisierten Bildanalyse-Systemen und verglich sie mit den Ergebnissen der standardisierten visuellen Beurteilung. Die Unterschiede waren mit einem ICC für die nicht standardisierte digitale Analyse von 0,86 (95 % KI = 0,79-0,93) zur standardisierten visuellen Beurteilung mit ICC = 0,87 (95 % KI = 0,81-0,93) nur minimal. Die Autoren der Studie formulierten daraus die Hypothese, dass bei der Messung von Ki67 durch eine Standardisierung der digitalen Bildanalyse eine noch höhere Konkordanz erzielt werden könnte als bei der standardisierten visuellen Analyse (Rimm et al. 2019). Diese Hypothese wurde im selben Jahr durch eine Untersuchung bestätigt, bei der die drei Bildanalyseplattformen HALO (IndicaLab), QuantCenter (3DHistech) und QuPath (open source software) anhand der Auswertung von Ki67 miteinander verglichen und in Bezug auf das klinische outcome überprüft wurden. Zunächst erfolgte eine Standardisierung an einer Kohorte von n = 30 Fällen von Brustkrebs, die für vorherige Studien des IKWG zentral gefärbt und geschnitten wurden. Anschließend wurde mit allen drei DIA-Plattformen eine zweite Kohorte von n = 149 Fällen analysiert, zu der man Daten zum klinischen Verlauf über einen Nachbeobachtungszeitraum von median 120 Monaten für das Gesamtüberleben und median 112 Monaten für das rezidivfreie Überleben erhoben hatte. Der klasseninterne Korrelationskoeffizient zeigte eine sehr gute Reproduzierbarkeit zwischen den drei verschiedenen Systemen (ICC = 0,933; 95 % KI = 0,879-0,966) und eine ebenfalls sehr hohe Reproduzierbarkeit innerhalb jedes einzelnen Systems (QuPath: ICC = 0,992; 95 % KI = 0,986-0,996; HALO: ICC = 0,972; 95 % KI = 0,924-0,988; QuantCenter: ICC = 0,978; 95 % KI = 0,932-0,991). Bei einem cut-off von 10 % Ki67-positiven Nuklei ermittelten alle drei Analyseplattformen ähnliche statistisch signifikante Ergebnisse bezüglich des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens (Acs et al. 2019). Kritisch muss dabei hinterfragt werden, ob bei der Beurteilung von Ki67 mit digitaler Bildanalyse dieselben Grenzwerte angewendet werden können wie bei der visuellen Auswertung. Eine neuere Studie, die einen Methodenvergleich zwischen visueller und digitaler Beurteilung von Ki67 an n = 248 Proben von Brustkrebsgewebe durchführte, kam zu dem Ergebnis, dass die DIA im Schnitt einen höheren Prozentsatz Ki67-positiver

Tumorzellen ermittelt als die VA. Bei Auszählung von 500 Tumorzellen betrug der mediane Ki67-Level bei der VA 22,3 % und bei der DIA 30,0 %. Dieses Ergebnis legt nahe, dass bei Einführung einer neuen Analysemethode wie der digitalen Bildanalyse die cut-offs zur Einteilung in Risikoklassen neu kalibriert werden sollten (Skjervold et al. 2022).

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass die digitale Bildanalyse bei der Auswertung immunhistochemisch angefärbter Biomarker analog zur visuellen Analyse angewendet und in die klinisch-pathologische Beurteilung von Mammatumoren einbezogen werden kann. Die digitale Auswertung hat sich in hohem Maße als zuverlässig, objektiv und reproduzierbar erwiesen. Trotz des apparativen Aufwands, der Investition in die dafür notwendige Hard- und Software und des notwendigen Engagements in der Installations- und Einarbeitungsphase können bei gut etabliertem System durch die maschinelle digitale Analyse langfristig zeitliche und personelle Ressourcen eingespart werden. Mit Blick auf die Effizienz unseres Gesundheitssystems und den zunehmenden Fachkräftemangel eröffnet die digitale Bildanalyse eine Perspektive, wie auch zukünftig eine hochwertige Diagnostik bei der pathologischen Untersuchung des Mammakarzinoms gewährleistet werden könnte.

Die Anwendung von Systemen der Künstlichen Intelligenz mit Deep-learning-Algorithmen und Convolutional Neuronal Networks besitzt das Potenzial, ein nächster Schritt in der digitalen Pathologie zu werden (Acs et al. 2020, Shamai et al. 2019, Yousif et al. 2022).

4.2 Auswertung der neuen Biomarker

Biomarker bilden in der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms die Basis einer personalisierten Krebsmedizin. Mit dem Ziel, verschiedene Kohorten von Patientinnen zu stratifizieren, wurden für die vorliegende Studie anhand definierter Fallauswahlkriterien 34 TMAs mit jeweils bis zu 104 Fällen erstellt und mit spezifischen Antikörpern auf die einzelnen Biomarker angefärbt. Für alle diese Fälle wurde zunächst eine Analyse und eine statistische Auswertung durchgeführt, die jedoch für manche Gruppen (z. B. wegen einer geringeren Fallzahl) mit einer höheren Unsicherheit behaftet waren. Um die Stringenz der vorliegenden Untersuchung zu erhöhen, erfolgte die Fokussierung auf die im Ergebnisteil angegebenen Gruppen.

4.2.1 Proliferationsmarker HH3 und Ki67 – eine Gegenüberstellung

Proliferation ist ein wichtiger Parameter für die Beurteilung der Biologie des Mammakarzinoms und ein entscheidendes Kriterium für dessen Prognose und Prädiktion. In der etablierten immunhistochemischen Klassifizierung wird die Proliferationsaktivität eines Malignoms mit Hilfe der Bestimmung von Ki67 angegeben. Mit Phosphohiston H3 (PHH3), auch Histon H3 (HH3) genannt, existiert ein weiterer Proliferationsmarker, der seit

vielen Jahren Gegenstand klinischer Studien ist und sich in mancher Hinsicht als überlegen erwiesen hat.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich bei der univariaten Analyse in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (DFS), dass in der Grundgesamtheit (Gruppen A+B) eine niedrige Expression der Proliferationsmarker HH3 und Ki67 mit einer signifikanten Verlängerung des DFS einhergeht. HH3 wies dabei mit $p = 0,0014$ ein ähnlich hochsignifikantes Ergebnis auf wie Ki67 ($p = 0,0011$) und kann somit als gleichwertiger Marker zur Bestimmung der Proliferation betrachtet werden. Für Ki67 konnte zusätzlich für die Gruppen A4 ($p = 0,0094$) und A ($p = 0,0062$) ein hochsignifikantes Ergebnis beschrieben werden. Möglicherweise zeichnet sich Ki67 damit als ein aussagekräftiger Marker für die Untergruppen der ER-positiven Tumore aus.

An dieser Stelle muss auf das Problem des multiplen Testens hingewiesen werden. Bei der großen Menge an Testungen, die in der Studie durchgeführt wurde, sind bereits durch die Anzahl der Testungen 4-5 Ergebnisse zufällig signifikant. Diese statistische Unsicherheit muss bei der Betrachtung und Interpretation der erhobenen Ergebnisse berücksichtigt werden.

In die multivariable Cox-Regressionsanalyse wurden zusätzlich zum jeweiligen Biomarker die Variablen histologischer Grad, Lymphknotenstatus, Tumorgroße und Alter der Patientin aufgenommen. Sie ergab für die Grundgesamtheit Gruppe A+B ein hochsignifikantes Ergebnis für die beiden Biomarker HH3 (Hazard ratio 1,67; 95 % KI 1,3-2,16; $p = 0,0001$) und Ki67 (Hazard ratio 1,4; 95 % KI 1,09-1,81; $p = 0,0084$). Passend zum Ergebnis der univariaten Analyse konnte für Ki67 in der Gruppe A ein signifikantes Resultat beobachtet werden (Hazard ratio 1,39; 95 % KI 1,0-1,92; $p = 0,0446$).

In einer früheren Untersuchung konnte Phosphohiston H3 als starker prognostischer und prädiktiver Faktor beim luminalen, triple-negativen und basal-ähnlichen nodalnegativen Mammakarzinom an $n = 240$ Patientinnen im Alter < 71 J. nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Anfärbung von Tumorgewebe mit polyklonalem Anti-PHH3 (Kaninchen) wies eine im Vergleich zu luminalen, HR-positiven Tumoren signifikant höhere Expression von PHH3 bei den prognostisch ungünstigeren TNBC und BLBC auf. Es konnte eine hohe Übereinstimmung bei der Auszählung durch verschiedene Untersucher sowie zwischen manueller Auszählung und digitaler Bildanalyse festgestellt werden (Skaland et al. 2009).

Die erste Studie, die einen direkten Vergleich mit dem etablierten Proliferationsmarker Ki67 herstellte, konnte eine deutliche Überlegenheit von PHH3 belegen. An zwei TMAs von 108 Brustkrebspatientinnen wurde eine IHC-Färbung von PHH3 und Ki67 durchgeführt und das outcome nach einem medianen follow-up von 85 Monaten (2 bis 191 Monate) analysiert. Im Ergebnis erhöhte PHH3 stärker als Ki67 den prognostischen Wert der klassischen

Vorhersagevariablen wie NPI und Patientenalter und war ein stärkerer Prädiktor für das 5-Jahres-Überleben der Patientin. Durch den Vorteil einer konstant starken und einheitlichen Anfärbung von PHH3 in mitotischen Zellen war die Quantifizierung einfacher und weniger zeitaufwändig als die Auszählung des durch eine variabelere Anfärbungsintensität charakterisierten Ki67 (Gerring et al. 2015).

Auch in weiteren Untersuchungen konnte die Überlegenheit von Phosphohiston H3 zu Ki67 und zum Mitotischen Aktivitätsindex (MAI) bestätigt werden. Eine prospektive multizentrische Beobachtungsstudie ließ Tumorproben von 159 Patientinnen mit lumbalem Mammakarzinom von drei versierten Brustkrebspathologen in Bezug auf PHH3, MAI (jeweils $n = 159$) und Ki67 ($n = 105$) beurteilen. Als cut-off zur Unterscheidung zwischen niedrig-proliferativen und hoch-proliferativen Tumoren wurde für PHH3 < 13 bzw. ≥ 13 positive Zellen pro 2 mm^2 gewählt, Ki67 galt entsprechend dem globalen Scoring mit $< 20 \%$ als negativ. Für den MAI wurde die Anzahl der Mitosen pro 2 mm^2 mit $0-7 = 1$, $8-12 = 2$ und $\geq 13 = 3$ kategorisiert. Bei der Beurteilung von PHH3 war eine hohe Interobserver-Übereinstimmung festzustellen ($\text{ICC} = 0,86$), während sie für Ki67 ($\text{ICC} = 0,64$) und MAI ($\text{ICC} = 0,57$) nur mäßig bis moderat war. Wenn zur Beurteilung des histologischen Grades (G) PHH3 anstelle von MAI verwendet wurde, verbesserte sich die Übereinstimmung zwischen den Pathologen bei der Beurteilung des Gratings (modifizierter Bloom-Richardson-Elston Nottingham-Score). Die Gruppe der G2-Tumore wies bei der konventionellen Beurteilung die höchste Variabilität zwischen den Untersuchern auf. Im klinischen Kontext sind die G2-Tumore die Gruppe, die sich bei der Frage nach einer adjuvanten systemischen Therapie am wenigsten eindeutig kategorisieren lässt. Durch Hinzuziehen von PHH3 verringerte sich die Variabilität, es kam zu einer Höherstufung des histologischen Grades und zu einer Erhöhung des Anteils an höhergradigen G3-Tumoren. Im klinischen Gebrauch könnte eine Hinzunahme von PHH3 die Anzahl der G2-Tumore verringern und damit die Indikationsstellung zur adjuvanten systemischen Therapie vereinfachen (van Steenhoven et al. 2020).

Auch zehn Jahre nach Gründung der IKWG und Etablierung einer Standardisierung bei der visuellen Auswertung von Ki67 wird von dieser Arbeitsgruppe eine erhebliche Variabilität zwischen Beobachtern und Laboren in einem Bereich zwischen $\text{Ki67} > 5 \%$ und $< 30 \%$ beobachtet. Das Expertengremium der IKWG entwickelte daraus die Empfehlung, in der klinischen Anwendung die visuelle Ki67-Analyse zur Therapieentscheidung nur in den Bereichen $\leq 5 \%$ und $\geq 30 \%$ einzusetzen. So kann im Bereich der sehr niedrigen ($\leq 5 \%$) und der sehr hohen ($\geq 30 \%$) Werte bei der Entscheidung über eine adjuvante Chemotherapie auf eine zusätzliche Multi-Genexpressionsanalyse verzichtet werden. Gegenstand weiterer Forschung soll eine bessere Festlegung der Grenzwerte nach klinischen Gesichtspunkten sein, eine Verbesserung der Präzision durch automatisierte

Scoring-Systeme und die Hinzunahme einer Genexpressionsanalyse für Ki67. Des Weiteren soll die Verwendung serieller Ki67-Messungen zur Beurteilung des Therapieansprechens bei neuartigen Therapeutika überprüft werden. Auch die Hinzunahme anderer Proliferationsproteinen, die Ki67 ersetzen könnten, soll laut Empfehlung der IKWG untersucht werden (Nielsen et al. 2021).

Als eines dieser alternativen Proliferationsproteine hat sich Histon H3 in einer aktuellen Untersuchung als valider Marker für die Beurteilung des mitotischen Scores erwiesen. Im Gegensatz zu Ki67, welches in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, ist HH3 ein spezifischer Marker für die aktive Proliferation in der M-Phase und der späten G2-Phase und kann somit ausschließlich an mitotisch aktiven Zellen nachgewiesen werden. Die Studie vergleicht die manuelle Mitosenzählung an Mammakarzinom-Gewebeproben bei einfacher Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung mit der kombinierten Färbung HE plus PHH3 (IHC) an $n = 97$ Fällen. Dabei wurde eine signifikant höhere Mitosenzahl bei den PHH3-HE-gefärbten Objektträgern (Median 20, SD \pm 33) im Vergleich zu den ausschließlich HE-gefärbten Präparaten (Median 16, SD \pm 25; $p < 0,001$) dokumentiert. Bei der Neubewertung des mitotischen Scores wurden 9 Fälle von Grad 1 auf Grad 2 und 15 Fälle von Grad 2 auf Grad 3 hochgestuft. Insgesamt wurden 24 Fälle in einen höheren Grad eingestuft, keiner der Fälle wurde herabgestuft. Die Übereinstimmung zwischen zwei Pathologen war bei signifikant kürzerer Auswertungszeit höher für die PHH3-HE-Färbung (ICC = 0,820) als für die alleinige HE-Färbung (ICC = 0,514). Auch der Grad der Übereinstimmung zwischen manueller und digitaler Analyse mit den Systemen ImageJ und QuPath war bei den PHH3-HE-gefärbten Präparaten größer als bei den HE-gefärbten Objektträgern (ICC = 0,702 bzw. 0,337 für ImageJ, ICC = 0,824 bzw. 0,405 für QuPath). In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse, in der der Mitose-Score durch PHH3 ersetzt wurde, zeigte sich PHH3 als unabhängiger Prädiktor für das Brustkrebspezifische Überleben (BCSS) (Hazard ratio 5,66; 95 % KI 1,92-16,69; $p = 0,002$) und wies eine stärker signifikante Assoziation mit dem BCSS auf als der Mitose-Score (Hazard ratio 3,63; 95 % KI 1,49-8,86; $p = 0,005$). Ersetzte man den Mitosescore durch Ki67, konnte im Cox-Modell kein signifikanter Einfluss auf das BCSS festgestellt werden (Hazard ratio 1,001, 95% KI 0,999 - 1,002; $p = 0,27$). Auch wenn PHH3 im multivariaten Modell dem Mitose-Score und Ki67 hinzugefügt wurde, stellte es einen unabhängigen Prädiktor für das BCSS (Hazard ratio 5,94; 95 % KI 2,37-14,89; $p < 0,001$) und das metastasenfremie Überleben (Hazard ratio 4,63; 95 % KI 2,13-10,04; $p < 0,001$) dar (Ibrahim et al. 2023).

Insgesamt hat sich gezeigt, dass Phosphohiston H3 ein einfach zu analysierender Biomarker mit geringer Interobserver-Variabilität und hoher Reproduzierbarkeit ist. Verglichen mit etablierten Markern und Indizes stellt PHH3 einen starken prognostischen

und prädiktiven Faktor zur Beurteilung des Mammakarzinoms dar. Gegenüber dem etablierten Proliferationsmarker Ki67 hat sich HH3 hinsichtlich einer besseren Reproduzierbarkeit, einer geringeren Anfälligkeit für präanalytische und analytische Ungenauigkeiten und einer höheren Sicherheit bei der Detektion mitotischer Zellen profiliert. Im klinischen Kontext könnte die Ergänzung des Biomarker-Panels um Histon H3 die Indikationsstellung zur adjuvanten systemischen Therapie vereinfachen und die Durchführung eines Multi-Genexpressionstestes in manchen Fällen überflüssig machen. Die Option einer sicheren Auszählung mit digitalen Bildanalyseverfahren ist ein Aspekt, der HH3 zukünftig einen wichtigen Stellenwert in der digitalen Pathologie sichern könnte.

In unserer Untersuchung konnte im Gegensatz zu vorangehenden Studien keine Überlegenheit von HH3 gegenüber Ki67 festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Analyse nicht an vollständigen Gewebeproben, sondern an Tissue Microarrays vorgenommen wurde und dadurch das Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität mit Hotspot-, Cluster- und Tumorrandbereichen nicht berücksichtigt wurde. Darüber hinaus könnte das zu HH3 äquivalente Ergebnis von Ki67 auch damit zusammenhängen, dass die IKWG-Kriterien zur Standardisierung der Auswertung von Ki67 in der Pathologie Hamburg-West in hohem Maße sorgfältig umgesetzt werden und somit eine gute Reliabilität und Validität bei der Analyse des etablierten Biomarkers Ki67 vorhanden ist.

4.2.2 Östrogenrezeptor β (ER β)

Die Ergebnisse der vorliegenden univariaten Analyse zeigen, dass eine höhere Expression von ER β mit einer Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens korreliert. Eine signifikante Verlängerung des DFS besteht für die Grundgesamtheit (Gruppe A+B, $p < 0,001$, $n = 1857$) sowie für die Untergruppen ‚Kohorte ohne spezifizierendes Kriterium‘ (Gruppe A4, $p < 0,0143$, $n = 427$) und ‚Gesamtheit der ER-positiven Gruppen‘ (Gruppe A, $p = 0,0002$, $n = 1472$). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigt ER β mit einer Hazard ratio von 0,55 den stärksten Effekt von allen neuen Biomarkern auf das DFS und mit $p < 0,0008$ als einziger ein signifikantes Ergebnis (Gruppe A). Der von allen Markern niedrigste Regressionskoeffizient $b = -0,59$ verdeutlicht, dass ER β am stärksten in das Modell eingeht und die Signifikanz der gesamten Analyse entscheidend prägt (likelihood-ratio-test $p = 0,01$). Bei den Triple-negativen Mammakarzinomen (Gruppe B) ist für ER β kein signifikantes Ergebnis festzustellen. In der Gesamtheit der untersuchten TMAs (Gruppe A+B) ist bei einer Hazard ratio von 0,56 und einem Regressionskoeffizienten $b = -0,57$ ein hochsignifikantes Ergebnis und ein starker Einfluss von ER β auf das gesamte Modell zu beobachten ($p = 0,0001$, $n = 1858$). Die Resultate der vorliegenden Studie legen dar, dass das Vorhandensein von ER β mit einem positiven Effekt auf das krankheitsfreie Überleben und die Prognose der Patientin assoziiert werden kann. Dieses Ergebnis

bestätigt eine Vielzahl von Untersuchungen, die in den vergangenen Jahren durchgeführt wurden, es muss jedoch vor dem Hintergrund einer insgesamt ambivalenten Studienlage betrachtet werden.

In einer prospektiven Beobachtungsstudie mit $n = 936$ Mammakarzinompatientinnen wurde ER β mittels IHC analysiert und zum einen mit dem molekularen Tumortyp, zum anderen mit den prognostischen Markern ER α , PR, HER2, p53, BCL2 und Ki67 korreliert. Für eine Subgruppe von $n = 728$ Patientinnen lagen klinische Daten über eine mediane Nachbeobachtungszeit von 50 Monaten (1 bis 108 Monate) vor. Die immunhistochemische Anfärbung der Tumore war in 55,5 % der Fälle positiv auf ER β , in 70,3 % der Fälle und damit deutlich häufiger positiv auf ER α . Die Expression von ER β war für alle molekularen Subtypen ungefähr gleich mit 54,7 % bei Luminal A-Tumoren, 55,4 % bei Luminal B-Tumoren, 55,3 % bei TNBC und 56,3 % beim Her2-Subtyp. Es ließ sich im Gegensatz zu ER α keine signifikante Korrelation zwischen ER β und den anderen analysierten Parametern darstellen. Allerdings konnte ER β in zwei Untergruppen als interessanter diskriminierender Faktor identifiziert werden: 1) die nodalpositiven Patientinnen, bei denen ER β besonders in Verbindung mit Progesteronrezeptor-Negativität ein erhöhtes Rezidivrisiko vorherzusagen schien und 2) die nodalnegativen Patientinnen, die bei Nachweis von ER β ein besseres Ansprechen auf eine endokrine Therapie zeigten. So scheint die Expression von ER β anders als bei nodalnegativen Patientinnen bei nodalpositivem Befund mit einem aggressiveren Verlauf einherzugehen (Novelli et al. 2008). Eine andere Untersuchung mit IHC-Färbung an Brusttumoren kam zu einem gegensätzlichen Ergebnis. Hier korrelierte eine hohe Expression von ER β 1 signifikant mit einer guten Prognose und verlängertem DFS ($p = 0,046$), was sich besonders für die Gruppe der nodalpositiven Patientinnen zeigte ($p = 0,013$). Einschränkend für die Vergleichbarkeit der Studien muss der mit $n = 162$ geringere Umfang der Kohorte, die auf den Luminalen Subtyp beschränkte Auswahl und eine Differenzierung zwischen den Isoformen ER β 1 und ER β 2 erwähnt werden (Zhang et al. 2012). In einer Meta-Analyse von 20 Studien aus den Jahren 1990-2015, die den ER β -Status bei Brustkrebspatientinnen im Frühstadium mittels immunhistochemischer Anfärbung bestimmten, wurden die Hazard ratios für das krankheitsfreie Überleben (DFS) und das Gesamtüberleben (OS) berechnet. Ein Ergebnis dieser Studie war, dass der prognostische Wert von ER β bei Patientinnen mit negativem ER α -Status höher war als bei Patientinnen mit positivem ER α -Status. So war bei ER α -negativen Patientinnen die ER β -Expression signifikant mit einem erhöhten DFS (Hazard ratio = 0,37; 95 % KI 0,14-0,93; $p = 0,03$) und OS (Hazard ratio = 0,44; 95 % KI 0,30-0,65, $p < 0,0001$) verbunden. Bei ER α -positiven Patientinnen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen ER β -Expression und dem DFS (Hazard ratio = 0,77; 95 % KI 0,46-1,27; $p = 0,31$) oder OS (Hazard ratio = 0,64; 95 % KI 0,37-1,11; $p = 0,11$) festgestellt

werden (Tan et al. 2016). Es existieren verschiedene ER β -Isoformen, die hinsichtlich der Prognose unterschiedlich zu bewerten sind. Bei aggressiveren Karzinomarten ist die Expression von ER β 1 oft erniedrigt, während eine höhere Expression von ER β 1 mit einem verlängertem Gesamtüberleben verbunden ist. Über eine ER β -Modulation mit spezifischen Liganden werden gleichzeitig mehrere tumorsuppressive Signalwege aktiviert, so dass der Kernrezeptor erfolgversprechend für die Anwendung einer zielgerichteten Therapie genutzt werden könnte (Mal et al. 2020).

Die Studienlage der vergangenen Jahre bleibt kontrovers. Das Vorliegen einer Vielzahl von ER β -Isoformen, deren unterschiedliche Funktion und verschiedenartige Auswirkung auf die Transkription sowie eine bis heute nicht optimale Spezifität vieler ER β -Antikörper könnte die widersprüchlichen Daten zur Rolle von ER β erklären (Sellitto et al. 2020). Da eine ausreichende ER β -Spezifität und -Sensitivität bei den meisten kommerziell verfügbaren ER β -Antikörpern fehlt, überprüften Hawse et al. die ER β -Antikörper PPZ0506 und PPG5/10 an benignem Brustgewebe sowie an malignem Brustkrebsgewebe. Unter der Voraussetzung, dass eine standardisierte Methodik bei IHC-Anfärbung und Auswertung eingehalten wird, stellten sie für beide ER β -spezifische Liganden eine hohe Validität fest und forderten die Einhaltung eines optimierten und standardisierten IHC-Protokolls für die Anwendung von ER β -Antikörpern in weiteren Studien (Hawse et al. 2020).

Während sich die meisten Untersuchungen auf die Messung der ER β -Proteinexpression konzentrieren, wurde in einer neueren Studie an einer großen populationsbasierten Kohorte (SCAN-B, n = 3207) die Expression des rezeptorcodierenden Gens ESR2 mittels RNA-Sequenzierung exploriert. Insgesamt war bei den Brusttumorgeweben deutlich häufiger das Vorkommen von ESR1 (ER α -codierendes Gen) als von ESR2 (ER β -codierendes Gen) nachzuweisen. Dabei war die Expression von ESR2 bei den ER α -negativen Tumoren deutlich höher als bei den ER α -positiven Tumoren. Von den ER α -negativen Subtypen (normal-like, basal-like, Her2-Typ) wurden 46,9 % der Fälle als ESR2-hoch eingestuft, während die ER α -positiven Subtypen (Luminal A, Luminal B) nur zu 30,9 % als ESR2-hoch eingestuft wurden. Mammakarzinompatientinnen mit einer hohen Expression von ESR2 wiesen ein signifikant längeres Gesamtüberleben auf als Patientinnen mit niedrigem ESR2 (p = 0,006). Dies betraf besonders die Subgruppe, die eine endokrine Therapie erhielt (p = 0,03) und eine weitere Subgruppe von Patientinnen, die an Triple-negativem Brustkrebs erkrankt waren (p = 0,01). Damit stellt sich ER β als aussagekräftiger Biomarker für eine günstige Prognose des TNBC dar. Eine Hochregulierung des Rezeptors bzw. der Proteinexpression könnte für eine gezielte Therapie nutzbar gemacht werden. Die Messung der ESR2-mRNA-Genexpression in dieser Studie hat den Vorteil, dass die Verwendung der bis heute größtenteils nicht zuverlässigen ER β -Antikörper vermieden wird. Trotz dieses Vorzuges und der großen Fallzahl müssen die Ergebnisse der Untersuchung jedoch kritisch

betrachtet werden. Obwohl eine Konkordanz von mRNA zu Proteinexpression angenommen werden kann, muss man von einer Varianz der Proteinspiegel aufgrund von Translation, posttranslationaler Modifikation und individuell unterschiedlichem Proteinzerfall ausgehen. Eine weitere Limitation könnte darstellen, dass neben den Tumorzellen auch Immunzellen wie zum Beispiel Lymphozyten ERS2 exprimieren und dadurch eine brustkrebspezifische Beurteilung nur eingeschränkt möglich ist (Dalal et al. 2022).

Die Mechanismen und Signalwege, mit denen ER β eine Funktion bei der Tumorsuppression einnimmt, sind vielfältig. Die onkosuppressive Wirkung von ER β beruht unter anderem auf seiner Rolle bei Migration und Invasion von Brustkrebszellen, seiner hemmenden Wirkung in der Zellzyklusprogression, seiner downregulierenden Wirkung auf den Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT-Signalweg und auf der Beeinflussung der mitochondrialen Funktion. Des Weiteren nimmt ER β Einfluss auf die Regulation der Gentranskription, der RNA-Reifung und der posttranskriptionellen Modifikation. ER β verursacht Veränderungen von microRNA-Expression und DNA-Methylierung und entfaltet seine tumorsuppressive Funktion über eine Wechselwirkung mit weiteren Proteinen und Onkogenen. Auch das Zusammenspiel von ER α und ER β hat eine Auswirkung auf die Brustkrebsprognose und das Ansprechen einer Therapie (Zhou und Liu 2020).

Die Beteiligung von ER β an verschiedenartigen zellulären Signalwegen lässt die Hypothese zu, dass ER β ein mögliches Ziel für die Krebstherapie sein könnte. Für den besonders aggressiven und schwer zu therapierenden Brustkrebstyp TNBC konnte mit umfassend validierten Antikörpern gezeigt werden, dass 15-30 % der Tumore ER β exprimieren. Bei TNBC konnten unterschiedliche Signalwege identifiziert werden, an denen ER β beteiligt war und über komplexe Interaktionen zur Hemmung von Invasivität, Zellmigration und Metastasenbildung beitrug (Sellitto et al. 2020). Das gleichzeitige Vorliegen eines positiven Androgenrezeptorstatus verstärkte bei TNBC die onkosuppressive Wirkung von ER β (Anestis et al. 2019).

Die Suche nach selektiven ER β -Agonisten und deren Anwendung zur Behandlung des Mammakarzinoms ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. In einer in-vitro-Studie wurde an ER α -positiven Brustkrebszelllinien (MCF7 und T47D) und immortalen Brustepithelzellen (MCF10A) die Wirkung der ER β -Agonisten OSU-ERb-12 und LY500307 überprüft. Es zeigte sich, dass die ER β -Agonisten eine blockierende Wirkung auf die Zellproliferation, Zellmigration und Koloniebildung ausübten und eine Induktion von Apoptose und Zellzyklus-Arrest verursachten. Die tumorsuppressive Wirkung war besonders ausgeprägt, wenn gleichzeitig eine Blockade des Östrogenrezeptors α mit einem ER α -Antagonisten wie Tamoxifen durchgeführt wurde. Der synergistische Effekt von ER β -Agonisten und ER α -Antagonisten ist möglicherweise auch bei weiteren selektiven

Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) vorhanden und müsste in einer in-vivo-Studie überprüft werden (Datta et al. 2022).

Eine präklinische Studie am Tiermodell gab Hinweise darauf, dass die Expression von ER β 1 das Wachstum des Primärtumors und die Metastasierung signifikant reduzierte (in-vivo-Xenograft, Mausmodell mit inokulierten humanen TNBC-Zellen). Mittels Genanalyse konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen von ER β 1 eine Suppression von proliferations- und metastasenassoziierten Genen (z. B. SNAIL, SLUG, Vimentin, N-Cadherin, MMP7 und TIMP2) induzierte und Brustkrebsstammzellmarker (z. B. OCT3/4, NANOG) deutlich reduzierte. Bei Anwendung eines ER β -Agonisten, dem ER β -selektiven Liganden Chloroindazol, und bei hohen ER β -Spiegeln wurde dieser Effekt in den meisten Fällen weiter verstärkt. Diese Erkenntnis führt zu der Annahme, dass ER β ein interessantes Ziel für eine endokrine Therapie bei dreifach negativem Brustkrebs darstellen könnte (Dey et al. 2022).

Eine seit 2019 laufende klinische Phase-II-Studie untersucht eine mögliche antitumorale Wirkung von Estradiol bei Patientinnen mit ER β -positivem, dreifach negativem lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem Brustkrebs. Dazu erfolgt die orale Gabe von Estradiol 3 x 2 mg pro Tag bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem TNBC, die eine ER β -Expression mit > 25 % moderater bis starker Kernfärbung aufweisen. Das therapeutische Ansprechen wird anhand von Gewebebiopsien, Blutplasma-Analysen und bildgebender Diagnostik (CT, MRT, PET-CT) überprüft. Die Studie mit nach aktuellem Stand geschätzten 38 Probandinnen wird voraussichtlich im April 2024 abgeschlossen sein (NCT-Nummer: NCT03941730).

In einem neueren Review wurden 51 experimentelle und klinische Studien aus den Jahren 1997–2021 analysiert, die die ER β -Proteinexpression und/oder die ER β -mRNA-Expression untersuchten und die Ergebnisse mit der Prognose, mit klinischen Parametern, endokrinem Therapieansprechen und dem Gesamtüberleben korrelierten. Die Ergebnisse bleiben widersprüchlich und die klinische Bedeutung von ER β ist weiter unklar, da günstige und ungünstige klinische Verläufe und sowohl gutes als auch schlechtes Ansprechen auf eine endokrine Therapie zu beobachten waren. Dies kann auf die unterschiedlichen Isoformen des Östrogen β -Rezeptors zurückzuführen sein, aber auch auf das Fehlen einer validierten und standardisierten Testmethode für die ER β -Proteinexpression und die ER β -mRNA-Expression (Choi 2022).

Ein in diesem Jahr veröffentlichtes Review bestätigte erneut die ambivalente Rolle von ER β . Die Koexpression von ER α beeinflusst maßgeblich die Funktion von ER β , ist aber nicht der alleinige Faktor für eine antitumorale oder karzinogene Wirkung. So muss ER β stets in der Interaktion mit anderen Rezeptoren, Signalwegen und Genen betrachtet werden. Das Vorkommen verschiedener ER β -Isoformen und das Fehlen spezifischer Antikörper können

die diskrepanten Forschungsergebnisse der vergangenen Jahre erklären. Die Entwicklung neuer ER β -selektiver Liganden könnte dazu beitragen, die Bedeutung von ER β zu klären und die Sicherheit diagnostischer und therapeutischer Studien zu erhöhen (Shen et al. 2023).

In der vorliegenden Untersuchung hat sich ER β als klinisch-pathologisch interessanter Biomarker erwiesen, der eine signifikante Korrelation mit einer Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens zeigte und auf das Bestehen einer günstigeren Prognose der Patientin hinwies. Die in manchen Studien nachgewiesene Bedeutung für die Gruppe der triple-negativen Karzinome konnte nicht bestätigt werden. Vor dem Hintergrund der Literatur könnte das mit einer nicht optimalen Antikörperspezifität bei der Verwendung eines kommerziellen Antikörpers zusammenhängen (mouse monoclonal Anti-Estrogenreceptor beta antibody (14C8), Firma Abcam, Fertigstellung der TMAs 2017/2018) und passt in das Bild der insgesamt uneinheitlichen Studienlage. Mittlerweile stehen standardisierte und validierte Antikörper zur Verfügung, die zur Verwendung in weiteren Studien empfohlen werden. Die Beobachtung, dass bei Anwendung ER β -selektiver Liganden eine ER β -Aktivierung stattfindet und eine Signalkaskade zur Tumorsuppression initiiert wird, macht ER β zu einem vielversprechenden Angriffspunkt für eine zielgerichtete Tumorthherapie. Die Behandlung mit ER β -Agonisten könnte eine einfache, kostengünstige und nebenwirkungsarme Therapieoption für die Patientin mit fortgeschrittenem Mammakarzinom und bei Versagen der First-Line-Therapie sein.

4.2.3 Rac-GTPase-aktivierendes Protein 1 (RacGAP1)

RacGAP1 weist als einziger der neuen Biomarkern bei der multivariaten Analyse in Gruppe B der Triple-negativen Mammakarzinome ein signifikantes Ergebnis auf. Eine hohe Expression von RacGAP1 führt zu einem signifikant besseren klinischen Verlauf (Hazard ratio 0,57, Coeff. $b = -0,56$, $p = 0,0136$, $n = 394$). Auch in der univariaten Analyse zeigt die hochrezeptorpositive Gruppe in der gesamten Kohorte (Gruppe A+B) ein signifikant besseres DFS als die Gruppe mit niedriger Expression des Markers ($p = 0,0022$, $n = 1816$). Dieses Ergebnis erscheint konträr zu einer Vielzahl von Studien, die eine erhöhte Expression von RacGAP1 mit einer schlechteren Prognose des Mammakarzinoms assoziieren.

RacGAP1 ist ein Protein, das über die Aktivierung des Enzyms Rac-GTPase an der Regulation von Zellwachstum, Zelltransformation und Metastasierung beteiligt ist. Die erste Studie, in der die RacGAP1-mRNA-Expression bei Hochrisikopatientinnen mit Brustkrebs untersucht wurde, zeigte ein signifikant schlechteres DFS ($p = 0,002$) und OS ($p < 0,001$, $n = 595$) bei Patientinnen mit einer hohen RacGAP1-mRNA-Expression. In dieser Gruppe war zusätzlich eine höhere Expression des Proliferationsmarkers Ki67 sowie ein hoher

histologischer Grad festzustellen (Pliarchopoulou et al. 2013). Eine weitere Studie verglich die Proliferationsmarker Ki67, TOP2a (Topoisomerase II α) und RacGAP1 und differenzierte die Ergebnisse für die drei Subkohorten des luminalen, Her2-positiven und triplenegativen Subtyps. Es konnte gezeigt werden, dass die RacGAP1-mRNA-Expression beim luminalen Subtyp den Proliferationsmarkern Ki67 und TOP2a als prognostischer und prädiktiver Marker überlegen war. In der luminalen Subgruppe war eine Überexpression aller drei Marker bei den mit Chemotherapie behandelten Patientinnen prädiktiv für ein frühes Tumorrezidiv, aber lediglich RacGAP1-mRNA zeigte in der multivariaten Analyse ein signifikantes Ergebnis. Für die Hormonrezeptor-positiven Patientinnen mit endokriner Therapie konnte RacGAP1 als einziger prädiktiver Proliferationsmarker identifiziert werden, weshalb er einen starken prognostischen und prädiktiven Marker für die Untergruppe der luminalen Tumoren darstellen könnte. Unklar bleibt, ob dies auch für eine immunhistochemische Anfärbung von RacGAP1 zutrifft und somit RacGAP1 analog zu Ki67 in der klinischen Routine zur Beurteilung der Proliferationsrate und der Aggressivität des Tumors verwendet werden kann (Milde-Langosch et al. 2013). Hinweise dafür lassen sich in einer etwas später durchgeführten Studie von Şahin et al. finden, die an TMAs von n = 457 Fällen von Mammakarzinom mittels immunhistochemischer Anfärbung die gleichen Biomarker Ki67, RacGAP1 und TOP2a hinsichtlich der Prognose der Patientin untersuchten. Dazu wurde die Expression der Proliferationsmarker mit klinischen, histopathologischen, prognostischen und weiteren immunhistochemischen Befunden korreliert. Auch in der IHC-basierten Untersuchung ging eine Überexpression der Marker mit einer schlechteren Prognose einher. Durch eine Hinzunahme der Marker zur histopathologischen Routinediagnostik könnte die Einschätzung der Prognose verbessert werden. Des Weiteren könnten die an Mitose und zellbiologischen Prozessen beteiligten Proteine RacGAP1 und TOP2a einen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie darstellen (Şahin et al. 2016). Eine Blockade der RacGAP1-vermittelten mitochondrialen Spaltung wäre ein mögliches Ziel für eine derartige Target-Therapie. Zhou et al. (2021) fanden in Zelllinien und in Brustkrebsgewebe eine gesteigerte Expression des Pseudogens von RacGAP1, die lange nicht-codierende RNA (lncRNA) RacGAP1P, und stellten eine Korrelation mit einer schlechteren Prognose, dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie dem TNM-Stadium fest. Bei einer Überexpression von lncRNA RacGAP1P kommt es über eine kompetitive Bindung an die tumorsuppressive Mikro-RNA miR-345-5p zu einer Freisetzung von RacGAP1, welches über den Drp1-Signalweg (Dynamin1-ähnliches Protein) die mitochondriale Spaltung initiiert und dadurch das invasive und metastatische Potenzial der Krebszellen erhöht (Zhou et al. 2021). Die entscheidende Rolle von RacGAP1 bei der mitochondrialen Spaltung und die Möglichkeit einer pharmakologischen bzw. genetischen Blockade konnten in einer Studie von Ren et

al. (2021) verifiziert werden. Eine Überexpression von RacGAP1-RNA in Brustkrebszellen führte auch hier zu einer schlechteren Prognose mit einer signifikanten Verkürzung des Gesamtüberlebens und einer Verstärkung von Invasivität und Metastasierung. Es wurden *in vitro* RacGAP1 überexprimierte Zellkulturen (MDA-MB-231 und MDA-MB-468) entnommen und *in vivo* am murinen Xenograft-Modell injiziert. Unbehandelt waren eine erhöhte Invasivität der Tumorzellen und eine pulmonale Metastasierung bei den Mäusen festzustellen. Eine genetische Blockade der mitochondrialen Spaltung durch Anwendung des Genmodifikators CRISPR/Cas9 führte genau wie die Applikation von small hairpin RNA (shRNA) zu einer Ausschaltung von RacGAP1 und damit zu einem Verlust der invasiven Funktion und einer Abnahme der Metastasierung. Dieser Effekt war auch bei der medikamentösen Behandlung mit Mdivi-1, einem Inhibitor der mitochondrialen Spaltung, zu beobachten. Eine Blockade der RacGAP1-vermittelten mitochondrialen Fragmentierung könnte ein vielversprechendes Therapieziel beim metastasierten Mammakarzinom darstellen (Ren et al. 2021). Eine aktuelle Multiomics-Analyse führte ebenfalls zu der Annahme, dass RacGAP1 ein zuverlässiger prognostischer Biomarker und ein mögliches Ziel für eine tumorsuppressive Therapie sein könnte. Bei Auswertung der RacGAP1-Gen- und Proteinexpression von 33 verschiedenen menschlichen Malignomen wurde festgestellt, dass eine Überexpression von RacGAP1 ausnahmslos mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Für Brustkrebs konnte eine signifikante Verkürzung des Gesamtüberlebens sowie des rezidiv- und metastasenfrenen Überlebens gezeigt werden ($p < 0,001$) (Eid et al. 2022).

Vor dem Hintergrund des wissenschaftlichen Umfelds ist die in der vorliegenden Untersuchung beobachtete Assoziation einer erhöhten RacGAP1-Expression mit einer günstigeren Prognose schwierig einzuordnen. Trotz hoher Fallzahl könnte die Verwendung von tissue microarrays eine mögliche Limitation darstellen, da der kleine Tumorausschnitt nicht zwingend den gesamten Tumor repräsentiert und eine intratumorale Heterogenität nicht ausreichend abgebildet wird. Eine mögliche Unschärfe könnte dadurch zustande kommen, dass hier im Unterschied zu der überwiegenden Anzahl an Publikationen keine Gen-Expressionsdaten, sondern eine immunhistochemische Antikörperfärbung zur Beurteilung der Proteinexpression verwendet wurde. Auch eine zusätzlich zur nukleären Anfärbung vorliegende diffuse zytoplasmatische IHC-Färbung des Biomarkers RacGAP1 könnte das Ergebnis der Messung verzerren. In einer Untersuchung zum gegensätzlichen prognostischen Effekt der nukleären und zytoplasmatischen RacGAP1-Expression wurden beim kolorektalen Karzinom verschiedene Anfärbungsmuster differenziert. Das Ergebnis zeigte, dass eine erhöhte nukleäre Expression mit einer Verschlechterung des Gesamtüberlebens einherging, während eine erhöhte zytoplasmatische Expression mit einer Verlängerung des Gesamtüberlebens verbunden war. Dies traf besonders stark bei

gleichzeitigem Vorliegen einer erhöhten zytoplasmatischen und einer erniedrigten nukleären Expression zu ($p < 0,001$) (Yeh et al. 2016). Möglicherweise ist der in der vorliegenden Studie verwendete RacGAP1-Antikörper ILMN_2077550, der sich bei Durchsicht des METABRIC-Datensatzes als geeignet erwiesen hatte und aus diesem Grund für die Anfärbung ausgewählt wurde, sensibel auf zytoplasmatische Anfärbung und könnte damit das Ergebnis beeinflusst haben. Die visuelle Kontrolle der TMAs bestätigte die Annahme, dass neben der nukleären Anfärbung auch zytoplasmatische und unspezifische Anfärbung vorhanden sind und durch diese deutliche Hintergrundfärbung ein nur eingeschränkt repräsentatives Resultat bei der Verwendung der digitalen Bildanalyse vorliegt.

4.2.4 B-cell lymphoma 2 (BCL2)

Eine erhöhte Expression des Biomarkers BCL2 war in dieser Studie mit einer signifikanten Verlängerung des DFS in der Grundgesamtheit (Gruppe A+B, $p < 0,001$, $n = 1765$) sowie in den Untergruppen ‚G2-Tumore‘ (Gruppe A1, $p = 0,0053$, $n = 285$) und ‚Gesamtheit der ER-positiven Gruppen‘ (Gruppe A, $p = 0,0073$, $n = 1375$) assoziiert. Dieses Resultat bestätigt eine Vielzahl von Untersuchungen, die BCL2 als pro-apoptotisches und damit antikarzinogenes Protein und als validen prognostischen Marker für die Anwendung beim Mammakarzinom einstufen.

Eine Studie, in der immunhistochemisch angefärbte Gewebe-Microarrays (TMAs) von $n = 393$ Brustkrebspatientinnen untersucht wurden, prüfte den prognostischen Wert der BCL1- und BCL2-Expression. Uni- und multivariate Analyse erbrachten das Ergebnis, dass BCL1 keinen prognostischen Effekt hatte, während sich BCL2 bezogen auf die klinisch-pathologischen Faktoren Tumorgröße, Nodalstatus, histologischer Grad, Östrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR), HER2, lymphovaskuläre Invasion, Alter, Body-Mass-Index, Operation, Strahlentherapie, Chemotherapie, Anti-HER2-Therapie und endokrine Therapie als unabhängiger prognostischer Marker erwies. Dass eine hohe BCL2-Expression signifikant mit einem längeren krankheitsfreien Überleben einherging, konnte nur in der Subgruppe der HR+/HER2- Karzinome ($n = 137$) festgestellt werden, galt aber nicht für die Karzinome der anderen Subtypen HR+/HER2+ ($n = 28$), HR-/HER2+ ($n = 7$) und HR-/HER2- ($n = 15$). Dies könnte die Annahme einer unterschiedlichen Wirkung von BCL2 auf verschiedene Zell- und Karzinomtypen bekräftigen, ist aber unter Berücksichtigung der vor allem bei den nicht signifikanten Subtypen geringen Fallzahlen mit Vorsicht zu interpretieren (Hwang et al. 2021).

Eine prospektive Analyse mit einer deutlich höheren Fallzahl von 11.212 Brustkrebspatientinnen aus fünf Studienzentren prüfte die klinische Validität von BCL2 als prognostischen Marker für das Gesamtüberleben über eine längere Nachbeobachtungszeit

von bis zu 15 Jahren (bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 8,4 Jahren). Sie kam zu dem Ergebnis, dass BCL2 unabhängig von pathologischen Kriterien wie Tumorgröße, Grading, Lymphknotenstatus sowie von ER- und Her2-Status und bei allen mittels IHC ermittelten Subtypen (ER+/ER-, Her2+, Her2- und Triple negativ) zu einer Verbesserung der Vorhersage führte. Die Hinzunahme von BCL2-Immunhistochemie zu dem etablierten Risikovorhersagealgorithmus Adjuvant Online (AOL) verbesserte signifikant die Vorhersagequalität im Vergleich zu AOL allein ($p = 0,0039$). Frauen mit ER+/BCL2- hatten eine schlechtere Prognose als Frauen mit ER-/BCL2+. Der prognostische Einfluss blieb unabhängig davon, ob eine adjuvante Chemotherapie oder eine adjuvante endokrine Therapie erfolgte und erwies sich in der Cox-Regressionsanalyse als stabil über die Zeit (Dawson et al. 2010).

In einer retrospektiven Studie wurde überprüft, ob ein Markerpanel von 13 Biomarkern (ER, PR, BCL2, p53, p27, Cyclin E, c-Myc, Ki67 (= MIB-1), Mcm-2, HER2, CK17, CK 8/18 und CK 5/6) oder einzelne Biomarker die prognostische Kraft des Nottingham Prognostic Index (NPI) verbessern könnten. Dazu wurden in einer Entwicklungsstudie Gewebe-Microarrays von 930 Brustkrebspatientinnen der University of British Columbia aus den Jahren 1970 bis 1990 immunhistochemisch angefärbt, die Patientinnen bis 2001 nachbeobachtet. Die Untersuchungen ergaben, dass die Hinzunahme des Markerpanels die Vorhersage des langfristigen Ergebnisses im Vergleich zum NPI allein nicht verbesserte. Lediglich ein einzelner Biomarker, das BCL2 erwies sich als unabhängiger Prädiktor für das outcome der Patientin und schien als prognostische Ergänzung zum NPI nützlich zu sein. Dieses Ergebnis wurde in einer Validierungsstudie mit einer unabhängigen Serie von 1961 Fällen von Mammakarzinom aus der Nottingham Tenovus Primary Breast Carcinoma Series (1986-1998) bestätigt. Dabei zeigte sich der maximale prognostische Effekt innerhalb der ersten 5 Jahre nach der Diagnosestellung (Callagy et al. 2006).

In einer Meta-Analyse wurden 12 Studien mit insgesamt 5000 Patientinnen im Alter von ≥ 65 Jahren mit primär operablem invasivem Brustkrebs ausgewertet. In den zehn Beobachtungsstudien und zwei Fall-Kontroll-Studien wurden 28 Biomarker im Vergleich zu Standard-Biomarkern (definiert als ER, PR, HER2, Ki67) untersucht. BCL2 gehörte neben Cyclin E, EGFR, LKB1, MUC1 und Creatin-Kinasen zu den sechs Markern mit der höchsten Evidenz für einen möglichen prädiktiven und prognostischen Einsatz. Eine höhere BCL2-Expression war bei den älteren Patientinnen nachzuweisen und mit einem längeren progressionsfreien Überleben verbunden (Parks et al. 2021). Das Ergebnis dieser Untersuchung bestätigt die Aussage einer früheren Meta-Analyse, bei der in 18 Studien mit 5.892 Fällen unabhängig von Lymphknotenstatus, Tumorgröße, Tumorgrad und anderen biologischer Variablen in der multivariaten Analyse sowohl das krankheitsfreie Überleben

als auch das Gesamtüberleben bei Vorhandensein einer Überexpression von BCL2 signifikant verbessert war (Callagy et al. 2008).

Die Tatsache, dass BCL2 eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des apoptotischen Signalweges einnimmt, könnte das Protein zu einem interessanten Ziel für einen möglichen therapeutischen Ansatz bei der Behandlung des Mammakarzinoms machen. Mit dem Wirkstoff ABT-199 (Venetoclax) wurde ein hochselektives BH3-Mimetikum gefunden, welches die Aktivität der physiologischen pro-apoptotischen BH3-only-Proteine im intrinsischen Signalweg der Apoptose imitiert. Über eine Inhibition des anti-apoptotischen BCL2 aktiviert es die Apoptose und fördert so den Abbau von Tumorzellen. Venetoclax (Venclyxto®) ist ein zur oralen Einnahme vorgesehener BCL2-Inhibitor, der nach einem Aufdosierungsschema eingenommen wird, damit ein schrittweises Tumordebülking erfolgt und schwerere Nebenwirkungen wie Neutropenie oder Tumorlysesyndrom vermieden werden. Durch die Einnahme in ansteigender Dosierung weist Venetoclax ein kalkulierbares Sicherheitsprofil auf und ist seit 2016 zur Mono- und zur Kombinationstherapie der metastasierten und therapierefraktären Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) (Roberts et al. 2016) und seit 2018 zur Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) zugelassen (Pollyea et al. 2019).

Bezogen auf das Mammakarzinom führte eine präklinische Untersuchung am human-in-mice Xenograft-Modell zu der Erkenntnis, dass die alleinige Applikation des BH3-Mimetikums ABT-199 keinen therapeutischen Nutzen hatte, während sie in Kombination mit der bei ER-positiven Tumoren angewendeten Tamoxifentherapie zu einer Verbesserung des Ansprechens dieser Therapie führte. Von den hormonsensitiven Tumoren profitierte am stärksten die Gruppe der klinisch aggressiveren Luminal B-Tumore, die eine höhere BCL2-Expression aufwiesen und sich durch ein selbst nach längerem tumorfreiem Intervall noch erhöhtes Rezidivrisiko auszeichneten. Als positiver side effect konnte bei Anwendung der Kombinationstherapie eine Verringerung der tamoxifeninduzierten Endometriumhyperplasie beobachtet und daraus ein weiterer karzinoprotektiver Effekt in Bezug auf das Endometriumkarzinom abgeleitet werden (Vaillant et al. 2013). In einer ersten klinischen Studie an Patientinnen mit Östrogenrezeptor- und BCL2-positivem metastasiertem Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Venetoclax und Tamoxifen eine vielversprechende antitumorale Wirkung und eine gute Verträglichkeit bei den zum Teil stark vorbehandelten Patientinnen aufwies. Es handelte sich hier um eine kleine Phase-Ib-Dosisescalations- und Expansionsstudie mit 33 Patientinnen, so dass die Ergebnisse zunächst in weiteren randomisierten klinischen Studien verifiziert werden müssen, bevor daraus eine Behandlungsempfehlung abgeleitet werden kann (Lok et al. 2019).

Eine in-vitro-Untersuchung an Zelllinien des triple negativen Mammakarzinoms (MDA-MB-231-Zellen) bestätigte die antikarzinogene Wirkung von Venetoclax. Das BH3-Mimetikum führte durch seine Funktion als BCL2-Inhibitor über eine Einleitung von Apoptose, Zellzyklusstillstand und autophagieassoziiertem Zelltod zu einer Wachstumshemmung der Krebszellen und einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin (Alhoshani et al. 2020). In einem murinen in-vivo Modellversuch wurde die Wirksamkeit von Venetoclax zur Chemoprävention untersucht. Dazu erhielten Mäuse in die Brustdrüse eine intraduktale Injektion von Lentiviren, die eine onkogene PIK3CA-Genvariante trugen. Nach Bildung einer frühen präkanzerösen Läsion wurden die Mäuse mit einem (n = 29) oder mit zwei (n = 29) Zyklen ABT-199 (Venetoclax) behandelt. Verglichen mit einer nicht behandelten Kontrollgruppe (n = 28) hatte ein einzelner Behandlungszyklus keine Auswirkung auf die Dauer des krankheitsfreien und des Gesamtüberlebens oder auf das Auftreten einer Metastasierung. Bei zwei Behandlungszyklen im Abstand von vier Wochen hingegen war eine signifikante Verlängerung der Tumorlatenz, des Gesamtüberlebens und eine Reduktion der metastatischen Kapazität zu beobachten. In beiden Gruppen konnte kein Unterschied zur unbehandelten Gruppe bezüglich der histopathologischen Merkmale des Tumors, des ER-, PR- und Her2-Status sowie der Expression von Proteinen der BCL2-Familie festgestellt werden. Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass eine dosisabhängige Chemoprävention mit Venetoclax eine mögliche Option zur Verhinderung der Transformation früher Läsionen zum invasiven Brustkrebs darstellen könnte (Young et al. 2022).

In der vorliegenden Untersuchung hat sich BCL2 als aussagekräftiger Biomarker für die Gruppe der hormonrezeptorpositiven Tumore und für die Gruppe aller Tumore gezeigt, der mit der digitalen Bildauswertung gut und sicher zu analysieren war. Vor dem Hintergrund der aktuellen Forschung haben unsere Ergebnisse bestätigt, dass sich BCL2 als geeigneter prognostischer Biomarker erweisen und eine mögliche Option für eine gezielte Chemoprävention mit BH3-Mimetika beim Mammakarzinom darstellen könnte.

4.2.5 Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing Protein (BIRC5, Survivin)

Die univariate Analyse der erhobenen Daten ergab für Brustkrebspatientinnen mit einer erhöhten BIRC5-Expression eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens. Dies traf sowohl für die Grundgesamtheit zu (alle Fälle, Gruppen A+B, p = 0,0024, n = 1793) als auch für die Untergruppe aller ER-positiven Fälle (Gruppe A, p = 0,0175, n = 1404) und die der ausschließlich mit Tamoxifen behandelten Fälle (Gruppe A2, p = 0,0489, n = 360).

Damit stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu einer Vielzahl von Untersuchungen, die Survivin tendenziell häufiger als prognostisch ungünstigen Faktor evaluierten. Es gab jedoch auch in der Vergangenheit gegensätzliche Befunde in Bezug auf die Relevanz von

BIRC5 als Biomarker zur Risikobewertung bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Eine Studie ermittelte bei immunhistochemischer Anfärbung von BIRC5 eine höhere Expression von nukleärem BIRC5 als unabhängigen und günstigen prognostischen Faktor in Bezug auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patientinnen (n = 293) (Kennedy et al. 2003). Damit steht sie kontradiktorisch zu einer anderen, die über Genanalyse mittels RT-PCR (Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion) Survivin als starken und unabhängigen, prognostisch ungünstigen Marker darstellte (n = 275) (Span et al. 2004).

Eine neuere schwedische Studie zeigte in einem größeren Studienumfang, dass eine höhere Expression von BIRC5 mit einer schlechteren Prognose für die Patientin korrelierte (n = 6503). Untersucht wurden in dieser Studie drei unabhängige Kohorten, zum einen Brustkrebs-Gewebeproben aus der Biobank des Universitätskrankenhauses der Region Västra Götaland (VGR-BC, n = 845), zum anderen Daten der METABRIC-Datenbank (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium, n = 1980) und einer kürzlich veröffentlichten multizentrischen schwedischen Datenbank (Sweden Cancerome Analysis Network – Breast, SCAN-B, n = 3678). Es wurde eine quantitative Messung von BIRC5-Protein (für VGR-BC) und BIRC5-mRNA (für METABRIC und SCAN-B) durchgeführt. Das Ergebnis war unabhängig von Nodalstatus und Östrogenrezeptor und es war ein Zusammenhang festzustellen mit dem histologischen Grad (je höher das Grading, desto höher die Survivin-Expression) und dem molekularen Subtyp. Die aggressiveren Subtypen Luminal B und der basal-ähnliche Subtyp (basal-like breast cancer, BLBC) wiesen eine deutlich höhere BIRC5-Expression auf (Oparina et al. 2021).

Da sich die aggressiveren Subtypen häufig therapierefraktär verhalten und zur Metastasierung tendieren, wird intensiv nach zielgerichteten neuen Therapieoptionen gesucht. Seit mehr als zehn Jahren wird erforscht, wie sich die Anwendung von YM155 (Sepantroniumbromid), einem kleinen molekularen Survivin-Suppressor, auf triple-negativen Brustkrebs (TNBC) und das metastasierte Mammakarzinom auswirkt. Nachdem der Wirkstoff über eine Hemmung der Survivin-Expression im in-vitro-Versuch an humanen TNBC-Zelllinien zu einer Verminderung der Tumorzellproliferation und einer Zunahme der Apoptose führte, konnte seine antitumorale Wirkung im in-vivo Xenograft-Mausmodell bestätigt werden. Die kontinuierliche Infusion von YM155 bewirkte eine vollständige Regression der subkutan implantierten Tumore, führte zu einer Reduzierung von Metastasen und einer signifikanten Verlängerung des Überlebens dieser Tiere (Yamanaka et al. 2011). Dies und die Ergebnisse von Untersuchungen des Survivin-Suppressors an Karzinomen anderer Organe ermutigten zu einer multizentrischen, offen randomisierten 2-armigen Phase-II-Studie an 99 Patientinnen mit Her-2-negativem metastasiertem Mammakarzinom. Die Patientinnen erhielten entweder Docetaxel allein (im Median 7,4 Zyklen) oder Docetaxel plus YM155 (im Median 6,0 Zyklen). Das mediane

progressionsfreie Überleben (PFS) betrug im Docetaxel-Arm 10,5 Monate, im Docetaxel + YM155-Arm 8,4 Monate, dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,172$). Entgegen der Annahme führte die Kombinationstherapie trotz guter Verträglichkeit nicht zu einem Benefit für die Patientin (Clemens et al. 2015).

Nahezu sämtliche neuere Studien zeigen bei einer Überexpression von BIRC5 eine schlechtere Prognose für die Patientin mit Mammakarzinom. Eine multiomische Pan-Krebs-Analyse stellte dar, dass BIRC5 bei den meisten der 33 untersuchten Krebsarten im Vergleich zum normalen Gewebe überexprimiert und in der Regel mit einem schlechteren klinischen Verlauf und einer Verkürzung des Gesamtüberlebens assoziiert war. Das traf auch für die Entität der invasiven Mammakarzinome zu (Fäldt Beding et al. 2022).

Auch die Durchsichtung der Brustkrebs-Datenbanken Oncomine und Cancer Genome Atlas (TCGA) erbrachten den Nachweis einer BIRC5-Expression, die im Brustkrebsgewebe signifikant höher war als im normalen Brustgewebe. Bei der Untersuchung von Brustgewebeprobe-Paaren (Karzinomgewebe und angrenzendes normales Drüsengewebe, $n = 2014$) konnte dieser Unterschied sowohl für die Proteinexpression als auch für die mRNA-Expression gezeigt werden. Von den klinisch-pathologischen Merkmalen wurde eine positive Korrelation mit dem Grading, dem Nottingham Prognostic Index (NPI) und dem humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER-2) sowie eine negative Korrelation mit dem Hormonrezeptorstatus (ER, PR) festgestellt. Patientinnen mit triple negativen und basal-ähnlichen Mammakarzinomen wiesen eine signifikant höhere BIRC5-Expression auf ($p < 0,001$). Anhand von Überlebenskurven konnte gezeigt werden, dass eine hohe BIRC5-Expression zu einem kürzeren rezidiv- und metastasenfremem Überleben und einem schlechteren Gesamtüberleben führte. Eine vergleichende Toxikogenomik-Datenbank (Comparative Toxicogenomics Database der North Carolina State University, CTD) wurde verwendet, um die Interaktion zwischen BIRC5 und verschiedenen chemischen Wirkstoffen zu überprüfen. Die Datenbankanalyse zeigte, dass gängige Medikamente über die Modulation von Signalwegen eine Regulierung der mRNA- und Proteinexpression von Survivin hervorrufen konnten. So waren endokrine Medikamente wie Tamoxifen oder Fulvestrant, Chemotherapeutika wie Cisplatin, Epirubicin oder Doxorubicin sowie CDK4/6-Hemmer wie Lapatinib oder Palbociclib mit einer Senkung der BIRC5-Expression verbunden, während zum Beispiel Docetaxel den BIRC5-Level anheben konnte (Dai et al. 2020). Eine große Datenbankanalyse bestätigte die signifikant erhöhte BIRC5-Expression bei der aggressivsten und häufig therapieresistenten Form des Mammakarzinoms, dem TNBC. Bei ca. 45-90 % der triple-negativen Brustkrebsfälle war BIRC5-mRNA überexprimiert und mit einer Verkürzung des Gesamtüberlebens sowie des rezidiv- und metastasenfremem Überlebens korreliert. Die Prognose der TNBC-Patientinnen, die eine Chemotherapie oder eine anti-Her2-Therapie erhielten, unterschied sich in Bezug

auf Gesamtüberleben und pathologische Komplettremission nicht wesentlich von den Patientinnen, die keine Therapie erhielten. BIRC5 spielt somit eine Schlüsselrolle bei der Resistenz des TNBC gegen Chemotherapie und andere Behandlungsschemata. Epigenetische Prozesse wie Hypermethylierung und Chromatinmodellierung durch Histonmodifikation führten zu einer Erhöhung der Transkriptionsexpression des BIRC5-Gens. Eine Interaktion mit anderen onkogenen Zielgenen und mit verschiedenen Tumorpromotoren und Tumorsuppressoren konnte nachgewiesen werden. Das alles macht BIRC5 zu einem vielversprechenden prädiktiven Biomarker und zu einem potenziellen therapeutischen Ziel für die Behandlung von TNBC-Patientinnen (Adinew 2022).

Bei der Entwicklung von Krebstherapeutika fokussieren die Studien der vergangenen Jahre neben generalisierten Survivin-Inhibitoren wie Bexpipazol im Wesentlichen auf fünf Therapiestrategien, die in einem umfangreichen Review gesammelt und bewertet wurden. Es existieren 1) Inhibitoren, die eine Interaktion von BIRC5 mit Partnerproteinen beeinträchtigen wie zum Beispiel Shepherdin, AICAR, Deazaflavin-Analogverbindung 1 oder UC-11, 2) Inhibitoren, die eine für die Funktion von Survivin essentielle Bildung von Homodimeren aus zwei Survivin-Monomeren stören (beispielsweise Abbot 8, LLP3, LLP9, S12, LQZ-7, LGZ-7F oder Indavir), 3) Inhibitoren, die für eine Downregulation der Survivin-Gentranskription sorgen (zum Beispiel YM155, LF118, SF002-96-1 oder WM-127), 4) Inhibitoren, die den Abbau von Survivin-mRNA induzieren wie zum Beispiel ISIS 23722/LY2181308 oder SPC3042/EZN-3042 und 5) zur Immuntherapie verwendetes Survivin und seine Peptide (beispielsweise Survivin-2B80-88 oder SurVaxM). Aufgrund des zielgerichteten Therapieansatzes ist eine geringe Toxizität für das gesunde Gewebe zu erwarten. Diese Vielzahl an Behandlungsoptionen, die noch in klinischen Studien und in vivo überprüft werden müssen, machen BIRC5 zu einem interessanten Biomarker und einem vielversprechenden Therapieziel (Li et al. 2019).

Die Frage, warum in der Studie eine hohe Expression von BIRC5 mit einer signifikant besseren Prognose korrelierte, lässt sich nicht abschließend klären. Mögliche Ursachen können auch hier die Qualität der Färbung, der kleine Tumorauschnitt und eine Limitation durch die automatisierte digitale Bildanalyse sein.

4.2.6 Forkhead Box Protein M1 (FoxM1)

Eine Überexpression des Biomarkers FoxM1 war in dieser Studie mit einer Verlängerung des Gesamtüberlebens assoziiert. FoxM1 ist der einzige Biomarker, der für jede einzelne der Untergruppen eine positive Korrelation zwischen erhöhter Expression und verbesserter Prognose zeigte. Es war jedoch ausschließlich für die Gesamtheit aller Fälle (Gruppe A+B) ein signifikantes Ergebnis darzustellen ($p < 0,0005$ $n = 1812$). Dieses Ergebnis bildet das Gegenteil dessen ab, was in der Literatur über FoxM1 zu finden ist.

In einer früheren Untersuchung wurde eine FoxM1-Überexpression beim Mammakarzinom auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene nachgewiesen und eine signifikante Korrelation zwischen der FoxM1-Expression und dem immunhistochemisch bestimmtem Her2-Status festgestellt ($p = 0,045$). Zunächst wurde mittels PCR-Analyse die mRNA-Expression in nicht-malignen und malignen Brustepithelzelllinien untersucht. Bei den nicht-karzinomatösen Brustepithelzelllinien HMEC, MCF10A und MCF12A wurde eine homogen niedrige FoxM1-mRNA-Expression festgestellt, während sich bei den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, ZR75-1, MDA-MB231, MDA-MB468, MDA-MB435s, SKBR3 und BT20 ein inhomogener und signifikant höherer Expressionsspiegel zeigte ($p = 0,048$). Auffallend war eine außergewöhnlich hohe Expression bei der metastasierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB231. Die folgende Realtime-PCR-Untersuchung der FoxM1-mRNA-Expression an formalinfixiertem, paraffineingebettetem humanem Mammakarzinomgewebe ($n = 25$) und an normalem Brustgewebe ($n = 12$) ergab ebenfalls eine signifikante FoxM1-Upregulation im malignen Gewebe ($p = 0,029$). Zuletzt wurde die FoxM1-Proteinexpression mittels immunhistochemischer Färbung am Tissue-Micro-Array (TMA) ($n = 250$) analysiert. Eine nukleäre FoxM1-Proteinexpression konnte in 87 % der Brustkrebsgewebe ($n = 204$) und nur in 42 % der normalen Brustgewebeproben ($n = 46$) dargestellt werden und erwies sich somit als gleichläufig zur FoxM1-mRNA-Expression. Eine höhere Expression von FoxM1 war mit einer tendenziell schlechteren Prognose der Patientinnen mit Mammakarzinom assoziiert. Die fehlende Signifikanz dieser Korrelation könnte ihre Ursache in der niedrigen Fallzahl der untersuchten Kohorte haben ($p = 0,11$; $n = 202$) (Bektas et al. 2008).

Eine neuere Studie zum Mammakarzinom bestätigte am murinen Modell eine erhöhte Expression von FoxM1 und eine Korrelation mit einer schlechteren Prognose bei den Mäusen, die eine Implantation von Tumorzellen mit originärem FoxM1-Gen aus den Brustkrebszelllinien MCF7 und MDA-MB-213 erhalten hatten. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Komplexbildung des überexprimierten FoxM1 mit dem Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (pRb) zu einer Reduktion der antionkogenen Wirkung von pRb und einem Anstieg der Tumorzellproliferation führte. Bei einer zweiten Kohorte von Mäusen wurde mittels CRISPR/Cas9-Technologie das FoxM1-Gen dahingehend verändert, dass eine Bindung an pRb erschwert wurde und somit weniger FoxM1/pRb-Komplex und mehr freies pRb zur Tumorsuppression vorhanden war. Diese Kohorte zeichnete sich durch eine signifikante Verminderung der Bildung von Lungenmetastasen aus. Die Überexpression von FoxM1 war mit einer reduzierten Expression eines weiteren tumorsuppressiven Proteins, dem Phosphatase and Tensin homolog (PTEN), assoziiert. Eine Überprüfung anhand des TCGA-Datensatzes verifizierte eine inverse Korrelation von FoxM1 und PTEN-mRNA. PTEN greift durch Unterbrechung des PI3K/AKT-Signalweges antionkogen in die

Signaltransduktion ein und bewirkt damit eine Hemmung der Zellproliferation und Tumorbildung. Bei Überexpression von FoxM1 kann durch die Suppression von PTEN eine Kreuzresistenz gegen CDK4/6- und PI3K-Inhibitoren hervorgerufen werden. Eine FoxM1-bedingte Verminderung des freien pRb kann zusätzlich zu einer Resistenz gegen den CDK4/6-Inhibitor Palbociclib führen. Aus diesen Gründen könnte die Evaluation des Biomarkers FoxM1 bei fehlendem Therapieansprechen eine sinnvolle Information liefern und einen möglichen Ansatz für eine gezielte Therapie darstellen (Kopanja et al. 2022). In einer offenen, nicht-randomisierten multizentrischen klinischen Studie wurde überprüft, inwiefern eine Modulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges das Therapieansprechen von Patientinnen mit metastasiertem HR+/Her2- Mammakarzinom beeinflusst, die mit einer Kombination aus Endokriner Therapie (ET) und CDK4/6-Inhibitoren behandelt wurden. Die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6), die wegen ihrer Homologie in der Regel gemeinsam betrachtet werden, dienen im Zellzyklus der Regulation des Überganges von der G1- zur S-Phase. Bei tumorbedingter Dysregulation überwiegen an diesem Checkpoint die mitogenen Signale und es kommt zu einer Erhöhung der Cyclin D-Konzentration. In Folge der dadurch verursachten CDK4/6-Aktivierung wird eine Phosphatgruppe auf das Tumorsuppressorprotein pRb übertragen, das dadurch inaktiviert wird und seine antiproliferative Funktion verliert. Basierend auf der Analyse der Phosphorylierungswerte war das Ziel dieser Studie eine Identifikation prädiktiver Marker für das Ansprechen einer kombinierten endokrinen und CDK4/6-inhibitorischen Therapie. In einem Panel von 126 Proteinen erwiesen sich 61 als signifikant, um zwischen Respondern und Non-Respondern zu unterscheiden. Für die dem CDK4/6-Checkpoint nachgeschalteten Substanzen FoxM1, pRb und Cyclin D1 konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung zu einer signifikanten Verschlechterung des Ansprechens auf eine Kombinationstherapie mit ET und CDK4/6-Inhibitoren führte ($p = 0,025$, $n = 20$) (Abu-Khalaf et al. 2023).

Dem FoxM1-Signalweg wird eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese zugesprochen. Daher könnte eine zielgerichtete Inaktivierung von FoxM1 ein erfolgversprechender Ansatz in der Krebstherapie bedeuten. Die Interaktion mit anderen für die Krebsentstehung bedeutenden Faktoren und Signalwegen wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), Östrogenrezeptor (ER), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Matrixmetalloproteinasen (MMP), Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) und anderen wurde von Wang et al. (2010) beschrieben und als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt in Betracht gezogen. Bekannt sind die downregulierende Wirkung von Docetaxel allein bzw. in Kombination mit Estramustin, von den antibiotischen Thiazolverbindungen Siomycin A und Thiostrepton, vom EGFR-Inhibitor Gefitinib und von Proteasomhemmern wie MG115, MG132 und Bortezomib. Mit dem Ziel, die unerwünschte Toxizität dieser chemischen Inhibitoren zu

vermeiden, wurden erste Studien zu natürlichen chemopräventiven Wirkstoffen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das in natürlichen Quellen wie der Nahrung vorkommende 3,3'-Diindolylmethan in vitro ebenfalls eine Inhibition der FoxM1-Aktivierung bewirkt (Wang et al. 2010). In einer weiteren Therapiestudie erwiesen sich verschiedene 1,1-Diarylethylen-Mono- und Diaminverbindungen und ihre entsprechenden Methiodidsalze über eine Hemmung von FoxM1 als zuverlässige Suppressoren der Tumorzellproliferation und bereits in niedrigen Dosen als wirkungsvolle Antitumormittel. Dies konnte in vitro in zellfreien und zellbasierten Assays und in vivo im präklinischen Mausversuch unter Anwendung menschlicher Brustkrebszelllinien und einer nicht-tumorigenen Brustzelllinie gezeigt werden (Ziegler et al. 2019).

Anhand der Studienlage handelt es sich bei FoxM1 um einen aussagekräftigen prädiktiven Biomarker und ein mögliches Therapieziel für die Behandlung von Brustkrebs. Eine Überexpression von FoxM1 kann bei soliden Tumoren wie auch beim Mammakarzinom unstrittig mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden. Umso mehr überrascht das Ergebnis der vorliegenden Analyse, in dem eine hohe Expression mit einer Verbesserung der Prognose korreliert. Eine mögliche Begründung könnte sein, dass bei Vorliegen einer ausgeprägten Hintergrundfärbung die unspezifischen Anfärbungsartefakte bei der digitalen Bildanalyse mit in die Berechnung eingehen und dadurch falsch-positiv als ‚hohe Expression‘ registriert werden. Im Gegensatz zu HH3, bei dem wir eine gute Übereinstimmung von visueller und digitaler Analyse zeigen konnten, ist möglicherweise FoxM1 für die Auswertung mit digitaler Bildanalyse nicht geeignet, vielleicht hat auch der Algorithmus für die Auswertung noch Potenzial zur Verbesserung. Eine weitere Unschärfe könnte durch den verwendeten Antikörper verursacht sein, der eventuell trotz sorgfältiger Einhaltung der präanalytischen und analytischen Anforderungen in der Anfärbung zu einem nicht ausreichend spezifischen Ergebnis führte.

4.2.7 Asparagin-Synthetase (ASNS)

Bei Auswertung der Asparagin-Synthetase hat sich weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen dem klinischen Verlauf der hoch rezeptorpositiven und der niedrig rezeptorpositiven Gruppe ergeben. Tendenziell ist in allen ER-positiven Gruppen (Gruppen A1 – A4 und A) und in der Gesamtheit aller Tumore (Gruppe A+B) ein besserer Verlauf bei einer hohen Expression von ASNS festzustellen, während bei den triple-negativen Tumoren eine niedrigere Expression mit einem besseren klinischen Verlauf assoziiert ist. Aufgrund der fehlenden Signifikanz in allen Gruppen ist dieses Ergebnis jedoch lediglich eingeschränkt zu bewerten und nur als Tendenz zu betrachten.

In einer neueren Beobachtungsstudie konnte eine signifikante Überexpression von ASNS-mRNA im Tumorgewebe von Mammakarzinompatientinnen gezeigt werden ($n = 135$), verglichen mit bei einem Teil dieser Probandinnen entnommenen Kontroll-Gewebeproben ohne Tumoranteile ($n = 56$, $p < 0,05$). Eine uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde durchgeführt und mit einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve das Gesamtüberleben über einen Beobachtungszeitraum von fünf Jahren graphisch dargestellt, um die prognostische Bedeutung von ASNS zu ermitteln. Eine hohe Expression von ASNS war signifikant mit dem histologischen Grad ($p = 0,017$), der vaskulären Invasion ($p = 0,019$), dem Progesteronrezeptor-Status ($p = 0,014$), dem Her2-Status ($p = 0,035$) und einem kürzeren Gesamtüberleben der Patientin assoziiert ($p < 0,001$, Hazard ratio 3,293, 95 % KI = 1,790-6,058). Ergänzend wurde *in vitro* an MCF-7-Brustkrebszellen ein Knockdown von ASNS durch sogenannte ‚kleine interferierende RNA‘ (siRNA) durchgeführt und mittels MTT-Assay eine signifikante Hemmung der Proliferation von Brustkrebszellen nachgewiesen ($p < 0,05$) (Qin et al. 2020).

In einer anderen Studie wurden die Auswirkungen einer Asparaginverminderung untersucht, die durch Herunterregulierung von ASNS mittels muriner/humaner shRNA (small hairpin RNA), durch Behandlung mit L-Asparaginase oder durch diätetische Asparaginrestriktion bewirkt wurde. In allen drei Versuchsreihen wirkte sich die Depletion von Asparagin reduzierend auf die Bildung von Metastasen aus, ohne jedoch das Wachstum des Primärtumors zu beeinflussen. Dies traf auf die *in-vivo*-Untersuchung (Mausversuch) genauso zu wie auf die *in-vitro*-Analyse (Matrigel®) und wurde an Brustkrebszelllinien von Maus (4T1) und Mensch (MDA-MB-231) durchgeführt. Die ASNS-Expression im Primärtumor zeigte eine starke Korrelation mit der Ausbildung späterer Metastasen. Da die Mortalität von Brustkrebs maßgeblich durch eine Metastasierung und nicht durch den Primärtumor bestimmt wird, könnte die Anwendung von ASNS-Inhibitoren zu einer Verminderung von Metastasen und einer Verlängerung des Gesamtüberlebens führen (Knott et al. 2018).

Bereits in einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Downregulation von ASNS zu einer Verminderung der Tumorzellproliferation, zu einer Hemmung der Koloniebildungskapazität und zu einer Blockade der Zellzyklusprogression in der S-Phase führte. Dazu hat man Brustkrebszellen der Zelllinien ZR-75-30 und MDA-MB-231 *in-vitro* mit Lentiviren infiziert, die zuvor mit siRNA gekoppelt wurden. Die spezifische Bindung der siRNA an ASNS-mRNA führt zu einem posttranskriptionellen Gen-Silencing und damit zu einer verminderten Replikation des ASNS-Gens, was wiederum zu einer verminderten Expression von Asparagin-Synthetase führt. Die Kohorte, die mit dem ASNS-spezifischen siRNA-armierten Lentivirus zusammengebracht wurde, zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion des ASNS-Expressionslevels von 90,0 % für die

ZR-75-30-Zellen bzw. 66,9 % für die MDA-MB-231-Zellen ($p < 0,01$). Diese Studie zeigt zum einen, dass eine niedrigere Expression von ASNS mit einem geringeren onkogenen Potenzial einhergeht, zum anderen lässt sie einen Ausblick auf eine mögliche Therapie mit Lentiviren als Vektor für eine zielgerichtete Behandlung mit siRNA oder anderen Wirkstoffen zu (Yang et al. 2014). Zur medikamentösen Therapie werden kleine interferierende RNA in Deutschland bereits seit 2018 erfolgreich eingesetzt. Die erste Zulassung in Deutschland erfolgte 2018 für die Indikation der Hereditären Transthyretin-vermittelten Amyloidose mit Polyneuropathie (Patisiran, Onpattro®), die letzte mit der Indikation Hypercholesterinämie und Dyslipidämie (Inclisiran, Leqvio®, Erstzulassung 2021). An der Entwicklung von Krebsmedikamenten mit siRNA wird intensiv gearbeitet. Es existieren bereits abgeschlossene Phase-II-Studien an soliden Tumoren wie z. B. dem Pankreaskarzinom, weitere Studien sind im Prozess (Ranasinghe et al. 2022).

Trotz Fehlen eines signifikanten Ergebnisses in der vorliegenden Untersuchung erscheint ASNS vor dem Hintergrund der internationalen Forschung als guter Biomarker mit Potenzial für eine individualisierte Therapie. Eine spezifische Behandlung mit den kleinen interferierenden RNAs (siRNA oder shRNA) steht dabei im Zusammenhang mit ASNS wiederholt im Fokus. Die Wirkungsweise dieser kurzen RNA-Fragmente besteht darin, im Organismus selektiv an eine komplementäre mRNA zu binden, die dadurch fragmentiert und abgebaut wird. Die mRNA steht anschließend nicht mehr für die Proteintranslation zur Verfügung und die Menge des von ihr kodierten Proteins nimmt ab, was im Falle einer Verminderung des ASNS-Spiegels zu einer Verbesserung der Prognose führen würde. Da siRNA-Therapeutika für die klinische Anwendung bereits seit ein paar Jahren zugelassen sind, könnte die Entwicklung eines siRNA-basierten antionkogenen Medikamentes möglicherweise in nicht mehr allzu ferner Zukunft liegen.

4.2.8 Androgenrezeptor (AR)

Auch für den Androgenrezeptor hat die vorliegende Untersuchung in keiner der Gruppen einen signifikanten Unterschied im klinischen Verlauf zwischen der hoch und der niedrig rezeptorpositiven Gruppe ergeben. AR ist der Biomarker mit der höchsten Anzahl an Untergruppen (Gruppen A1, A2, A, A+B), bei denen die Kaplan-Meier-Kurven beider Gruppen mit einem identischen Verlauf dargestellt werden und kein Unterschied in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben besteht. Allerdings ist auch dieser Befund mit Zurückhaltung zu interpretieren, da es sich lediglich um eine Tendenz und nicht um ein signifikantes Ergebnis handelt.

Mit diesem Resultat fügt sich die Studie in das wissenschaftliche Umfeld ein, das mit kontroversen Erkenntnissen zur prognostischen Bedeutung des Androgenrezeptors aufwartet. Ein Grund für die uneinheitliche Studienlage könnte sein, dass es bislang keinen

einheitlich definierten Grenzwert für die Positivität des Androgenrezeptors gibt und keinen immunreaktiven Score, wie wir ihn für den Östrogen- oder Progesteronrezeptor kennen. Eine weitere Ursache stellt vermutlich die Tatsache dar, dass der AR-Signalweg mit einer Vielzahl weiterer Signalwege interagiert und über ein Zusammenspiel multipler Rezeptoren, Proteine und Kinasen reguliert wird (Kono et al. 2017). In der veröffentlichten Literatur finden sich Hinweise auf eine kontextabhängige Funktion von AR bei Anwesenheit weiterer Rezeptoren, die das ambivalente Verhalten ebenfalls erklären könnten. So zeigten Anestis et al., dass die onkosuppressive Wirkung von ER β beim TNBC bei einer Ko-Expression von AR verstärkt wurde (Anestis et al. 2019). Sie stellten ebenfalls fest, dass Patientinnen mit einem positiven Östrogen- α - und Androgen-Rezeptorstatus eine bessere Prognose und günstigere klinisch-pathologische Merkmale (negativer Nodalstatus, niedrigeres Grading) hatten als diejenigen mit negativem ER α - und positivem AR-Status (Anestis et al. 2020). In einem umfangreichen Review wurden Daten aus 74 Publikationen und 19 klinischen Studien bis Ende 2015 sowie Kongressdaten von ASCO, AACR, ESMO und SABCS der Jahre 2011-2015 zusammengefasst. Diese bestätigten eine bessere Prognose bei konkordanter Expression von ER+/AR+ bzw. ER-/AR- gegenüber diskordanter Expression von ER-/AR+ oder ER+/AR-. Die Koexpression von Her2 und AR war mit geringerer TumorgroÙe, niedrigerem klinischen Stadium, einer höheren Expression von ER und PR und somit einem weniger aggressiven Subtyp assoziiert. Die Gruppe der Triple-negativen Brustkrebserkrankungen (TNBC) wies in 10–35 % der Fälle eine Überexpression des Androgenrezeptors auf. Mehrere Studien zeigten bei Patientinnen mit AR-positivem TNBC ein deutlich besseres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben, obwohl sie weniger gut auf eine neoadjuvante Chemotherapie ansprachen. Diese „luminal androgenrezeptor-ähnliche“ (LAR) Subgruppe von TNBC hatte die höchste OS-Rate trotz des geringsten Ansprechens auf eine neoadjuvante Chemotherapie (10 % LAR versus 28 % für TNBC gesamt) (Kono et al. 2017). Dem widerspricht eine klinische Studie, die bei TNBC eine immunhistochemische AR-Positivitätsrate von 50 % nachgewiesen und eine fehlende Assoziation der AR-Expression mit der Prognose der Patientin gezeigt hat. Es konnte keine signifikante Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren wie Grading, Stadium, histologischer Tumortyp, TumorgroÙe, Lymphknotenstatus, Alter der Patientin, Ki67- und p53-Expression bewiesen werden. Weder in der univariate noch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse konnte eine signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben der Patientin festgestellt werden (Hazard ratio = 0,66, 95 % KI 0,26-1,70, p = 393, n = 90), so dass die prognostische Bedeutung des AR bei TNBC in Frage gestellt wurde (Giannos et al. 2015). Aufgrund der Aggressivität und der limitierten Therapiemöglichkeiten des TNBC ist trotz kontradiktorischer Studienergebnisse eine auf AR abzielende Therapie Gegenstand intensiver klinischer Forschung. Je nach Tumortyp

werden AR-Agonisten (SERMs, z. B. Enobosarm), AR-Antagonisten (z. B. Bicalutamid und Enzalutamid, die zur Therapie des Prostatakarzinoms im klinischen Einsatz sind), Signalweg-Inhibitoren (z. B. CDK4/6-Inhibitoren und PI3K-Inhibitoren, allein oder in Kombination mit AR-Inhibitoren) und Kombinationen von Anti-Her2-Wirkstoffen mit AR-Antagonisten (z. B. Trastuzumab und Enzalutamid) auf ihre Wirksamkeit bei Brustkrebs überprüft (Pietri et al. 2016, Kono et al. 2017). Neuere Untersuchungen legten nahe, dass die gleichzeitige Präsenz von ER β bei AR-positivem TNBC einen Einfluss auf den AR-Signalweg und dadurch eine onkosuppressive Wirkung zur Folge hat. Unter Verwendung von MDA-MB-453-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von ER β die Empfindlichkeit von AR-positivem TNBC gegenüber dem antiandrogenen Wirkstoff Enzalutamid erhöht (Anestis et al. 2019). Eine aktuelle einarmige, offene multizentrische Machbarkeitsstudie prüfte die Anwendung einer adjuvanten Therapie mit dem AR-Antagonisten Enzalutamid bei Patientinnen mit triple-negativem, androgenrezeptorpositivem Mammakarzinom, die eine Standardtherapie abgeschlossen hatten und mit 160 mg Enzalutamid pro Tag für ein Jahr behandelt wurden. AR-Positivität wurde definiert als $\geq 1\%$ in der immunhistochemischen Anfärbung. Primärer Endpunkt der Studie war eine Überprüfung der Durchführbarkeit über ein Jahr, gemessen an Therapieabbrüchen aufgrund von Toxizität, Widerruf der Studieneinwilligung oder schlechter Verträglichkeit des verabreichten Medikamentes. Sekundäre Endpunkte der Studie waren das DFS, OS, die Sicherheit des Arzneimittels und die genomischen Merkmale des Tumors bei Rezidiv. Der primäre Endpunkt wurde erreicht, indem 35 von 50 Patientinnen bei guter Verträglichkeit eine Therapieadhärenz über ein Jahr bewiesen. 32 der Patientinnen willigten für ein optionales zweites Jahr der Studienteilnahme ein. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Müdigkeit, Hyperglykämie, Leukopenie und Kopfschmerzen. Die fünf Therapieabbrüche aufgrund von Nebenwirkungen erfolgten hauptsächlich wegen Müdigkeit, einmal in Kombination mit Dyspepsie und in einem Fall wegen Alopezie. Das krankheitsfreie Überleben betrug nach einem Jahr 94 % (95%iges KI 87-100 %), nach zwei Jahren 92 % (95%iges KI 84-100 %) und nach drei Jahren 80 % (95%iges KI 67-94 %). Weitere Studien mit einer längeren Nachbeobachtungszeit und eine Kohortenstudie zum Vergleich mit androgenrezeptornegativem TNBC sind geplant, um eine Aussage über das Gesamtüberleben treffen zu können (Walsh et al. 2022).

Trotz uneinheitlicher Studienlage kann die Analyse der Androgenrezeptor-Expression zum Erkenntnisgewinn bei Brustkrebs beitragen und eine weitere Option zur Behandlung des Mammakarzinoms darstellen. Das gilt besonders für den aggressiveren TNBC, bei Therapie-Resistenz gegen die first-line-Therapie und in der metastasierten Situation. Wünschenswert wäre die Festlegung eines für Positivität von AR einheitlich definierten Grenzwertes oder eines Scores, um eine Vergleichbarkeit von Studien zu erreichen und

analog zu anderen Biomarkern über einen Schwellenwert für die Einleitung einer zielgerichteten Therapie zu verfügen. Die Interaktion mit weiteren Biomarkern, allen voran den Östrogenrezeptoren ER α und ER β , sollte überprüft und in die Therapieentscheidung mit einbezogen werden.

Abschließend ist hervorzuheben, dass mit der vorliegenden Arbeit Prävalenzdaten zur immunhistochemischen Darstellung der acht Biomarkern ASNS, FoxM1, RacGAP1, BCL2, BIRC5, HH3, ER β und AR an einem großen Kollektiv generiert wurden. An einer Fallzahl von 3126 Patientinnen mit Mammakarzinom wurde die Häufigkeit der Expression dieser Biomarker im gesamten Kollektiv und in den einzelnen Subgruppen analysiert. Dadurch unterscheidet sich diese Studie von einer Vielzahl von Veröffentlichungen, die aufgrund eines meist deutlich kleineren Stichprobenumfangs und der nicht einheitlichen Festlegung auf Gen- oder Proteinexpression zu teilweise kontradiktorischen Ergebnissen führten. Die Limitierung der Altersgrenze auf ≤ 70 Jahre bei Studieneintritt hat zur Folge, dass bezüglich der Studienendpunkte ‚krankheitsfreies Überleben‘ und ‚relatives Überleben über die Zeit‘ der Faktor ‚Tod aus anderer Ursache‘ nicht zu einer Verzerrung der Daten führte. Da es sich durch den Ausschluss von speziellen Tumortypen, extremen Tumorgrößen, hohem Grading und Patientinnen fortgeschrittenen Alters um ein weitestgehend um Störfaktoren bereinigtes Kollektiv handelt, ist bei den Daten ein geringes Maß an Konfundierung anzunehmen.

5. Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wird die Expression der innovativen Biomarker ASNS, FoxM1, RacGAP1, BCL2, BIRC5, Histon H3, ER β und AR sowie der etablierten Biomarker ER, PR, Her2 und Ki67 an einer umfangreichen Anzahl von Fällen des invasiven Mammakarzinoms in Bezug auf ihre prognostische Relevanz untersucht (n = 3126). Zur Anwendung kommt die immunhistochemische Antikörperfärbung an 34 Objektträgern im Tissue-Microarray-Format. Die Analyse der Expressionshöhe erfolgt mittels computerassistierter digitaler Bildanalyse, die initial durch den Vergleich mit einer visuellen Auswertung am Mikroskop validiert wird.

Die univariate Analyse der Expressionswerte ergibt in der Gruppe der gesamten Kohorte eine signifikante prognostische Aussage für zehn der zwölf oben genannten Biomarker, mit Ausnahme von ASNS und AR. In der Subgruppen-Analyse zeigen sich zusätzlich für BCL2, BIRC5, ER β , PR und Ki67 in einzelnen TMA-Gruppen prognostisch signifikante Expressionsunterschiede.

Bei der multivariaten Cox-Regressionsanalyse weist in der Gruppe der östrogenrezeptorpositiven Tumoren von den nicht-etablierten Biomarkern der Parameter ER β mit einer Hazard-ratio von 0,55 den größten Effekt und als einziger ein signifikantes Ergebnis auf. Von den konventionellen Biomarkern erreichen Progesteron mit einer Hazard-Ratio von 0,65 und Ki67 mit einer Hazard-ratio von 1,39 Signifikanzniveau. In der Gruppe der östrogenrezeptornegativen Tumoren ist ausschließlich für RacGAP1 mit einer Hazard-ratio von 0,57 ein signifikantes Ergebnis zu beobachten.

Zum Verständnis der biologischen Funktionsweise erfolgt in der Einleitung eine Beschreibung der einzelnen Biomarker und eine kurze Ausführung zum Mammakarzinom. In der Diskussion wird unter den Aspekten der prognostischen Aussage und der möglichen therapeutischen Relevanz auf die klinische Bedeutung der in der Arbeit dargestellten Ergebnisse Bezug genommen. Hierbei wird auf die in der Literatur zum Teil widersprüchlichen Daten eingegangen und versucht, aus der Perspektive dieser Dissertation eine Erklärung dafür zu finden. Ursachen könnten zum Beispiel die unterschiedlichen technischen Ansätze der Analysen oder die häufig geringen Fallzahlen sein, die die Ermittlung belastbarer Schwellenwerte erschweren könnten.

Die vorliegende Untersuchung zeigt die Bedeutung einer quantitativen immunhistochemischen Analyse für die Aussage einzelner Biomarker zur Prognose der Patientin. Mit ER β für die Gruppe der östrogenrezeptorpositiven Tumoren und RacGAP1 für die Gruppe der östrogenrezeptornegativen Tumoren lassen sich zwei Parameter identifizieren, die von besonderem klinisch-pathologischen Interesse sein könnten.

5.2 Summary

In this dissertation we investigate the expression of the innovative biomarkers ASNS, FoxM1, RacGAP1, BCL2, BIRC5, Histone H3, ER β and AR as well as the established biomarkers ER, PR, Her2 and Ki67 in an extensive number of cases of invasive breast cancer with focus on their prognostic relevance (n = 3126). For this purpose immunohistochemical antibody staining is applied on 34 slides of tissue-microarrays. The analysis of expression levels is performed by computer-assisted digital image analysis which is initially validated by comparison with visual evaluation on a microscope.

Univariate analysis of expression levels reveals significant prognostic relevance in the whole cohort for ten of the twelve biomarkers mentioned above, with an exception of ASNS and AR. Subgroup analysis shows prognostically significant differences of expression for BCL2, BIRC5, ER β , PR, and Ki67 in some of the TMA-groups.

Multivariate Cox-regression analysis reveals, that in the cohort of estrogenreceptor-positive tumors the parameter ER β has the largest effect of the nonestablished biomarkers with a hazard ratio of 0.55 and is the only one to show a significant result. Among the conventional biomarkers, progesterone with a hazard ratio of 0.65 and Ki67 with a hazard ratio of 1.39 reached levels of significance. In the cohort of estrogenreceptor-negative tumors, a significant result is observed exclusively for RacGAP1 with a hazard ratio of 0.57.

To understand the biological mode of action, a description of the individual biomarkers and a brief elaboration on breast carcinoma is given in the introduction. In the discussion, reference is made to the clinical significance of the results presented in the paper under the aspects of prognostic significance and possible therapeutic relevance. In this context, the partly contradictory data in literature is considered and an attempt is made to find an explanation for this from the perspective of this dissertation. The different technical approaches used for the analyses or the common occurrence of small numbers of cases, which could make it difficult to determine robust threshold values, could be an explanation for these differences.

The present study demonstrates the importance of the quantitative immunohistochemical analysis of individual biomarkers for predicting patients prognosis. With ER β for the cohort of estrogenreceptor-positive tumors and RacGAP1 for the cohort of estrogenreceptor-negative tumors, two parameters can be identified that could be of particular clinicopathological interest.

6. Abkürzungsverzeichnis

A1	BCL-2-related gene A1
AACR	American Association for Cancer Research
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ADC	Antibody-Drug-Conjugate
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AF	Activation function
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AICAR	Amidoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid
AIF	Apoptosis-inducing factor
AKT	Proteinkinase B
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AOL	Adjuvant online
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen Responsive Elements
ARF	Adenosyl-Ribosylierungsfaktor
ARHGAP	Rho-GTPase-aktivierendes Protein
AS	Aminosäuren
ASCO	American Association of Clinical Oncology
ASNase	Asparaginase
ASNS	Asparagin-Synthetase
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated Serin-Proteinkinase
BAD	BCL-2 antagonist of cell death
BAK	BCL-2 antagonist killer 1
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein 1
BAXx	BCL-2-associated protein X
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCLw	BCL2-ähnliches Protein 2
BCLxL	BCL-2-related gene, long isoform
BCSS	Brustkrebspezifisches Überleben
BH	BCL2-Homologiedomäne
BID	BCL-2-interacting domain death agonist
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death

BIRC5	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing Protein 5, Survivin
BIR-Domäne	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-Domäne
BLBC	Basal-like Breast cancer
BP	Basenpaare
BRCA1	Breastcancer-Gen 1
BRCA2	Breastcancer-Gen 2
BTB	Broad complex, tramtrack, bric-a-brac
Cas	CRISPR-associated
CCND1	Cyclin D1 codierendes Gen
Cdc42	Cell division control protein 42
CDH1	Cadherin1 proteinkodierendes Gen
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Komplementäre DNA
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
CI	Konfidenzintervall
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
Cox	Cyclooxygenase
CPC	Chromosomaler Passagierkomplex
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Computertomographie
CTD	Comparative Toxicogenomic Database
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCIS	Ductales carcinoma in situ
DFS	Desease-free survival, Krankheitsfreies Überleben
DHT	Dihydrotestosteron
DIA	Digital imaging analysis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drp-1	Dynamin-1-ähnliches Protein
E	Effektor
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
EGFR	Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
ER	Östrogenrezeptor
ERBB2	Erythroblastisches Onkogen B2 = HER2
ERE	Estrogen response elements
ESMO	European Society of Medical Oncology

ESR1	Östrogenrezeptor alpha codierendes Gen
ESR2	Östrogenrezeptor beta codierendes Gen
ET	Endokrine Therapie
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FDG	Fluordesoxyglucose
FFPE	Formalinfixiert und paraffineingebettet
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FlnA	Filamin A
FoxM1	Forkhead Box Protein M1
G	Grad
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GR	Glukokortikoidrezeptor
GSK	Glykogen-Synthase Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
HH3	Histon H3
HR	Hormonrezeptor
HRK	Harakiri
HSP	Hitzeschockproteine
IAP	Inhibitor of apoptosis Protein
ICC	Intraclass Correlation Coefficient
IHC	Immunhistochemie
IKWG	International Ki67 in Breast Cancer Working Group
INCENP	Inneres Zentromerprotein
IT	Informationstechnik
Kap.	Kapitel
KI	Konfidenzintervall
Ki67	Kiel-Antigen Nr. 67
LAR	Luminaler Androgen-Rezeptor
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LK	Lymphknoten

LKB1	Leberkinase B1
lncRNA	Lange, nicht-codierende RNA
MAI	Mitotischer Aktivitätsindex
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCA	Multiple Korrespondenzanalyse
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7
MCL-1	Myeloisches Zelleukämie-Sequenz-1-Protein
Mdivi1	Mitochondrialer Teilungshemmer 1
MEK1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1
METABRIC	Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium
MI	Mitoseindex
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MOLT-4	Humaner T-Lymphoblast; akute lymphatische Leukämie
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MUC	Muzin
MYBL2	MYB Proto-Oncogene Like 2
MYC	Myelocytomatosis
NCP	Nukleosom-Kernpartikel
NCT	National clinical trial
NF1	Neurofibromatose 1 codierendes Gen
NOXA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-induziertes Protein
NPI	Nottingham Prognostic Index
NR	Nukleäre Rezeptoren
NST	No special type
OS	Overall survival, Gesamtüberleben
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PAM50	Prediction Analysis of Microarray 50
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDX	Patient derived Xenograft
PET	Positronenemissionstomographie
PFS	Progression free survival

PHH3	Phosphohiston H3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase katalyt. Untereinheit alpha
PR	Progesteronrezeptor
pRB	Retinoblastom-Protein
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTM	Post-translationale Modifikation
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptoseprotein
qRT-PCR	Quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion
RAD51C	RAD51 Paralog C
RAD51D	RAD51 Paralog D
Ras	Rat sarcoma
RASSF1A	Ras association domain-containing protein 1 isoform A
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RFS	Rezidivfreies Überleben
RGB	Rot-Grün-Blau
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
Rnd	Resistance-nodulation-cell division
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
SABCS	San Antonio Breast Cancer Symposium
SCAN-B	Sweden Cancerome Analysis Network – Breast
SE	Standardfehler
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
shRNA	Small hairpin ribonucleic acid
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SLNB	Sentinal-node-Biopsie
STK11	Serin Threonin Kinase 11
Tab.	Tabelle
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TIFF	Tagged image file format
TMA	Tissue Micro Array
TNBC	Triple negative breast cancer
TNF	Tumornekrosefaktor alpha
TOP2a	Topoisomerase II alpha
TP53	Tumorprotein p53

TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
VA	Visuelle Auszählung, visuelle Analyse
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
VGR-BC	Västra Götalandsregionen Brustkrebs Kohorte
WHO	World Health Organisation
YM155	Sepantroniumbromid

7. Literaturverzeichnis

- 1) Abu-Khalaf MM, Alex Hodge K, Hatzis C, Baldelli E, El Gazzah E, Valdes F, Sikov WM, Mita MM, Denduluri N, Murphy R, Zelterman D, Liotta L, Dunetz B, Dunetz R, Petricoin EF, Pierobon M (2023) AKT/mTOR signaling modulates resistance to endocrine therapy and CDK4/6 inhibition in metastatic breast cancers. *NPJ Precis Oncol.* 7(1):18.
- 2) Acs B, Pelekanou V, Bai Y, Martinez-Morilla S, Toki M, Leung SCY, Nielsen TO, Rimm DL (2019) Ki67 reproducibility using digital image analysis: an inter-platform and inter-operator study. *Lab Invest.* 99(1):107-117.
- 3) Acs B, Rantalainen M, Hartman J (2020) Artificial intelligence as the next step towards precision pathology. *J Intern Med.* 288(1):62-81.
- 4) Adinew GM, Messeha S, Taka E, Soliman KFA (2022) The Prognostic and Therapeutic Implications of the Chemoresistance Gene BIRC5 in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 14(21):5180.
- 5) Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, Ravdin P, Bugarini R, Baehner FL, Davidson NE, Sledge GW, Winer EP, Hudis C, Ingle JN, Perez EA, Pritchard KI, Shepherd L, Gralow JR, Yoshizawa C, Allred DC (Breast Cancer Intergroup of North America) (2010) Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 11(1), 55–65.
- 6) Alhoshani A, Alatawi FO, Al-Anazi FE, Attafi IM, Zeidan A, Agouni A, El Gamal HM, Shamooun LS, Khalaf S, Korashy HM (2020) BCL-2 Inhibitor Venetoclax Induces Autophagy-Associated Cell Death, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Onco Targets Ther.* 13:13357-13370.
- 7) Altieri DC (2003) Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Rev Cancer.* 3(1), 46–54.

- 8) An Y, Furber KL, Ji S (2017) Pseudogenes regulate parental gene expression via ceRNA network. *J Cell Mol Med.* 21(1), 185–192.
- 9) Anestis A, Sarantis P, Theocharis S, Zoi I, Tryfonopoulos D, Korogiannos A, Koumariannou A, Xingi E, Thomaidou D, Kontos M, Papavassiliou AG, Karamouzis MV (2019) Estrogen receptor beta increases sensitivity to enzalutamide in androgen receptor-positive triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 145(5), 1221–1233.
- 10) Anestis A, Zoi I, Papavassiliou AG, Karamouzis MV (2020) Androgen Receptor in Breast Cancer-Clinical and Preclinical Research Insights. *Molecules.* 25(2), 358.
- 11) Balasubramanian MN, Butterworth EA, Kilberg MS (2013) Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 304(8), E789–E799.
- 12) Banys-Paluchowski M, Lux MP, Untch M (2023) Endokrin-basierte und zielgerichtete Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. *Guidelines Breast Version 2023.1D* [Online im Internet] URL: <http://www.ago-online.de> [Stand: 23.04.2023, 15:50].
- 13) Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Oliveira M, Brufsky A, Sardesai SD, Kalinsky K, Zelnak AB, Weaver R, Traina T, Dalenc F, Aftimos P, Lynce F, Diab S, Cortés J, O'Shaughnessy J, Diéras V, Ferrario C, Schmid P, Carey LA, Gianni L, Piccart MJ, Loibl S, Goldenberg DM, Hong Q, Olivo MS, Itri LM, Rugo HS (2021) ASCENT Clinical Trial Investigators. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 384(16):1529-1541.
- 14) Bates SE (2020) Epigenetic Therapies for Cancer. *N Engl J Med.* 383(7), 650–663.
- 15) Behling F, Schittenhelm J (2018) Tissue microarrays - translational biomarker research in the fast lane. *Expert Rev Mol Diagn.* 18(10), 833–835.
- 16) Bektas N, Haaf At, Veeck J, Wild PJ, Lüscher-Firzlaff J, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E (2008) Tight correlation between expression of the Forkhead transcription factor FOXM1 and HER2 in human breast cancer. *BMC cancer.* 8:42.

- 17) Burridge K, Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell*. 116(2), 167–179.
- 18) Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, Ellis IO, Huntsman D, Caldas C (2006) Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res*. 12(8), 2468–2475.
- 19) Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C (2008) Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC cancer*. 8, 153.
- 20) Chervona Y, Costa M (2012) Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? *Am J Cancer Res*. 2(5), 589–597.
- 21) Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 37(3), 299–310.
- 22) Chiu M, Taurino G, Bianchi MG, Kilberg MS, Bussolati O (2020) Asparagine Synthetase in Cancer: Beyond Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Oncol*. 9, 1480.
- 23) Choi Y (2022) Estrogen Receptor β Expression and Its Clinical Implication in Breast Cancers: Favorable or Unfavorable? *J Breast Cancer*. 25(2):75-93.
- 24) Clemens MR, Gladkov OA, Gartner E, Vladimirov V, Crown J, Steinberg J, Jie F, Keating A (2015) Phase II, multicenter, open-label, randomized study of YM155 plus docetaxel as first-line treatment in patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 149(1), 171–179.
- 25) Courts C (2013) Was ist Krebs? Dem programmierten Zelltod entgehen. Prof. Cornelius Courts, Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln [Online im Internet] URL: <http://www.scienceblogs.de/bloodDNAcid> [Stand: 22.04.2023, 16:40].
- 26) Cui X, Harada S, Shen D, Siegal GP, Wei S (2015) The Utility of Phosphohistone H3 in Breast Cancer Grading. *Appl immunohistochem Mol Morphol*. 23(10), 689–695.

- 27) Dai JB, Zhu B, Lin WJ, Gao HY, Dai H, Zheng L, Shi WH, Chen WX (2020) Identification of prognostic significance of BIRC5 in breast cancer using integrative bioinformatics analysis. *Biosci Rep.* 40(2): BSR20193678.
- 28) Dalal H, Dahlgren M, Gladchuk S, Brueffer C, Gruvberger-Saal SK, Saal LH (2022) Clinical associations of ESR2 (estrogen receptor beta) expression across thousands of primary breast tumors. *Sci Rep.* 12(1):4696.
- 29) Datta J, Willingham N, Manouchehri JM, Schnell P, Sheth M, David JJ, Kassem M, Wilson TA, Radomska HS, Coss CC, Bennett CE, Ganju RK, Sardesai SD, Lustberg M, Ramaswamy B, Stover DG, Cherian MA (2022) Activity of Estrogen Receptor β Agonists in Therapy-Resistant Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Front Oncol.* 12:857590.
- 30) Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA, Callagy G, Green AR, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Leung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P (2010) BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer.* 103(5), 668–675.
- 31) Dessauvage BF, Thomas C, Robinson C, Frost FA, Harvey J, Sterrett GF (2015) Validation of mitosis counting by automated phosphohistone H3 (PHH3) digital image analysis in a breast carcinoma tissue microarray. *Pathology.* 47(4), 329–334.
- 32) Destatis, Statistisches Bundesamt (2023) Häufigste Todesursachen [Online im Internet] URL: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/_Grafik/_Interaktiv/haeufigste-todesursachen-weiblich.html. [Stand: 23.04.2023, 10:15].
- 33) Dey P, Wang A, Ziegler Y, Kumar S, Yan S, Kim SH, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2022) Estrogen Receptor Beta 1: A Potential Therapeutic Target for Female Triple Negative Breast Cancer. *Endocrinology.* 163(12):bqac172.
- 34) Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF (2011) International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer:

- recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 103(22):1656-64.
- 35) Dufour E, Gay F, Aguera K, Scoazec JY, Horand F, Lorenzi PL, Godfrin Y (2012) Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation. *Pancreas.* 41(6), 940–948.
- 36) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 365(9472), 1687–1717.
- 37) Eid RA, Soltan MA, Eldeen MA, Shati AA, Dawood SA, Eissa M, Zaki MSA, Algahtani M, Theyab A, Abdel-Daim MM, Kim B (2022) Assessment of RACGAP1 as a Prognostic and Immunological Biomarker in Multiple Human Tumors: A Multiomics Analysis. *International Journal of Molecular Sciences.* 23(22):14102.
- 38) Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, Van Tine BA, Hoog J, Goiffon RJ, Goldstein TC, Ng S, Lin L, Crowder R, Snider J, Ballman K, Weber J, Chen K, Koboldt DC, Kandoth C, Schierding WS, Mardis ER (2012) Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature.* 486(7403), 353–360.
- 39) Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR., Abdelghany MK, Martinez-Pomares L, Heery DM, Ellis IO (2009) Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 69(9), 3802–3809.
- 40) Emrich K, Kraywinkel K (2021) Epidemiology of breast cancer in women: trends in early stage tumors. *Onkologe.* 27(12), 1156-1164.
- 41) Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420(6916), 629–635.
- 42) Fäldt Beding A, Larsson P, Helou K, Einbeigi Z, Parris TZ (2022) Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker. *BMC Cancer.* 22(1):322.

- 43) Fallenberg E, Kühn T (2023) Früherkennung und Diagnostik, AGO Guidelines Breast, Version 2023.1D [Online im Internet] URL: <http://www.ago-online.de> [Stand: 23.04.2023, 13:00].
- 44) Gartel AL (2017) FOXM1 in Cancer: Interactions and Vulnerabilities. *Cancer Res.* 77(12), 3135–3139.
- 45) Gerring Z, Pearson JF, Morrin HR, Robinson BA, Harris GC, Walker LC (2015) Phosphohistone H3 outperforms Ki67 as a marker of outcome for breast cancer patients. *Histopathology.* 67(4), 538–547.
- 46) Giannos A, Filipits M, Zagouri F, Brandstetter A, Tsigginou A, Sotiropoulou M, Paspaspyrou I, Sergentanis TN, Psaltopoulou T, Rodolakis A, Antsaklis A, Dimopoulos MA, Dimitrakakis C (2015) Expression of ARs in triple negative breast cancer tumors: a potential prognostic factor? *Onco Targets Ther.* 8:1843-7.
- 47) Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ (2011) Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 22(8), 1736–1747.
- 48) Greaves M, Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature.* 481(7381), 306–313.
- 49) Gutierrez JA, Pan YX, Koroniak L, Hiratake J, Kilberg MS, Richards NG (2006) An inhibitor of human asparagine synthetase suppresses proliferation of an L-asparaginase-resistant leukemia cell line. *Chem Biol.* 13(12), 1339–1347.
- 50) Halasi M, Gartel AL (2013) FOX(M1) news--it is cancer. *Mol Cancer Ther.* 12(3), 245–254.
- 51) Hans F, Dimitrov S (2001) Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene.* 20(24), 3021–3027.
- 52) Harbeck N, Gnant M (2017) Breast cancer. *Lancet.* 389(10074), 1134–1150.

-
- 53) Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F (2019) Breast cancer. *Nature Rev Dis Primers*. 5(1), 66.
- 54) Hawse JR, Carter JM, Aspros KGM, Bruinsma ES, Koeplin JW, Negron V, Subramaniam M, Ingle JN, Rech KL, Goetz MP (2020) Optimized immunohistochemical detection of estrogen receptor beta using two validated monoclonal antibodies confirms its expression in normal and malignant breast tissues. *Breast Cancer Res Treat*. 179(1):241-249.
- 55) Hwang KT, Kim YA, Kim J, Oh HJ, Park JH, Choi IS, Park JH, Oh S, Chu A, Lee JY, Hwang KR (2021) Prognostic influences of BCL1 and BCL2 expression on disease-free survival in breast cancer. *Sci Rep*. 11(1), 11942.
- 56) Ibrahim A, Toss MS, Makhoul S, Miligy IM, Minhas F, Rakha EA (2023) Improving mitotic cell counting accuracy and efficiency using phosphohistone-H3 (PHH3) antibody counterstained with haematoxylin and eosin as part of breast cancer grading. *Histopathol*. 82(3):393-406.
- 57) Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 21, 247–269.
- 58) Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER (1968) A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 59(2), 632–638.
- 59) Kalin TV, Ustiyani V, Kalinichenko VV (2011) Multiple faces of FoxM1 transcription factor: lessons from transgenic mouse models. *Cell cycle*. 10(3), 396–405.
- 60) Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, Ngollo M, Penault-Llorca F, Pajon A, Bignon YJ, Bernard-Gallon D (2014) Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics*. 6(6), 651–664.
- 61) Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M (2003) Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer*. 88(7), 1077–1083.

- 62) Kim JY, Jeong HS, Chung T, Kim M, Lee JH, Jung WH, Koo JS (2017) The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67. *Oncotarget*. 8(39), 65064–65076.
- 63) Klintman M, Strand C, Ahlin C, Beglerbegovic S, Fjällskog ML, Grabau D, Gudlaugsson E, Janssen EA, Lövgren K, Skaland I, Bendahl PO, Malmström P, Baak JP, Fernö M (2013) The prognostic value of mitotic activity index (MAI), phosphohistone H3 (PPH3), cyclin B1, cyclin A, and Ki67, alone and in combinations, in node-negative premenopausal breast cancer. *PloS one*. 8(12), e81902.
- 64) Knott SRV, Wagenblast E, Khan S, Kim SY, Soto M, Wagner M, Turgeon MO, Fish L, Erard N, Gable AL, Maceli AR, Dickopf S, Papachristou EK, D'Santos CS, Carey LA, Wilkinson JE, Harrell JC, Perou CM, Goodarzi H, Poulogiannis G, Hannon GJ (2018) Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. *Nature*. 554(7692):378-381. Erratum in: *Nature*. 2018 Apr 4;556(7699):135.
- 65) Kono M, Fujii T, Lim B, Karuturi MS, Tripathy D, Ueno NT (2017) Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol*. 3(9), 1266–1273.
- 66) Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Med*. 4(7), 844–847.
- 67) Kopanja D, Chand V, O'Brien E, Mukhopadhyay NK, Zappia MP, Islam ABMMK, Frolov MV, Merrill BJ, Raychaudhuri P (2022) Transcriptional Repression by FoxM1 Suppresses Tumor Differentiation and Promotes Metastasis of Breast Cancer. *Cancer Res*. 82(13):2458-2471.
- 68) Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(12), 5925–5930.
- 69) Laoukili J, Stahl M, Medema RH (2007) FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1775(1), 92–102.

- 70) Laudet V, Auwerx J, Gustafsson J, Wahli W (Nuclear Receptors Nomenclature Committee) (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 97(2), 161–163.
- 71) Lawson CD, Der CJ (2018) Filling Gaps in our knowledge: ARHGAP11A and RACGAP1 act as oncogenes in basal-like breast cancers. *Small GTPases*. 9(4), 290–296.
- 72) Lebeau A (2021). Aktualisierte WHO-Klassifikation der Tumoren der Mamma [Updated WHO classification of tumors of the breast]. *Pathologe*. 42(Suppl 2), 155–159.
- 73) Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn HP (2014) Invasive Mammakarzinome: Die aktuelle WHO-Klassifikation [Invasive breast cancer: the current WHO classification]. *Pathologe*. 35(1), 7–17.
- 74) Li F, Aljahdali I, Ling X (2019) Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of study? *J Exp Clin Cancer Res*. 38(1):368.
- 75) Lok SW, Whittle JR, Vaillant F, Teh CE, Lo LL, Policheni AN, Bergin A, Desai J, Ftouni S, Gandolfo LC, Liew D, Liu HK, Mann GB, Moodie K, Murugasu A, Pal B, Roberts AW, Rosenthal MA, Shackleton K, Silva MJ, Siow ZR, Smyth GK, Taylor L, Travers A, Yeo B, Yeung MM, Bujak AZ, Dawson SJ, Gray DHD, Visvader JE, Lindeman GJ (2019) A Phase Ib Dose-Escalation and Expansion Study of the BCL2 Inhibitor Venetoclax Combined with Tamoxifen in ER and BCL2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancer Discov*. 9(3), 354–369.
- 76) Lomelino CL, Andring JT, McKenna R, Kilberg MS (2017) Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *J Biol Chem*. 292(49), 19952–19958.
- 77) Lorenzi PL, Llamas J, Gunsior M, Ozbun L, Reinhold WC, Varma S, Ji H, Kim H, Hutchinson AA, Kohn EC, Goldsmith PK, Birrer MJ, Weinstein JN (2008) Asparagine synthetase is a predictive biomarker of L-asparaginase activity in ovarian cancer cell lines. *Mol Cancer Ther*. 7(10), 3123–3128.
- 78) Lorenzi PL, Weinstein JN (2009) Asparagine synthetase: a new potential biomarker in ovarian cancer. *Drug News Perspect*. 22(1), 61–64.

- 79) Macenko M, Niethammer M, Marron JS, Borland D, Woosley JT, Xiaojun G, Schmitt C, Thomas N (2009) A method for normalizing histology slides for quantitative analysis. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Boston, MA, USA, S. 1107-1110.
- 80) Mal R, Magner A, David J, Datta J, Vallabhaneni M, Kassem M, Manouchehri J, Willingham N, Stover D, Vandeusen J, Sardesai S, Williams N, Wesolowski R, Lustberg M, Ganju RK, Ramaswamy B, Cherian MA (2020) Estrogen Receptor Beta (ER β): A Ligand Activated Tumor Suppressor. *Front Oncol.* 10, 587386.
- 81) Milde-Langosch K, Karn T, Müller V, Witzel I, Rody A, Schmidt M, Wirtz RM (2013) Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 137(1):57-67.
- 82) Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ (2008) Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 14(16):5000-5.
- 83) Mitter D, Ortmann O, Treeck O (2005) Östrogenrezeptor-beta-Isoformen--Funktionen und klinische Bedeutung bei Brustkrebs [Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer]. *Zentralbl Gynakol.* 127(4), 228–234.
- 84) Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, Ueno NT, Prat A, Chae YS, Lee KS, Niikura N, Park YH, Xu B, Wang X, Gil-Gil M, Li W, Pierga JY, Im SA, Moore HCF, Rugo HS, Yerushalmi R, Zagouri F, Gombos A, Kim SB, Liu Q, Luo T, Saura C, Schmid P, Sun T, Gambhire D, Yung L, Wang Y, Singh J, Vitazka P, Meinhardt G, Harbeck N, Cameron DA (2022) DESTINY-Breast04 Trial Investigators. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 387(1):9-20.
- 85) Narayanan R, Coss CC, Dalton JT (2018) Development of selective androgen receptor modulators (SARMs). *Mol Cell Endocrinol.* 465, 134–142.
- 86) Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, Denkert C, Ellis MJ, Fineberg S, Flowers M, Kreipe HH, Laenholm AV, Pan H, Penault-Llorca FM, Polley MY, Salgado R, Smith IE, Sugie T, Bartlett JMS, McShane LM, Dowsett M, Hayes DF

- (2021) Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.* 113(7):808-819.
- 87) Novelli F, Milella M, Melucci E, Di Benedetto A, Sperduti I, Perrone-Donnorso R, Perracchio L, Venturo I, Nisticò C, Fabi A, Buglioni S, Natali PG, Mottolese M (2008) A divergent role for estrogen receptor-beta in node-positive and node-negative breast cancer classified according to molecular subtypes: an observational prospective study. *Breast Cancer Res.*10(5), R74.
- 88) Oparina N, Erlandsson MC, Fäldt Beding A, Parris T, Helou K, Karlsson P, Einbeigi Z, Bokarewa MI (2021) Prognostic Significance of BIRC5/Survivin in Breast Cancer: Results from Three Independent Cohorts. *Cancers.* 13(9), 2209.
- 89) Parks RM, Alfarsi LH, Green AR, Cheung KL (2021) Biology of primary breast cancer in older women beyond routine biomarkers. *Breast cancer.* 28(5), 991–1001.
- 90) Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Aksten LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 406(6797), 747–752.
- 91) Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2. *Cancer Res.* 54(14), 3714–3717.
- 92) Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, Goekbuget N, Schrappe M, Pui CH (2011) L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. *Cancer.* 117(2), 238–249.
- 93) Pietri E, Conteduca V, Andreis D, Massa I, Melegari E, Sarti S, Cecconetto L, Schirone A, Bravaccini S, Serra P, Fedeli A, Maltoni R, Amadori D, De Giorgi U, Rocca A (2016) Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocr Relat Cancer.* 23(10), R485–R498.
- 94) Pliarchopoulou K, Kalogeras KT, Kronenwett R, Wirtz RM, Eleftheraki AG, Batistatou A, Bobos M, Soupos N, Polychronidou G, Gogas H, Samantas E, Christodoulou C,

- Makatsoris T, Pavlidis N, Pectasides D, Fountzilas G (2013) Prognostic significance of RACGAP1 mRNA expression in high-risk early breast cancer: a study in primary tumors of breast cancer patients participating in a randomized Hellenic Cooperative Oncology Group trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 71(1):245-55.
- 95) Polley MY, Leung SC, Gao D, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JM, McShane LM, Enos RA, Badve SS, Bane AL, Borgquist S, Fineberg S, Lin MG, Gown AM, Grabau D, Gutierrez C, Hugh JC, Moriya T, Ohi Y, Osborne CK, Penault-Llorca FM, Piper T, Porter PL, Sakatani T, Salgado R, Starczynski J, Lænkholm AV, Viale G, Dowsett M, Hayes DF, Nielsen TO (2015) An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol*. 28(6):778-86.
- 96) Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, Viale G, Zabaglo LA, Penault-Llorca F, Bartlett JM, Gown AM, Symmans WF, Piper T, Mehl E, Enos RA, Hayes DF, Dowsett M, Nielsen TO (2013) International Ki67 in Breast Cancer Working Group of the Breast International Group and North American Breast Cancer Group. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 105(24):1897-906.
- 97) Pollyea DA, Amaya M, Strati P, Konopleva MY (2019) Venetoclax for AML: changing the treatment paradigm. *Blood Adv*. 3(24), 4326–4335.
- 98) Pontén F, Jirström K, Uhlen M (2008) The Human Protein Atlas--a tool for pathology. *The J Pathol* 216(4), 387–393. [Online im Internet] URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000070669-ASNS> [Stand: 22.08.2021, 16:47].
- 99) Qin C, Yang X, Zhan Z (2020) High Expression of Asparagine Synthetase Is Associated with Poor Prognosis of Breast Cancer in Chinese Population. *Cancer Biother Radiopharm*. 35(8), 581–585.
- 100) Ranasinghe P, Addison ML, Dear JW, Webb, DJ (2022) Small interfering RNA: Discovery, pharmacology and clinical development—An introductory review. *British Journal of Pharmacology*, 1– 24.
- 101) Ray-Gallet D, Almouzni G (2021) The Histone H3 Family and Its Deposition Pathways. *Adv Exp Med Biol*. 1283, 17–42.

- 102) Ren K, Zhou D, Wang M, Li E, Hou C, Su Y, Zou Q, Zhou P, Liu X (2021) RACGAP1 modulates ECT2-Dependent mitochondrial quality control to drive breast cancer metastasis. *Exp Cell Res.* 400(1):112493.
- 103) Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB). [Online im Internet] URL: <http://www.rcsb.org/structure/3G73> [Stand:19.04.2023, 10:15].
- 104) Richards NG, Kilberg MS (2006) Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu Rev Biochem.* 75, 629–654.
- 105) Rimm DL, Leung SCY, McShane LM, Bai Y, Bane AL, Bartlett JMS, Bayani J, Chang MC, Dean M, Denkert C, Enwere EK, Galderisi C, Gholap A, Hugh JC, Jadhav A, Kornaga EN, Laurinavicius A, Levenson R, Lima J, Miller K, Pantanowitz L, Piper T, Ruan J, Srinivasan M, Virk S, Wu Y, Yang H, Hayes DF, Nielsen TO, Dowsett M (2019) An international multicenter study to evaluate reproducibility of automated scoring for assessment of Ki67 in breast cancer. *Mod Pathol.* 32(1):59-69.
- 106) Robert Koch Institut (RKI), Zentrum für Krebsregisterdaten (2023) [Online im Internet] URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_no_de.html [Stand: 23.04.2023, 11:00].
- 107) Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, Desai MB, Cerri E, Heitner Enschede S, Humerickhouse RA, Wierda WG, Seymour JF (2016) Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 374(4), 311–322.
- 108) Ruzzo EK, Capo-Chichi JM, Ben-Zeev B, Chitayat D, Mao H, Pappas AL, Hitomi Y, Lu YF, Yao X, Hamdan FF, Pelak K, Reznik-Wolf H, Bar-Joseph I, Oz-Levi D, Lev D, Lerman-Sagie T, Leshinsky-Silver E, Anikster Y, Ben-Asher E, Olender T, Goldstein DB (2013) Deficiency of asparagine synthetase causes congenital microcephaly and a progressive form of encephalopathy. *Neuron.* 80(2), 429–441.

- 109) Şahin S, Işık Gönül İ, Çakır A, Seçkin S, Uluoğlu Ö (2016) Clinicopathological Significance of the Proliferation Markers Ki67, RacGAP1, and Topoisomerase 2 Alpha in Breast Cancer. *Int J Surg Pathol.* 24(7):607-13.
- 110) Saxena R, Badve S (2021) Tissue Microarray – Construction and Quality assurance. In: *Immunohistochemical Staining Methods, IHC Guidebook.* Taylor C, Rudbeck L (Hrsg.), Sixth Edition, Agilent Dako, USA, 144-151.
- 111) Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G (2018) Cell Detection with Star-convex Polygons. In: *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018.* Frangi A, Schnabel J, Davatzikos C, Alberola-López C, Fichtinger G (Hrsg.), *Lecture Notes in Computer Science*, Vol. 11071, pp. 265-273, Springer International Publishing.
- 112) Schütz F, Thomssen C (2023) Brustkrebsrisiko, Genetik und Prävention, AGO Guidelines Breast, Version 2023.1D [Online im Internet] URL: <http://www.ago-online.de> [Stand: 23.04.2023, 12:10].
- 113) Sellitto A, D'Agostino Y, Alexandrova E, Lamberti J, Pecoraro G, Memoli D, Rocco D, Coviello E, Giurato G, Nassa G, Tarallo R, Weisz A, Rizzo F (2020) Insights into the Role of Estrogen Receptor β in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers.* 12(6), 1477.
- 114) Shen K, Yu H, Xie B, Meng Q, Dong C, Shen K, Zhou HB (2023) Anticancer or carcinogenic? The role of estrogen receptor β in breast cancer progression. *Pharmacol Ther.* 242:108350.
- 115) Shamai G, Binenbaum Y, Slossberg R, Duek I, Gil Z, Kimmel R (2019) Artificial Intelligence Algorithms to Assess Hormonal Status From Tissue Microarrays in Patients With Breast Cancer. *JAMA Netw Open.* 3;2(7).
- 116) Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H (2015) The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol.* 89(3), 289–317.
- 117) Skaland I, Janssen EA, Gudlaugsson E, Hui Ru Guo L, Baak JP (2009) The prognostic value of the proliferation marker phosphohistone H3 (PPH3) in luminal, basal-like and triple negative phenotype invasive lymph node-negative breast cancer. *Cell Oncol.* 31(4), 261–271.

- 118) Skjervold AH, Pettersen HS, Valla M, Opdahl S, Bofin AM (2022) Visual and digital assessment of Ki-67 in breast cancer tissue - a comparison of methods. *Diagn Pathol.* 17(1):45.
- 119) Song X, Fiati Kenston SS, Zhao J, Yang D, Gu Y (2017) Roles of FoxM1 in cell regulation and breast cancer targeting therapy. *Med Oncol.* 34(3), 41.
- 120) Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(19), 10869–10874.
- 121) Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB (2004) Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem.* 50(11), 1986–1993.
- 122) Stålhammar G, Fuentes Martinez N, Lippert M, Tobin NP, Mølholm I, Kis L, Rosin G, Rantalainen M, Pedersen L, Bergh J, Grunkin M, Hartman J (2016) Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod Pathol.* 29(4):318-29.
- 123) Sukocheva OA, Li B, Due SL, Hussey DJ, Watson DI (2015) Androgens and esophageal cancer: What do we know? *World J Gastroenterol.* 21(20):6146-56.
- 124) Talbert PB, Henikoff S (2021) Histone variants at a glance. *J Cell Sci.* 134(6), jcs244749.
- 125) Tan W, Li Q, Chen K, Su F, Song E, Gong C (2016) Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 7(9):10373-85.
- 126) Vaillant F, Merino D, Lee L, Breslin K, Pal B, Ritchie ME, Smyth GK, Christie M, Phillipson LJ, Burns CJ, Mann GB, Visvader JE, Lindeman GJ (2013) Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer cell.* 24(1), 120–129.

- 127) van Steenhoven J, Kuijter A, Kornegoor R, van Leeuwen G, van Gorp J, van Dalen T, van Diest PJ (2020) Assessment of tumour proliferation by use of the mitotic activity index, and Ki67 and phosphohistone H3 expression, in early-stage luminal breast cancer. *Histopathology*. 77(4), 579–587.
- 128) Waldmann A, Hübner J, Katalinic A (2021) Trends Over Time in Breast-Cancer-Specific Mortality in Germany. *Dtsch Arztebl Int*. 118(31-32), 538–539.
- 129) Walsh EM, Gucalp A, Patil S, Edelweiss M, Ross DS, Razavi P, Modi S, Iyengar NM, Sanford R, Troso-Sandoval T, Gorsky M, Bromberg J, Drullinsky P, Lake D, Wong S, DeFusco PA, Lamparella N, Gupta R, Tabassum T, Boyle LA, Arumov A, Traina TA (2022) Adjuvant enzalutamide for the treatment of early-stage androgen-receptor positive, triple-negative breast cancer: a feasibility study. *Breast Cancer Res Treat*. 195(3):341-351.
- 130) Wang C, Wang W, Liu Y, Yong M, Yang Y, Zhou H (2018) Rac GTPase activating protein 1 promotes oncogenic progression of epithelial ovarian cancer. *Cancer Sci*. 109(1), 84–93.
- 131) Wang Z, Ahmad A, Li Y, Banerjee S, Kong D, Sarkar FH (2010) Forkhead box M1 transcription factor: a novel target for cancer therapy. *Cancer Treat Rev*. 36(2), 151–156.
- 132) Wheatley SP, Altieri DC (2019) Survivin at a glance. *J Cell Sci*. 132(7), jcs223826.
- 133) Who Classification of Tumours Editorial Board (2019) WHO classification of tumours - Breast Tumours. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Volume 2.
- 134) Wöckel A, Kreienberg R, Janni W (2021) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.4 – Juni 2021, AWMF-Registernummer: 032-045OL. [Online im Internet] URL: https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf [Stand: 23.04.2023, 14:35].
- 135) Yamanaka K, Nakata M, Kaneko N, Fushiki H, Kita A, Nakahara T, Koutoku H, Sasamata M (2011) YM155, a selective survivin suppressant, inhibits tumor spread

- and prolongs survival in a spontaneous metastatic model of human triple negative breast cancer. *Int J Oncol.* 39(3), 569–575.
- 136) Yang H, He X, Zheng Y, Feng W, Xia X, Yu X, Lin Z (2014) Down-regulation of asparagine synthetase induces cell cycle arrest and inhibits cell proliferation of breast cancer. *Chem Biol Drug Des.* 84(5):578-84.
- 137) Yeh CM, Sung WW, Lai HW, Hsieh MJ, Yen HH, Su TC, Chang WH, Chen CY, Ko JL, Chen CJ (2016) Opposing prognostic roles of nuclear and cytoplasmic RACGAP1 expression in colorectal cancer patients. *Hum Pathol.* 47(1):45-51.
- 138) Young A, Bu W, Jiang W, Ku A, Kapali J, Dhamne S, Qin L, Hilsenbeck SG, Du YN, Li Y (2022) Targeting the Pro-survival Protein BCL-2 to Prevent Breast Cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 15(1):3-10.
- 139) Yousif M, van Diest PJ, Laurinavicius A, Rimm D, van der Laak J, Madabhushi A, Schnitt S, Pantanowitz L (2022) Artificial intelligence applied to breast pathology. *Virchows Arch.* 480(1):191-209.
- 140) Zhang H, Zhang Z, Xuan L, Zheng S, Guo L, Zhan Q, Qu X, Zhang B, Wang Y, Wang X, Song Y (2012) Evaluation of ER- α , ER-B1 and ER-B2 expression and correlation with clinicopathologic factors in invasive luminal subtype breast cancers. *Clin Transl Oncol.* 14(3), 225–231.
- 141) Zhong F, Bi R, Yu B, Yang F, Yang W, Shui R (2016) A Comparison of Visual Assessment and Automated Digital Image Analysis of Ki67 Labeling Index in Breast Cancer. *PLoS One* 11(2):e0150505.
- 142) Zhou Y, Liu X (2020) The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomark Res.* 8, 39.
- 143) Zhou D, Ren K, Wang M, Wang J, Li E, Hou C, Su Y, Jin Y, Zou Q, Zhou P, Liu X (2021) Long non-coding RNA RACGAP1P promotes breast cancer invasion and metastasis via miR-345-5p/RACGAP1-mediated mitochondrial fission. *Mol Oncol.* 15(2), 543–559.

- 144) Zhu W, Radadiya A, Bisson C, Wenzel S, Nordin BE, Martínez-Márquez F, Imasaki T, Sedelnikova SE, Coricello A, Baumann P, Berry AH, Nomanbhoy TK, Kozarich JW, Jin Y, Rice DW, Takagi Y, Richards N (2019) High-resolution crystal structure of human asparagine synthetase enables analysis of inhibitor binding and selectivity. *Commun Biol.* 2, 345.
- 145) Ziegler Y, Laws MJ, Sanabria Guillen V, Kim SH, Dey P, Smith BP, Gong P, Bindman N, Zhao Y, Carlson K, Yasuda MA, Singh D, Li Z, El-Ashry D, Madak-Erdogan Z, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2019) Suppression of FOXM1 activities and breast cancer growth in vitro and in vivo by a new class of compounds. *NPJ Breast Cancer.* 5, 45.
- 146) Zinkel S, Gross A, Yang E (2006) BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* 13(8), 1351–1359.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Axel Niendorf von der Pathologie Hamburg-West, der jede Phase meiner Arbeit engagiert und professionell begleitet hat und mir mit seiner enormen Fachkompetenz zu jeder Zeit zur Seite stand. Ich danke für alles: Für die Idee zu diesem interessanten Thema, für die vertrauensvolle Bereitstellung des durch jahrelange Vorarbeiten erstellten umfangreichen Datensatzes und der histologischen Präparate, für die fundierte Einführung in das wissenschaftliche Denken und Arbeiten und für die zahlreichen Videokonferenzen, E-Mails und Gespräche. Unseren konstruktiven Austausch und die anregenden Diskussionen habe ich stets als sehr bereichernd empfunden.

Als Zweitbetreuer am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf danke ich Herrn Professor em. Dr. Udo Schumacher für seine hilfsbereite wissenschaftliche Betreuung, für seinen kompetenten Rat und seine wertvollen Anmerkungen zu meiner Arbeit. Genauso danke ich seinem Nachfolger am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, dem kommissarischen Direktor Herrn Prof. Dr. Andreas K. Engel.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Josef A. Käs und seine Arbeitsgruppe vom Department of Soft Matter Physics der Universität Leipzig, die mit der Erstellung und Auswertung der digitalisierten Daten und der statistischen Analyse einen bedeutenden Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Ganz besonders möchte ich Herrn Pablo Gottheil (M. Sc.) danken, der mit unermüdlicher Ausdauer und hohem Anspruch die Erstellung der Daten kompetent vorgebracht hat. Dass er dabei jederzeit und kurzfristig auf alle meine Fragen zur Statistik eine Antwort wusste, hat unsere Zusammenarbeit zu einer besonderen Freude gemacht.

Ich danke Frau Denise Helmer von der Pathologie Hamburg-West für ihre sachkundige Unterstützung, mit der sie mir bei der Beschaffung von Dokumenten und Materialien, bei organisatorischen Fragen und bei praktischen Herausforderungen eine geduldige und wertvolle Hilfe war.

Frau Dr. Anne-Sophie Wegscheider danke ich für die intensive wissenschaftliche Auseinandersetzung mit meiner Arbeit, für den konstruktiven medizinischen Austausch und für ihre Bereitschaft, mir ihr fundiertes pathologisches Fachwissen weiterzugeben. Ihr und dem ganzen Team der Pathologie Hamburg-West danke ich für die freundliche Aufnahme in der Abteilung während des praktischen Teils meiner Arbeit und für die wohlwollende Anteilnahme an meiner Dissertation.

Herrn Bernhard Ulm danke ich für seinen substanziellen Beitrag zu der im Vorfeld durchgeführten Stratifizierung des Patientengutes und für die wertvollen Hinweise zur statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Des Weiteren danke ich meinen lieben Kolleginnen unserer Gynäkologischen Gemeinschaftspraxis, die mir viel Verständnis für mein ungewöhnliches Projekt entgegengebracht und es mit Interesse verfolgt haben. Zu wissen, dass ich mich jederzeit auf sie verlassen kann und dass unser kollegiales wie freundschaftliches Miteinander eine Menge trägt, hat mir den Freiraum für diese Arbeit erst ermöglicht.

Ich danke meinen langjährigen Freundinnen und Freunden, die während der gesamten Zeit ein offenes Ohr für mich hatten und mit mir Geduld geübt haben, wenn es mal nicht ganz so schnell voran ging, wie ich es mir in der Theorie vorgestellt hatte.

Mein abschließender großer Dank gilt meinen zwei erwachsenen Kindern und meinem Mann – you mean the world to me. Trotz eigener Herausforderungen in Schule, Studium, Beruf und Familie waren sie immer für mich da und haben mich liebevoll unterstützt, motiviert und begleitet.

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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: