

Aus dem Department für Frauengesundheit Tübingen

**Expression von Stammzellproteinen auf disseminierten
Tumorzellen und korrespondierenden Primärtumoren bei
Mammakarzinompatientinnen mit neoadjuvanter
Chemotherapie als Resistenzmarker**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Janowski, Kathrin (geb. Meese)

2018

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Tanja Fehm

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Todenhöfer

Tag der Disputation: 14.03.2018

Meinen Eltern

Lisa, Marlene und David

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2	Therapie des Mammakarzinoms	2
1.2.1	Chirurgische Therapie.....	2
1.2.2	Systemtherapie.....	2
1.2.3	Radiotherapie.....	4
1.3	Tumorzelldissemination.....	5
1.3.1	Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen	5
1.3.2	Charakterisierung disseminierter Tumorzellen.....	6
1.4	Tumorstammzellen und ihre Bedeutung für eine „Stammzell-spezifische“ Therapie.....	7
1.4.1	Stammzellmarker.....	10
1.4.1.1	Aldh1.....	11
1.4.1.2	Notch1.....	11
1.4.1.3	Sox2.....	12
1.5	Problemstellung.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Patientenkollektiv.....	14
2.1.2	Zelllinien.....	14
2.1.3	Kulturmedien, Medienbestandteile.....	15
2.1.4	Antikörper, Normalseren, Peptide.....	16
2.1.5	Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.7	Geräte, Laborbedarf.....	18
2.1.8	Software.....	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Aufbereitung der Gewebeprobe.....	20

2.2.1.1	Gewinnung und Aufbereitung der Knochenmarkaspirate	20
2.2.1.2	Erstellung der Zytospins	21
2.2.1.3	Erstellung des Gewebe-Mikroarrays (TMA).....	22
2.2.2	Nachweisprinzip Zytokeratine	23
2.2.3	Etablierung der Immunfluoreszenz-basierten Methode.....	23
2.2.3.1	Optimales Färbeprotoll der Sox2-Immunfluoreszenzfärbung	25
2.2.3.2	Auswertung der KM-Präparate	26
2.2.3.3	Auswertungskriterien	27
2.2.4	Immunhistochemische Färbung des Primärtumors für Sox2, Aldh1 und Notch1	29
2.2.5	Auswertung der Präparate der immunhistochemischen Färbung des Primärtumors	30
2.2.6	Versuchsaufbau	32
2.2.7	Statistische Auswertung.....	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Etablierung der Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen von DTZ für Epithelzellmarker und Stammzellmarker.....	35
3.2	Patientenkollektiv.....	39
3.3	Detektion Sox2-positiver disseminierter Tumorzellen.....	44
3.3.1	Korrelation des Sox2-Status von DTZ mit klinisch-pathologischen Faktoren des Primärtumors.....	46
3.3.2	Korrelation des Sox2-Status von DTZ mit Überlebensdaten.....	48
3.4	Stammzellmarkerexpression im Primärtumor.....	51
3.4.1	Aldh1-Status des Primärtumors	51
3.4.1.1	Korrelation des Adh1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	53
3.4.1.2	Korrelation des Aldh1-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten	56
3.4.1.3	Korrelation des Aldh1-Status des Primärtumors prä- und posttherapeutisch	57
3.4.2	Notch1-Status des Primärtumors	58

3.4.2.1	Korrelation des Notch1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	60
3.4.2.2	Korrelation des Notch1-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten	64
3.4.2.3	Korrelation des Notch1-Status des Primärtumors prä- und posttherapeutisch	65
3.4.3	Sox2-Status des Primärtumors	66
3.4.3.1	Korrelation des Sox2-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	68
3.4.3.2	Korrelation des Sox2-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten	71
3.4.3.3	Korrelation des Sox2-Status des Primärtumors prä- und posttherapeutisch	74
3.4.3.4	Korrelation des Sox2-Status von disseminierten Tumorzellen und dem prätherapeutischen Primärtumor	75
3.4.3.5	Korrelation Sox2-Status von disseminierten Tumorzellen und dem posttherapeutischen Primärtumor.....	75
4	Diskussion	77
4.1	Tumorzell dissemination und Stammzelltheorie	77
4.2	Sox2-Expression auf DTZ	79
4.2.1	Sox2-Expression von DTZ und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren des Primärtumors.....	80
4.2.2	Sox2-Expression von DTZ und Korrelation mit Überleben und Therapieresponse	80
4.3	Sox2-Expression im Primärtumor	81
4.3.1	Prä- und posttherapeutische Sox2-Expression und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren.....	81
4.3.2	Prä- und posttherapeutische Sox2-Expression und Korrelation mit Überleben und Therapieresponse.....	82
4.4	Korrelation prä- und posttherapeutische Sox2-Expression.....	83
4.5	Korrelation Sox2-Status von DTZ und dem Primärtumor	83

4.6	Aldh1-Expression im Primärtumor.....	85
4.6.1	Prä- und posttherapeutische Aldh1-Expression und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren.....	85
4.6.2	Prä- und posttherapeutische Aldh1-Expression und Korrelation mit Überleben und Therapieresponse.....	86
4.7	Korrelation prä- und posttherapeutische Aldh1-Expression.....	87
4.8	Notch1-Expression im Primärtumor.....	88
4.8.1	Prä- und posttherapeutische Notch1-Expression und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren.....	88
4.8.2	Prä- und posttherapeutische Notch1-Expression und Korrelation mit Überleben und Therapieresponse.....	90
4.9	Korrelation prä- und posttherapeutische Notch1-Expression	90
4.10	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	92
4.11	Konsequenzen für die Therapie	93
4.11.1	Zielgerichtete Therapie gegen Tumorstammzellen.....	94
5	Zusammenfassung.....	99
6	Abbildungsverzeichnis.....	102
7	Tabellenverzeichnis.....	104
8	Literaturverzeichnis	107
9	Erklärung zum Eigenanteil.....	126
10	Danksagung.....	127

Abkürzungsverzeichnis

AB Diluent	<i>antibody diluent</i>
AC	Adriamycin, Cyclophosphamid
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AK	Antikörper
Aldh1	Aldehyddehydrogenase1
AML	Akute myeloische Leukämie
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BRCA1/2	<i>Breast Cancer 1/2</i> (Brustkrebsgen 1/ 2)
CCD	<i>Charge Coupled Device</i> (ladungsgekoppeltes Bauteil)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungsgruppe)
CK	Zytokeratin
DAB	Diaminobenzidin
DAC	Docetaxel, Doxorubicin, Cyclophosphamid
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DLL	<i>delta-like ligand</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTZ/DTC	disseminierte Tumorzellen
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>
EC	Epirubicin, Cyclophosphamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetic (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ER	<i>estrogen receptor</i>
FEC	5-Fluoruracil, Epirubicin, Cyclophosphamid, Docetaxel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HES	Humane embryonale Stammzellen
HTB	<i>human tissue bank</i>
IF	Immunfluoreszenz

IDC	Invasiv duktales Mammakarzinom
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
ILC	Invasiv lobuläres Mammakarzinom
ILDC	Invasiv lobulär duktales Mammakarzinom
ISHAGE	<i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>
JAG	<i>Jagged</i>
KMP	Knochenmarkpunktion
LAB	<i>labelled avidin biotin</i>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> (humane Mammakarzinom-Zelllinie)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Oct4	<i>octamer binding transcription factor 4</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
pCR	<i>pathological complete response</i>
PR	<i>progesteron receptor</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i> (Proto-Onkogen)
RNS	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rt-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SOX2	<i>sex determining region RaY (SRY)- box 2</i>
™	<i>unregistered Trademark</i>
TMA	<i>tissue microarray</i>
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TOP 2α	Topoisomerase 2α
ZTZ/CTC	zirkulierende Tumorzellen

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit einem Anteil von 29% die häufigste maligne Erkrankung der Frau in Deutschland und den westlichen Industrieländern. Statistisch gesehen tritt dieses Malignom bei jeder 10. Frau im Laufe ihres Lebens auf. Im Jahr 2012 kam es in Europa zu 464.900 Neuerkrankungen. 131.000 Frauen starben im gleichen Jahr an den Folgen eines Mammakarzinoms (Ferlay *et al.* 2013).

Wichtige Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind unter anderem das weibliche Geschlecht, ein hohes Alter und hormonelle Faktoren (Backe *et al.* 2002; Henderson *et al.* 1982, 1988; Preston-Martin *et al.* 1990; Schmidt-Mattiesen, 2004). Eine erhöhte bzw. verlängerte Exposition gegenüber endogenen Östrogenen durch eine frühe Menarche, späte Menopause, späte erste Schwangerschaft oder Kinderlosigkeit erhöhen dabei das Erkrankungsrisiko.

Bei 5-10% aller an Brustkrebs erkrankten Frauen liegt eine erbliche Disposition vor. Frauen mit Mutation in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 oder BRCA2 erkranken in etwa 20 Jahre früher als Frauen ohne familiäres Risiko. Das lebenslange Erkrankungsrisiko liegt bei 50-80% (Antoniou *et al.* 2003).

Schließlich haben auch Umwelteinflüsse, Alkohol und Nikotin, sowie ein erhöhter Body-Mass-Index Auswirkungen auf das Erkrankungsrisiko (Hiatt *et al.* 1990; Renehan *et al.* 2008; Reynolds *et al.* 2004).

Nach Empfehlungen der Konsensus-Konferenz in St. Gallen im Jahr 2011 ist der molekulare Subtyp (Tabelle 1) neben den klassischen Prognoseparametern, wie Lymphknotenstatus, Grading, Hormon- und Her2-Rezeptorstatus und Alter der Patientin bei der Therapieentscheidung von zentraler Bedeutung (Goldhirsch *et al.* 2011). In den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO) werden zusätzlich die Tumorgroße, der histologische Tumortyp, das Auftreten von

Fernmetastasen und die pathologische Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie als wichtige Faktoren aufgeführt, die die Prognose beim Mammakarzinom beeinflussen (Aktuelle Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome der Kommission MAMMA in der AGO e.V., 2017).

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (Goldhirsch et al.2011)

Subtyp	ER und/ oder PR	Her2	Ki-67
Luminal A	+	-	Niedrig
Luminal B (Her2-negativ)	+	-	Hoch
Luminal B (Her2-positiv)	+	+	Jeder
Her2-positiv	-	+	
Basal-like: triple-negativ	-	-	

1.2 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms wird heutzutage für jede Patientin, in Abhängigkeit vom vorliegenden Risikoprofil, individualisiert getroffen. Dabei unterscheidet man drei Säulen:

1.2.1 Chirurgische Therapie

Das wichtigste Kriterium einer operativen Therapie beim nicht metastasierten Mammakarzinom ist die komplette Tumorsektion (Renton *et al.* 1996). Ein tumorfreier Schnittrand ist dabei mit einer geringen Lokalrezidivrate assoziiert (Houssami *et al.* 2014).

1.2.2 Systemtherapie

Prä- und/ oder postoperativ wird die chirurgische Tumorthherapie des Mammakarzinoms durch eine systemische Therapie ergänzt. Entsprechend der S3-Leitlinie sollte bei Her2-positiven, hormonrezeptornegativen oder gering differenzierten Tumoren sowie bei einem jungen Erkrankungsalter (<35 Jahren)

und einer hohen Tumorlast eine **Chemotherapie** indiziert werden (Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2012). Durch den Einsatz adjuvanter (postoperativer) Chemotherapien kann sowohl das Rezidiv- als auch das Sterberisiko verringert werden (EBCTCG, 2005; EBCTCG: Peto *et al.* 2012).

Besteht die Indikation zur Chemotherapie, muss die Möglichkeit der **neoadjuvanten Chemotherapie** (oder primär systemischen Therapie) erwogen werden (Schmidt *et al.* 2014). Ziel ist es, die Operabilität des Tumors zu verbessern bzw. eine brusterhaltende Therapie zu ermöglichen (Kaufmann *et al.* 2012; Makhoul *et al.* 2011). Des Weiteren kann durch diese Art der Behandlung die Wirksamkeit der Therapie *in vivo* beurteilt und das weitere Vorgehen individuell geplant werden (Berruti *et al.* 2014; Kaufmann *et al.* 2012; Symmans *et al.* 2007; von Minckwitz *et al.* 2012). Die Behandlungsdauer sollte entsprechend dem adjuvanten Standardregime mindestens 18 Wochen betragen (Kaufmann *et al.* 2012). Den höchsten Empfehlungsgrad entsprechend der AGO haben das AC-, EC- Schema, jeweils gefolgt von Docetaxel alle drei Wochen oder Paclitaxel wöchentlich sowie das DAC-Regime (Rastogi *et al.* 2008; von Minckwitz *et al.* 2005, 2008a, 2008b). Handelt es sich um einen Her2-positiven Tumor wird die zusätzliche Gabe von Trastuzumab (Herceptin) oder die duale Blockade mit Trastuzumab und Pertuzumab (Perjeta) empfohlen (Gianni *et al.* 2014; Gianni *et al.* 2016). Dadurch kann eine höhere Rate an pathologischen Komplettremissionen erreicht werden (Gianni *et al.* 2012; Untch *et al.* 2010).

Bei Vorliegen eines Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms wird stets eine adjuvante **endokrine Therapie** für 5 bis 10 Jahre durchgeführt (EBCTCG: Davies *et al.* 2011; Davies *et al.* 2013).

Die endokrine Therapie der Wahl bei prämenopausalen Patientinnen ist der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen. So können sowohl das Risiko für die Entstehung eines Rezidivs als auch das Sterberisiko verringert werden (Davies *et al.* 2013; EBCTCG: Davies *et al.* 2011).

Postmenopausale Patientinnen werden in der Regel mit Tamoxifen, Aromataseinhibitoren oder einer sequentiell verabreichten Kombination aus beiden behandelt (Burstein *et al.* 2010).

Bei ca. 30% aller Mammakarzinome ist der Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2 überexprimiert, was mit einem kürzeren Überleben der Patientinnen assoziiert ist (Slamon *et al.* 1987). Diese erhalten adjuvant eine zielgerichtete Therapie mit Trastuzumab, einem **Her2-spezifischen monoklonalen Antikörper**, für die Dauer von einem Jahr (Smith *et al.* 2007). In der Neoadjuvanz wird die Trastuzumabgabe mit Pertuzumab (duale Blockade) ergänzt (Gianni *et al.* 2012).

1.2.3 Radiotherapie

Nach brusterhaltender Operation sollte bei Vorliegen eines invasiven Karzinoms eine Bestrahlung der betroffenen Brust erfolgen (EBCTCG: Darby *et al.* 2011). Das Rezidivrisiko kann so gesenkt und das Gesamtüberleben verbessert werden (Clarke *et al.* 2005). Eine postoperative Radiotherapie der Brustwand nach Mastektomie senkt das Risiko eines lokoregionären Rezidiv und verbessert bei Patientinnen mit hohem Lokalrezidivrisiko das Gesamtüberleben (Clarke *et al.* 2005). Indiziert ist diese bei T3/ T4-Tumoren, bei invasiven Tumoren, wenn keine R0-Situation möglich ist und bei mehr als 3 befallenen Lymphknoten (EBCTCG: McGale *et al.* 2014). Entsprechend der interdisziplinären S3-Leitlinie soll eine Strahlentherapie der Axilla bei Tumorresiduen nach axillärer Dissektion oder eindeutigem klinischen Befall bei nicht erfolgter Axilladissektion erfolgen (S3-Leitlinien: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2012.).

1.3 Tumorzelldissemination

1.3.1 Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen

Unter dem Begriff Tumorzelldissemination versteht man die hämatogene Streuung einzelner Zellen aus dem Primärtumor.

Disseminierte Tumorzellen (DTZ) können bei bis zu über 40% aller Mammakarzinompatientinnen im Knochenmark nachgewiesen werden (Braun *et al.* 2000a; Diel *et al.* 1996; Solomayer *et al.* 2001). Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein positiver Knochenmarkstatus mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Sowohl die rezidivfreie Überlebenszeit als auch die Dauer des Gesamtüberlebens waren bei diesen Patientinnen verkürzt (Fortunato *et al.* 2009; Gebauer *et al.* 2001; Harbeck *et al.* 1994; Hartkopf *et al.* 2014; Mansi *et al.* 1999). Eine im *New England Journal of Medicine* veröffentlichte große Metaanalyse von 4703 Mammakarzinompatientinnen bestätigte den Nachweis von DTZ im Knochenmark beim Mammakarzinom als unabhängigen prognostischen Faktor (Braun *et al.* 2005).

Bereits im frühen Erkrankungsstadium können DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden (Hüsemann *et al.* 2008; Banys *et al.* 2012). Allerdings entwickelt nicht jede Patientin mit einem positiven Knochenmarkbefund manifeste Metastasen (Braun *et al.* 2005). Nach der Hypothese der metastatischen Ineffizienz („*metastatic inefficiency*“) werden epitheliale Zellen, die der Primärtumor in die Blutbahn abgibt, größtenteils durch die Scherkräfte aus Blut und Knochenmark eliminiert oder sterben ab (Fidler *et al.* 1970; Luzzi *et al.* 1998). Es besteht auch die Möglichkeit, dass ein Teil dieser Zellen über mehrere Jahre im Knochenmark persistiert. Dort befinden sie sich zunächst in einem Ruhestadium, was als *tumor cell dormancy* bezeichnet wird (Meng *et al.* 2004; Pantel *et al.* 1993). Persistierende DTZ können dann der Ausgangspunkt für Metastasen sein (Fehm *et al.* 2002; Mansi *et al.* 1989).

Können nach Abschluss einer systemischen Therapie weiterhin Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen detektiert werden, wirkt sich dies ungünstig auf die Prognose aus (Braun *et al.* 2000b; Janni *et al.* 2011;

Wiedswang *et al.* 2004). Damit gelten disseminierte Tumorzellen als Surrogatmarker der minimalen residualen Tumorerkrankung und stellen ein potentielles Ziel zukünftiger Therapien dar. Eine umfangreiche Charakterisierung ist aus diesem Grund notwendig.

1.3.2 Charakterisierung disseminierter Tumorzellen

Vielen Studien zufolge können sich DTZ von den Zellen des Primärtumors phäno- und genotypisch unterscheiden, was auch in Bezug auf die Expression prädiktiver Faktoren, wie Her2 und den Östrogenrezeptorstatus beobachtet werden kann (Braun *et al.* 1999, 2001; Fehm *et al.* 2008b; Pantel *et al.* 1993; Solomayer *et al.* 2006).

Des Weiteren zeigten die Untersuchungen des Expressionsmusters verschiedener Antigene auf der DTZ-Oberfläche, dass diese Zellen Proliferationsmarker, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren unterschiedlich stark exprimieren.

So konnten die Proliferationsmarker Ki-67 und p120 auf DTZ nur vereinzelt nachgewiesen werden (Pantel *et al.* 1993). Dies könnte bedeuten, dass sich diese Zellen in der G0- oder frühen G1-Phase des Zellzyklus befinden (Gerdes *et al.* 1984), was deren Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Chemotherapeutika erklären würde (Becker *et al.* 2007; Braun *et al.* 2000b). Darüber hinaus könnte dies ein Grund für die lange Latenzzeit einer klinischen Manifestation von Metastasen sein.

Der Verlust bzw. die Reduktion des MHC-Klasse-I-Komplexes an der Oberfläche von DTZ schützt diese vor der Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten. Dieses Phänomen konnte vor allem bei schlecht differenzierten Tumoren beobachtet werden (Pantel *et al.* 1991).

Proteolysefaktoren wie der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) mit seinem membranständigen Rezeptor (uPA-R) oder Kathepsin D konnten auf DTZ von Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden. Eine hohe Proteaseaktivität in DTZ führt zum Abbau der Basalmembran, was wiederum die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen erhöhen kann (Solomayer *et al.* 1997, 1998; Tögel *et al.* 2001).

Der Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2 kann in bis zu 87% aller Fälle auf disseminierten Tumorzellen nachgewiesen werden (Braun *et al.* 1999, 2001; Pantel *et al.* 1993). In der Studie von Solomayer *et al.* wurden der Her2-Status der disseminierten Tumorzellen und des Primärtumors miteinander verglichen. Bei den 137 untersuchten primären Mammakarzinompatientinnen war Her2 häufiger auf DTZ als im Primärtumor exprimiert. (Solomayer *et al.* 2006).

Für den Östrogenrezeptor konnten Fehm *et al.* zeigen, dass DTZ meistens ER-negativ sind, obwohl es sich in über 80% der Fälle um einen positiven Primärtumor handelte (Fehm *et al.* 2008b). Mittlerweile gibt es Hinweise, dass Subpopulationen von disseminierten Tumorzellen auf Grund ihres Phänotyps sowie ihrer Fähigkeit Metastasen zu induzieren auch als sogenannte Tumorstammzellen interpretiert werden können.

1.4 Tumorstammzellen und ihre Bedeutung für eine „Stammzell-spezifische“ Therapie

Die Existenz von Tumorstammzellen konnte bereits in verschiedenen soliden Tumoren anhand von Oberflächenrezeptoren nachgewiesen werden.

Über den Ausgangspunkt der Tumorstammzellen beim Mammakarzinom wird kontrovers diskutiert. Aktuelle Studien stützen zwei Theorien (Velasco-Velázquez *et al.* 2012):

Die erste Theorie besagt, dass es durch Fehlregulation in der Selbsterneuerung und Differenzierung normaler Stammzellen oder frühen Progenitorzellen zu Funktionsstörungen und gegebenenfalls zur Karzinogenese kommen kann (Dontu *et al.* 2003b, 2004a; Sagar *et al.* 2007). Dabei könnten sogenannte Tumorstammzellen entstehen (Abbildung 1). Bestärkt wird diese Theorie durch die bestehenden Gemeinsamkeiten normaler Stammzellen und bestimmter Tumorzellen (Reya *et al.* 2001). Durch Differenzierung können Stammzellen und Tumorstammzellen eine zelluläre Heterogenität entwickeln. Bei jeder Zellteilung entsteht zudem eine neue Stammzelle bzw. Tumorstammzelle. Dies wird als Selbsterneuerung (*self-renewal*) bezeichnet.

Außerdem besteht bei beiden Zelltypen eine deutliche Resistenz gegenüber Apoptose-Stimuli. Sowohl Stammzellen als auch Tumorzellen besitzen die Fähigkeit zur Migration. Eine hohe Anzahl an membranständigen Transportproteinen in Tumorzellen könnte, wie bei Stammzellen dem Schutz vor Zytostatika dienen (Dontu *et al.* 2003a).

Manche Krebszellen können, wie auch Stammzellen, überwiegend in der Ruhephase G0 (*cell dormancy*) verharren, was auch bei DTZ beobachtet werden kann (Fehm *et al.* 2008a). Dadurch werden sie für die herkömmliche, antiproliferative Therapie unzugänglich.

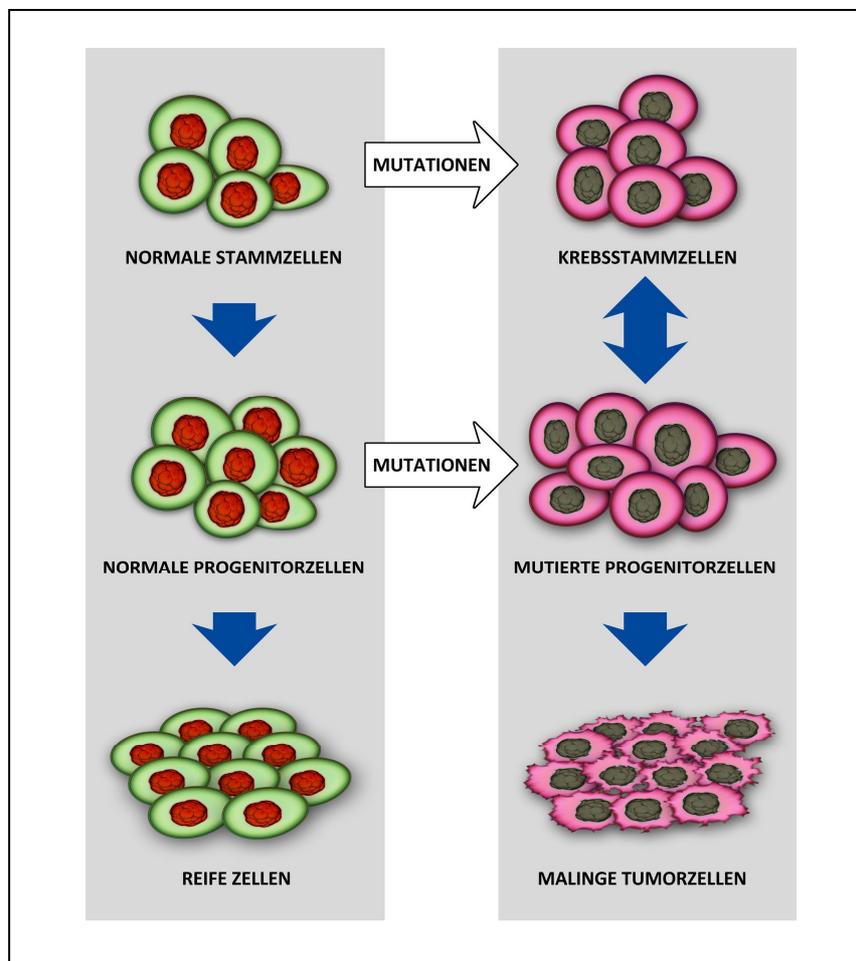


Abbildung 1: Entstehung von Tumorstammzellen 1

Karzinogenese als Resultat von Mutationen, die in Stammzellen und Progenitorzellen stattfinden (Quelle: Sagar *et al.* 2007).

Eine zweite Theorie nimmt an, dass Tumorstammzellen durch epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) entstehen. Sie beschreibt den Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften (Abbildung 2). Dadurch verlieren differenzierte Epithelzellen ihre zellspezifischen Charaktereigenschaften, einschließlich Zelladhäsion, apikal-basaler Polarität sowie eingeschränkter Mobilität und erlangen stattdessen mesenchymale Eigenschaften, wie Zellmotilität, Invasivität und verstärkte Apoptoseresistenz (Polyak *et al.* 2009). Die resultierenden Zellen können migrieren und die Basalmembran durchdringen. Am Zielort angekommen, können sie sich dann in Epithelzellen oder andere Zelltypen differenzieren (Kalluri *et al.* 2009). Die EMT könnte somit eine wichtige Voraussetzung für Tumorzellinvasion und Metastasierung beim Mammakarzinom sein (Morel *et al.* 2008).

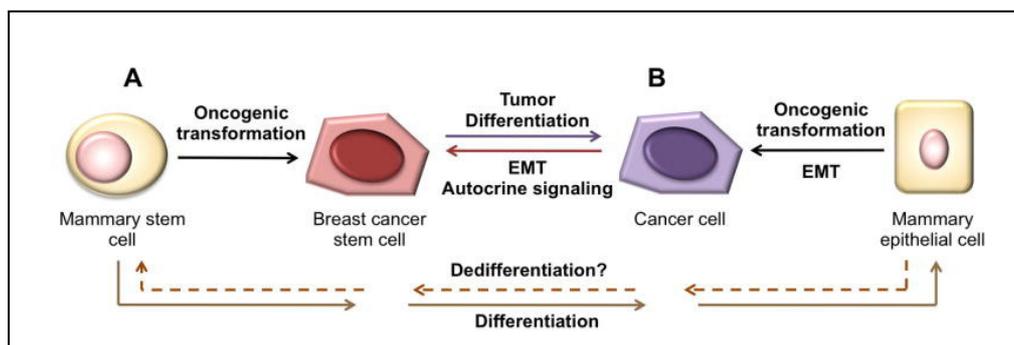


Abbildung 2: Entstehung von Tumorstammzellen 2

*Tumorstammzellen beim Mammakarzinom können aus Stammzellen des gesunden Brustdrüsengewebes entstehen (A) oder aus Tumorzellen ohne Stammzeleigenschaften, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (B) durch epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und onkogene Umwandlung erworben haben (Quelle: Velasco-Velázquez *et al.* 2012).*

Nur wenige Tumorstammzellen sind nötig um nach einer konventionellen Therapie und Tumorremission den Tumor wieder aufzubauen. Al-Hajj *et al.* konnten eine Subpopulation an Tumorzellen mit den oberflächlichen Stammzellmarkern CD44+/CD24- aus einem Mammakarzinom isolieren und daraus Tumoren generieren (Al-Hajj *et al.* 2003).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz von CD44+/CD24- Tumorzellen beim Mammakarzinom das Auftreten von

Fernmetastasen begünstigt (Abraham *et al.* 2005). Außerdem scheinen CD44+/CD24- Tumorzellen resistent gegenüber Chemotherapeutika zu sein. Beobachtungen zu Folge ist der Anteil dieser Zell-Subpopulation nach einer neoadjuvanten Chemotherapie sogar größer als vor Therapiebeginn (Lee *et al.* 2011; Li *et al.* 2008).

Balic *et al.* konnten CD44+/CD24- DTZ im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen nachweisen (Balic *et al.* 2006). So wird vermutet, dass Tumorstammzellen nicht nur für das Tumorwachstum verantwortlich sind, sondern auch Ursprung der metastasenbildenden Tumorausbreitung darstellen (Aktas *et al.* 2009).

Tumorstammzellen machen rund 1-10% der Tumormasse des Primarius aus (Wicha *et al.* 2006) und konnten bereits in verschiedenen Malignomen nachgewiesen werden, wie in Hirntumoren (Singh *et al.* 2004), Mammakarzinomen (Al-Hajj *et al.* 2003), Prostatakarzinomen (Collins *et al.* 2005), Melanomen (Fang *et al.* 2005) und Kolonkarzinomen (O'Brien *et al.* 2007; Ricci-Vitiani *et al.* 2007).

Zusammenfassend scheinen Tumorstammzellen im Besonderen in der Lage zu sein, Resistenzen gegenüber Krebsmedikamenten auszubilden, lange Zeit in einer Ruhephase zu verbringen sowie Rezidive und Metastasen zu verursachen. Deswegen scheint die **Eliminierung dieser Zellen für einen kurativen Therapieansatz** entscheidend zu sein (Rizzo *et al.* 2008a).

1.4.1 Stammzellmarker

Charakteristische Stammzellmarker, die auch von Tumorstammzellen exprimiert werden können, sind z.B. das zytoplasmatische Protein Aldh1 (Ginestier *et al.* 2007) sowie Pluripotenz-assoziierte Transkriptionsfaktoren, wie Notch, Nanog, Oct4 und Sox2. Letztere weisen besonders in schlecht differenzierten Tumoren eine hohe Aktivität auf (Ben-Porath *et al.* 2008).

1.4.1.1 Aldh1

Aldehyddehydrogenasen (Aldh) gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen. Dehydrogenasen sind Enzyme, die ihr Substrat durch Abspaltung von Wasserstoffanionen oxidieren. Beim Menschen kommen mehrere Aldh-Formen mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen vor. Aldh kann im Zytosol oder mitochondrial lokalisiert sein. Studien haben gezeigt, dass Aldh als Marker für humane Stamm- und Progenitorzellen verwendet werden kann (Cai *et al.* 2004; Hess *et al.* 2004). Im Brustdrüsengewebe können sowohl gesunde Zellen als auch Tumorzellen den Stammzellmarker Aldh1 exprimieren (Ginestier *et al.* 2007). Triple-negative Mammakarzinome weisen keine therapierelevante Expression von Östrogenrezeptoren, Progesteronrezeptoren und Her2-Rezeptoren auf. Für diese Tumore ist Aldh1 ein unabhängiger Faktor bezüglich des rezidivfreien Überlebens (Ohi *et al.* 2011).

1.4.1.2 Notch1

Durch den Notch-Signaltransduktionsweg ist es Zellen möglich auf äußere Signale zu reagieren. Vier verschiedene Notch-Rezeptoren (Notch1, Notch2, Notch3 und Notch4) und fünf Liganden (JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 und DLL4) wurden bisher beschrieben (Pannuti *et al.* 2010). Das Transmembranprotein Notch besteht aus einer Transmembrandomäne und einer großen extrazellulären Domäne, welche sich aus mehreren EGF-ähnlichen Sequenzwiederholungen zusammensetzt. Notch1 kommt im Kern, in Zellmembranen und im Zytoplasma vor. Mitglieder der Notch-Familie haben Einfluss auf die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1999). Auch im gesunden Brustdrüsengewebe ist der Notch-Rezeptor in Entwicklungsprozesse involviert. Eine abnorme Veränderung in den Signalwegen könnte so für eine maligne Entartung der Zellen verantwortlich sein (Dontu *et al.* 2004b; Stylianou *et al.* 2006). Eine hohe Expression des Notch-Rezeptors kann sowohl beim duktalem Carcinoma in situ als auch beim invasiven Karzinom der Mamma beobachtet werden und ist mit einem schlechteren Outcome assoziiert (Farnie *et al.* 2007; Reedijk *et al.* 2005; Wang,

et al. 2010). Vor allem in basalen Karzinomen, welche als undifferenziert und „stammzellartig“ gelten, wird Notch1 überexprimiert (Yuan *et al.* 2015).

1.4.1.3 Sox2

Diese Gruppe von Proteinen wurde erstmalig Anfang der 90er Jahre durch A.H. Sinclair beschrieben (Sinclair *et al.* 1990). Die Abkürzung SOX2 steht für „sex determining region Y (SRY)- box 2“ („geschlechtsbestimmende Region Y- Box 2“). Sox2 ist ein Transkriptionsfaktor, der über eine HMG (*high-mobility-group*) - Domäne verfügt, welcher eine DNS-bindende Funktion zugeschrieben wird. Eine wichtige Rolle spielt Sox2 in der Organogenese. Zudem nimmt es Einfluss auf das Schicksal einer Zelle (Yuan *et al.* 1995).

Das Zusammenwirken von Sox2 und anderen Faktoren spielt in der frühen Entwicklung eine entscheidende Rolle. So regulieren die Transkriptionsfaktoren Sox2 und Oct3/4 gemeinsam die Expression des *fibroblast growth factor 4* (FGF4), welchem eine Schlüsselrolle in der frühen embryonalen Entwicklung obliegt (Ambrosetti *et al.* 2000; Yuan *et al.* 1995). Bei der Umwandlung adulter Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen ist das Zusammenwirken von Sox2, Oct3/4, Nanog und anderen Stammzellfaktoren ebenfalls essentiell (Takahashi *et al.* 2006).

Fong *et al.* konnten an humanen embryonalen Stammzellen zeigen, dass das Ausschalten der Sox2-Expression zu einem Verlust des undifferenzierten Stammzellstatus führt. Dies resultierte in einer veränderten Zellmorphologie und einer Expression anderer Marker, wie Oct4 und Nanog (Fong *et al.* 2008).

Sox2 kann sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch exprimiert werden. Allerdings scheint die Expression im Nukleus zu bestimmen, ob eine Zelle ihren pluripotenten Status beibehält (Baltus *et al.* 2009).

Es wird angenommen, dass Sox2 an der Tumorentstehung in verschiedenen Organen beteiligt ist (Dong *et al.* 2004). Auch Tumorzellen des Mammakarzinoms können eine starke Sox2-Expression aufweisen, welche beim gesunden Brustdrüsengewebe nicht beobachtet werden kann (Chen *et al.* 2008). Sox2-positive Zellen können vor allem in basalen Tumoren detektiert werden (Rodriguez-Pinilla *et al.* 2007).

Beim Mammakarzinom könnte Sox2 eine wichtige Rolle in der frühen Karzinogenese spielen und dessen hohe Expression die Entstehung von Metastasen fördern (Lengerke *et al.* 2011).

1.5 Problemstellung

Beim Mammakarzinom ist der Nachweis von disseminierten Tumorzellen (DTZ) nach Abschluss der neoadjuvanten bzw. adjuvanten Systemtherapie mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Hall *et al.* 2012; Mathiesen *et al.* 2012). Da es auch bei Patientinnen mit einer pathologischen Komplettremission nach neoadjuvanter Therapie zum Auftreten von Metastasen kommen kann, lässt dies vermuten, dass das lokale Therapieansprechen nicht der systemischen Wirkung entspricht (Hartkopf *et al.* 2013).

Persistierende DTZ nach einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie gelten deswegen als Surrogatmarker für eine Chemotherapie-resistente, minimale residuale Tumorerkrankung und als potentiell Ziel innovativer Therapieansätze (Fehm *et al.* 2006a).

Ein möglicher Grund für die Tumorzellpersistenz im Knochenmark nach neoadjuvanter bzw. adjuvanter Systemtherapie könnten DTZ mit Stammzelleigenschaften sein. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Tumorstammzellen positiv mit einem aggressiven Tumortyp und einer schlechten Prognose korreliert (Farnie *et al.* 2007; Ohi *et al.* 2011; Rodriguez-Pinilla *et al.* 2007).

Es ist somit von größter Bedeutung, den Geno- und Phänotyp der DTZ, aber auch der Zellen im Primärtumor weiter zu untersuchen, um Therapieformen zu entwickeln, die Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften zielgenau angreifen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war daher zu analysieren, ob bei neoadjuvant behandelten Mammakarzinompatientinnen ein Zusammenhang zwischen der Expression von Stammzellmarkern im Primärtumor bzw. auf DTZ und klinisch-pathologischen Faktoren sowie dem Therapieansprechen und den Überlebensdaten besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

In einer Datenbank wurden 488 Mammakarzinompatientinnen erfasst, die im Zeitraum von Januar 2001 bis Dezember 2011 an der Universitätsfrauenklinik Tübingen aufgrund ihrer Tumorerkrankung behandelt wurden. Die therapeutische Vorgehensweise beinhaltete jeweils eine neoadjuvante Systemtherapie mit anschließender operativer Therapie. Als pathologische Komplettremission (pCR) galt ein postoperatives Tumorstadium ypT0/Tis ypN0. Bei jeder Patientin wurde im Rahmen der Operation eine Knochenmarkpunktion nach der Jamshidi-Technik durchgeführt (Jamshidi *et al.* 1971).

Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme der Patientinnen und ihre Einwilligung zur Knochenmarkpunktion sowie der weitergehenden Analyse von DTZ und des Primärtumors lagen vor. Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen bewilligt (**307/2012R**).

2.1.2 Zelllinien

Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften konnten unter anderem bereits in Hirntumoren, Mammakarzinomen und Kolonkarzinomen beschrieben werden (Al-Hajj *et al.* 2003; O'Brien *et al.* 2007; Ricci-Vitiani *et al.* 2007 Singh *et al.* 2004). Für diese Arbeit wurden Zelllinien dieser Malignome für die Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung und als Färbekontrolle verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellherkunft	Hersteller/ zur Verfügung gestellt
HES	Humane embryonale Stammzellen	AG Projekt C6, Innere Medizin II Tübingen (Prof. Dr. med. C. Lengerke)
HT-29 ATCC®-Nr. HTB-38	Kolorektales Adenokarzinom	American type culture collection (ATCC)
LN229	Glioblastom	AG Neuro-Onkologie, Hertie-Institut Tübingen (PD Dr. U. Naumann)
MCF-7 ATCC®-Nr. HTB-2	Pleuraerguss aus Adenokarzinom der Mamma	American type culture collection (ATCC)
SKBr-3 ATCC®-Nr. HTB-30	Adenokarzinom Mamma	American type culture collection (ATCC)

2.1.3 Kulturmedien, Medienbestandteile

Tabelle 3: Kulturmedien und Medienbestandteile

Kulturmedien/ Medienbestandteile	Firma
0,05% Trypsin/ EDTA (1x)	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
DPBS, 1x - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne CaCl ₂ , ohne MgCl ₂)	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS- Fetal Bovine Serum	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HEPES, 1M	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L- Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
McCoy's 5a Medium, modified	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 10.000µg/ml	Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640 Medium	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium mit Phenolrot	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.4 Antikörper, Normalseren, Peptide

Tabelle 4: Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Firma
pan Cytokeratin [C-11] antibody monoclonal	Maus	Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim
pan Cytokeratin [C-11] antibody (FITC) monoconal	Maus	Abcam, Cambridge, UK
pan Cytokeratin [C-11] antibody (FITC) monoclonal	Maus	GeneTex [®] , Inc; Irvine, USA
Epithelial Specific Antigen Lyophilisierter Monoklonaler Maus-AK	Maus	Novocastra, Nußloch
Aldh1a1 monoclonal	Kaninchen	Epitomics, Inc, Burlingame, USA
Notch1 monoclonal	Kaninchen	Epitomics, Inc, Burlingame, USA
Notch 4 polyclonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Notch4 monoclonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Sox2 polyclonal	Ziege	R&D Systems, Inc; Minneapolis, USA

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Firma
Alexa Fluor [®] 594 Esel-anti-Ziege IgG	Esel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 647 Esel-anti-Ziege IgG	Esel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 546 Esel-anti-Kaninchen IgG	Esel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 594 Esel-anti-Kaninchen IgG	Esel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 647 Esel-anti-Kaninchen IgG	Esel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 546 Ziege-anti-Kaninchen IgG	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 594 Ziege-anti-Kaninchen IgG	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 488 Ziege-anti-Maus IgG	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 594 Ziege-anti-Maus IgG	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 647 Ziege-anti-Maus IgG	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 6: Normalseren

Normalserum	Firma
Esel Serum (Normal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Ziege Serum (Normal)	Dako, Hamburg

Tabelle 7: Peptide

Peptide	Firma
Normal Kaninchen IgG-FITC	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Normal Ziege IgG-FITC	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz/ Kit	Firma
2-Propanol	Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
AB Diluent	Dako, Hamburg
Aceton	Merck KgaA, Darmstadt
Ampuwa (Nuklease-freies Wasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	VWR International GmbH, Bruchsal
PBS Tablets	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Prolong [®] Gold Antifade Reagent with DAPI	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Triton-X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%)	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
VECTASHIELD [®] Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
“Assistent” - Färbetrog	Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim
3M™ Comply™ Steam Indicator Tape	3M, St. Paul, USA
CELLSTAR® FilterTop Zellkultur Flasche 75cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR® Tubes- 15ml, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CRYO.S™ Einfrierröhrchen 2ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser 24x60 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
DermaClean® Latex Handschuhe	Ansell GmbH, München
Einfrierbox	NUNCTM-Thermo Scientific, Rochster, NY USA
Hettich Filterkarten 2-fach	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
MBT PAP PEN mini	Micro Bio-Tec Brand, Giessen
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
PACLAN® Aluminium	CeDo Folien und Haushaltsprodukte GmbH, Mönchengladbach
Pasteurpipetten- 150mm, 230mm	Wilhelm Ulbrich GdbR, Bamberg
Pipettenspitzen- 10µl, 200µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße- 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.7 Geräte, Laborbedarf

Tabelle 10: Geräte, Laborbedarf

Geräte/ Laborbedarf	Firma
Axioplan 2 imaging Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
BIOFUGE® pico	Heraeus Instruments, Hanau
BIOFUGE® fresco	Heraeus Instruments, Hanau
BX 45 Mikroskop	Olympus Europa GmbH, Hamburg
CO2-Inkubator CB150	Binder, Tuttlingen
Digital Camera DXM 1200	Nikon Instruments Europa BV, Amstelveen, NL
DURAN® Laborflasche	DURAN® Group GmbH, Wertheim/Main
DURAN® Messzylinder	DURAN® Group GmbH, Wertheim/Main
DURAN® Trichter	DURAN® Group GmbH, Wertheim/Main

Eclipse TE200-U Mikroskop	Nikon Instruments Europa BV, Amstelveen, NL
Eppendorf Pipetten: Reference [®] (variabel), 10-100 µl Research [®] (variabel), 10-100 µl Research [®] (variabel), 0,5-10 µl Research [®] (fix), 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Fluovort VU Mikroskop	Leitz, Bensheim
Gilson Pipetten: PIPETMAN P2, 0.2-2 µl PIPETMAN P10, 1-10 µl PIPETMAN P100, 20-100 µl PIPETMAN P200, 50-200 µl PIPETMAN P1000, 2000-1000 µl	Gilson Inc., Middletown, USA
HERA safe Sterilbank	Heraeus Instruments Holding GmbH, Hanau
Hettich Rotina 380	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
MR 3001 Magnetrührer/Heizplatte	Heidolph Instruments, Schwabach
MS1 Minishaker Vortexer	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Multifuge 3 S-R; Rotor 6445	Heraeus Instruments, Hanau
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Olympus BX45	Olympus GmbH, Hamburg
Rocky [®] Wippe	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg
Varioklav [®] Dampfsterilisator	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim
Wasserbad Typ 1013	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

2.1.8 Software

Tabelle 11: Software

Software	Hersteller
Act1	Nikon Instruments Europa BV, Amstelveen, NL
ISIS Vers. 5.1	MetaSystems GmbH, Altlußheim
SPSS Statistics 21.0/ 22.0	Inc, Chicago, IL, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung der Gewebeproben

2.2.1.1 Gewinnung und Aufbereitung der Knochenmarkaspirate

Alle Knochenmarkaspirate wurden präoperativ unter streng aseptischen Bedingungen nach der Jamshidi-Technik (Jamshidi *et al.* 1971) gewonnen. Dabei wurde das Knochenmark im Bereich der *Spina iliaca anterior superior* punktiert. Um eine Kontamination der Aspirate mit Hautepithelzellen zu vermeiden, wurde die Haut über der Punktionsstelle mit einem 11er- Skalpell inzidiert. Mit einer 20ml Spritze, welche mit 1000IE Heparin versetzt war, wurde jeweils mindestens 10ml Knochenmark entnommen. Anschließend wurden die Aspirate bei Raumtemperatur in das Labor der Frauenklinik überführt.

Die Aufbereitung der gewonnenen Knochenmarkaspirate erfolgte mittels Dichtegradient-Zentrifugation. Das Knochenmarkaspirat wurde hierfür in ein 50ml-CELLSTAR[®]Tube überführt und mit PBS (*phosphate buffered saline*, Sigma- Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover, DE) auf 30ml aufgefüllt. Unter Verwendung von 15ml Ficoll (Dichte 1,077g/cm³, Biochrom, DE) wurde die Zellsuspension auf ein Separiermedium aufgetragen und anschließend 30 Minuten bei 1600rpm und abgeschalteter Bremse zentrifugiert.

Da die Dichte des Mediums kleiner als die der Granulozyten und Erythrozyten, jedoch größer als die Dichte der Monozyten und Lymphozyten ist, werden die Bestandteile des Knochenmark durch die Zentrifugation in verschiedene Phasen aufgetrennt (Abbildung 3).

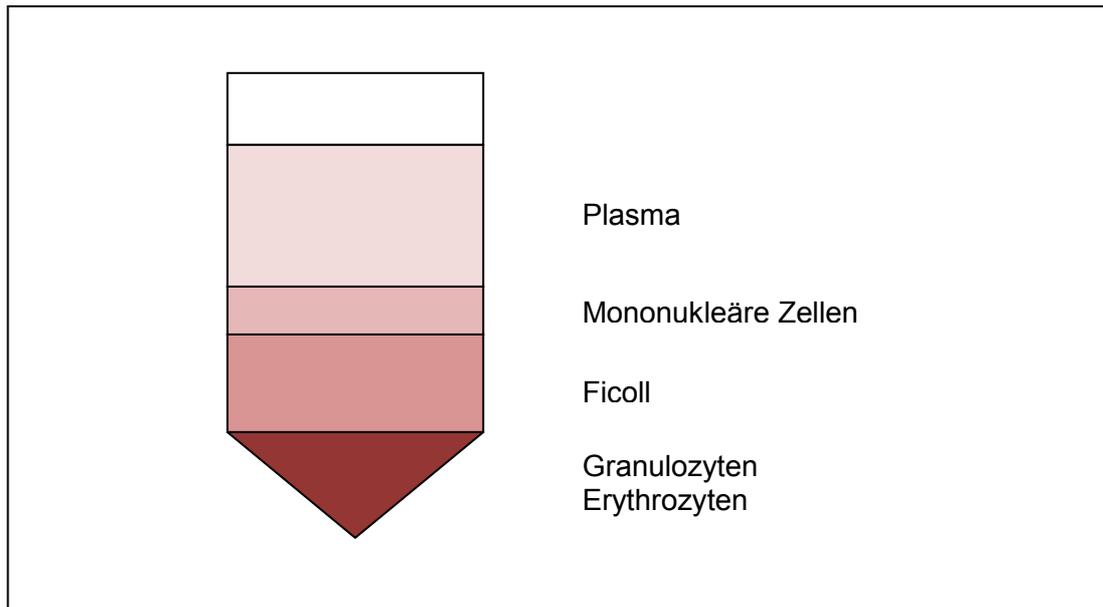


Abbildung 3: Schematische Darstellung der aufbereiteten Knochenmarksuspensionen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die Interphase mit der mononukleären Zellfraktion, bestehend aus Monozyten, Lymphozyten und evtl. DTZ wurde in einem separaten CELLSTAR[®]Tube mit PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (7min, 1600rpm) und der Überstand abgekippt. Durch Lyse der Erythrozyten in 5-10ml Erythrozyten-Lysepuffer wurden die mononukleären Zellen von den Erythrozyten getrennt. Nach 10-minütiger Inkubation im Kühlschrank wurde die Zellsuspension zentrifugiert (7min, 1600rpm). Der Überstand wurde abgekippt und das Sediment, welches die mononukleären Zellen beinhaltete, in 5-10ml PBS-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Objektträger aufgebracht.

2.2.1.2 Erstellung der Zytospins

Bei der Herstellung von Zytospins wurden Zellen in Suspension auf Objektträger zentrifugiert. Anschließend konnten diese für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet werden. Nachdem die Zahl der mononukleären Zellen des Knochenmarkspirats ermittelt wurde, wurde diese mit PBS auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die

Zentrifugenhalterungen wurden entsprechend der Herstellervorschriften der Zentrifuge Rotina380 (Hettich) mit Superfrost-Objektträgern, Filterkarten und Aufsätzen bestückt. Pro Zytospin wurde 1ml der angefertigten Zellsuspension in den jeweiligen Aufsatz pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 1600rpm für 2min. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und die Zytospinhalterung entfernt. Nun wurde erneut mit 1600rpm für 1min zentrifugiert. Abschließend wurden die Filterkarten vorsichtig entfernt und die Objektträger über Nacht luftgetrocknet.

2.2.1.3 Erstellung des Gewebe-Mikroarrays (TMA)

Im Rahmen der Doktorarbeit sollten prä- und posttherapeutische Gewebeproben auf die Expression von Stammzellmarker hin untersucht werden. Es wurden dabei Patientinnen bei denen nach Rücksprache mit der Pathologie ausreichend Gewebeproben vorhanden waren in diese Doktorarbeit eingeschlossen. Stand die prätherapeutische Gewebeprobe einer Patientin ebenfalls zu Verfügung, wurde auch diese nach der Expression von Stammzellmarkern hin untersucht. Zusätzlich wurden prätherapeutische Gewebeproben von Patientinnen mit einer pathologischen Komplettremission nach neoadjuvanter Systemtherapie in die Auswertung mit eingeschlossen.

Zur Diagnosesicherung eines Mammakarzinoms wurde eine Stanzbiopsie durchgeführt. Von diesem in Paraffinblöcken eingebetteten prätherapeutisch entnommenen Gewebe wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und anschließend mikroskopisch von einem Pathologen befundet. Es wurden jeweils die Areale der Probeexzision markiert in denen Tumorgewebe enthalten ist. Mit Hilfe eines halbautomatischen Gewebearray Instruments (Beecher Instruments Sun Prairie, WI, USA) wurden aus den entsprechenden Bereichen der zugehörigen Paraffintumorblöcke Gewebestanden mit einem Durchmesser von 0,6 mm entnommen und wiederum in Paraffinempfängerblöcke eingefügt. Je nach Bedarf konnten nun

von diesen Empfängerblöcken ebenfalls Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt werden, welche dann auf Superfrost-Objektträger aufgezogen wurden.

Die Gewebe-Mikroarrays für diese Arbeit wurden von PD Dr. med. Ulrich Vogel (Institut für Pathologie, Universität Tübingen) angefertigt.

Um ein möglichst repräsentatives Bild des Primärtumors nach neoadjuvanter Chemotherapie zu bekommen, wurde bei den posttherapeutischen Gewebeproben jeweils ein kompletter Schnitt immunhistochemisch gefärbt und auf die Expression von Stammzellmarkern hin untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 74 prätherapeutische und 65 posttherapeutische Gewebeproben analysiert.

2.2.2 Nachweisprinzip Zytokeratine

Zytokeratine (CK) sind Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen, welche im Zytoplasma lokalisiert sind. Da Zytokeratine in mesenchymalem Gewebe wie Blut oder Knochenmark nicht vorkommen, können diese dort, bei Vorliegen eines epithelialen Malignoms, als Marker für DTZ verwendet werden (Moll *et al.*, 1982).

Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale C11 Panzytokeratin-Antikörper richtet sich gegen die Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18 und wird standardmäßig zum Nachweis von DTZ im Knochenmark mittels Immunfluoreszenz eingesetzt (Fehm *et al.* 2002; Kraeft *et al.* 2004; Meng *et al.* 2006; Solomayer *et al.* 2006).

2.2.3 Etablierung der Immunfluoreszenz-basierten Methode

Derzeit gilt als Standardmethode zur Detektion von DTZ die Immunzytochemie (Fehm *et al.* 2006b). Mittels Immunfluoreszenz-Mehrfachfärbung können Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften detektiert werden (Pantel *et al.* 2001; Solomayer *et al.* 2006).

Als Grundlage für die Etablierung eines Immunfluoreszenz-basierten Färbeprotokolls zur Bestimmung von Stammzeleigenschaften auf DTZ dienten

die Arbeiten von Solomayer et al. und Krawczyk et al. (Krawczyk *et al.* 2009; Solomayer *et al.* 2006).

Hierfür wurde zunächst die Immunfluoreszenzfärbung für folgende Primärantikörper, die zur Erkennung von Stammzellproteinen dienen können auf Zelllinien etabliert: Aldh1, Notch1, Notch4 und Sox2. Durch Variieren der Inkubationszeiten der Primär- und Sekundärantikörper (15min, 30min, 45min, 60min) und Antikörperkonzentrationen in Verdünnungsstufen von 1:25 bis 1:1000 konnten optimale Färbeprotokoll für mehrere Stammzellmarker entwickelt werden (Tabelle 18). Verdünnt wurden die Antikörper in AB Diluent-Lösung von DAKO. Für die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern wurden Formalin und Aceton miteinander verglichen. Mit Hilfe von Triton-X100 wurden die Zellen permeabilisiert. Hier wurden ebenfalls verschiedene Konzentrationen untersucht. Der DTZ-Nachweis erfolgte mit einem FITC-konjugierten Panzytokeratin-Antikörper (C11), der sich gegen die humanen Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18 richtet. Zum Vergleich wurden Versuche mit einem lyophilisierten monoklonalen Mausantikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) durchgeführt. Beide wurden jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen von 1:30 bis 1:1000 getestet. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Verwendet wurden VECTASHIELD[®] Mounting Medium und Prolong[®] Gold Antifade Reagent. Es wurden Doppelt- und Dreifachimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt um Zytokeratine und ein bzw. zwei Stammzellmarker auf demselben Objektträger darstellen zu können. Zur besseren Beurteilung der Antikörper-Spezifität wurden Isotypkontrollen, Kontrollen mit blockierenden Peptiden und Negativkontrollen angefertigt. Die untersuchten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelistet. Die verwendeten Zelllinien werden in Tabelle 2 aufgeführt.

Für die Vorversuche wurden Zytospins mit Zelllinien eingesetzt. Hierfür wurde Blut von einem gesunden Probanden verwendet. Die Aufbereitung der Blutprobe mittels Dichtegradient-Zentrifugation verlief analog zur Aufbereitung von Knochenmarkaspiraten. Nachdem die Zellzahl der mononukleären Zellfraktion der Blutprobe bestimmt wurde, wurden der Suspension Tumorzellen

aus einer kultivierten Zelllinie mit einem Anteil von 5-10% an der Gesamtzellzahl beigefügt. Für die Optimierung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden hauptsächlich Objektträger mit HT-29 Zellen verwendet, da auf diesen in den Vorversuchen die besten Ergebnisse erzielt werden konnten.

Bei der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung für Stammzellmarker (Tabelle 4) auf DTZ, konnten nur für den Primärantikörper Sox2 valide und auswertbare Ergebnisse erzielt werden, weshalb die Knochenmarkaspirate des Patientenkollektivs nur auf die Expression dieses Stammzellmarkers hin untersucht wurden. Hingegen konnten Primärtumoren mit den Stammzellmarkern Sox2, Notch1 und Aldh1 analysiert werden (Abbildung 4).

2.2.3.1 Optimales Färbeprotoll der Sox2-Immunfluoreszenzfärbung

Die Sox2-Immunfluoreszenzfärbung der angefertigten Zytospins erfolgte in einer Feuchtkammer, um ein Eintrocknen der Zellen zu verhindern. Zunächst wurden die Zytospins mit dem MBT PAP-PEN umrandet, damit die Reaktionsflüssigkeiten nicht auslaufen konnten. Zur Fixierung der Zellen wurden anschließend 100µl einer 0,05%igen Formalinlösung auf jeden Zytospin pipettiert und die Zellen damit für 10min inkubiert. Nachdem das Formalin entfernt wurde, sind die Zytospins zweimal für 7min mit PBS/ 0,1% Tween[®]20 in Glasküvetten auf der Rocky[®]-Wippe gewaschen worden. Um die Zellmembran permeabel zu machen, wurden pro Zytospin 100 µl 0,1% Triton-X100/PBS benötigt. Die Inkubation erfolgte auf Eis über eine Dauer von 12min. Nach drei weiteren Waschschritten über 7min wurden 100 µl Esel-Normalserum, welches 1:10 in AB Diluent verdünnt wurde, auf die Zytospins gegeben. So sollte die Ausbildung unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers unterbunden werden. Nach 30min wurde die Blocking-Lösung abgekippt und durch den in AB Diluent 1:50 verdünnten polyklonalen Sox2-Ziege-Primärantikörper (R&D Systems, Inc.; USA) ersetzt, welcher für 60min auf dem Objektträger belassen wurde. Zeitgleich erfolgte die Inkubation des Panzytokeratin-Antikörper C11-FITC (Abcam; UK) in einer Verdünnung von 1:500. Als nächstes wurden die Objektträger erneut 3mal für 7min in PBS/ 0,1% Tween[®]20 gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 100 µl des Alexa Fluor 594-markierte Esel-anti-

Ziege-Sekundärantikörper 1:400 verdünnt für 30min. Anschließend erfolgten nochmals drei Waschschrte über 7min. Die Zellen wurden mit einem Tropfen VECTASHIELD® Mounting Medium, welches mit DAPI versetzt war, benetzt. Dies diente nicht nur der Gegenfärbung der Zellkerne, sondern auch dem Schutz der Fluorophor-markierten Antikörper vor dem Ausbleichen. Nachdem auf die Objektträger abschließend ein Deckglas aufgebracht wurde, konnten diese bis zur mikroskopischen Befundung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

Die im Rahmen der Färbeprotokolltablierung getesteten Parameter sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Das optimale, neu etablierte Immunfluoreszenz-Färbeprotokoll wird in Abbildung 5 dargestellt.

2.2.3.2 Auswertung der KM-Präparate

Die gewonnenen Knochenmarkaspirate wurden auf hämatogene Tumorzell dissemination hin untersucht und die detektierten epithelialen Zellen weiter bezüglich der Expression des Stammzellmarkers Sox2 charakterisiert.

Die Präparate wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioplan 2 von Zeiss ausgewertet. Das Mikroskop verfügt über einen Triple-Bandpass-Filter (FITC/TRITC/DAPI) sowie die Single-Bandpass-Filter für FITC, TRITC, Cy5, Texas Red und DAPI.

Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Filter und eingesetzten Farbstoffe sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 12: Fluoreszenzspektren der verwendeten Filter

Filter	Anregungsfilter [nm]	Emissionsfilter [nm]
Cy5	649	670
DAPI	365	397
FITC	450-490	515
Texas Red	586	605
TRITC	546	590

Tabelle 13: Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorophor	Farbe	Anregungsspektrum [nm]	Emissionsspektrum [nm]
DAPI	blau-violett	358	461
FITC	Grün	488	517
Alexa Fluor 488	blau-grün	495	519
Alexa Fluor 546	gelb	556	573
Alexa Fluor 594	orange-rot	590	617
Alexa Fluor 647	rot	650	665

Bilder der fluoreszierenden Zellen wurden mit einer angeschlossenen CCD-Kamera aufgenommen und mit der ISIS-Software Version 5.1 von Meta Systems nachbearbeitet.

2.2.3.3 Auswertungskriterien

Die aus Knochenmarkaspiraten angefertigten Zytospins wurden bei einer 63-fachen Vergrößerung mäanderförmig auf DTZ hin untersucht, welche zusätzlich Stammzellmarker exprimieren. Hierfür wurde der Triple-Bandpass-Filter verwendet. Anschließend wurden von jeder DTZ mit Stammzellmarkerexpression Fotos angefertigt, welche von einem zweiten, unabhängigen Betrachter begutachtet wurden. Die Auswertung erfolgte anhand der Empfehlungen der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection (Tabelle 14) und des internationalen Konsensus für den standardisierten Nachweis und die klinische Implementierung disseminierter Tumorzellen (Tabelle 15) (Borgen *et al.* 1999; Fehm *et al.* 2006b).

Tabelle 14: Einteilung der DTZ nach der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection (Borgen et al. 1999)

Gruppe	Klassifikation	Definition
1	Tumorzelle	Typische Tumorzellmorphologie <ul style="list-style-type: none"> • Deutliche Zellkernvergrößerung • Zellcluster
2	Wahrscheinliche Tumorzelle	Keine eindeutige Zuordnung von Tumorzelle oder hämatopoetischer Zelle möglich → Sicherung durch Isotypkontrolle für hämatopoetische Zellen
3	Keine Tumorzelle (Falsch-positiv)	Falsch-positive hämatopoetische Zellen Hautepithelzellen Artefakte

Tabelle 15: Kriterien zur Identifikation von Tumorzellen (Fehm et al. 2006b)

Zytomorphologie und Phänotyp disseminierter Tumorzellen
Vergrößerter Zellkern
Verhältnis Zellkern/ Zytoplasma >1
Granulierter Zellkern (unregelmäßige Struktur des Zellkerns)
Große Nukleoli
Zellcluster
Starkes und/ oder unregelmäßig gefärbtes Zytoplasma
Immunzytologische Färbung bedeckt zumindest partiell den Zellkern
Einzelne Zytokeratinfilamente sind erkennbar (netzartige Struktur)

Entsprechend dieser Kriterien wurden Zellgröße, Größe und Form des Zellkerns und die Kern-Plasma-Relation der angefärbten Zellen beurteilt. Kleine Zellen und Zellen mit kleinen Kernen, bei denen eine hämatopoetische Herkunft nicht ausgeschlossen werden konnte, sind auch bei positiver Epithelzellefärbung als falsch positiv bewertet worden. Besonders große Kerne weisen apoptotische Zellen auf oder können als Folge einer epidermalen Kontamination während der Materialentnahme auftreten. Die Kerngröße kann auch im Laufe der Verarbeitung zunehmen. Somit wurden nur die KMP-Proben als positiv für Tumorzellen eingestuft, bei welchen auf den Objektträgern Zellen der Kategorie I der ISHAGE Klassifikation nachweisbar waren bzw. deren Zellen den Kriterien des Konsensus für den standardisierten Nachweis und die klinische

Implementierung disseminierter Tumorzellen entsprachen. Wichtig war zudem das genaue Betrachten der Verteilungsmuster der jeweiligen Antikörperfärbung. Bei Verwendung von Antikörpern, die sich gegen humane Zytokeratine richten, kommt es zu einer feinfasrigen bis wolkigen Anreicherung im Zytoplasma. Je nach eingesetztem Stammzellmarker ist die Färbung im Zellkern oder ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert. Als Sox2-positiv wurden nur Zellen bewertet, deren Färbung im Kern detektiert werden konnte. Zellen, bei denen das Fluoreszenzsignal nicht auf die entsprechenden Strukturen begrenzt war, wurden nicht gewertet. Falsch positiv waren auch Zellen, bei denen sich beide Antikörperfärbungen stark überlappten. Die Intensität von Immunfluoreszenzfärbungen kann stark variieren. Als positiv wurden nur die Zellen gewertet, die ein mittelmäßiges bis starkes Signal aufwiesen.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung des Patientenkollektivs wurden bei jedem Lauf eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle auf Objektträgern der HT-29 Zelllinie angefertigt, um die Qualität der Färbung beurteilen zu können.

2.2.4 Immunhistochemische Färbung des Primärtumors für Sox2, Aldh1 und Notch1

Die immunhistochemische Färbung des Primärtumors für Sox2 wurde in dieser Arbeit nach dem Prinzip der LAB-Technik durchgeführt, für Aldh1 und Notch1 wurde die Polymer-Methode eingesetzt. Es wurden jeweils Gewebeproben des Primarius vor und nach neoadjuvanter Therapie auf eine Stammzellmarkerexpression hin untersucht.

Zur Vorbereitung wurden die Paraffinschnitte zunächst mit einem EDTA-basierten Puffer bei pH 8,4 entparaffinisiert. Durch die bei der Gewebefixierung entstandene Quervernetzung der Proteine, können Epitope ihre Eigenschaften verlieren und sind so für den Primärantikörper maskiert. Um das Anfärben der Zielproteine zu erleichtern, wurden die Schnitte dem HIER-Verfahren (Heat Induced Epitope Retrieval) unterzogen und so demaskiert. Der verwendete polyklonale Sox2-Ziege-Primärantikörper (R&D Systems, Inc; Minneapolis, USA) wurde im Verhältnis 1:40 in DISCOVERY Antibody Diluent (Ventana) verdünnt und appliziert. Als Sekundärantikörper ist ein anti-Ziege Antikörper aus

Kaninchen der Firma Jackson Immuno Research im Verdünnungsverhältnis von 1:200 zum Einsatz gekommen. Detektiert wurde der Antigen-Antikörper Komplex mittels einem Streptavidin-Biotin Peroxidase Detektionssystem (DABMap Kit; Ventana). Es kommt zur Reaktion von Peroxidase und dem Chromogen Diaminobenzidin wodurch das gesuchte Antigen sichtbar wird. Zur besseren Beurteilung des umliegenden, nicht markierten Gewebes, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (Roche) und Bluing Reagent gegengefärbt. Die Dehydratation erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (40%, 70%, 90%). Abschließend wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Cytoseal versehen. Der monoklonale Kaninchen-Antikörper für Aldh1 (Epitomics, Inc, Burlingame, USA) wurde im Verhältnis 1:100 in DISCOVERY Antibody Diluent (Ventana) verdünnt. Für den monoklonalen Notch1-Kaninchen-Antikörper (Epitomics, Inc, Burlingame, USA) konnte ebenfalls ein optimales Färbeergebnis bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 erzielt werden. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde das *ultraView* Universal DAB Detection Kit (Ventana) verwendet. Bei dem eingesetzten Enzym-Substrat-Komplex handelte es sich um eine DAB-Meerrettichperoxidase der Firma Braun. Zur Darstellung des umliegenden Gewebes wurden die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin (Roche) gegen gefärbt.

2.2.5 Auswertung der Präparate der immunhistochemischen Färbung des Primärtumors

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden nach einem semiquantitativen Punktesystem ausgewertet. Dieses berücksichtigt die relative Anzahl der Zellen, in welchen eine Expression des jeweiligen Antigens nachgewiesen werden konnte. Die Einteilung für den Stammzellmarker Sox2 erfolgte entsprechend der Arbeit von Pham et al. (Pham *et al.* 2013). Für Notch1 und Aldh1 wurden die Einstufungen durch das pathologische Institut der Universität Tübingen, in Anlehnung an die Auswertung von Sox2, festgelegt. Des Weiteren wurde auf die genaue Lokalisation der Färbung geachtet. Als Sox2-positiv wurden nur Zellen bewertet, deren Färbung im Kern detektiert werden konnte. Bei Aldh1 und Notch1 wurde das Färbesignal im Zytoplasma

beurteilt. Da manche Stammzellmarker nicht nur von Tumorzellen exprimiert werden, sondern auch im gesunden Gewebe vorkommen, ist die morphologische Begutachtung der Zellen äußerst wichtig.

Je nach Anzahl der positiv detektierten Tumorzellen wurde eine Punktzahl zwischen 0 und 4 vergeben, was dann auch dem jeweiligen Score entsprach. Konnte in keiner Tumorzelle eine Färbung nachgewiesen werden, wurde der Fall als komplett negativ gewertet und erhielt die Punktzahl 0.

Die Einteilung für die Stammzellmarker Sox2 und Aldh1 ist in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Punktesystem zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung für Sox2 und Aldh1 (Pham et al. 2013).

Sox2/ Aldh1	% der Sox2-/ Aldh1-positiven Zellen
Score 0	0 (negativ)
Score 1	>0 und <10
Score 2	≥10 und <50
Score 3	≥50 und <90
Score 4	≥90

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für Notch1 wurde zusätzlich zur Anzahl der positiven Tumorzellen die Intensität der Färbung beurteilt. In der endgültigen Bewertung wurden nur Zellen mit einem mäßigen oder starken Färbesignal (Score 2 oder 3) berücksichtigt. Die Vergabe der Punktezahl für diese Präparate erfolgte dann analog zu der von Sox2 und Aldh1 (Tabelle 17).

Tabelle 17: Punktesystem zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung für Notch1.

Notch1	Intensität der Färbung	% der Notch1-positiven Zellen
Score 0	Keine Färbung sichtbar	0 (negativ)
Score 1	Schwache Intensität	>0 und <10
Score 2	Mäßige Intensität	≥10 und <50
Score 3	Starke Intensität	≥50 und <90
Score 4	--	≥90

Die gesamte Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen wurde unabhängig voneinander von der Autorin dieser Arbeit und PD Dr. A. Staebler (Institut für Pathologie, Universität Tübingen) durchgeführt.

2.2.6 Versuchsaufbau

Die gewonnenen Knochenmarkaspirate wurden auf hämatogene Tumorzell dissemination hin untersucht und die detektierten epithelialen Zellen weiter nach der Expression des Stammzellmarkers Sox2 charakterisiert.

Das Tumorgewebe wurde vor und nach der neoadjuvanten Therapie auf verschiedene Stammzellmarker (Sox2, Aldh1 und Notch1) untersucht. Anschließend wurde der prätherapeutische Stammzellmarker-Status des Primarius mit dem Therapieansprechen verglichen.

Des Weiteren wurde der Einfluss des prä- und posttherapeutischen Stammzellmarker-Status des Primarius sowie des Sox2-Status von DTZ auf das Überleben untersucht.

Der Sox2 Status der DTZ und des Primarius wurden miteinander verglichen. Zudem wurde der Zusammenhang zwischen der Expression von Sox2 auf DTZ sowie der Stammzellmarkerexpression (Sox2, Aldh1, Notch1) im Primarius vor und nach neoadjuvanter Therapie und den klinisch-pathologischen Eigenschaften des Primärtumors untersucht.

In Abbildung 4 ist das Vorgehen der vorliegenden Arbeit als schematischer Versuchsaufbau dargestellt.

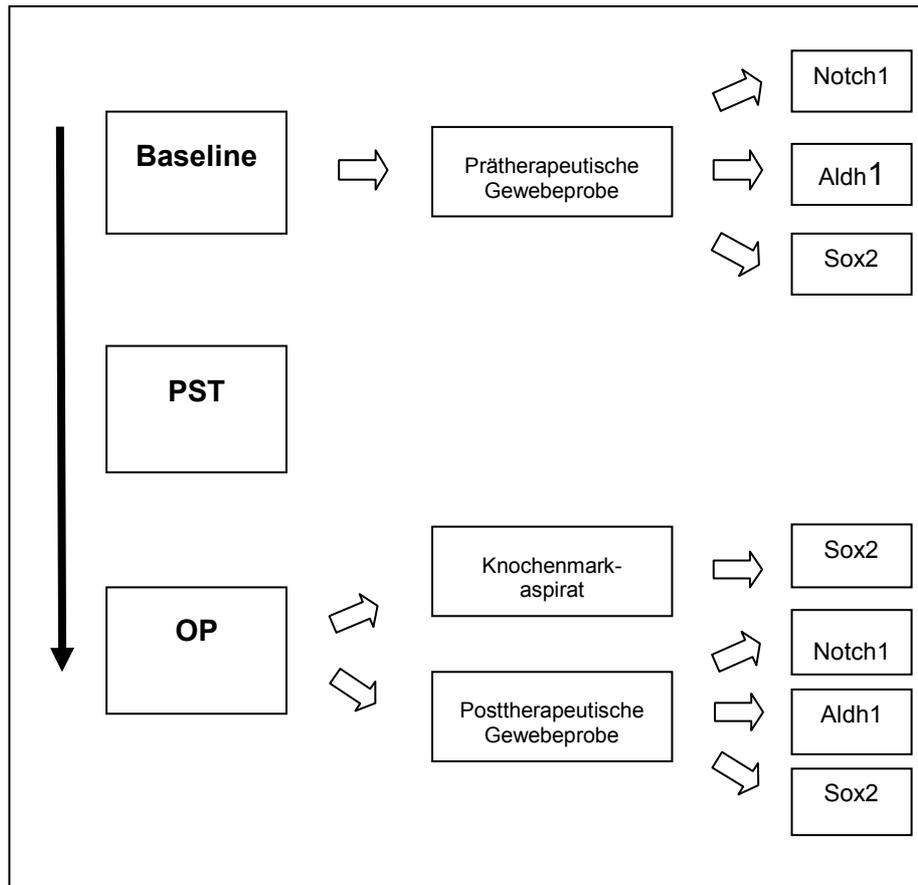


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbau

2.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die immunhistochemischen Untersuchungen und Immunfluoreszenzfärbungen in Untergruppen analysiert und die Ergebnisse mit den erhobenen klinisch-pathologischen Daten sowie dem Gesamtüberleben, der pathologischen Response, dem Wiederauftreten der Erkrankung und der Diagnose von Fernmetastasen verglichen. Mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher-Exakt-Test wurden bestehende Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern entwickelt. Mit der Kaplan-Meier-Methode wurden Kurven für die Überlebensdaten erstellt und anhand des Log-Rank-Tests verglichen.

Für alle Tests galt ein statistisches Signifikanzniveau von 5%. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der SPSS Software und wurde von Dr.

biol. hum. M.A. C. Meisner und Frau R. Alpermann, Mitarbeiter des Instituts für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen, unterstützt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen von DTZ für Epithelzellmarker und Stammzellmarker

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunfluoreszenz-basierte Doppelfärbung zum Nachweis Stammzellmarker-positiver DTZ etabliert. In einer Vielzahl an Versuchen wurden verschiedene Antikörper und Parameter angesetzt, die in der Tabelle 18 zusammengefasst sind.

Tabelle 18: Tabellarische Erfassung der bei der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung getesteten Parametern

Primär-AK	Sekundär-AK	Zellfixation/ Permeabilisie- rung	Inkuba- tions- zeit	AK- Konzentr- a-tion
C11-Fitc Monoklonal Maus	Alexa Fluor®594 Esel- anti-Ziege	Triton-X100 0,1%	15min	1:25
C11 Monoklonal Maus	Alexa Fluor®647 Esel- anti-Ziege	Triton-X100 0,01%	30min 45min	1:30 1:50
Epcam monoklonal Maus	Alexa Fluor®546 Esel- anti-Kaninchen	Formalin 0,05%	60min	1:100 1:200
Aldh1a1 Monoklonal Kaninchen	Alexa Fluor®594 Esel- anti-Kaninchen	Aceton 0,05%		1:400 1:500 1:1000
Noch1 Monoklonal Kaninchen	Alexa Fluor®647 Esel- anti-Kaninchen			
Notch4 Polyklonal Kaninchen	Alexa Fluor®546 Ziege-anti-Kaninchen			
Notch4 Monoklonal Ziege	Alexa Fluor®594 Ziege-anti-Kaninchen			
Sox2 Polyklonal Ziege	Alexa Fluor®488 Ziege-anti-Maus			
	Alexa Fluor®594 Ziege-anti-Maus			

Auswertbare und valide Färbungen konnten für den Sox2-Marker erzielt werden (Abbildung 6 und Abbildung 7). Hierfür zeigten sich der polyklonale Sox2-Ziege-AK 1:50 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) und der sekundäre mit Alexa 594 konjugierte Esel-anti-Ziege-AK 1:400 (Invitrogen, Karlsruhe) als optimal geeignet. In Abbildung 5 wird das optimale Färbeprotokoll schematisch dargestellt.

Anfeuchten mit PBS für 1min
Absaugen
Fixation mit 100µl 0,05% iger Formalinlösung für 10min
Absaugen
Waschen mit PBS bzw. PBS/ 0,1% Tween®20 2mal für 7min
Absaugen
100 µl 0,1% Triton-X100/PBS Für 10 min auf Eis
Absaugen
Waschen mit PBS bzw. PBS/ 0,1% Tween®20 3mal für 7min
Absaugen
Block mit Esel-Normalserum 1:10 für 30min
Absaugen, NICHT WASCHEN
Primär-AK: C11-FITC-AK 1:500; SOX2-AK 1:50 für 60min
Absaugen
Waschen mit PBS bzw. PBS/ 0,1% Tween®20 3mal für 7min
Absaugen
Sekundär-AK: Alexa Fluor 594 Esel-anti-Ziege 1:400 für 30min
Absaugen
Waschen mit PBS bzw. PBS/ 0,1% Tween®20 3mal für 7min
Absaugen
Einbetten in Vectashield Mounting Medium Eindecken mit Deckglass

Abbildung 5: Schematische Darstellung der einzelnen Färbeschritte der Immunfluoreszenzfärbung für den Sox2-Antikörper auf Knochenmarkspiraten von Patientinnen

Für weitere Stammzellmarker, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, konnte ebenfalls ein Immunfluoreszenzprotokoll etabliert werden (Tabelle 19). Da die Färbungen der DTZ bzw. Färbekontrollen (Zell-Linien) nicht die Qualitätskontrollen zu jederzeit erfüllten, wurden für diese Doktorarbeit nur die Sox2-Färbungen von DTZ ausgewertet.

Tabelle 19: Optimale Verdünnung der etablierten Stammzellmarker und Sekundärantikörper

Stammzellmarker	Spezies	Verdünnung	Sekundär-AK
Aldh1	Monoklonal Kaninchen	1:25	Alexa Fluor®594 Ziege- anti-Kaninchen 1:1000
Notch1	Monoklonal Kaninchen	1:50	Alexa Fluor®594 Ziege- anti-Kaninchen 1:200
Notch4	Polyklonal Kaninchen	1:50	Alexa Fluor®594 Ziege- anti-Kaninchen 1:1000

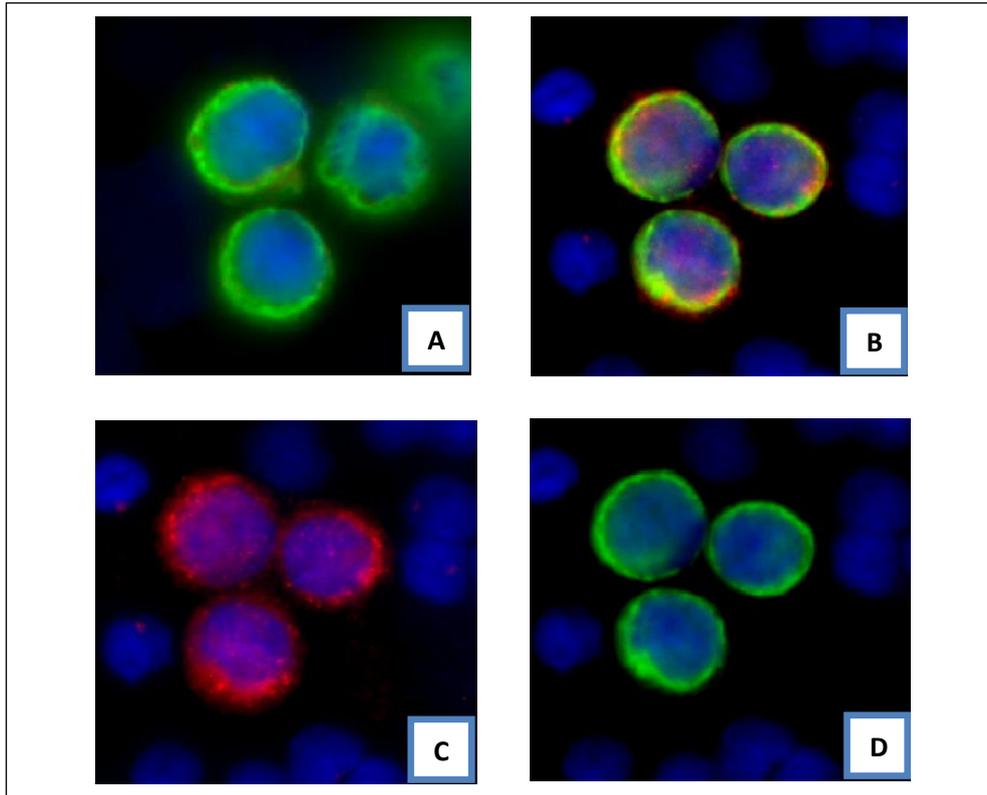


Abbildung 6: Sox2 Immunfluoreszenz Doppelfärbung (HT-29 Zelllinie, 63-fache Vergrößerung)

(A) Neg. Kontrolle: ohne Stammzellmarker, Zellkernfärbung mit DAPI, Panzytokeratin positive Zellen mit FITC markiert (B) Doppelfärbung Sox2/C11, (C) Stark angefärbte Sox2 positive Zellen mit Alexa Fluor 594 markiert, (D) Panzytokeratin positive Zellen mit FITC markiert

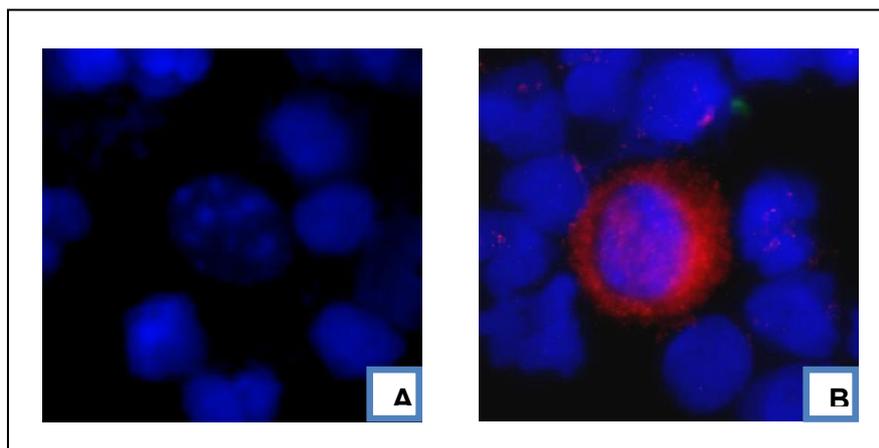


Abbildung 7: Sox2 Immunfluoreszenz Einzelfärbung (HES, 63-fache Vergrößerung)

(A) Neg. Kontrolle: ohne Stammzellmarker, Zellkernfärbung mit DAPI, (B) Mäßig angefärbte Sox2 positive Stammzelle mit Alexa Fluor 594 markiert

3.2 Patientenkollektiv

Es wurde retrospektiv eine Datenbank mit 488 Mammakarzinompatientinnen erstellt. Alle Patientinnen wurden im Zeitraum von Januar 2001 bis Dezember 2011 an der Universitätsfrauenklinik Tübingen aufgrund ihrer Mammakarzinomerkrankung neoadjuvant behandelt. 56 Patientinnen (11,5%) erhielten eine Anthrazyklin-basierte Chemotherapie und 397 Patientinnen eine Kombination aus Taxanen und Anthrazyklinen (81,5%). Eine endokrine Therapie wurde bei 30 Patientinnen (6,2%) angewandt. Andere Schemata kamen lediglich bei 4 Patientinnen zum Einsatz (0,8%). Für eine Patientin lagen keine Angaben zur durchgeführten Therapieform vor. Infolge der neoadjuvanten Therapie konnte bei 78 Patientinnen (16,2%) eine pathologische Komplettremission der Tumorerkrankung erzielt werden. Die Mehrheit der Fälle (75,3%) erreichte eine partielle Remission. Eine stabile Situation des Tumors war in 30 Fällen (6,2%) zu verzeichnen. Bei 11 Patientinnen (2,3%) kam es unter dem Einfluss der Systemtherapie zum Fortschreiten der Erkrankung.

Im Anschluss konnten 186 Patientinnen (38%) brusterhaltend operiert werden. Eine Mastektomie wurde in 302 Fällen (62%) durchgeführt. Die klinisch-pathologischen Parameter des Patientenkollektivs sind in Tabelle 20 aufgelistet. Seit der Erstdiagnose konnte bis zum Zeitpunkt der Datenauswertung (September 2012) bei 454 Patientinnen (93,0%) kein Rezidiv eines Mammakarzinoms festgestellt werden. In 34 Fällen (7,0%) trat die Erkrankung wieder auf. Bei 62 Patientinnen (14,3%) kam es im Verlauf zu Fernmetastasen. Patientinnen bei denen bereits zum Diagnosezeitpunkt Metastasen nachgewiesen werden konnten, wurden in die Analyse des rezidivfreien und metastasenfreien Überleben nicht mit einbezogen. Von den in der Datenbank aufgeführten 488 Patientinnen waren bis September 2012 94 (19,3%) verstorben.

Tabelle 20: Klinisch-pathologische Daten des Patientenkollektivs

Parameter	Anzahl der Patientinnen	
	N	%
Histologie		
IDC	384	79,3
ILC	64	13,1
ILDC	21	4,3
andere	15	3,1
Grading		
G1-2	320	66,9
G3	158	33,1
Stadium prätherapeutisch		
I	1	0,3
II	244	53
III	161	35
IV	54	11,7
Tumorgröße: cT		
cT1	17	3,7
cT2	225	49,1
cT3-4	216	47,2
Lymphknotenstatus: cN		
negativ	120	25,6
positiv	349	74,4
Fernmetastasen bei ED		
M0	434	88,9
M1	54	11,1
Tumorgröße: ypT		
ypT1	190	38,9
ypT2-4	203	41,6
ypT0/Tis	95	19,5
Lymphknotenstatus: ypN		
negativ	220	46
positiv	263	54
ER-Status		
negativ	163	34,8
positiv	306	65,2
PR-Status		
negativ	151	32,2
positiv	318	67,8
Her2-Status		
negativ	358	76,5
positiv	110	23,5

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus

Von allen 488 Patientinnen, die in der Datenbank aufgeführt sind, wurde für 205 ein positiver Knochenmarkstatus erhoben (43,8%). Einen negativen Status wiesen 263 Patientinnen auf (56,2%). Für 20 Fälle waren keine Daten vorhanden. Bei Patientinnen mit einem positiven DTZ-Nachweis handelte es sich dabei häufiger um fortgeschrittene Tumoren bzw. aggressivere Tumortypen (Tabelle 21):

Der DTZ-Status korrelierte signifikant mit der posttherapeutischen Tumorgroße ($p=0,023$). So konnten bei 40,5% der Patientinnen mit ypT1-Tumoren, 51% der Patientinnen mit pT2-4 Tumoren und lediglich bei 35,5% der Patientinnen mit ypT0/Tis Tumoren DTZ nachgewiesen werden. Für die prätherapeutische Tumorgroße cT ergab sich kein relevanter Zusammenhang mit dem DTZ-Nachweis.

Statistisch signifikant war auch die Korrelation zwischen dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen nach primär systemischer Therapie und einem positiven Knochenmarkstatus ($p=0,047$). Ein negativer Lymphknotenstatus (ypN0) war in 60,7% der Fälle mit einem negativen DTZ-Nachweis assoziiert. Beim prätherapeutischen Lymphknotenstatus ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen ($p=0,159$).

Ein negativer Progesteronrezeptorstatus lag bei 27% der DTZ-negativen Patientinnen vor, bei den DTZ-positiven Fällen waren es 39,1% ($p=0,004$). Die Korrelation des DTZ-Status mit klinisch-pathologischen Faktoren wird in der Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Korrelation des DTZ-Status mit klinisch-pathologischen Faktoren

Parameter	Gesamt	DTZ-negativ		DTZ-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Histologie						
IDC	371	217	58,5	154	41,5	0,422
ILC	60	31	51,7	29	48,3	
ILDC	20	9	45,0	11	55,0	
andere	13	6	46,2	7	53,8	
Grading						
G1-2	308	178	57,8	130	42,2	0,101
G3	151	77	51	74	49	
Stadium prätherapeutisch						
I-II	235	133	56,6	102	43,4	0,514
III-IV	206	116	56,3	90	43,7	
Tumorgröße: cT						
cT1	17	6	35,3	11	64,7	0,177
cT2	214	125	58,4	89	41,6	
cT3-4	208	116	55,8	92	44,2	
Lymphknotenstatus: cN						
negativ	115	70	60,9	45	39,1	0,159
positiv	335	184	54,9	151	45,1	
Fernmetastasen bei ED						
M0	420	238	56,7	182	43,3	0,324
M1	48	25	52,1	23	47,9	
Tumorgröße: ypT						
ypT1	183	109	59,6	74	40,5	0,023
ypT2-4	192	94	49,0	98	51,0	
ypT0/Tis	93	60	64,5	33	35,5	
Lymphknotenstatus: ypN						
negativ	214	130	60,7	84	39,3	0,047.
positiv	251	132	52,6	119	47,4	
ER-Status						
negativ	156	84	53,8	72	46,2	0,271
positiv	293	168	57,3	125	42,7	
PR-Status						
negativ	145	68	46,9	77	53,1	0,004
positiv	304	184	60,5	120	39,5	
Her2-Status						
negativ	342	191	55,8	151	44,2	0,491
positiv	106	60	56,6	46	43,4	

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus; n.s. = nicht signifikant

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis von DTZ im Knochenmark und den in Tabelle 22 aufgeführten Überlebensdaten konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Jedoch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Komplettremission und dem Nachweis von DTZ im Knochenmark. So konnten DTZ bei Patientinnen mit einer Komplettremission nach neoadjuvanter systemischer Therapie signifikant seltener nachgewiesen werden ($p=0,046$). Prognostisch war der Nachweis von DTZ im Knochenmark nach einer neoadjuvanten bzw. adjuvanten Systemtherapie tendenziell eher ungünstig. Bei Patientinnen mit einem positiven DTZ-Nachweis kam es – allerdings statistisch nicht signifikant – häufiger zu Rezidiven als im DTZ-negativen Vergleichskollektiv ($p=0,134$). So kam es bei DTZ-negativen Patientinnen in 7,7% der Fälle zur Rezidivkrankung, bei DTZ-positiven Patientinnen waren es 3,2% (Abbildung 8).

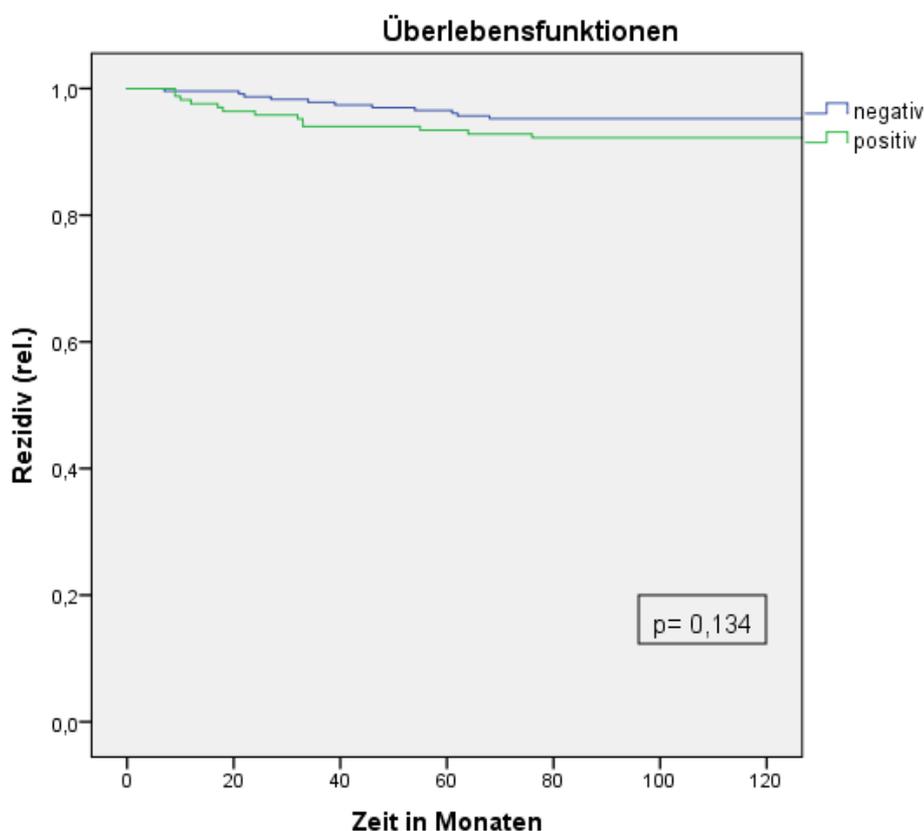


Abbildung 8: DTZ-Status: Rezidivfreie Zeit in Monaten

Tabelle 22: Korrelation des DTZ-Status mit Therapiereponse und Überlebensdaten

Parameter	Gesamt	DTZ-negativ		DTZ-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Response						
pCR	76	50	65,8	26	34,2	0,046
Non pCR	385	210	54,5	175	45,5	
Response						
pCR	76	50	65,8	26	34,2	0,195
Partielle Remission	345	188	54,5	157	45,5	
SD//Progress	40	22	55	18	45	
Rezidiv						
nein	395	227	57,5	168	42,5	0,134
ja	25	11	44	14	56	
Metastasen im Verlauf (ohne M1 bei ED)						
nein	361	208	57,6	153	42,4	0,203
ja	59	30	50,8	29	49,2	
Verstorben						
nein	380	216	56,8	164	43,2	0,320
ja	88	47	53,4	41	46,6	

ED = Erstdiagnose; n.s. = nicht signifikant; pCR = pathologische Komplettremission; SD = Stabe Disease

3.3 Detektion Sox2-positiver disseminierter Tumorzellen

194 Knochenmarkaspirate konnten im Rahmen dieser Arbeit für den Stammzellmarker Sox2 analysiert werden. In Proben von 70 Patientinnen (36,1%) ließen sich disseminierte Tumorzellen nachweisen. 124 Objektträger (63,9%) waren DTZ-negativ. In 22 der 70 Fälle mit DTZ-Nachweis (31,4%) konnten Sox2-positive Tumorzellen detektiert werden (Abbildung 9). Die Proben der übrigen 48 Patientinnen (68,6%) enthielten Sox2-negative DTZ.

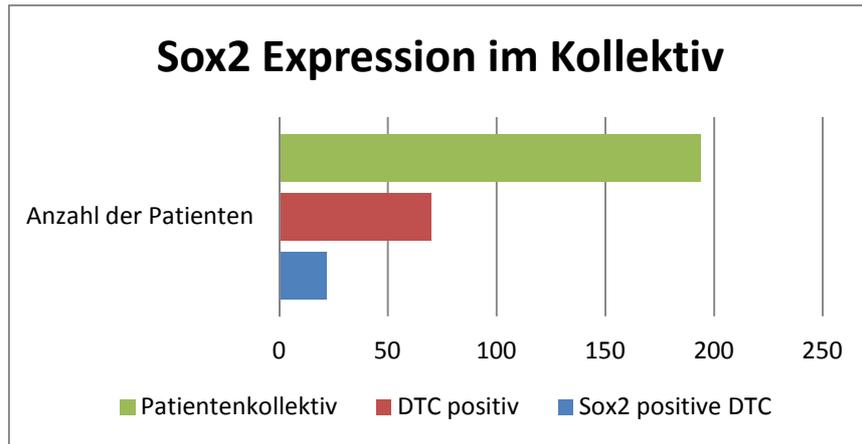


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung von Sox2-positiven DTZ im untersuchten Patientinnenkollektiv

In Abbildung 10 sind beispielhaft Sox2 positive DTZ aus Knochenmarkaspiraten verschiedener Patientinnen aufgeführt.

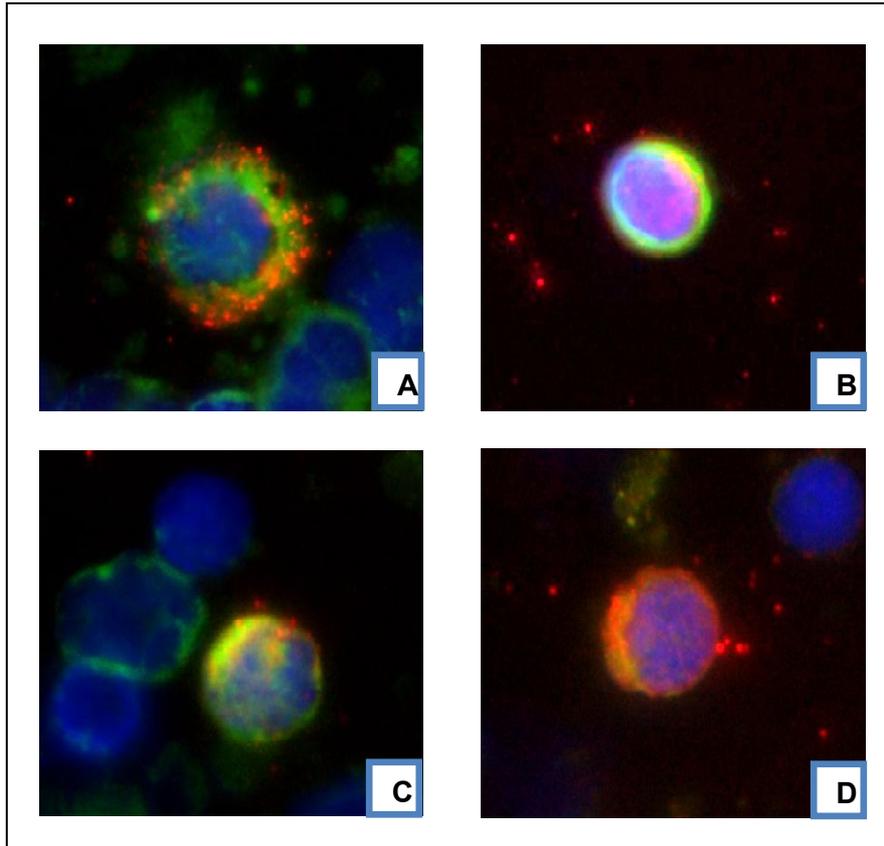


Abbildung 10: (A)-(D): Beispiele für Sox2 positive DTZ aus Knochenmarkaspiraten verschiedener Patientinnen (63-fache Vergrößerung):

(A)-(D): Doppelfärbung Sox2/C11: Zellkernfärbung mit DAPI; Panzytokeratin positive Zellen mit FITC markiert; Sox2 positive Zellen mit Alexa Fluor 594 markiert.

3.3.1 Korrelation des Sox2-Status von DTZ mit klinisch-pathologischen Faktoren des Primärtumors

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit Sox2-positiven DTZ konnte für keinen der untersuchten klinisch-pathologischen Faktoren nachgewiesen werden (Tabelle 23).

Tabelle 23: Korrelation des Sox2-Status von DTZ mit klinisch-pathologischen Faktoren

Parameter	Gesamt	Sox2-negativ		Sox2-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Histologie						
IDC	59	39	66,1	20	33,9	0,575
ILC	6	4	66,7	2	33,3	
ILDC	2	2	100	0	0	
andere	2	2	100	0	0	
Grading						
G1-2	48	33	68,8	15	31,3	0,538
G3	21	14	66,7	7	33,3	
Stadium prätherapeutisch						
I-II	31	22	71	9	29	0,492
III-IV	34	23	67,6	11	32,4	
Tumorgröße: cT						
cT1	2	1	50	1	50	0,748
cT2	29	21	72,4	8	27,6	
cT3-4	36	24	66,7	12	33,3	
Lymphknotenstatus: cN						
negativ	17	12	70,6	5	29,4	0,592
positiv	49	34	69,4	15	30,6	
Fernmetastasen bei ED						
M0	66	45	68,2	21	31,8	0,627
M1	4	3	75	1	25	
Tumorgröße: ypT						
ypT1	25	15	60	10	40	0,491
ypT2-4	28	21	75	7	25	
yoT0/Tis	17	12	70,6	5	29,4	
Lymphknotenstatus: ypN						
negativ	33	21	63,6	12	36,4	0,280
positiv	37	27	73	10	27	
ER-Status						
negativ	20	13	65	7	35	0,488
positiv	48	33	68,8	15	31,3	
PR-Status						
negativ	12	7	58,3	5	41,7	0,330
positiv	56	39	69,6	17	30,4	
Her2-Status						
negativ	49	34	69,4	15	30,6	0,414
positiv	19	12	63,2	7	36,8	

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus; n.s. = nicht signifikant

3.3.2 Korrelation des Sox2-Status von DTZ mit Überlebensdaten

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Sox2-Status der DTZ und dem Gesamtüberleben, sowie dem rezidivfreien und metastasenfreien Überleben bzw. der Therapieresponse nach neoadjuvanter Chemotherapie konnte nicht beobachtet werden. So konnten Sox2-positive DTZ bei 30,8% der Patientinnen mit pCR und bei 30,9% Patientinnen ohne pCR nachgewiesen werden ($p=0,636$). Allerdings war für Patientinnen mit einem Sox2-positiven Knochenmarkstatus die Prognose tendenziell besser (Tabelle 24):

Das Auftreten von Fernmetastasen nach Erstdiagnose konnte bei Sox2-positiven Patientinnen etwas weniger häufig beobachtet werden, war statistisch jedoch nicht signifikant (4,8% vs. 8,9%; $p=0,487$) (Abbildung 11).

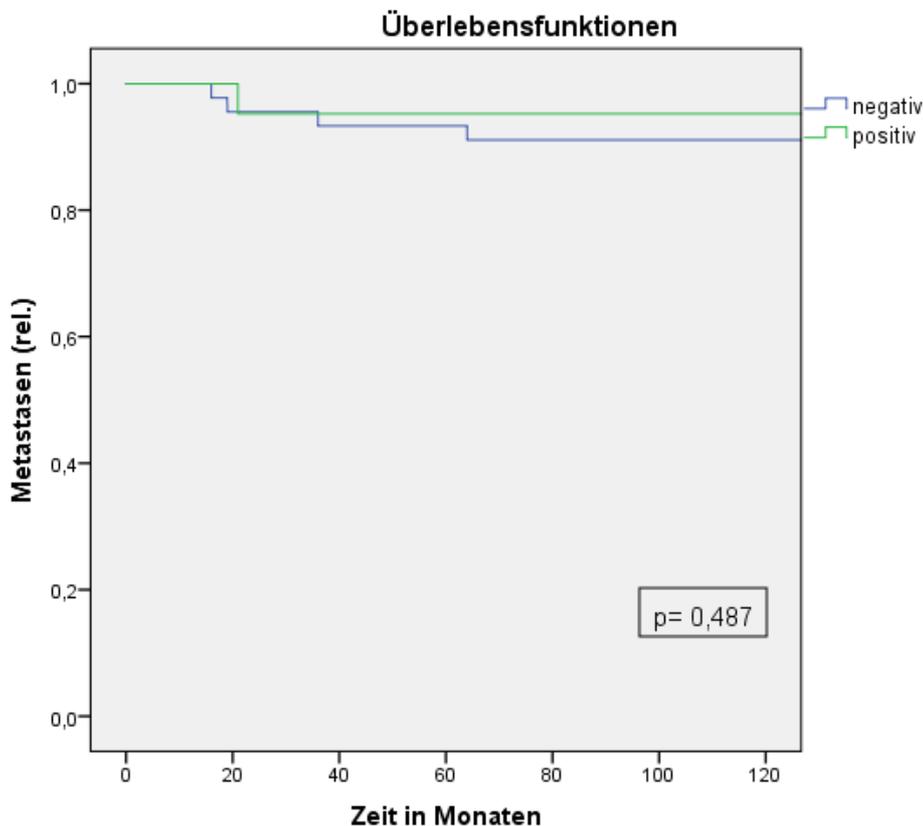


Abbildung 11: Sox2-Status von DTZ: Metastasenfreie Zeit in Monaten (Metastasen bei Erstdiagnose ausgeschlossen)

Auch scheint sich auf das Gesamtüberleben ein positiver Sox2-Status auf DTZ günstig auszuwirken. Von 7 verstorbenen Patientinnen konnten bei lediglich 2 Patientinnen Sox2-positive DTZ nachgewiesen werden. In der Gruppe der Sox2-positiven Fälle verstarben bis zur Datenerhebung im Jahre 2012 9% aller Patientinnen. Beim Nachweis Sox2-negativer DTZ kam es in 14,5 % der Fälle zum Tod (Abbildung 12). Eine statistisch signifikante Korrelation konnte jedoch nicht beobachtet werden ($p=0,415$).

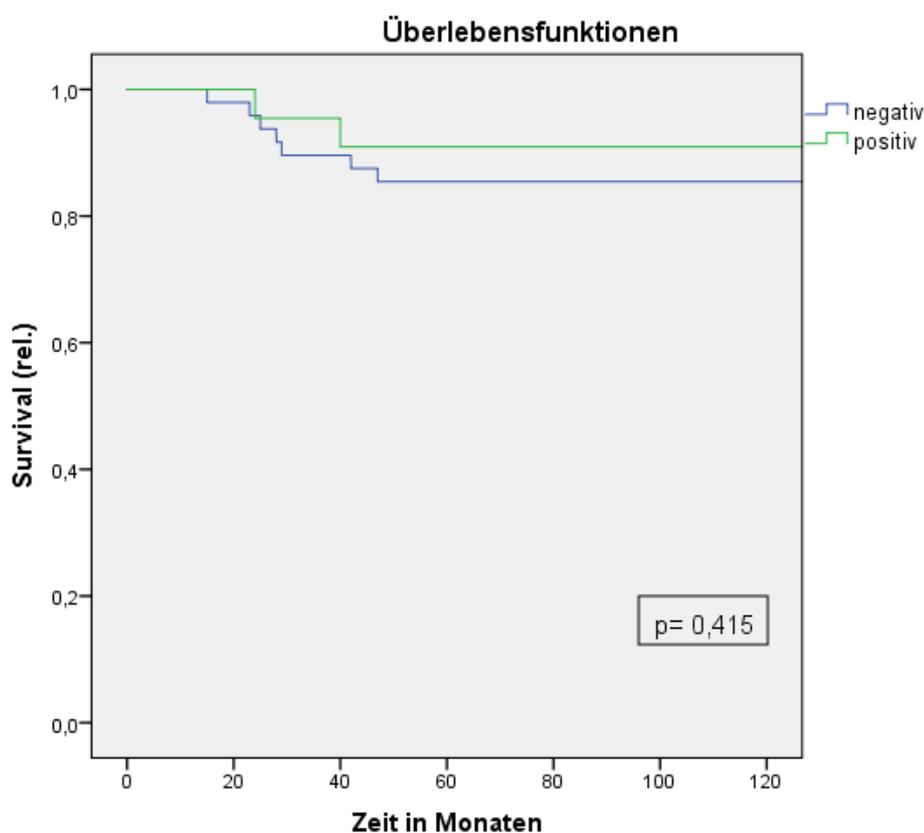


Abbildung 12: Sox2-Status von DTZ: Überlebenszeit in Monaten

Bis September 2012 wurde kein Rezidiv bei einer Patientin mit Sox2-positiven disseminierten Tumorzellen diagnostiziert. Bei Patientinnen mit Sox2-negativem DTZ-Nachweis kam es in lediglich 4,1% der Fälle zu einer Rezidivkrankung (Abbildung 13). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte auch hier nicht beobachtet werden ($p=0,491$).

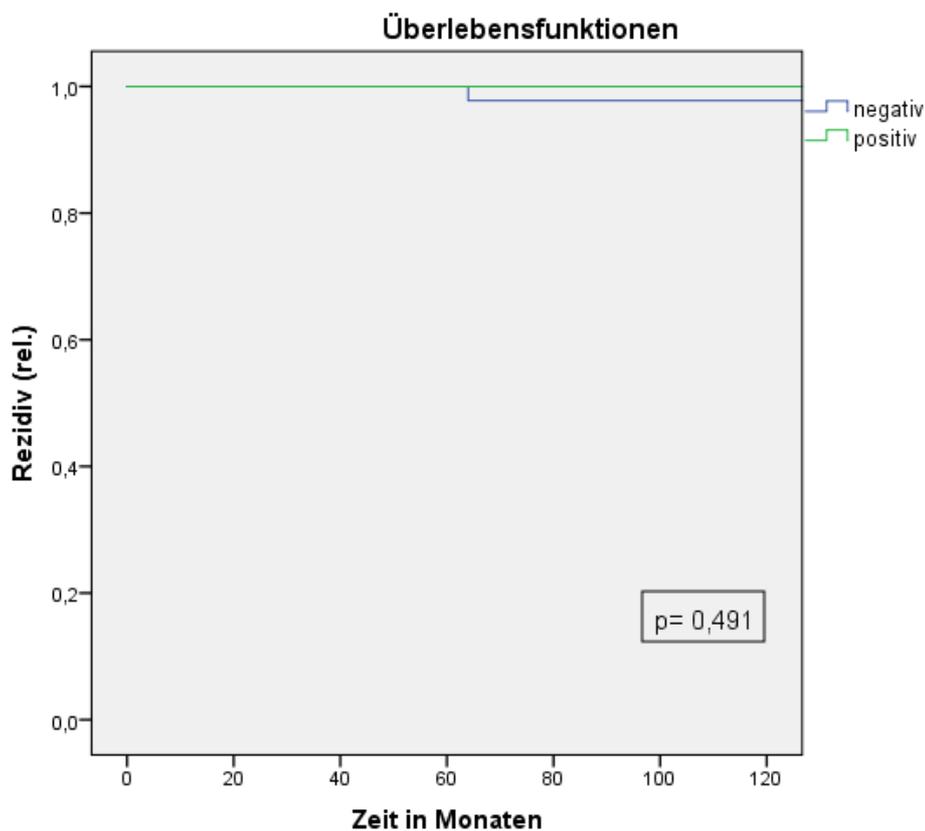


Abbildung 13: Sox2-Status von DTZ: Rezidivfreie Zeit in Monaten

Tabelle 24: Korrelation des Sox2-Status von DTZ mit Therapiereponse und Überlebensdaten

Parameter	Gesamt	Sox2-negativ		Sox2-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Response						
pCR	13	9	69,2	4	30,8	0,636
Non pCR	55	38	69,1	17	30,9	
Rezidiv						
nein	65	44	67,7	21	32,3	0,491
ja	1	1	100	0	0	
Metastasen im Verlauf (ohne M1 bei ED)						0,487
nein	61	41	67,2	20	32,8	
ja	5	4	80	1	20	
Verstorben						
nein	61	41	67,2	20	32,8	0,415
ja	9	7	77,8	2	22,2	

ED = Erstdiagnose; n.s. = nicht signifikant; pCR = pathologische Komplettremission

3.4 Stammzellmarkerexpression im Primärtumor

Die immunhistochemischen Färbungen des Primärtumors für Aldh1, Notch1 und Sox2 wurden am Institut für Pathologie der Universität Tübingen etabliert und Rahmen der Routine gefärbt.

Auf Grund der teilweise geringen Anzahl an Fällen in einzelnen Score-Untergruppen wurden alle Patientinnen mit einem Aldh1-Score bzw. Notch1- oder Sox2-Score von >0% zusammengefasst und als positiv gewertet.

3.4.1 Aldh1-Status des Primärtumors

In 57,5% der 68 prätherapeutischen Gewebeproben konnten Aldh1-positive Tumorzellen nachgewiesen werden. Bei den posttherapeutischen Gewebeproben zeigten 51,8% der 56 untersuchten Fälle einen positiven Aldh1-Score (Tabelle 25).

Tabelle 25: Häufigkeitsverteilung des Aldh1-Scores der prä- und posttherapeutischen Gewebeproben

Score Aldh1	prätherapeutisch		posttherapeutisch	
	Häufigkeit N=68	Prozent %	Häufigkeit N=56	Prozent %
0	29	42,6	27	48,2
1	35	51,5	22	39,3
2	4	5,9	3	5,4
3	0	0	3	5,4
4	0	0	1	1,8

In Abbildung 14 ist beispielhaft für jeden Aldh1-Score die immunhistochemische Färbung an einer prä- oder posttherapeutischen Gewebeprobe dargestellt.

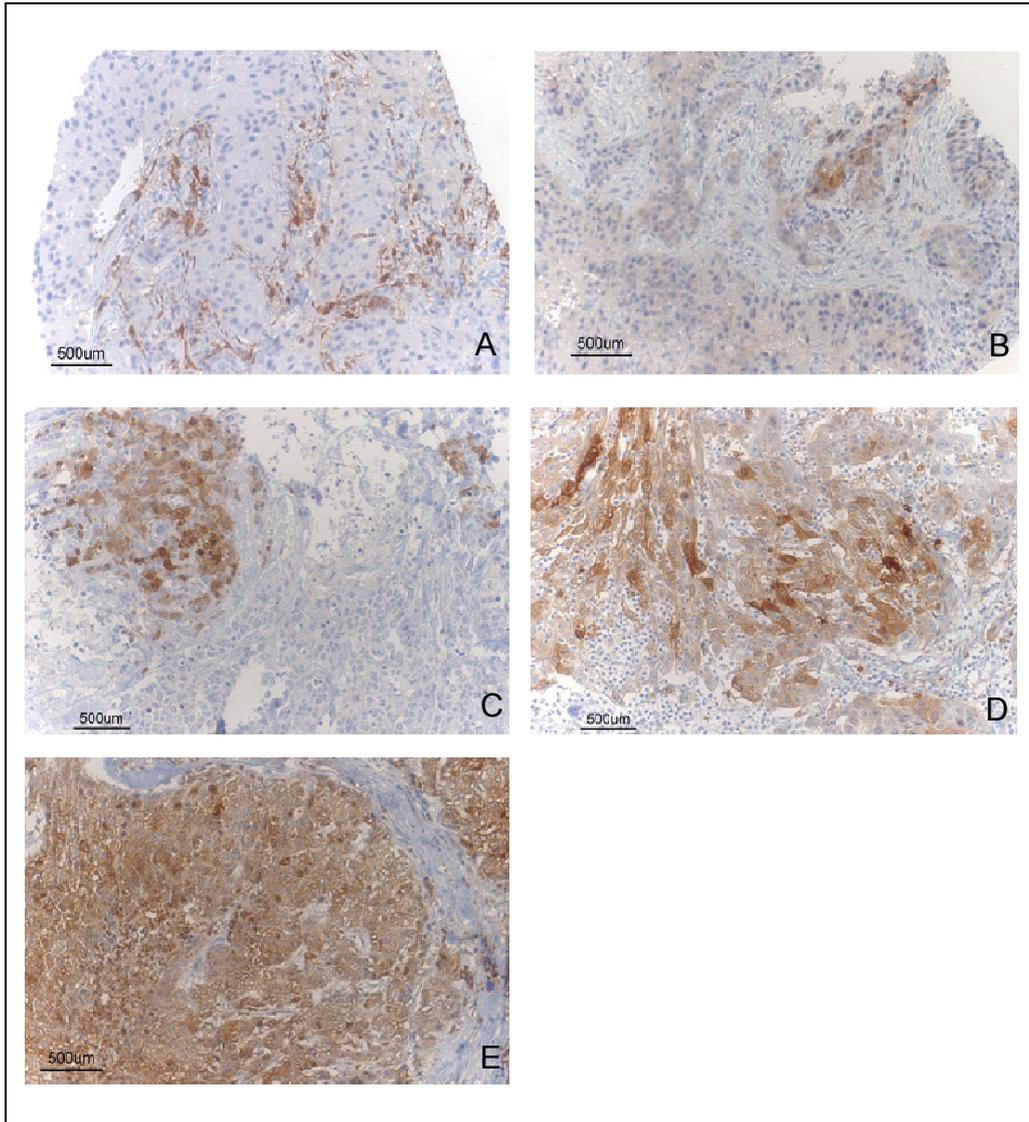


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung auf Aldh1 Expression an prä- und posttherapeutischem Gewebe neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen (20-fache Vergrößerung).

(A) Score 0: kein Nachweis einer zytoplasmatischen Expression in Tumorzellen der prätherapeutischen Gewebeprobe. Zellen des Bindegewebes weisen allerdings eine positive Reaktion gegenüber dem Aldh1 Antikörper auf. (B) Score 1: 1-10% der Tumorzellen der prätherapeutischen Gewebeprobe weisen eine mäßig bis starke Aldh1 Färbung auf. (C) Score 2: 11-50% positive Tumorzellen konnten in dieser posttherapeutisch gewonnenen Probe detektiert werden. (D) Score 3: 51-90% der Tumorzellen im posttherapeutischen Gewebe zeigen eine mäßig bis stark positive Aldh1 Expression. (E) Score 4: über 90% der Tumorzellen des posttherapeutischen Gewebes sind mäßig bis stark Aldh1 positiv.

3.4.1.1 Korrelation des Adh1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Der Aldh1 Status des Primärtumors konnte bei 68 Tumoren prätherapeutisch und bei 56 posttherapeutisch bestimmt werden. Eine signifikante Korrelation zwischen dem Aldh1-positiven Status des Primarius und den unten aufgeführten klinisch-pathologischen Faktoren war sowohl für die prä- als auch posttherapeutischen Gewebeproben nicht nachzuweisen (Tabelle 26 und Tabelle 27).

Tabelle 26: Korrelation von prätherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Parameter	Gesamt	Aldh1-negativ		Aldh1-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Histologie						
IDC	50	24	48	26	52	0,437
ILC	10	2	20	8	80	
ILDC	5	2	40	3	60	
andere	2	1	50	1	50	
Grading						
G1-2	45	17	37,8	28	62,2	0,150
G3	22	12	54,5	10	45,5	
Stadium prätherapeutisch						
I-II	29	10	34,5	19	65,5	0,288
III-IV	36	16	44,4	20	55,6	
Tumorgröße: cT						
cT1	2	0	0	2	100	0,421
cT2	24	9	37,5	15	62,5	
cT3-4	38	17	44,7	21	55,3	
Lymphknotenstatus: cN						
negativ	18	7	38,9	11	61,1	0,472
positiv	48	21	43,8	27	56,3	
Fernmetastasen bei ED						
M0	60	26	43,3	34	56,7	0,532
M1	8	3	37,5	5	62,5	
Tumorgröße: ypT						
ypT1	8	2	25	6	75	0,544
ypT2-4	41	18	43,9	23	56,1	
ypT0/Tis	19	9	47,4	10	52,6	
Lymphknotenstatus: ypN						
negativ	27	10	37	17	63	0,276
positiv	40	19	47,5	21	52,5	
ER-Status						
negativ	25	14	56	11	44	0,114
positiv	40	15	37,5	25	62,5	
PR-Status						
negativ	25	12	48	13	52	0,429
positiv	40	17	42,5	23	57,5	
Her2-Status						
negativ	47	19	40,4	28	59,6	0,206
positiv	18	10	55,6	8	44,4	

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 27: Korrelation von posttherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Parameter	Gesamt	Aldh1-negativ		Aldh1-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Histologie						
IDC	44	19	43,2	25	56,8	0,239
ILC	6	4	66,7	2	33,3	
ILDC	5	4	80	1	20	
andere	1	0	0	1	100	
Grading						
G1-2	41	19	46,3	22	53,7	0,435
G3	15	8	53,3	7	46,7	
Stadium prätherapeutisch						
I-II	21	9	42,9	12	57,1	0,507
III-IV	30	14	46,7	16	53,3	
Tumorgroße: cT						
cT1	-	-	-	-	-	0,287
cT2	18	7	38,9	11	61,1	
T3-4	31	16	51,6	15	48,4	
Lymphknotenstatus: cN						
negativ	12	6	50	6	50	0,599
positiv	41	20	48,8	21	51,2	
Fernmetastasen bei ED						
M0	46	22	47,8	24	52,2	0,587
M1	10	5	50	5	50	
Tumorgroße: ypT						
ypT1	4	3	75	1	25	0,266
ypT2-4	52	24	46,2	28	53,8	
Lymphknotenstatus: ypN						
negativ	11	4	36,4	7	63,6	0,297
positiv	43	22	51,2	21	48,8	
ER-Status						
negativ	13	6	46,2	7	53,8	0,500
positiv	37	19	51,4	18	48,6	
PR-Status						
negativ	15	8	53,3	7	46,7	0,500
positiv	35	17	48,6	18	51,4	
Her2-Status						
negativ	42	23	54,8	19	45,2	0,123
positiv	8	2	25	6	75	

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus; n.s. = nicht signifikant

3.4.1.2 Korrelation des Aldh1-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten

Die Überlebensdaten zeigten keinen signifikanten Zusammenhang bezüglich des prä- und posttherapeutischen Aldh1-Status auf. Dies galt ebenfalls für die Therapieresponse bezogen auf die prätherapeutische Aldh1-Expression (Tabelle 28 und Tabelle 29). Eine Komplettremission nach neoadjuvanter Therapie trat bei Aldh1-positiven Tumoren und Aldh1-negativen Tumoren gleich häufig auf ($p=0,338$).

Tabelle 28: Korrelation von prätherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten

Parameter	Gesamt	Aldh1-negativ		Aldh1-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Response						
pCR	16	8	50	8	50	0,338
Non pCR	50	20	40	30	60	
Rezidiv						
nein	53	23	43,4	30	56,6	0,651
ja	7	3	42,9	4	57,1	
Metastasen im Verlauf (ohne M1 bei ED)						
nein	41	16	39	25	61	0,239
ja	19	10	52,6	9	47,4	
Verstorben						
nein	46	18	39,1	28	60,9	0,278
ja	22	11	50	11	50	

ED = Erstdiagnose; n.s. = nicht signifikant; pCR = pathologische Kompletteremission

Tabelle 29: Korrelation von posttherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors mit Überlebensdaten

Parameter	Gesamt	Aldh1-negativ		Aldh1-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Rezidiv						
nein	40	20	50	20	50	0,376
ja	6	2	33,3	4	66,7	
Metastasen im Verlauf (ohne M1 bei ED)						
nein	31	16	51,6	15	48,4	0,337
ja	15	6	40	9	60	
Verstorben						
nein	34	14	41,2	20	58,8	0,150
ja	22	13	59,1	9	40,9	

ED = Erstdiagnose; n.s. = nicht signifikant

3.4.1.3 Korrelation des Aldh1-Status des Primärtumors prä- und posttherapeutisch

Bei 36 Patientinnen konnte der Aldh1-Status prä- und posttherapeutisch verglichen werden. Zwischen dem prä- und posttherapeutischen Aldh1-Status des Primärtumors konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden ($p=0,376$). Prätherapeutisch handelte es sich bei 47,2% (17 Patientinnen) um Aldh1-negative Tumoren. Bei lediglich 8 dieser 17 Patientinnen (47%) entsprach dies auch dem posttherapeutischen Aldh1-Status. Bei den übrigen 9 Patientinnen (53%) ließ sich posttherapeutisch eine Aldh1-Positivität nachweisen. Von den 19 Patientinnen mit positivem prätherapeutischem Aldh1-Status wiesen 8 (42,1%) der posttherapeutischen Gewebeproben Aldh1-Positivität auf, wohingegen bei 11 Patientinnen (57,9%) der Primärtumor posttherapeutisch Aldh1-negativ war. Die Konkordanzrate zwischen prä- und posttherapeutischem Aldh1-Status lag bei 65,5% (Tabelle 30).

Tabelle 30: Korrelation des Aldh1-Status von prä- und posttherapeutischem Tumor

		Prätherapeutisch		Total
		Aldh1 negativ n (%)	Aldh1 positiv n (%)	
Post- therapeutisch	Aldh1 negativ n (%)	8 (22,2)	11 (30,6)	19 (52,8)
	Aldh1 positiv n (%)	9 (25)	8 (22,2)	17 (47,2)
Total		17 (47,2)	19 (52,8)	36 (100)
				p= 0,376

3.4.2 Notch1-Status des Primärtumors

Die Untersuchung der 70 prätherapeutischen Gewebeproben auf eine Notch1-Expression hin, ergab in 30% der Fälle ein positives Ergebnis. Bei den 65 posttherapeutisch untersuchten Primärtumoren handelte es sich in 27,7% der Fälle um Notch1-positive Tumoren (Tabelle 31).

Tabelle 31: Häufigkeitsverteilung des Notch1-Scores der prä- und posttherapeutischen Gewebeproben

Score Notch1	prätherapeutisch		posttherapeutisch	
	Häufigkeit N=70	Prozent %	Häufigkeit N=65	Prozent %
0	49	70,0	47	72,3
1	8	11,4	4	6,2
2	5	7,1	4	6,2
3	4	5,7	6	9,2
4	4	5,7	4	6,2

Beispiele der immunhistochemischen Färbung für Notch1 finden sich für alle angegebenen Scores in Abbildung 15.

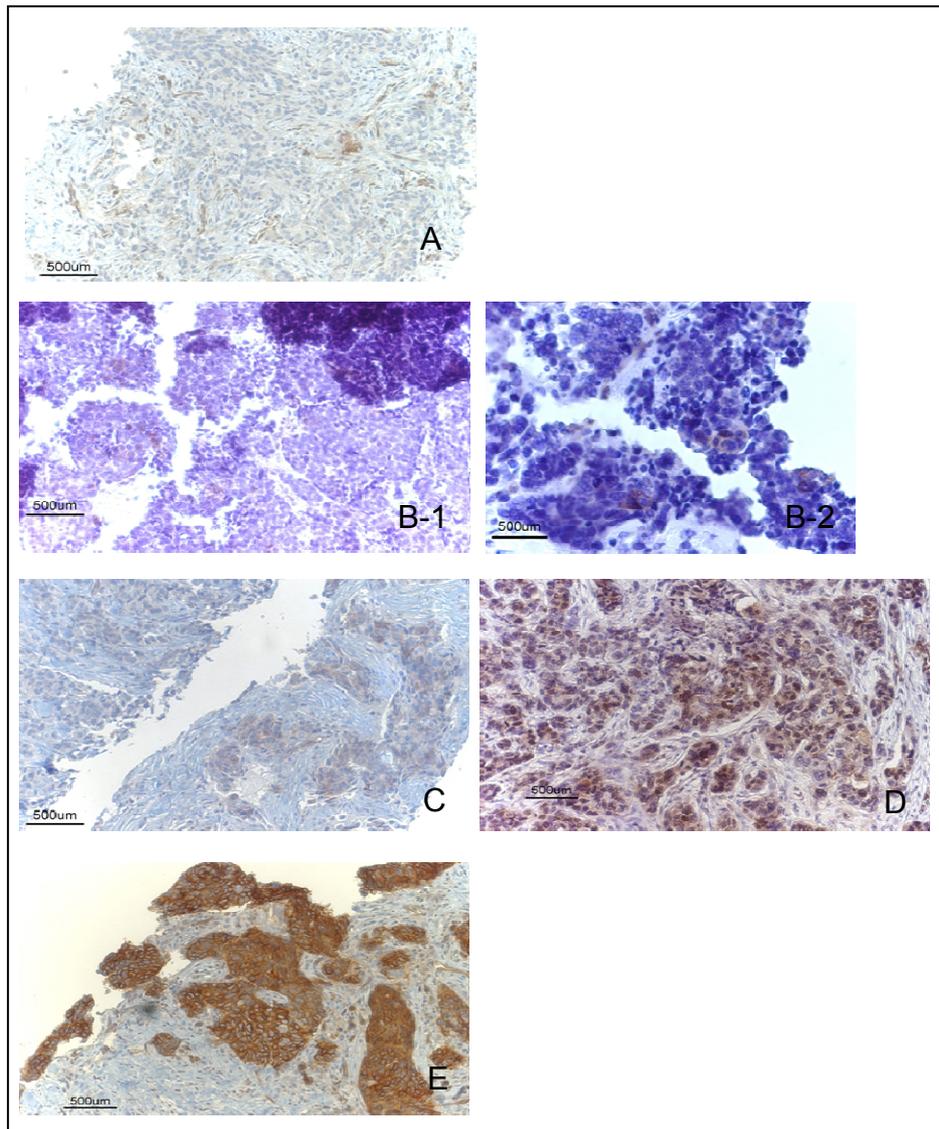


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung auf Notch1 Expression an prä- und posttherapeutischem Gewebe neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen (20-fache Vergrößerung).

(A) Score 0: kein Nachweis einer zytoplasmatischen Expression in Tumorzellen der prätherapeutischen Gewebeprobe. (B) Score 1: 1-10% der Tumorzellen der posttherapeutischen Gewebeprobe weisen eine mäßige Notch1 Färbung auf. (B-2) Bildausschnitt aus (B-1) in 40facher Vergrößerung. (C) Score 2: 11-50% positive Tumorzellen mit einer mäßigen bis starken Expression von Notch1 konnten in dieser prätherapeutisch gewonnenen Probe detektiert werden. (D) Score 3: 51-90% der Tumorzellen im posttherapeutischen Gewebe zeigen eine positive Notch1 Expression. (E) Score 4: über 90% der Tumorzellen des prätherapeutischen Gewebes sind stark Notch1 positiv.

3.4.2.1 Korrelation des Notch1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Es konnten 70 Tumore prätherapeutisch und 65 posttherapeutisch auf eine Notch1-Expression hin untersucht werden. Bezüglich der klinisch-pathologischen Faktoren der untersuchten Mammakarzinome konnten signifikante Korrelationen zwischen dem prätherapeutischen Notch1-Status und dem Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus nachgewiesen werden: Notch1-positive Mammakarzinome waren häufiger Hormonrezeptor-negativ verglichen mit Tumoren ohne Notch1-Expression (Östrogenrezeptor: $p=0,001$, Progesteronrezeptor: $p=0,007$). Auch in Bezug auf den posttherapeutischen Notch1-Status des Tumors ließ sich dies als Trend für den Östrogenrezeptorstatus beobachten, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,062$).

Darüber hinaus zeigte sich, dass Patientinnen mit einem Notch1-positiven Mammakarzinom häufiger einen negativen Her2-Rezeptorstatus aufweisen: Prätherapeutisch ließ sich in 80% der Notch1-positiven Gewebeproben keine Her2-Expression nachweisen. In der Gruppe der Notch1-negativen Tumoren traf dies auf 68,1% der Fälle zu. In den posttherapeutischen Gewebeproben waren 93,3% der Notch1-positiven Tumoren Her2-negativ. In der Gruppe der Notch1-negativen Karzinome lag der Anteil der Tumoren mit einem negativen Her2-Rezeptorstatus bei 78,6%. Sowohl für die prä- als auch posttherapeutischen Gewebeproben war die Korrelation zwischen einer Notch1-Expression und dem Her2-Status statistisch nicht signifikant (prätherapeutisch: $p=0,247$; posttherapeutisch $p=0,189$).

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Notch1-Status der posttherapeutischen Gewebeproben und den untersuchten klinisch-pathologischen Faktoren lag nicht vor. Es handelte sich bei den Notch1-positiven posttherapeutischen Gewebeproben eher um Tumoren mit einer schlechten Differenzierung, jedoch ohne statistisch signifikanten Zusammenhang ($p=0,130$). So wiesen 38,9% aller posttherapeutisch Notch1-positiven Mammakarzinome ein Tumorigradung G3 auf im Vergleich zu 21,3% in der Gruppe der Notch1-negativen Tumoren.

Histologisch betrachtet waren es fast ausschließlich invasiv duktales Karzinome, bei denen eine Notch1-Expression nachgewiesen werden konnte. Eine signifikante Korrelation lag jedoch nicht vor ($p=0,061$).

In Tabelle 32 und Tabelle 33 sind die Korrelationen von prä- bzw. posttherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit den klinisch-pathologischen Faktoren aufgeführt.

Tabelle 32: Korrelation von prätherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Parameter	Gesamt	Notch1-negativ		Notch1-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Histologie						
IDC	53	34	64,2	19	35,8	0,061
ILC	9	9	100	0	0	
ILDC	5	5	100	0	0	
andere	2	1	50	1	50	
Grading						
G1-2	49	36	73,5	13	26,5	0,206
G3	20	12	60	8	40	
Stadium prätherapeutisch						
I-II	29	17	58,6	12	41,4	0,113
III-IV	37	28	75,7	9	24,3	
Tumorgroße: cT						
cT1	1	0	0	1	100	0,054
cT2	26	15	57,7	11	42,3	
cT3-4	39	31	79,5	8	20,5	
Lymphknotenstatus: cN						
negativ	17	11	64,7	6	35,3	0,390
positiv	50	36	72	14	28	
Fernmetastasen bei ED						
M0	62	43	69,4	19	30,6	0,550
M1	8	6	75	2	25	
Tumorgroße: ypT						
ypT1	8	5	62,5	3	37,5	0,770
ypT2-4	41	30	73,2	11	26,8	
ypT0/Tis	21	14	66,7	7	33,3	
Lymphknotenstatus: ypN						
negativ	28	18	64,3	10	35,7	0,227
positiv	41	31	75,6	10	24,4	
ER-Status						
negativ	26	12	46,2	14	53,8	0,001
positiv	41	35	85,4	6	14,6	
PR-Status						
negativ	24	12	50	12	50	0,007
positiv	43	35	81,4	8	18,6	
Her2-Status						
negativ	48	32	66,7	16	33,3	0,247
positiv	19	15	78,9	4	21,1	

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 33: Korrelation von posttherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Parameter	Gesamt	Notch1-negativ		Notch1-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Histologie						
IDC	51	36	70,6	15	29,4	0,289
ILC	8	7	87,5	1	12,5	
ILDC	5	4	80	1	20	
andere	1	0	0	1	100	
Grading						
G1-2	48	37	77,1	11	22,9	0,130
G3	17	10	58,8	7	41,2	
Stadium prätherapeutisch						
I-II	24	18	75	6	25	0,347
III-IV	36	24	66,7	12	33,3	
Tumorgröße: cT						
cT1	1	1	100	0	0	0,681
cT2	20	15	75	5	25	
cT3-4	37	25	67,6	12	32,4	
Lymphknotenstatus: cN						
negativ	15	12	80	3	20	0,295
positiv	47	32	68,1	15	31,9	
Fernmetastasen bei ED						
M0	54	41	75,9	13	24,1	0,142
M1	11	6	54,5	5	45,5	
Tumorgröße: ypT						
ypT1	8	5	62,5	3	37,5	0,388
ypT2-4	57	42	73,	15	26,3	
Lymphknotenstatus: ypN						
negativ	16	9	56,3	7	43,8	0,080
positiv	47	37	78,7	10	21,3	
ER-Status						
negativ	16	9	56,3	7	43,8	0,062
positiv	41	33	80,5	8	19,5	
PR-Status						
negativ	17	12	70,6	5	29,4	0,484
positiv	40	30	75	10	25	
Her2-Status						
negativ	47	33	70,2	14	29,8	0,189
positiv	10	9	90	1	10	

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus; n.s. = nicht signifikant

3.4.2.2 Korrelation des Notch1-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem prätherapeutischen Notch1-Status und den unten aufgeführten Überlebensdaten sowie der Therapieresponse konnten nicht beobachtet werden (Tabelle 34). Unter den pathologischen Komplettremissionen waren 33,3% Notch1-positive Fälle ($p=0,526$).

Tabelle 34: Korrelation von prätherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten

Parameter	Gesamt	Notch1-negativ		Notch1-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Response						
pCR	18	12	66,7	6	33,3	0,526
Non pCR	49	34	69,4	15	30,6	
Rezidiv						
nein	55	38	69,1	17	30,9	0,636
ja	7	5	71,4	2	28,6	
Metastasen im Verlauf (ohne M1 bei ED)						
nein	44	30	68,2	14	31,8	0,503
ja	18	13	72,2	5	27,8	
Verstorben						
nein	50	36	72	14	28	0,381
ja	20	13	65	7	35	

ED = Erstdiagnose; n.s. = nicht signifikant; pCR = pathologische Komplettremission; PR = partielle Remission

Zwischen posttherapeutischem Notch1-Status und den Überlebensdaten ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 35).

Tabelle 35: Korrelation von posttherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit Überlebensdaten

Parameter	Gesamt	Notch1-negativ		Notch1-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Rezidiv						
nein	47	36	76,6	11	23,4	0,543
ja	7	5	71,4	2	28,6	
Metastasen im Verlauf (ohne M1 bei ED)						
nein	35	27	77,1	8	22,9	0,512
ja	19	14	73,7	5	26,3	
Verstorben						
nein	38	27	71,1	11	28,9	0,508
ja	27	20	74,1	7	25,9	

ED = Erstdiagnose; n.s. = nicht signifikant

3.4.2.3 Korrelation des Notch1-Status des Primärtumors prä- und posttherapeutisch

Bei 42 Patientinnen wurden der prä- und posttherapeutische Notch1-Status des Primärtumors verglichen. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p=0,003$). Die prätherapeutische Notch1-Negativrate des Primärtumors betrug 71,4% (30 Patientinnen). Bei 26 der 30 Patientinnen (86,7%) war der posttherapeutische Notch1-Status ebenfalls negativ. Lediglich 4 Patientinnen (13,3%) waren trotz negativem prätherapeutischem Notch1-Status in der posttherapeutischen Gewebeprobe Notch1-positiv. Von den 12 Patientinnen mit positivem prätherapeutischem Notch1-Status war der posttherapeutische Tumor in 7 Fällen (58,3%) Notch1-positiv und 5 Fällen (41,7%) Notch1-negativ. Die Konkordanzrate zwischen prä- und posttherapeutischem Notch1-Status lag bei 73,9% (Tabelle 36).

Tabelle 36: Korrelation des Notch1-Status von prä- und posttherapeutischem Tumor

		Prätherapeutisch		Total
		Notch1 negativ n (%)	Notch1 positiv n (%)	
Post- therapeutisch	Notch1 negativ n (%)	26 (61,9)	5 (11,9)	31 (73,8)
	Notch1 positiv n (%)	4 (9,5)	7 (16,7)	11 (26,2)
Total		30 (71,4)	12 (28,6)	42 (100)
				p= 0,003

3.4.3 Sox2-Status des Primärtumors

In den 74 prätherapeutischen Gewebeproben wiesen 23% der untersuchten Mammakarzinompatientinnen einen Sox2-positiven Primärtumor auf. Im posttherapeutischen Patientenkollektiv wurden 24,6% der 65 Fälle als positiv eingestuft (Tabelle 37).

Tabelle 37: Häufigkeitsverteilung des Sox2-Scores der prätherapeutischen und posttherapeutischen Gewebeproben

Sore Sox2	prätherapeutisch		posttherapeutisch	
	Häufigkeit N=74	Prozent %	Häufigkeit N=65	Prozent %
0	57	77	49	75,4
1	11	14,9	6	9,2
2	4	5,4	4	6,2
3	1	1,4	5	7,7
4	1	1,4	1	1,5

In Abbildung 16 werden beispielhaft Bilder der immunhistochemischen Färbung für jeden Sox2-Score aufgeführt.

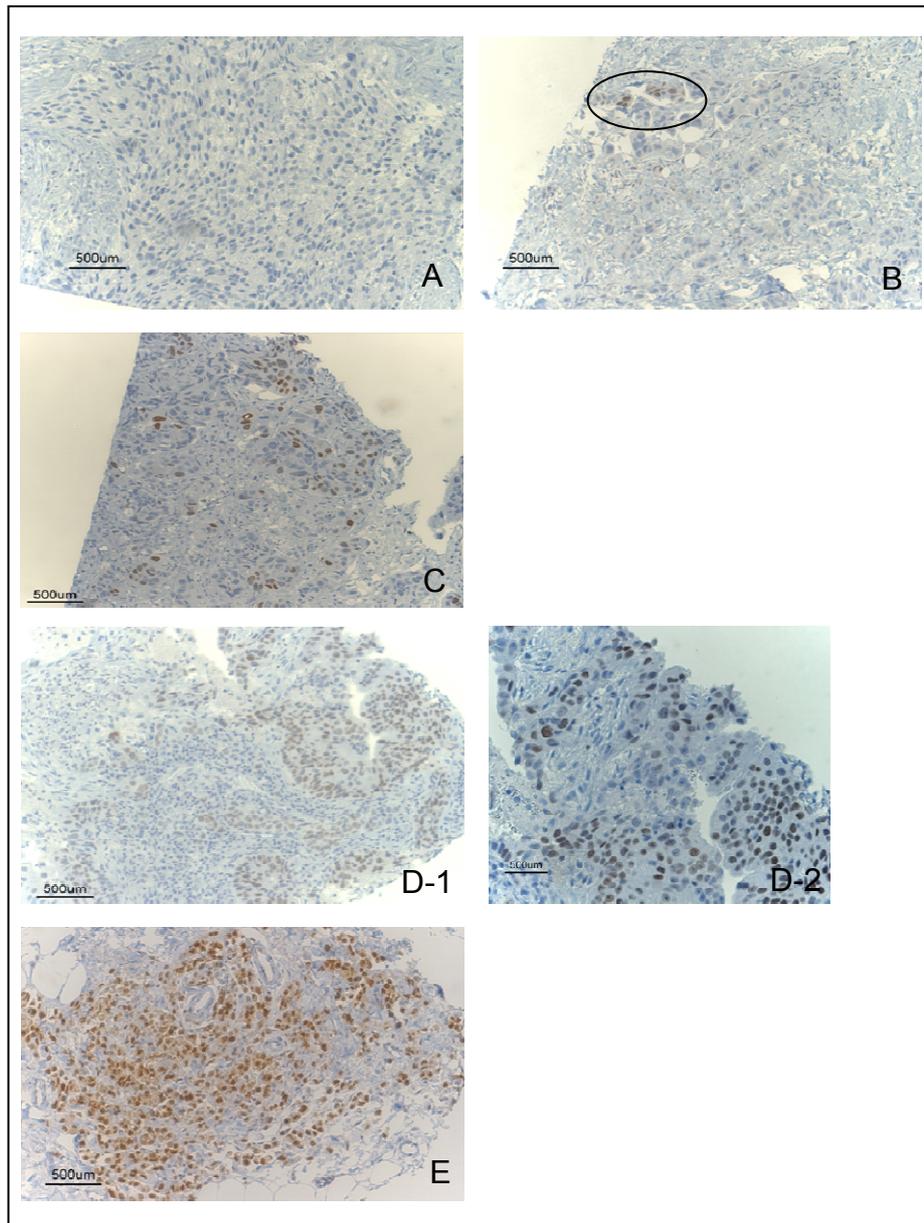


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung auf Sox2 Expression an prä- und posttherapeutischem Gewebe neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen (20-fache Vergrößerung).

(A) Score 0: kein Nachweis einer nukleären Sox2 Expression in Tumorzellen der prätherapeutischen Gewebeprobe. (B) Score 1: 1-10% der Tumorzellen der prätherapeutischen Gewebeprobe weisen eine nukleäre Sox2 Färbung auf. (C) Score 2: 11-50% positive Tumorzellen konnten in dieser prätherapeutisch gewonnenen Probe detektiert werden. (D-1) Score 3: 51-90% der Tumorzellen im prätherapeutischen Gewebe zeigen eine positive Sox2 Expression. (D-2) Bildausschnitt aus Abbildung D-1 in 40facher Vergrößerung. (E) Score 4: über 90% der Tumorzellen des posttherapeutischen Gewebes sind stark Sox2 positiv.

3.4.3.1 Korrelation des Sox2-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Es konnten 74 Tumore prätherapeutisch und 65 posttherapeutisch auf eine Sox2-Expression hin untersucht werden.

Signifikant war der Zusammenhang zwischen prätherapeutischem Sox2-Status und Lymphknotenstatus nach neoadjuvanter Chemotherapie ($p=0,012$). So wurden bei 87,5% der Patientinnen mit einem positiven Sox2-Status Lymphknotenmetastasen diagnostiziert, in der Sox2-negativen Vergleichsgruppe waren es 53,6%. Der prätherapeutische Lymphknotenstatus bei den prätherapeutisch Sox2-positiven Patientinnen war ebenfalls meist positiv, jedoch ohne signifikanten Zusammenhang ($p=0,200$).

Es zeigte sich zudem die Tendenz, dass es sich bei prätherapeutisch Sox2-positiven Tumoren eher um Tumoren im fortgeschrittenen Stadium handelte. Dies war jedoch ohne statistisch signifikanten Zusammenhang ($p=0,119$). Dem Stadium III und IV konnten dabei 75% der Fälle zugeordnet werden. In der Sox2-negativen Vergleichsgruppe lag bei 54,5% der Fälle ein Stadium III bzw. IV vor. Tumoren, die prätherapeutisch Sox2 exprimierten waren häufig schlecht differenziert (47,1%). Bei den Sox2-negativen Tumoren waren es 26,8%, welche ein Tumorgrading von G3 aufwiesen. Eine statistisch signifikante Korrelation lag nicht vor ($p=0,102$) (Tabelle 38).

Zwischen den untersuchten klinisch-pathologischen Faktoren und dem Sox2-Status der posttherapeutischen Gewebeproben bestand kein signifikanter Zusammenhang (Tabelle 39).

Tabelle 38: Korrelation von prätherapeutischem Sox2-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Parameter	Gesamt	Sox2-negativ		Sox2-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Histologie						
IDC	55	41	74,5	14	25,5	0,815
ILC	11	9	81,8	2	18,2	
ILDC	5	4	80	1	20	
andere	2	2	100	0	0	
Grading						
G1-2	50	41	82	9	18	0,102
G3	23	15	65,2	8	34,8	
Stadium prätherapeutisch						
I-II	29	25	86,2	4	13,8	0,119
III-IV	42	30	71,4	12	28,6	
Tumorgroße: cT						
cT1	1	1	100	0	0	0,657
cT2	24	20	83,3	4	16,7	
cT3-4	45	34	75,6	11	24,4	
Lymphknotenstatus: cN						
negativ	17	15	88,2	2	11,8	0,200
positiv	55	41	74,5	14	25,5	
Fernmetastasen bei ED						
M0	65	52	80	13	20	0,102
M1	9	5	55,6	4	44,4	
Tumorgroße: ypT						
ypT1	8	4	50	4	50	0,122
ypT2-4	45	35	77,8	10	22,2	
ypT0/Tis	21	18	85,7	3	14,3	
Lymphknotenstatus: ypN						
negativ	28	26	92,9	2	7,1	0,012
positiv	44	30	68,2	14	31,8	
ER-Status						
negativ	28	22	78,6	6	21,4	0,458
positiv	43	32	74,4	11	25,6	
PR-Status						
negativ	26	20	76,9	6	23,1	0,568
positiv	45	34	75,6	11	24,4	
Her2-Status						
negativ	52	40	76,9	12	23,1	0,502
positiv	19	14	73,7	5	26,3	

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 39: Korrelation von posttherapeutischem Sox2-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren

Parameter	Gesamt	Sox2-negativ		Sox2-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Histologie						
IDC	51	40	78,4	11	21,6	0,586
ILC	8	5	62,5	3	37,5	
ILDC	5	3	60	2	40	
andere	1	1	100	0	0	
Grading						
G1-2	48	36	75	12	25	0,592
G3	17	13	76,5	4	23,5	
Stadium prätherapeutisch						
I-II	23	16	69,6	7	30,4	0,237
III-IV	37	30	81,1	7	18,9	
Tumorgroße: cT						
cT1	1	1	100	0	0	0,373
cT2	18	12	66,7	6	33,3	
cT3-4	39	32	82,1	7	17,9	
Lymphknotenstatus: cN						
negativ	15	10	66,7	5	33,3	0,267
positiv	47	37	78,7	10	21,3	
Fernmetastasen bei ED						
M0	55	41	74,5	14	25,5	0,532
M1	10	8	80	2	20	
Tumorgroße: ypT						
ypT1	7	6	85,7	1	14,3	0,445
ypT2-4	58	43	74,1	15	25,9	
Lymphknotenstatus: ypN						
negativ	16	13	81,3	3	18,7	0,429
positiv	47	35	74,5	12	25,5	
ER-Status						
negativ	16	13	81,3	3	18,7	0,343
positiv	42	30	71,4	12	28,6	
PR-Status						
negativ	17	11	64,7	6	35,3	0,231
positiv	41	32	78	9	22	
Her2-Status						
negativ	48	35	72,9	13	27,1	0,491
positiv	10	8	80	2	20	

IDC = invasiv duktales Mammakarzinom; ILC = invasiv lobuläres Mammakarzinom; ILDC = invasiv lobulär duktales Mammakarzinom; ED = Erstdiagnose; ER-Status = Östrogenrezeptorstatus; PR-Status = Progesteronrezeptorstatus; n.s. = nicht signifikant

3.4.3.2 Korrelation des Sox2-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten

Zwischen der Therapieresponse sowie den Überlebensdaten und dem Sox2-Status der prätherapeutischen Gewebeproben konnte keine statistisch relevante Korrelation erhoben werden (Tabelle 40). Unter allen Tumoren, bei denen die systemische Therapie zu einer Komplettremission führte, waren lediglich 11,8% Sox2-positiv ($p=0,162$). Zudem ließ sich beobachten, dass bezüglich des Gesamtüberlebens Patientinnen mit einem Sox2-positiven Tumor, eine ungünstigere Prognose hatten jedoch ohne statistisch signifikante Korrelation ($p=0,121$). Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren in diesem Kollektiv bereits 47,1% der Patientinnen verstorben, in der Patientengruppe mit Sox2-negativem Tumor waren es 28,1% (Abbildung 17).

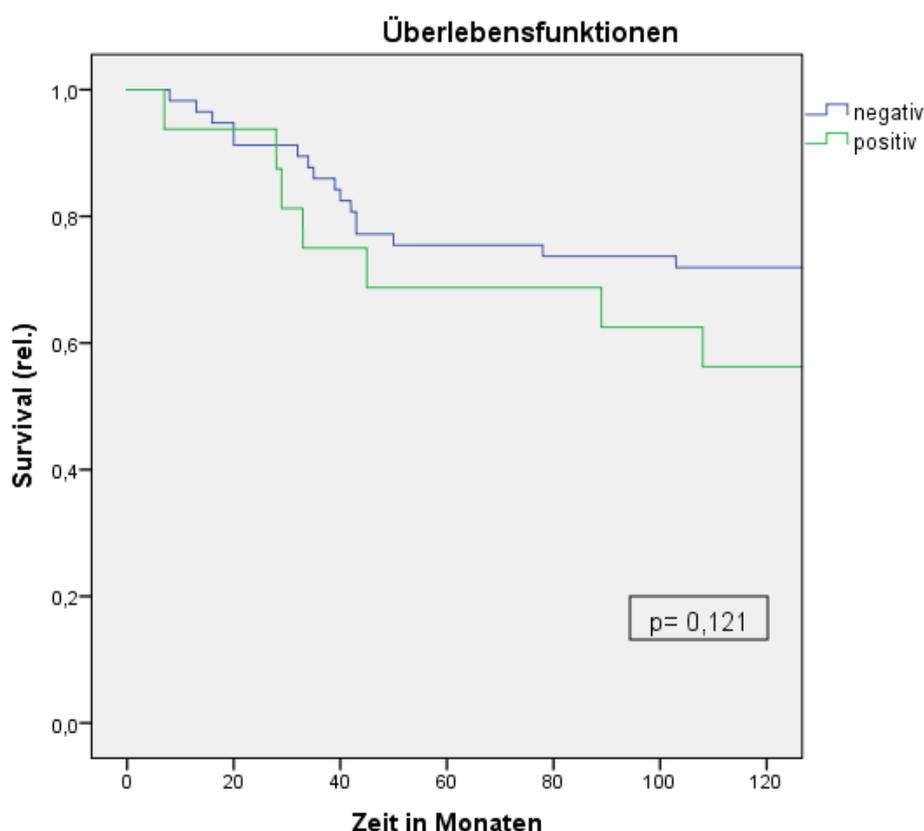


Abbildung 17: Prätherapeutischer Sox2-Status: Überlebenszeit in Monaten

Darüber hinaus zeigte sich, dass bei Vorliegen eines Sox2-positiven Tumors häufiger Fernmetastasen im Verlauf aufgetreten sind, jedoch ohne signifikante Korrelation ($p=0,157$). Im Beobachtungszeitraum konnten bei 47,1% der Patientinnen mit positivem Sox2-Status Fernmetastasen nach der Erstdiagnose diagnostiziert werden. Unter den Patientinnen mit Sox2-negativen Tumoren entwickelten 26,9% Fernmetastasen. Primär metastasierte Patienten wurden in die Berechnung nicht mit einbezogen (Abbildung 18).

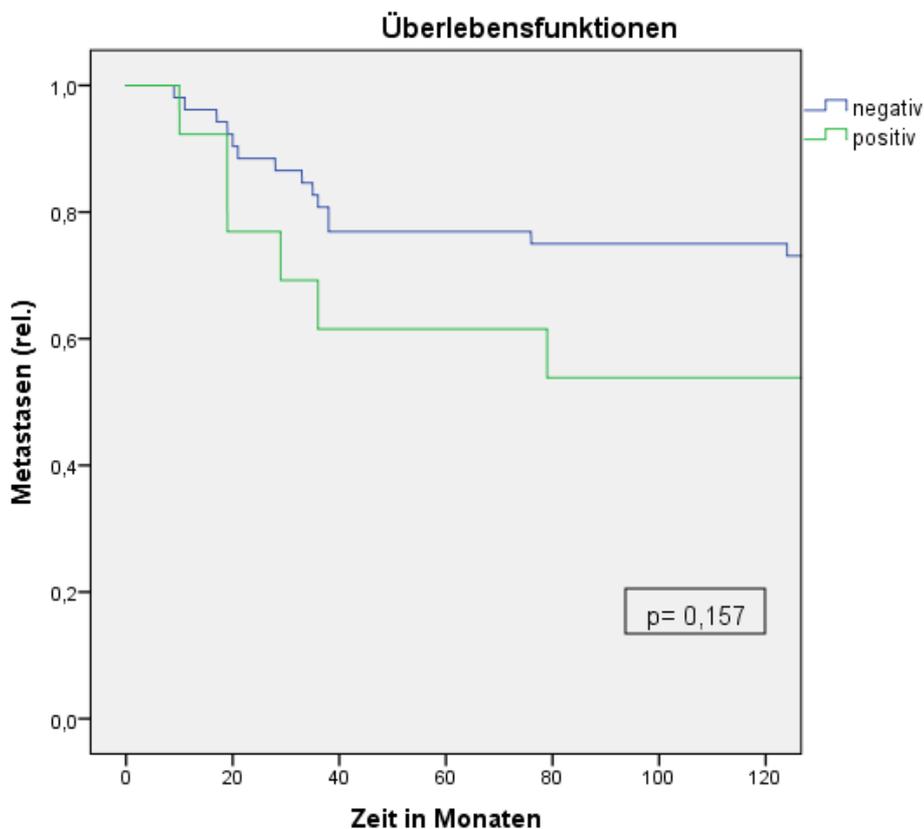


Abbildung 18: Prätherapeutischer Sox2-Status: Metastasenfreie Zeit in Monaten (Metastasen bei Erstdiagnose ausgeschlossen)

Tabelle 40: Korrelation von prätherapeutischem Sox2-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten

Parameter	Gesamt	Sox2-negativ		Sox2-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Response						
pCR	17	15	88,2	2	11,8	0,162
Non pCR	55	40	72,7	15	27,3	
Rezidiv						
nein	58	46	79,3	12	20,7	0,572
ja	7	6	85,7	1	14,3	
Metastasen im Verlauf (ohne M1 bei ED)						
nein	45	38	84,4	7	15,6	0,157
ja	20	14	70	6	30	
Verstorben						
nein	50	41	82	9	18	0,121
ja	24	16	66,7	8	33,3	

ED = Erstdiagnose; n.s. = nicht signifikant; pCR = pathologische Kompletteremission

Für den posttherapeutischen Sox2-Status ließ sich bei den Überlebensdaten ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang feststellen (Tabelle 41).

Tabelle 41: Korrelation von posttherapeutischem Sox2-Status des Primärtumors mit Überlebensdaten

Parameter	Gesamt	Sox2-negativ		Sox2-positiv		p-value
		n	%	n	%	
Rezidiv						
nein	47	33	70,2	14	29,8	0,074
ja	8	8	100	0	0	
Metastasen im Verlauf (ohne M1 bei ED)						
nein	36	28	77,8	8	22,2	0,328
ja	19	13	68,4	6	31,6	
Verstorben						
nein	39	31	79,5	8	20,5	0,257
ja	26	18	69,2	8	30,8	

ED = Erstdiagnose; n.s. = nicht signifikant

3.4.3.3 Korrelation des Sox2-Status des Primärtumors prä- und posttherapeutisch

Zwischen dem prä- und posttherapeutischen Sox2-Status des Primärtumors konnte eine signifikante Korrelation beobachtet werden ($p=0,014$): Für den Vergleich wurden der prä- und posttherapeutische Sox2-Status des Primärtumors von 46 Patientinnen herangezogen. Prätherapeutisch waren 73,9% der Tumore (34 Patientinnen) Sox2-negativ. Bei 29 der 34 Patientinnen (85,3%) war der posttherapeutische Sox2-Status ebenfalls negativ. Lediglich 5 Patientinnen (14,7%) zeigten bei negativem prätherapeutischem Sox2-Status, Sox2-positive Tumorzellen in der posttherapeutischen Gewebeprobe auf. Von den 12 Patientinnen mit positivem prätherapeutischem Sox2-Status wiesen im posttherapeutischen Primärtumor jeweils 6 Patientinnen (50%) Sox2-positive bzw. Sox2-negative Tumorzellen auf. Die Konkordanzrate zwischen dem prä- und posttherapeutischen Sox2-Status lag bei 76,3% (Tabelle 42).

Tabelle 42: Korrelation des Sox2-Status von prä- und posttherapeutischem Tumor

		Prätherapeutisch		Total
		Sox2 negativ n (%)	Sox2 positiv n (%)	
Post- therapeutisch	Sox2 negativ n (%)	29 (63)	6 (13)	35 (76,1)
	Sox2 positiv n (%)	5 (10,9)	6 (13)	11 (23,9)
Total		34 (73,9)	12 (26,1)	46 (100)
				p= 0,014

3.4.3.4 Korrelation des Sox2-Status von disseminierten Tumorzellen und dem prätherapeutischen Primärtumor

Von 46 Patientinnen mit einem positiven Knochenmarkbefund wurden der prätherapeutische Sox2-Status des Primärtumors und jener der DTZ verglichen. 10 der 46 Primärtumoren (21,7%) waren Sox2-positiv. Allerdings konnten nur bei einer dieser 10 Patientinnen (10%) Sox2-positive DTZ im Knochenmark beobachtet werden. Die übrigen 9 Patientinnen (90%) hatten trotz positivem Sox2-Status des Primärtumors nur Sox2-negative DTZ. Von den 36 Patientinnen mit prätherapeutisch negativem Sox2-Status des Primärtumors war in 31 Fällen (86,1%) der Knochenmarkstatus bezüglich Sox2 ebenfalls negativ und in 5 Fällen (13,9%) positiv. Die Konkordanzrate zwischen dem Sox2-Status der DTZ und dem prätherapeutischen Primärtumor lag bei 19,7%. Eine signifikante Korrelation lag nicht vor (Tabelle 43) ($p=0,610$).

Tabelle 43: Korrelation des Sox2-Status zwischen DTZ und prätherapeutischen Primärtumor

		Primärtumor prätherapeutisch		Total
		Sox2 negativ n (%)	Sox2 positiv n (%)	
DTZ	Sox2 negativ n (%)	31 (67,4)	9 (19,6)	40 (87)
	Sox2 positiv n (%)	5 (10,9)	1 (2,2)	6 (13)
Total		36 (78,3)	10 (21,7)	46 (100)
				p= 0,610

3.4.3.5 Korrelation Sox2-Status von disseminierten Tumorzellen und dem posttherapeutischen Primärtumor

Von 39 Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefund wurde der posttherapeutische Sox2-Status des Primärtumors und jener der DTZ verglichen. Die Sox2-Positivrate des Primärtumors betrug in dieser Gruppe 10,3% (3 Patientinnen). Allerdings konnten bei keiner dieser Patientinnen Sox2-

positive DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden. Von den 36 Patientinnen mit negativem Sox2-Status des Primärtumors wiesen 26 (72,2%) Sox2-negative und 10 (27,8%) Sox2-positive Tumorzellen im Knochenmark auf. Die Konkordanzrate zwischen dem Sox2-Status der DTZ und dem posttherapeutischen Primärtumor lag bei 5,2%. Eine signifikante Korrelation lag nicht vor ($p=0,290$) (Tabelle 44).

Tabelle 44: Korrelation des Sox2-Status zwischen DTZ und posttherapeutischen Primärtumor

		Primärtumor posttherapeutisch		Total
		Sox2 negativ n (%)	Sox2 positiv n (%)	
DTZ	Sox2 negativ n (%)	26 (66,7)	10 (25,6)	36 (92,3)
	Sox2 positiv n (%)	3 (7,7)	0 (0)	3 (7,7)
Total		29 (74,4)	10 (25,6)	39 (100)
				p= 0,290

4 Diskussion

4.1 Tumorzelldissemination und Stammzelltheorie

Eine Tumorzelldissemination kann beim Mammakarzinom bereits im frühen Erkrankungsstadium auftreten und ggf. auf eine beginnende Metastasierung hinweisen (Fehm *et al.* 2002; Hüsemann *et al.* 2008; Mansi *et al.* 1989). Die klassischen, klinisch-pathologischen Prognoseparameter wie Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus und das Alter der Patientin (Goldhirsch *et al.* 2007) scheinen somit nicht ausreichend zu sein.

Mit seiner prognostisch hohen Relevanz ist der Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen als unabhängiger Prognosefaktor mit Level-I-Evidenz heutzutage anerkannt (Braun *et al.* 2005). Bei bis zu über 40% aller Mammakarzinompatientinnen können DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden (Braun *et al.* 2000a; Diel *et al.* 1996; Solomayer *et al.* 2001), was mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Fortunato *et al.* 2009; Gebauer *et al.* 2001, Harbeck *et al.* 1994; Hartkopf *et al.* 2014; Mansi *et al.* 1999).

Die hier vorliegende Arbeit zeigte, dass DTZ-positive Mammakarzinome signifikant häufiger posttherapeutisch Lymphknotenmetastasen aufweisen ($p=0,047$), Progesteronrezeptor-negativ sind ($p=0,004$) und ein hohes ypT-Stadium haben ($p=0,023$). Außerdem kam es bei Vorliegen eines positiven Knochenmarkstatus signifikant seltener zu einer pathologischen Komplettremission ($p=0,046$). Letzteres konnte die Arbeit von Fehm *et al.* ebenfalls zeigen, wohingegen die weiteren signifikanten Ergebnisse zwischen dem DTZ-Nachweis und einigen Prognoseparametern nicht bestätigt werden können (Fehm *et al.* 2006a).

Persistieren Tumorzellen nach einer adjuvanten Systemtherapie weiterhin im Knochenmark, gilt dies als besonders ungünstig (Janni *et al.* 2011; Wiedswang *et al.* 2004). Damit gelten DTZ als Surrogatmarker für die Persistenz einer minimalen residualen Tumorerkrankung.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und den untersuchten Überlebensdaten konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Allerdings zeigte sich auch hier, dass der Nachweis von DTZ im Knochenmark nach einer neoadjuvanten bzw. adjuvanten Systemtherapie tendenziell mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Bei Patientinnen mit einem positiven DTZ-Nachweis kam es häufiger zu Rezidiven als im DTZ-negativen Vergleichskollektiv ($p=0,134$). Die Ergebnisse verschiedener Studien stützen diese Beobachtung (Tabelle 45).

Tabelle 45: Zusammenfassung an Studien über den Nachweis von DTZ nach neoadjuvanter/ adjuvanter Systemtherapie und dessen prognostische Bedeutung

Therapieform	Patientenkollektiv N	Korrelation	p-value	Studie
adjuvant	55	Gesamtüberleben	0,011	Braun et al. 2000b
adjuvant	676	Gesamtüberleben Brustkrebs-assoziiertes Überleben Erkrankungsfreies Überleben	<0,001 <0,001 <0,001	Janni et al. 2011
neoadjuvant	95	Brustkrebs-assoziiertes Überleben	<0,02	Hall et al. 2012
neoadjuvant	231	Brustkrebs-assoziiertes Überleben Erkrankungsfreies Überleben	0,002 0,005	Mathiesen et al. 2012
neoadjuvant	400	Erkrankungsfreies Überleben	0,019	Hartkopf et al. 2013
adjuvant	190	Erkrankungsfreies Überleben	0,01	Gruber et al. 2014

Die reine Detektion von DTZ scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, um den Verlauf einer Mammakarzinomkrankung präzise vorherzusagen. Langzeitstudien zeigten, dass nicht alle Brustkrebspatientinnen mit positivem Knochenmarkbefund ein Rezidiv bzw. Metastasen entwickeln (Mansi *et al.* 1989, 1999). Es müssen also zelluläre Unterschiede vorliegen, welche die Metastasierungsbereitschaft der DTZ beeinflussen (*metastatic inefficiency*) (Fehm *et al.* 2002; Luzzi *et al.* 1998; Mehes *et al.* 2001). Eine nähere Charakterisierung der DTZ ist somit neben dem Nachweis essentiell um die Tumorthherapie zu optimieren und diese Zellen gezielt anzugreifen (Braun *et al.*

2000b). Stammzellmarker könnten für diese Charakterisierung eine wichtige Rolle spielen.

Studien zufolge sind nur wenige maligne Zellen mit Stammzeleigenschaften nötig um maligne Tumoren zu erzeugen (Bonnet *et al.* 1997; Lapidot *et al.* 1994). Beim Mammakarzinom konnte dies für Zellen mit einem CD44+/CD24- Phänotyp gezeigt werden (Al-Hajj *et al.* 2003). Die Prävalenz CD44+/CD24- Tumorzellen war zudem mit einem gehäuften Auftreten von Fernmetastasen assoziiert (Abraham *et al.* 2005). Balic *et al.* konnten den putativen Stammzellmarker CD44+/CD24- auch auf DTZ nachweisen (Balic *et al.* 2006). Auf zirkulierenden Tumorzellen (ZTZ) konnte bereits der Stammzellmarker Aldh1 detektiert werden (Aktas *et al.* 2009). Dies lässt vermuten, dass Tumorstammzellen sowohl für das Tumorstadium, als auch für die metastasenbildende Tumorausbreitung verantwortlich sind (Aktas *et al.* 2009). Es ist somit äußerst wichtig, weitere Marker zu finden mit denen Tumorstammzellen detektiert und weitergehend charakterisiert werden können um als Angriffspunkt für neue Therapieregime zu dienen.

4.2 Sox2-Expression auf DTZ

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Stammzellmarkern sowohl auf DTZ als auch im Primärtumor möglich ist.

Bei der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung für Stammzellmarker auf DTZ, konnten nur für den Primärantikörper Sox2 valide und auswertbare Ergebnisse erzielt werden, weshalb die Knochenmarkaspirate des Patientenkollektivs nur auf die Expression dieses Stammzellmarkers hin untersucht wurden. Hingegen konnten Primärtumoren mit allen drei Stammzellmarkern analysiert werden.

4.2.1 Sox2-Expression von DTZ und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren des Primärtumors

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte der Stammzellmarker Sox2 sowohl in DTZ als auch im Primärtumor nachgewiesen werden. In 31,4% der 70 Knochenmarkaspirate mit positivem DTZ-Nachweis konnten Sox2-positive Tumorzellen detektiert werden. Die restlichen 124 der 194 untersuchten Patientenproben waren DTZ-negativ. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von Sox2 auf DTZ und den oben aufgeführten klinisch-pathologischen Parametern wurde nicht beobachtet. Da es in der Literatur aktuell keine Studien gibt, die sich mit der Expression von Sox2 auf DTZ befassen, müssen unsere Ergebnisse an Hand eines größeren Kollektivs bestätigt werden.

4.2.2 Sox2-Expression von DTZ und Korrelation mit Überleben und Therapieresponse

Bezogen auf die Überlebensdaten und die Therapieresponse ergaben sich für die Sox2-Expression auf DTZ keine signifikanten Zusammenhänge. Der Anteil an pathologischen Komplettremissionen lag sowohl bei den Fällen mit Sox2-positiven DTZ, als auch bei den Patientinnen ohne Sox2-Nachweis auf DTZ bei ca. 20% ($p=0,636$).

Basierend auf unserem Kollektiv war ein positiver Sox2-Status mit weniger Rezidiven ($p=0,491$), Metastasen ($p=0,487$) und Todesfällen ($p=0,415$) assoziiert, allerdings zeigte sich keine statistisch relevante Signifikanz, was auf die geringen Fallzahlen zurückgeführt werden könnte. Generell gilt jedoch die Detektion von DTZ im Knochenmark als prognostisch ungünstig (Fortunato *et al.* 2009; Gebauer *et al.* 2001; Harbeck *et al.* 1994; Hartkopf *et al.* 2014; Mansi *et al.* 1999).

DTZ können für lange Zeit im Knochenmark latent vorliegen. Malladi *et al.* konnten in Tumorzellen, die im Mausmodell in der Lage sind, sich in Organen anzusiedeln ohne Metastasen zu bilden, nachweisen, dass derartige Zellen Stammzeleigenschaften besitzen und die Transkriptionsfaktoren Sox2 und

Sox9 exprimieren. Beide sind für das Überleben dieser *latency competent cancer cells* im jeweiligen Organ wichtig (Malladi *et al.* 2016).

4.3 Sox2-Expression im Primärtumor

4.3.1 Prä- und posttherapeutische Sox2-Expression und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren

Zwischen dem posttherapeutischen Sox2-Status und den untersuchten klinisch-pathologischen Faktoren konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang erhoben werden.

Für die prätherapeutischen Gewebeproben ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Sox2 und dem Lymphknotenstatus nach neoadjuvanter Chemotherapie ($p=0,012$). So wiesen Sox2-positive Tumore häufiger Lymphknotenmetastasen auf. Dieser Trend konnte auch für den prätherapeutischen Lymphknotenstatus beobachtet werden. Hier lag jedoch keine signifikante Korrelation vor ($p=0,200$). Außerdem waren prätherapeutisch Sox2-positive Tumore häufiger schlecht differenziert ($p=0,102$) und in einem fortgeschrittenen Stadium ($p=0,119$), allerdings bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Verschiedene Studien konnten identische Zusammenhänge aufzeigen (Abd El-Maqsoud *et al.* 2014; Ben-Porath *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008; Huang *et al.* 2014; Lengerke *et al.* 2011). Zudem beschrieben einige der erwähnten Arbeiten, dass die Sox2-Expressionsrate in Lymphknotenmetastasen höher ist, als im dazugehörigen Primärtumor (Abd El-Maqsoud *et al.* 2014; Huang *et al.* 2014; Lengerke *et al.* 2011). Für Patientinnen mit einem ausgedehnten Lymphknotenbefall konnten Huang *et al.* eine Sox2-Überexpression als unabhängigen Prognosefaktor bestätigen.

4.3.2 Prä- und posttherapeutische Sox2-Expression und Korrelation mit Überleben und Therapieresponse

Für die Sox2-Expression der posttherapeutischen Gewebeproben konnten keine relevanten Korrelationen mit den Überlebensdaten der Patientinnen gezeigt werden.

Im prätherapeutischen Kollektiv traten bei Sox2-positiven Tumoren häufiger als bei Sox2-negativen Tumoren Fernmetastasen auf. Eine statistisch relevante Korrelation lag nicht vor ($p=0,157$). Außerdem war die Gesamtüberlebenszeit bei Patientinnen mit Sox2-positiven Tumoren tendenziell kürzer, jedoch auch hier ohne signifikantem Zusammenhang ($p=0,121$). Letzteres konnte auch in der Studie von Finicelli *et al.* beobachtet werden, in welcher die Expression von Stammzellgenen beim primären Mammakarzinom mittels RT-PCR untersucht wurde. Zudem ergab diese Studie, dass Sox2-positive Patientinnen ein statistisch signifikant höheres Risiko haben ein Rezidiv zu entwickeln. Auch war das rezidivfreie Intervall von Sox2-positiven Tumoren kürzer. Sox2 scheint somit ein unabhängiger Prognosefaktor für das Auftreten eines Rezidivs zu sein (Finicelli *et al.* 2014). Weitere Studien konnten die Korrelation einer Sox2-Überexpression und einem kürzeren erkrankungsfreien Intervall (Huang *et al.* 2014), sowie einer höheren Mortalität bestätigen (Ben-Porath *et al.* 2008).

Insbesondere bei Mammakarzinomen vom Basal-Zell-Phänotyp kann eine Sox2-Expression nachgewiesen werden (Ben-Porath *et al.* 2008). Dabei scheint Sox2 an der Ausprägung dieses prognostisch ungünstigen Tumortyps beteiligt zu sein (Rodriguez-Pinilla *et al.* 2007).

Stolzenburg *et al.* konnte zeigen, dass eine Herunterregulation des Transkriptionsfaktors Sox2 in Mammakarzinom-Zelllinien zu einer verminderten Tumorzellproliferation führt (Stolzenburg *et al.* 2012).

Eine signifikante Korrelation zwischen dem prätherapeutischen Sox2-Status und der Therapieresponse konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden ($p=0,162$). Nur 11,8% der pathologischen Komplettremissionen waren Sox2-positive Tumore. Beobachtungen zeigten, dass eine hohe Sox2-Expression in chemoresistenten Zellen zu finden ist (Liu *et al.* 2013). Zudem scheinen Sox2-positive Zellen resistent gegenüber einer Tamoxifentherapie zu sein (Lin *et al.*

2013). Durch Herunterregulation der Sox2-Expression kann die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber Tamoxifen erhöht werden (Piva *et al.* 2014).

4.4 Korrelation prä- und posttherapeutische Sox2-Expression

Zwischen dem prä- und posttherapeutischen Sox2-Status des Primärtumors konnte in dieser Arbeit eine signifikante Korrelation beobachtet werden ($p=0,014$): Bei 85,3% der Patientinnen mit prätherapeutisch Sox2-negativem Tumor war der posttherapeutisch erhobene Status ebenfalls negativ. Bei der Hälfte der Patientinnen mit positivem prätherapeutischem Sox2-Status konnten im posttherapeutischen Primärtumor ebenfalls Sox2-positive Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Konkordanzrate zwischen der prä- und posttherapeutischen Sox2-Expression lag bei 76,3%. Trotz hoher Konkordanzrate von prä- und posttherapeutischem Sox2-Status unterschieden sich die beiden Gewebeproben doch deutlich in ihren Korrelationen bezüglich klinisch-pathologischer Faktoren und Überlebensdaten. Ursache für diese Diskrepanz könnte die geringe Anzahl an Fällen sein, für die sowohl prä- als auch posttherapeutische Gewebeproben vorhanden waren. Um die Zusammenhänge von prä- und posttherapeutischem Status und den untersuchten Parametern zu verifizieren, sollten die Beobachtungen an einer deutlich höheren Patientenzahl wiederholt werden.

4.5 Korrelation Sox2-Status von DTZ und dem Primärtumor

Zwischen dem Sox2-Status der DTZ und der prä- bzw. posttherapeutischen Gewebeprobe ergaben sich keine signifikanten Korrelationen (prätherapeutisch $p=0,610$; posttherapeutisch $p=0,290$). Auch andere Studien zeigten eine Diskrepanz der Expressionsmuster zwischen Primärtumor und DTZ auf (Braun *et al.* 2001; Fehm *et al.* 2008b).

Eine mögliche Erklärung könnte die klonale Heterogenität des Primarius sein. Bezogen auf die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass ein Sox2-positives Mammakarzinom auch Sox2-negative Zellen aufweist. Einzelne

Zellpopulationen verfügen somit über ein individuelles Proliferations- und Metastasierungspotential. Die Expression von Sox2 auf DTZ scheint sich günstig auf die Prognose auszuwirken, wohingegen ein positiver Sox2-Status des Primärtumors mit einem schlechten klinischen Outcome assoziiert ist. Daraus ließe sich schlussfolgern, dass nicht nur die Expression von Sox2 für die jeweilige Zelle wichtig ist, sondern auch die Nische, in der sie sich befindet. So hat das Zusammenwirken zwischen Tumorzellen und umgebenden Stroma eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression. Das Tumorstroma kann dabei günstigen oder ungünstigen Einfluss auf die Tumorentwicklung haben (Rizzo *et al.* 2008a). Eine unterschiedliche Funktion von Sox2 auf DTZ und im Primärtumor könnte ein weiterer Grund für die prognostische Diskrepanz sein. Zuletzt könnte auch die geringe Fallzahl die abweichende prognostische Bedeutung von Sox2 auf DTZ und im Primärtumor erklären.

Aktuell gibt es in der Literatur keine Studien, die sich mit der Expression des putativen Stammzellmarkers Sox2 auf DTZ befassen. Zur Validierung der Ergebnisse sollte eine identische Erhebung an einem größeren Patientenkollektiv durchgeführt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nur der Sox2-Status der prätherapeutischen Gewebeprobe signifikant mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert ($p=0,012$). So waren prätherapeutisch Sox2-positive Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert: Es handelte sich eher um schlecht differenzierte Tumoren ($p=0,102$) im fortgeschrittenen Stadium ($p=0,119$). Im Krankheitsverlauf kam es hier oftmals zu Fernmetastasen ($p=0,157$). Außerdem war das Gesamtüberleben bei Sox2-positiven Patientinnen tendenziell kürzer ($p=0,121$).

Interessanterweise wirkte sich ein positiver Sox2-Status auf DTZ eher günstig auf die klinische Prognose aus. Da in der Literatur bisher keine Arbeiten zu finden sind, die diese Ergebnisse bestätigen, ist es äußerst wichtig auf diesem Gebiet weiter Forschung zu betreiben, um im Besonderen die prognostische Bedeutung Sox2-positiver DTZ zu klären. Einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Therapieresponse und der Expression von Sox2

im Primarius bzw. der Detektion Sox2-positiver DTZ konnte nicht detektiert werden.

4.6 Aldh1-Expression im Primärtumor

4.6.1 Prä- und posttherapeutische Aldh1-Expression und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren

In dieser Arbeit ließ sich keine Korrelation zwischen prä- und posttherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors und den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern beobachten. Diese Ergebnisse entsprechen denen von de Brot *et al.*, die die Expression von Aldh1 in basalen und triple-negativen Mammakarzinomen untersucht haben (De Brot *et al.* 2012). Resetkova *et al.* konnten eine signifikante Korrelation von Aldh1-Expression und dem Differenzierungsgrad in prätherapeutischen Proben neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen beobachten. Für die Gewebeproben nach neoadjuvanter Therapie war dies nicht möglich. Eine weitere relevante Beziehung konnten Resetkova *et al.* in der Gruppe der adjuvant behandelten Patientinnen zwischen dem positiven Aldh1-Status und basalen sowie Her2-positiven Tumoren zeigen (Resetkova *et al.* 2010). Dieser Aspekt wurde auch in anderen Studien diskutiert (Duru *et al.* 2012; Korkaya *et al.* 2008; Lee *et al.* 2011; Morimoto *et al.* 2009; Reuben *et al.* 2011; Tsang *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2013). Vermutlich handelt es sich bei Aldh1-positiven Mammakarzinomen um Tumore mit einem aggressivem Phänotyp (Kang *et al.* 2014; Pan *et al.* 2015; Zhou *et al.* 2010).

4.6.2 Prä- und posttherapeutische Aldh1-Expression und Korrelation mit Überleben und Therapieresponse

Eine statistisch signifikante Relevanz zwischen der prätherapeutischen Expression von Aldh1 und der Therapieresponse konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Pathologische Komplettremissionen waren in 50% Aldh1-positive Mammakarzinome ($p=0,338$).

Es ergab sich weder für die prä- noch posttherapeutischen Gewebeproben eine signifikante Korrelation zwischen dem Aldh1-Status und den Überlebensdaten. Qiu *et al.* konnten ebenfalls für keine Aldh1-Isoform, mit Ausnahme von Aldh1A3, signifikante Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Faktoren oder Überlebensdaten finden. Nur für Aldh1A3 ergab sich eine positive Korrelation mit dem Auftreten von Fernmetastasen sowie dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben (Qiu *et al.* 2014).

Da für die hier durchgeführten Experimente ein monoklonaler Aldh1A1-Antikörper verwendet wurde, könnte dies der Grund für das Fehlen relevanter Beziehungen zwischen einer Aldh1-Expression und den untersuchten Parametern sein. Opdenaker *et al.* konnten ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge für Aldh1A1 finden (Opdenaker *et al.* 2014).

Weitere Studien bestätigen, dass die Aldh-Aktivität von Tumorstammzellen vor allem der Aldh1A3-Expression zuzuschreiben ist. Nur durch Ausschalten von Aldh1A3 konnte die Aldh-Aktivität in Tumorzellen gleichmäßig vermindert werden (Marcato *et al.* 2011a).

Ob der Aldh1-Status einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf beim Mammakarzinom hat, konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden. Mehrere Studien sahen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Aldh1-Status und den Überlebensdaten (Morimoto *et al.* 2009; Neumeister *et al.* 2010; Resetkova *et al.* 2010; Tan *et al.* 2013). Wohingegen andere Arbeitsgruppen beobachteten, dass die Expression von Aldh mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Charafe-Jauffret *et al.* 2010; Croker *et al.* 2009; Ginestier *et al.* 2007; Woodward *et al.* 2014; Zhong *et al.* 2013) (Tabelle 46).

Tabelle 46: Zusammenfassung immunhistochemischer Studien über die Detektion von Aldh-Isoformen und ihr Vorkommen beim Mammakarzinom (Marcato et al. 2011b)

Aldh-Isoform	Karzinom	Patientenkollektiv	Schlechte Prognose/ aggressiver Tumor	Keine Korrelation	Studie
Aldh1A1	Mamma	577	X		Ginestier et al. 2007
Aldh1A1	Mamma	203		X	Morimoto et al. 2009
Aldh1A1	Mamma	381		X	Resetkova et al. 2009
Aldh1A1	Mamma	109	X		Charafe-Jauffret et al. 2010
Aldh1A1	Mamma	639		X	Neumeister et al. 2010
Aldh1A1	Mamma	47		X	Marcato et al. 2011a
Aldh1A1	Mamma	147	X		Zhong et al. 2013
Aldh1A3	Mamma	47	X		Marcato et al. 2011a
Aldh2	Mamma	47	X		Marcato et al. 2011a
Aldh4A1	Mamma	47		X	Marcato et al. 2011a

4.7 Korrelation prä- und posttherapeutische Aldh1-Expression

Zwischen dem prä- und posttherapeutischen Aldh1-Status des Primärtumors konnte in der vorliegenden Arbeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($p=0,376$).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit weder für die prä- noch für die posttherapeutischen Gewebeproben signifikante Korrelationen des Aldh1-Status mit den untersuchten klinisch-pathologischen Faktoren sowie den

Überlebensdaten beobachtet werden. Auch ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Aldh1-Expression und der Therapieresponse. Ein Grund für die fehlende Signifikanz könnte die Verwendung eines monoklonalen Aldh1A1-Antikörpers sein. Verschiedene Studien berichteten, dass vor allem die Aldh1A3-Isoform in Tumoren aktiv ist. Unter diesem Gesichtspunkt sollten weitere Experimente das Auftreten verschiedener Aldh1-Isoformen in Tumoren vergleichen und die evtl. bestehenden Korrelationen mit klinischen Parametern und dem Überleben überprüfen.

4.8 Notch1-Expression im Primärtumor

4.8.1 Prä- und posttherapeutische Notch1-Expression und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren

Für den Notch1-Status der prätherapeutischen Gewebeproben bestand ein signifikanter Zusammenhang mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus: So korrelierte in der vorliegenden Arbeit die Notch1-Expression mit einem negativen Hormonrezeptorstatus (ER: $p=0,001$; PR: $p=0,007$). Speiser et al. konnten dies in ihrer Arbeit bestätigen (Speiser *et al.* 2012). In Östrogenrezeptor-positiven Zellen wird die Notch-Aktivität durch Estradiol gehemmt. Tamoxifen kann diesen Effekt abblocken und die Notch1-Aktivität wiederherstellen (Rizzo *et al.* 2008b). Bezüglich der Her2-Expression zeigte sich im untersuchten Patientenkollektiv, dass Notch1-positive Tumoren häufiger einen negativen Her2-Rezeptorstatus hatten, jedoch ohne relevante Signifikanz ($p=0,247$). In der Literatur werden für den Nachweis von Notch1 und der Überexpression des Her2-Rezeptors sowohl positive als auch negative Zusammenhänge beschrieben. So konnten Zardawi et al. eine signifikante Korrelation zwischen einer hohen Expression des Notch1-Proteins und dem Her2-positiven Subtyp beobachten (Zardawi *et al.* 2010). Dagegen zeigte die Studie von Hirose et al. einen signifikanten Zusammenhang von positivem Notch1-Status und fehlender Expression von Her2 (Hirose *et al.* 2010). Letztere könnte richtungsweisend für die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit sein.

Osipo et al. konnten zudem zeigen, dass eine Überexpression des Her2-Rezeptors in Brustkrebszellen die Transkriptionsaktivität von Notch1 unterdrückt und die Inhibition von Her2 mittels Trastuzumab oder (EGFR)/Her2-Tyrosinkinase-Hemmer zur Reaktivierung der Notch1-Aktivität führt (Osipo *et al.* 2008). In Tumoren mit negativem Östrogen- und Her2-Rezeptorstatus scheint Notch1 am stärksten exprimiert zu werden (Rizzo *et al.* 2008b). Dies konnte in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Magnifico et al. beschrieben jedoch, dass der Notch1-Signalweg direkten Einfluss auf die Her2-Expression in Tumor-initiiierenden Zellen hat und somit die Hemmung von Notch1 mit einem verminderten Expressionslevel des Her2-Rezeptors einhergeht (Magnifico *et al.* 2009). Die diskrepanten Beobachtungen, bezogen auf den Her2-Rezeptor, könnten durch die Untersuchung verschiedener Komponenten des Notch-Signalweges oder durch den Vergleich unterschiedlicher Parameter, z.B. Protein und mRNA, entstehen (Zardawi *et al.* 2010).

Für die postoperativen Gewebeproben ergab sich eine Korrelation zwischen einem positiven Notch1-Status und dem Differenzierungsgrad des Tumors, welche jedoch nicht signifikant war ($p=0,130$). In der Gruppe der Tumoren mit einem G3-Status war der Anteil an Notch1-positiven Tumoren größer als in der Gruppe der gut bis mäßig differenzierten Karzinome. Dies konnte in anderen Studien ebenfalls dargelegt werden (Hua *et al.* 2009; Parr *et al.* 2004; Yao *et al.* 2011).

Tendenziell waren auch im posttherapeutischen Patientenkollektiv die Östrogenrezeptor-positiven Tumore häufiger Notch1-negativ ($p=0,062$). Der Anteil an Her2-negativen Karzinomen war bei Patientinnen mit einer nachgewiesenen Notch1-Expression höher ($p=0,189$). Beides spiegelt die Ergebnisse der prätherapeutisch durchgeführten Untersuchungen wieder, war für die posttherapeutischen Gewebeproben jedoch ohne Signifikanz.

4.8.2 Prä- und posttherapeutische Notch1-Expression und Korrelation mit Überleben und Therapieresponse

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der prätherapeutischen Notch1-Expression im Primärtumor und der Therapieresponse konnte nicht beobachtet werden ($p=0,526$). Bei 33,3% der Mammakarzinome mit Komplettremission nach neoadjuvanter Systemtherapie handelte es sich um Notch1-positive Tumore.

Bezüglich der Überlebensdaten ergab sich weder für die prä- noch für die posttherapeutischen Gewebeproben eine signifikante Korrelation. In einer aktuellen Metaanalyse von Yuan *et al.* hatten Patientinnen mit einer hohen Expression des Notch1-Rezeptors eine signifikant schlechtere Prognose sowohl im Gesamt- als auch im rezidivfreien Überleben (Yuan *et al.* 2015). Ältere Studien bestärken diese Ergebnisse (Farnie *et al.* 2007; Osipo *et al.* 2008; Parr *et al.* 2004; Reedijk *et al.* 2005; Rizzo *et al.* 2008b; Wang *et al.* 2010).

Des Weiteren konnte von Peng *et al.* gezeigt werden, dass eine Blockade des Notch1-Stoffwechselwegs das maligne Verhalten von Tumorstammzellen beim Mammakarzinom hemmt (Peng *et al.* 2014). Eine Tumorregression und die Unterdrückung der Rezidivkrankung durch die Hemmung des Notch1-Signalwegs konnte die Studie von Simmons *et al.* darlegen (Simmons *et al.* 2012). Weiterhin kommt es durch Herunterregulierung der Notch1-Expression zur Apoptoseinduktion und somit zur Hemmung des Tumorzellwachstums (Zang *et al.* 2010). Eine gemeinsame Unterdrückung des EGF- und Notch-Rezeptors schränkt das Tumorstadium deutlich mehr ein, als die Blockade einer der beiden Signalwege (Dong *et al.* 2010).

4.9 Korrelation prä- und posttherapeutische Notch1-Expression

Zwischen dem prä- und posttherapeutischen Notch1-Status des Primärtumors zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Korrelation ($p=0,003$): So wiesen 86,7% der prätherapeutisch Notch1-negativen Patientinnen auch

posttherapeutisch einen negativen Status auf. Bei den Notch1-positiven Fällen konnten bei 58,3% sowohl in der prä- als auch in der posttherapeutischen Gewebeprobe Notch1-positive Tumorzellen detektiert werden. Dies entspricht einer Konkordanzrate von 73,9%. Trotzdem unterschieden sich auch hier die prä- und posttherapeutischen Gewebeproben in den Korrelationen bezüglich klinisch-pathologischen Faktoren und Überlebensdaten. Ursache für diese Diskrepanz könnte, wie bei Sox2, die geringe Anzahl an Fällen sein, für die sowohl prä- als auch posttherapeutische Proben untersucht wurden. Um die Zusammenhänge von prä- und posttherapeutischem Status und den untersuchten Parametern zu bestärken, sollten die Beobachtungen an einer deutlich höheren Patientenzahl wiederholt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit für den Notch1-Status beim Mammakarzinom kein signifikanter Zusammenhang mit den Überlebensdaten und der Therapieresponse beobachtet werden. Entsprechend der aktuellen Literatur scheint jedoch eine positive Notch1-Expression mit einer schlechteren Prognose einherzugehen.

Bei den prätherapeutischen Notch1-positiven Gewebeproben handelte es sich signifikant häufiger um Hormonrezeptor-negative Tumoren (ER: $p=0,001$; PR: $p=0,007$). Auch wiesen Notch1-positive Tumoren öfters einen negativen Her2-Rezeptorstatus auf, was statistisch jedoch nicht relevant war ($p=0,247$). Triple-negative Tumoren gelten als aggressiver und sind somit für den weiteren Erkrankungsverlauf ungünstig. Histologisch betrachtet waren es fast ausschließlich invasiv duktale Karzinome, bei denen eine Notch1-Expression nachgewiesen werden konnte ($p=0,061$).

In den posttherapeutischen Gewebeproben waren es die schlecht differenzierten Tumore ($p=0,130$) mit negativem Östrogenrezeptorstatus ($p=0,062$) bzw. Her2-Status ($p=0,189$), die eine Notch1-Expression aufwiesen. Hier lag keine statistische Signifikanz vor.

4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Beim Mammakarzinom ist der Nachweis der Stammzellmarker Notch1 und Sox2 mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Ben-Porath *et al.* 2008; Finicelli *et al.* 2014; Huang *et al.* 2014; Yuan *et al.* 2015). Tumoren, welche diese Marker exprimieren, scheinen aggressiver zu sein, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte: Sie waren häufig schlecht differenziert und bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Zudem waren Tumoren mit einer Notch1-Expression häufiger Hormonrezeptor- und Her2-Rezeptor-negativ.

Für Aldh1 ist es äußerst wichtig, die verschiedenen Isoformen getrennt zu beurteilen, um herauszufinden, welche von ihnen Auswirkung auf das Tumorgeschehen hat. In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen prä- bzw. posttherapeutischem Aldh1-Status und den untersuchten klinisch-pathologischen Faktoren sowie den Überlebensdaten beobachtet werden.

Auf Grund der geringen Größe des untersuchten Patientenkollektivs konnten für den Vergleich der Expression von Stammzellmarkern vor und nach neoadjuvanter Systemtherapie und deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren und Überlebensdaten keine richtungsweisenden Ergebnisse erzielt werden. Die Aussagekraft des Stammzellnachweises im Primärtumor vor und nach Neoadjuvanz sollte durch Untersuchungen an einer größeren Patientengruppe geklärt werden.

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expression der Stammzellmarker Aldh1, Notch1 und Sox2 bzw. Sox2-positiven DTZ und der Therapieresponse konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Welchen Einfluss disseminierte Tumorzellen mit Stammzellcharakter auf den Krankheitsverlauf haben, muss daher an größeren Kohorten untersucht werden. Generell ist die Detektion von DTZ im Knochenmark mit einer schlechten Prognose assoziiert. In der vorliegenden Arbeit wirkte sich jedoch der Nachweis von DTZ mit positivem Sox2-Status günstig auf das Gesamtüberleben sowie das Auftreten von Metastasen und Rezidiven aus. Dagegen führte ein positiver Sox2-Status im Primarius zu einem schlechten klinischen Outcome. Das Zusammenwirken von Tumorzelle und umgebendem Stroma oder abweichende

Funktionen von Sox2 auf DTZ und in Tumorzellen könnten diese Diskrepanz erklären. Zwischen dem Sox2-Status der DTZ und der prä- bzw. posttherapeutischen Gewebeprobe bestand kein Zusammenhang.

Der Einfluss von Sox2-positiven DTZ auf die Prognose sollte weiter untersucht werden, da auch diese Zellen Angriffspunkt für neue Therapieschemata sein könnten.

Vermutlich können Stammzellmarker als prognostische Marker für den klinischen Verlauf von Tumoren dienen und somit die individuelle Therapieauswahl für Patientinnen mit einem Mammakarzinom ermöglichen. Ihre Aussagekraft als prädiktive Marker für das Ansprechen einer bestimmten Therapieform konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig beurteilt werden.

4.11 Konsequenzen für die Therapie

Da das Mammakarzinom schon im sehr frühen Stadium Zellen an die Peripherie abgibt (Hüsemann *et al.* 2008), ist es von Bedeutung diese Erkrankung systemisch zu behandeln. Wichtig ist zudem, unter Einbezug des Expressionsmuster des Primärtumors und der jeweiligen Erkrankungssituation, eine individuelle Therapie für jede Patientin zu finden. Allerdings kann beim Nachweis disseminierter Tumorzellen auch eine Diskrepanz der Oberflächenantigene zum Primarius bestehen (Braun *et al.* 1999, 2001; Fehm *et al.* 2008b; Pantel *et al.* 1993; Solomayer *et al.* 2006). Da diese Zellen als Surrogatmarker der minimal residualen Tumorerkrankung gelten und ein potentielles Ziel zukünftiger Therapien darstellen, sollten sie näher charakterisiert werden.

Tumorstammzellen scheinen die Subpopulation an Zellen zu sein, die für die Entstehung, die Aufrechterhaltung und das Wiederauftreten von Malignomen verantwortlich sind. Somit sind die genaue Typisierung und die Eliminierung dieser Zellen bedeutend für eine kurative Therapiestrategie.

4.11.1 Zielgerichtete Therapie gegen Tumorstammzellen

Die zielgerichtete Therapie gegen Tumorstammzellen bietet neue Möglichkeiten zur Erweiterung und Optimierung individueller Therapieschemata beim Mammakarzinom. Tumorstammzellen sind mit den bisher angewendeten Therapieformen nur schwer zu erreichen. In der hier vorliegenden Arbeit konnten auch nach neoadjuvanter Systemtherapie Tumorstammzellen im Primarius nachgewiesen werden. Dies traf auf alle drei untersuchten Stammzellmarker zu. Grund für die Persistenz der Tumorstammzellen könnte ihre geringe Zellteilungsrate und die hohe Anzahl membranständiger Transportproteine sein. Somit könnten Tumorstammzellen für die Entstehung lokaler Krankheitsrezidive verantwortlich sein. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen in die Blutbahn gelangen und Fernmetastasen verursachen. Die genaue Identifikation und Charakterisierung von Krebsstammzellen könnte die Entwicklung neuer Therapieansätze ermöglichen, die gezielt gegen tumorstammzellspezifische Oberflächenantigene ausgerichtet sind. Ein potentieller Angriffspunkt könnten dabei die spezifischen Transportwege von Tumorstammzellen sein. Durch spezifische Hemmung könnten Brustkrebsstammzellen beseitigt werden.

Viele Studien beschäftigen sich derzeit mit der Suche nach Wirkstoffen, die zur Eliminierung der Tumorstammzellen beitragen könnten:

So reduziert das Polyether-Antibiotikum Salinomycin den Anteil an Tumorstammzellen beim Mammakarzinom über ein 100faches gegenüber dem Chemotherapeutikum Paclitaxel. Im Mausmodell hemmt Salinomycin das Wachstum der Mammakarzinomzellen und führt zur Apoptose sowie Nekrose der Tumorzellen. Durch die Behandlung mit Salinomycin kommt es außerdem zum Verlust von Genen, die mit Tumorstammzellen assoziiert sind (Gupta *et al.* 2009). So vermindert Salinomycin die Expression des Stammzellmarkers Sox2 in Mammosphären (Oak *et al.* 2012). Dies könnte sich günstig auf den Krankheitsverlauf und die Prognose auswirken. Eine hohe Sox2-Expression könnte Grund für die Chemoresistenz der Zellen sein (Liu *et al.* 2013). Die Hemmung des Sox2-Stoffwechselweges könnte das Therapieansprechen verbessern.

Mikro-RNS haben eine zentrale Rolle bei der Regulation von Tumorstammzellen. Beim Mammakarzinom ist die MikroRNS-34a herunterreguliert (Kang *et al.* 2015). Sie fungiert als wichtiger Tumorsuppressor und ist in Tumorstammzellen unterdrückt. Durch Re-Expression ist die Mikro-RNS-34a imstande die tumorgene Aktivität von Tumorstammzellen zu hemmen (Wu, *et al.* 2014). Beim Mammakarzinom kann so Tumorwachstum, Migration und Invasion vermindert werden (Li *et al.* 2012).

Ein weiteres mögliches Therapietarget von Tumorstammzellen ist die Carboanhydrase. Dieses Protein kann durch Herbeiführen einer Hypoxie das Überleben von Tumorzellen sowie deren Eindringen in ein hypoxisches Milieu begünstigen. Außerdem ist es für die Expression von EMT-Marker und EMT-Regulatoren sowie für die Ausprägung von Stammzeleigenschaften erforderlich. Beim Mammakarzinom ist der Nachweis der Carboanhydrase mit einer schlechten Prognose assoziiert. Gleichzeitig kann durch Hemmung dieses Proteins die Ausbreitung der Tumorstammzellen vermindert werden. In Kombination mit Paclitaxel kommt es zur weiteren Herabsetzung des Tumorwachstums und zur Rückbildung von Lungenmetastasen (Lock *et al.* 2013).

Tranilast wird originär als Antiallergikum eingesetzt. Es scheint jedoch auch die Expression von Stammzellmarkern beim Mammakarzinom herabzusetzen. Sowohl in Her2-positiven als auch in triple-negativen Tumoren konnte seine Wirksamkeit beobachtet werden. Angriffspunkt ist der Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor (Prud'homme *et al.* 2010).

Darüber hinaus wird das maligne Verhalten von Tumorstammzellen durch die Blockade des Notch1-Stoffwechselwegs herabgesetzt (Peng *et al.* 2014). Zwei Therapieoptionen zur Behandlung Notch1-positiver Tumoren sind der Einsatz von Gamma-Sekretase-Inhibitoren und die Entwicklung von Antikörpern gegen den Notch-Rezeptor (Groth *et al.* 2012):

Gamma-Sekretase-Inhibitoren führen zu einer Inaktivierung des Notch1-Signalweges (Dontu *et al.* 2004b; Schott *et al.* 2013; Zang *et al.* 2007). Ihren Ursprung haben diese Stoffe in der Therapie von Morbus Alzheimer. Durch den Einsatz von Gamma-Sekretase-Inhibitoren kommt es beim Mammakarzinom zur Reduktion von Tumorstammzellen (Schott *et al.* 2013).

Die Hemmung von Notch1 und Ras mittels monoklonaler Antikörper reduziert signifikant die Tumorzellproliferation und das Überleben der Tumorzellen. Insbesondere für die Therapie triple-negativer Tumoren stellt dies eine mögliche Therapieoption dar (Mittal *et al.* 2014). Die Studie von Sharma *et al.* bestätigt, dass spezifische, gegen den Notch-Rezeptor gerichtete Antikörper eine potentielle Therapieform zur Reduktion von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften darstellen. Der Effekt den der Antikörper dabei auf die mutmaßlichen Stammzellen hat, scheint irreversibel zu sein (Sharma *et al.* 2012).

Die Blockade des Notch1-Signalwegs kann jedoch zu gastrointestinaler Toxizität und Diarrhö führen. Vor allem bei der Verwendung von Gamma-Sekretase-Inhibitoren ist dies häufig zu beobachten (Garber *et al.* 2007; Rizzo *et al.* 2008a). Ein genaues Anpassen der Dosis ist somit essentiell. Durch eine intermittierende Verabreichung können die intestinalen Nebenwirkungen ebenfalls verbessert werden (Rizzo *et al.* 2008a).

Des Weiteren kann der Notch1-Signalweg durch den pflanzlichen Stoff Psoralidin herunter reguliert werden. Dadurch wird das Zellwachstum gestoppt und die EMT von Tumorzellen und Tumorstammzellen gehemmt (Suman *et al.* 2013).

Der Einfluss von Aldh1 auf den Krankheitsverlauf beim Mammakarzinom konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden. So vermuten manche Studien, dass es sich bei Aldh1-positiven Mammakarzinomen um Tumoren mit einem aggressiven Phänotyp handelt. Die Expression von Aldh1 steht dabei in signifikantem Zusammenhang mit Markern, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, wie z.B. ein negativer Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus, eine hohe Ki67-Expression, ein niedriger

Differenzierungsgrad, ein hohes T-Stadium oder ein positiver Her2-Status (Kang *et al.* 2014; Morimoto *et al.* 2009; Pan *et al.* 2015; Zhou *et al.* 2010).

Eine Option Aldh-positive Tumoren zielgerichtet anzugreifen, stellt Disulfiram dar. Disulfiram wird in der Klinik zur Behandlung der Alkoholabhängigkeit eingesetzt. Als irreversibler Hemmstoff der Aldehyddehydrogenase könnte Disulfiram aber auch in der Behandlung von Karzinomen eingesetzt werden (Liu *et al.* 2012; Wang *et al.* 2011). Chen *et al.* konnte beobachten, dass Disulfiram beim Mammakarzinom zur Einschränkung des Tumorwachstums und zur Apoptoseinduktion führt (Chen *et al.* 2006). Tumorstammzellen dienen vermutlich als Angriffspunkt (Yip *et al.*, 2011). Zudem scheint Disulfiram die Zytotoxizität von Chemotherapeutika in Mammakarzinom-Zelllinien zu verbessern (Yip *et al.* 2011). Dies konnte auch in triple-negativen Tumoren und inflammatorischen Mammakarzinomen beobachtet werden (Allensworth *et al.* 2015; Liu *et al.* 2013).

Darüber hinaus kann eine Vorbehandlung mit All-trans-Retinsäure (ATRA) oder Diethylaminobenzaldehyden (DEAB) Aldh1-positive Mammakarzinomzellen empfindlicher gegenüber Chemo- und Radiotherapie machen (Crocker *et al.* 2012). Die Subpopulation von Tumorstammzellen kann so verringert werden (Ginestier *et al.* 2009).

Die Therapiemöglichkeiten zur Eliminierung von Tumorstammzellen erscheinen vielfältig (Tabelle 47). Welche Stoffe im klinischen Alltag zur Anwendung kommen, bleibt jedoch abzuwarten. Bedeutend ist nun die klinischen Studien weiter voranzutreiben und die gezielte Therapie gegen Tumorstammzellen in die bestehenden Krebstherapien einzugliedern.

Tabelle 47: Übersicht der Therapien gegen Tumorstammzellen

Therapietarget	Substanz	Studie
Sox2	Salinomycin	Oak et al. 2012
MikroRNS-34a	T-VISA-miR-34a	Li et al. 2012
Carboanhydrase	<i>Small- molecule inhibitors</i>	Lock et al. 2013
Akrylkohlenwasserstoff-Rezeptor	Tranilast	Prud'homme et al. 2010
Notch1	Gamma-Sekretase-Inhibitor	Schott et al. 2013
	Psoralidin	Suman et al. 2013
	Antikörper	Sharma et al. 2012
Aldh1	Disulfiram	Yip et al. 2011
	All-trans-Retinsäure (ATRA), Diethylaminobenzaldehyden (DEAB)	Ginestier et al. 2009

5 Zusammenfassung

Zielsetzung: Tumorstammzellen könnten der Grund für die Entstehung, das Fortschreiten und das Wiederauftreten von Karzinomen sein. Beim Mammakarzinom konnten bereits in zahlreichen Studien positive Korrelationen zwischen dem Nachweis von Tumorstammzellen und aggressiven Tumortypen sowie einer schlechten Prognose beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob bei neoadjuvant behandelten Mammakarzinompatientinnen ein Zusammenhang zwischen der Expression der Stammzellmarker Sox2, Notch1 und Aldh1 im Primärtumor bzw. auf disseminierten Tumorzellen (DTZ) und klinisch-pathologischen Faktoren sowie dem Therapieansprechen und den Überlebensdaten besteht.

Material und Methoden: Zunächst wurden alle an der Universitätsfrauenklinik Tübingen neoadjuvant behandelten Mammakarzinompatientinnen der Jahre 2001 bis 2011 in einer Datenbank zusammengefasst. Knochenmarkaspirate von 194 Patientinnen mit abgeschlossener neoadjuvanter Chemotherapie sowie 74 prätherapeutische und 65 posttherapeutische Gewebeproben konnten im Rahmen dieser Arbeit immunhistochemisch analysiert werden. Für die DTZ-Analyse konnte nur für Sox2 eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung etabliert werden. Für die Stammzellmarker Aldh1 und Notch1 hingegen ließen sich keine reproduzierbaren Färbeprotokolle für DTZ entwickeln. Der immunhistochemische Nachweis der Stammzellmarker Aldh1 und Notch1 wurde somit nur im Primärtumor durchgeführt.

Ergebnisse: In 31,4% der 70 DTZ-positiven Knochenmarkaspirate konnten Sox2-positive Tumorzellen detektiert werden. Die restlichen 124 der 194 untersuchten Patientenproben waren DTZ-negativ.

Die Expression von Sox2 auf DTZ und im Primarius zeigten keine Korrelation. Der Sox2-Status der prätherapeutischen Gewebeprobe korrelierte signifikant mit einem positiven Lymphknotenstatus nach neoadjuvanter Chemotherapie

($p=0,012$). Zudem waren prätherapeutisch Sox2-positive Tumoren häufiger schlechter differenziert ($p=0,102$) und in einem fortgeschrittenen Stadium ($p=0,119$), jedoch ohne statistische Signifikanz. Im Verlauf traten hier häufiger Fernmetastasen auf (47,1% vs. 26,9%). Außerdem verstarben mehr Sox2-positiven Patientinnen (47,1% vs. 28,1%). Hingegen wirkte sich der Nachweis von Sox2 auf DTZ günstiger auf die klinische Prognose aus, da die Patientinnen tendenziell weniger Metastasen und Rezidive entwickelten und weniger Todesfälle auftraten.

Ein Zusammenhang zwischen der Expression von Sox2 in den prätherapeutischen Gewebeproben bzw. der Detektion Sox2-positiver DTZ und der Therapieresponse ergab sich nicht.

Für den Stammzellmarker Aldh1 ergaben sich weder für die prä- noch für die posttherapeutischen Gewebeproben signifikante Zusammenhänge mit den untersuchten Parametern.

Die prätherapeutische Notch1-Expression korrelierte signifikant mit einem negativen Hormonrezeptorstatus (ER: $p=0,001$; PR: $p=0,007$). Notch1-positive Tumoren wiesen tendenziell häufiger einen negativen Her2-Rezeptorstatus auf ($p=0,247$). Die posttherapeutische Notch1-Expression korrelierte mit einer schlechten Differenzierung ($p=0,130$). Auch hier wiesen Notch1-positive Mammakarzinome häufiger einen negativen Östrogenrezeptor- bzw. Her2-Rezeptorstatus auf. Eine statistisch relevante Korrelation ergab sich nicht. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Notch1-Status und Überlebensdaten oder der Therapieresponse konnte nicht beobachtet werden. Nur für Sox2 und Notch1 konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem prä- und posttherapeutischen Status des Primärtumors beobachtet werden (Sox2: $p=0,014$; Notch1: $p=0,003$).

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis der Stammzellmarker Notch1 und Sox2 beim Mammakarzinom mit einem aggressiven Phänotyp assoziiert ist. Zudem wirkte sich ein positiver Sox2-

Status im Primärtumor ungünstig auf die Prognose aus. Interessanterweise hatte die Expression von Sox2 auf DTZ einen positiven Einfluss auf das klinische Outcome der Patientinnen.

Eine Korrelation zwischen der Expression von Stammzellmarkern im Primärtumor bzw. auf DTZ und der Therapieresponse war nicht zu beobachten. Jedoch konnten auch nach neoadjuvanter Systemtherapie Tumorstammzellen im Knochenmark bzw. Primärtumor nachgewiesen werden. Die genaue Identifikation und Charakterisierung dieser Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften könnte für die Entwicklung neuer innovativer Therapieansätze bedeutend sein.

Die potentiellen Therapiemöglichkeiten zur Eliminierung von Tumorstammzellen erscheinen vielfältig und sollten in klinischen Studien - auch unter Einbeziehung der minimalen Resterkrankung – initiiert werden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung von Tumorstammzellen 1	8
Abbildung 2: Entstehung von Tumorstammzellen 2	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der aufbereiteten Knochenmarksuspensionen mittels Dichtegradientenzentrifugation	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbau	33
Abbildung 5: Schematische Darstellung der einzelnen Färbeschritte der Immunfluoreszenzfärbung für den Sox2-Antikörper auf Knochenmarkaspiraten von Patientinnen.....	36
Abbildung 6: Sox2 Immunfluoreszenz Doppelfärbung (HT-29 Zelllinie, 63-fache Vergrößerung)	38
Abbildung 7: Sox2 Immunfluoreszenz Einzelfärbung (HES, 63-fache Vergrößerung).....	38
Abbildung 8: DTZ-Status: Rezidivfreie Zeit in Monaten.....	43
Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung von Sox2-positiven DTZ im untersuchten Patientinnenkollektiv.....	45
Abbildung 10: (A)-(D): Beispiele für Sox2 positive DTZ aus Knochenmarkaspiraten verschiedener Patientinnen (63-fache Vergrößerung)	46
Abbildung 11: Sox2-Status von DTZ: Metastasenfreie Zeit in Monaten (Metastasen bei Erstdiagnose ausgeschlossen)	48
Abbildung 12: Sox2-Status von DTZ: Überlebenszeit in Monaten.....	49
Abbildung 13: Sox2-Status von DTZ: Rezidivfreie Zeit in Monaten	50
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung auf Aldh1 Expression an prä- und posttherapeutischem Gewebe neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen (20-fache Vergrößerung).....	52
Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung auf Notch1 Expression an prä- und posttherapeutischem Gewebe neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen (20-fache Vergrößerung).....	59

Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung auf Sox2 Expression an prä- und posttherapeutischem Gewebe neoadjuvant behandelter Mammakarzinompatientinnen (20-fache Vergrößerung).....	67
Abbildung 17: Prätherapeutischer Sox2-Status: Überlebenszeit in Monaten .	71
Abbildung 18: Prätherapeutischer Sox2-Status: Metastasenfreie Zeit in Monaten (Metastasen bei Erstdiagnose ausgeschlossen)	72

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (Goldhirsch et al.2011)	2
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien.....	15
Tabelle 3: Kulturmedien und Medienbestandteile.....	15
Tabelle 4: Primärantikörper	16
Tabelle 5: Sekundärantikörper.....	16
Tabelle 6: Normalseren	17
Tabelle 7: Peptide.....	17
Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 10: Geräte, Laborbedarf.....	18
Tabelle 11: Software.....	19
Tabelle 12: Fluoreszenzspektren der verwendeten Filter	26
Tabelle 13: Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	27
Tabelle 14: Einteilung der DTZ nach der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection (Borgen et al. 1999)	28
Tabelle 15: Kriterien zur Identifikation von Tumorzellen (Fehm et al. 2006b)..	28
Tabelle 16: Punktesystem zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung für Sox2 und Aldh1 (Pham et al. 2013).	31
Tabelle 17: Punktesystem zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung für Notch1.....	32
Tabelle 18: Tabellarische Erfassung der bei der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung getesteten Parametern.....	35
Tabelle 19: Optimale Verdünnung der etablierten Stammzellmarker und Sekundärantikörper	37
Tabelle 20: Klinisch-pathologische Daten des Patientenkollektivs	40
Tabelle 21: Korrelation des DTZ-Status mit klinisch-pathologischen Faktoren	42
Tabelle 22: Korrelation des DTZ-Status mit Therapieresponse und Überlebensdaten	44

Tabelle 23: Korrelation des Sox2-Status von DTZ mit klinisch-pathologischen Faktoren	47
Tabelle 24: Korrelation des Sox2-Status von DTZ mit Therapieresponse und Überlebensdaten	50
Tabelle 25: Häufigkeitsverteilung des Aldh1-Scores der prä- und posttherapeutischen Gewebeprobe.....	51
Tabelle 26: Korrelation von prätherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	54
Tabelle 27: Korrelation von posttherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	55
Tabelle 28: Korrelation von prätherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten	56
Tabelle 29: Korrelation von posttherapeutischem Aldh1-Status des Primärtumors mit Überlebensdaten.....	57
Tabelle 30: Korrelation des Aldh1-Status von prä- und posttherapeutischem Tumor.....	58
Tabelle 31: Häufigkeitsverteilung des Notch1-Scores der prä- und posttherapeutischen Gewebeprobe.....	58
Tabelle 32: Korrelation von prätherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	62
Tabelle 33: Korrelation von posttherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	63
Tabelle 34: Korrelation von prätherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten	64
Tabelle 35: Korrelation von posttherapeutischem Notch1-Status des Primärtumors mit Überlebensdaten.....	65
Tabelle 36: Korrelation des Notch1-Status von prä- und posttherapeutischem Tumor.....	66
Tabelle 37: Häufigkeitsverteilung des Sox2-Scores der prätherapeutischen und posttherapeutischen Gewebeprobe.....	66
Tabelle 38: Korrelation von prätherapeutischem Sox2-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	69

Tabelle 39: Korrelation von posttherapeutischem Sox2-Status des Primärtumors mit klinisch-pathologischen Faktoren	70
Tabelle 40: Korrelation von prätherapeutischem Sox2-Status des Primärtumors mit Therapieresponse und Überlebensdaten.....	73
Tabelle 41: Korrelation von posttherapeutischem Sox2-Status des Primärtumors mit Überlebensdaten.....	73
Tabelle 42: Korrelation des Sox2-Status von prä- und posttherapeutischem Tumor.....	74
Tabelle 43: Korrelation des Sox2-Status zwischen DTZ und prätherapeutischen Primärtumor.....	75
Tabelle 44: Korrelation des Sox2-Status zwischen DTZ und posttherapeutischen Primärtumor	76
Tabelle 45: Zusammenfassung an Studien über den Nachweis von DTZ nach neoadjuvanter/ adjuvanter Systemtherapie und dessen prognostische Bedeutung	78
Tabelle 46: Zusammenfassung immunhistochemischer Studien über die Detektion von Aldh-Isoformen und ihr Vorkommen beim Mammakarzinom (Marcato et al. 2011b)	87
Tabelle 47: Übersicht der Therapien gegen Tumorstammzellen	98

8 Literaturverzeichnis

- Abd El-Maqsoud NM, Abd El-Rehim DM. Clinicopathologic implications of EpCAM and Sox2 expression in breast cancer. *Clin Breast Cancer*. **2014** Feb;14(1):e1-9.
- Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*. **2005** Feb 1;11(3):1154-9.
- Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. **2009**;11(4):R46.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003** Apr 1;100(7):3983-8.
- Allensworth JL, Evans MK, Bertucci F, Aldrich AJ, Festa RA, Finetti P, Ueno NT, Safi R, McDonnell DP, Thiele DJ, Van Laere S, Devi GR. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Mol Oncol*. **2015** Jun;9(6):1155-68.
- Ambrosetti DC, Schöler HR, Dailey L, Basilico C. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J Biol Chem*. **2000** Jul 28;275(30):23387-97.
- Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E.; Anton-Culver, H.; Warner, E.; Lubinski, J.; Gronwald, J.; Gorski, B.; Tulinius, H.; Thorlacius, S.; Eerola, H.; Nevanlinna, H.; Syrjäkoski, K.; Kallioniemi, O. P.; Thompson, D.; Evans, C.; Peto, J.; Lalloo, F.; Evans, D. G.; Easton, D. F. **(2003)**. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am J Hum Genet*, 72(5), 1117–1130.
- Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Kommission MAMMA. Aktuelle Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome der Kommission MAMMA in der AGO e.V., **2017**.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. **1999** Apr 30;284(5415):770-6. Review.

- Backe, J: Brustkrebs beim Mann. Dtsch Arztebl **2002**; 99(17): A-1168 / B-970 / C-913.
- Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, Datar RH, Cote RJ. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. Clin Cancer Res. **2006** Oct 1;12(19):5615-21.
- Baltus GA, Kowalski MP, Zhai H, Tutter AV, Quinn D, Wall D, Kadam S. Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. Stem Cells. **2009** Sep;27(9):2175-84.
- Banys M, Gruber I, Krawczyk N, Becker S, Kurth R, Wallwiener D, Jakubowska J, Hoffmann J, Rothmund R, Staebler A, Fehm T. Hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination may be detected in patients diagnosed with ductal carcinoma in situ of the breast. Breast Cancer Res Treat. **2012** Feb;131(3):801-8.
- Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Fehm T. Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. **2007** Dec;106(2):239-43.
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat Genet. **2008** May;40(5):499-507.
- Berruti A, Amoroso V, Gallo F, Bertaglia V, Simoncini E, Pedersini R, Ferrari L, Bottini A, Bruzzi P, Sormani MP. Pathologic complete response as a potential surrogate for the clinical outcome in patients with breast cancer after neoadjuvant therapy: a meta-regression of 29 randomized prospective studies. J Clin Oncol. **2014** Dec 1;32(34):3883-91.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med. **1997** Jul;3(7):730-7.
- Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. Cytotherapy **1999**; 5: 377-88.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. N Engl J Med. **2005** Aug 25;353(8):793-802.
- Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmüller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. Cancer Res. **2001** Mar 1;61(5):1890-5.

- Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.* **2000a** Feb 24;342(8):525-33.
- Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol.* **2000b** Jan;18(1):80-6.
- Braun S, Hepp F, Sommer HL, Pantel K. Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer.* **1999** Feb 19;84(1):1-5.
- Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Malin J, Mamounas EP, Rowden D, Solky AJ, Sowers MR, Stearns V, Winer EP, Somerfield MR, Griggs JJ; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* **2010** Aug 10;28(23):3784-96.
- Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of "stemness". *Exp Hematol.* **2004** Jul;32(7):585-98. Review.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS. Aldehyde dehydrogenase1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res.* **2010** Jan 1;16(1):45-55.
- Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.* **2006** Nov 1;66(21):10425-33.
- Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, Sun L, Yang X, Wang Y, Zhang Y, Shang Y. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem.* **2008** Jun 27;283(26):17969-78.
- Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* **2005** Dec 17;366(9503):2087-106. Review.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* **2005** Dec 1;65(23):10946-51.

- Croker AK, Allan AL. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* **2012** May;133(1):75-87.
- Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med.* **2009** Aug;13(8B):2236-52.
- Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, Bradbury J, Clarke M, Collins R, Davis SR, Delmestri A, Forbes JF, Haddad P, Hou MF, Inbar M, Khaled H, Kielanowska J, Kwan WH, Mathew BS, Mittra I, Müller B, Nicolucci A, Peralta O, Pernas F, Petruzella L, Pienkowski T, Radhika R, Rajan B, Rubach MT, Tort S, Urrútia G, Valentini M, Wang Y, Peto R; Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group.. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet.* **2013** Mar 9;381(9869):805-16.
- De Brot M, Rocha RM, Soares FA, Gobbi H. Prognostic impact of the cancer stem cell related markers ALDH1 and EZH2 in triple negative and basal-like breast cancers. *Pathology.* **2012** Jun;44(4):303-12.
- Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst.* **1996** Nov 20;88(22):1652-8.
- Dong C, Wilhelm D, Koopman P. Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res.* **2004**;105(2-4):442-7. Review.
- Dong Y, Li A, Wang J, Weber JD, Michel LS. Synthetic lethality through combined Notch-epidermal growth factor receptor pathway inhibition in basal-like breast cancer. *Cancer Res.* **2010** Jul 1;70(13):5465-74.
- Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab.* **2004a** Jul;15(5):193-7.
- Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* **2004b**;6(6):R605-15.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* **2003a** May 15;17(10):1253-70.
- Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* **2003b** Oct;36 Suppl 1:59-72. Review.

- Duru N, Fan M, Candas D, Menea C, Liu HC, Nantajit D, Wen Y, Xiao K, Eldridge A, Chromy BA, Li S, Spitz DR, Lam KS, Wicha MS, Li JJ. HER2-associated radioresistance of breast cancer stem cells isolated from HER2-negative breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* **2012** Dec 15;18(24):6634-47.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, Ewertz M, Gray R, Mannu G, Peto R, Whelan T, Wang Y, Wang Z, Darby S. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet.* **2014** Jun 21;383(9935):2127-35.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M, Pritchard K. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* **2012** Feb 4;379(9814):432-44.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet.* **2011** Nov 12;378(9804):1707-16.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* **2011** Aug 27;378(9793):771-84.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* **2005** May 14-20;365(9472):1687-717.
- Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* **2005** Oct 15;65(20):9328-37.
- Farnie G, Clarke RB. Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling. *Stem Cell Rev.* **2007** Jun;3(2):169-75. Review.
- Fehm T, Mueller V, Marches R, Klein G, Gueckel B, Neubauer H, Solomayer E, Becker S. Tumor cell dormancy: implications for the biology and treatment of breast cancer. *APMIS.* **2008a** Jul-Aug;116(7-8):742-53.

- Fehm T, Krawczyk N, Solomayer EF, Becker-Pergola G, Dürr-Störzer S, Neubauer H, Seeger H, Staebler A, Wallwiener D, Becker S. ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **2008b**;10(5):R76.
- Fehm T, Becker S, Becker-Pergola G, Sotlar K, Gebauer G, Dürr-Störzer S, Neubauer H, Wallwiener D, Solomayer EF. Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2006a**;8(5):R60.
- Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* **2006b**; 107(5): 885-92.
- Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res.* **2002** Jul;8(7):2073-84.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* **2013** Apr;49(6):1374-403.
- Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst.* **1970** Oct;45(4):773-82.
- Finicelli M, Benedetti G, Squillaro T, Pistilli B, Marcellusi A, Mariani P, Santinelli A, Latini L, Galderisi U, Giordano A. Expression of stemness genes in primary breast cancer tissues: the role of SOX2 as a prognostic marker for detection of early recurrence. *Oncotarget.* **2014** Oct 30;5(20):9678-88.
- Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* **2008** Aug;26(8):1931-8.
- Fortunato L, Mascaro A, Baldi A, Farina M, Cortese G, Ventrone MA, Amini M, Vitelli C. Positive bone marrow biopsy is associated with a decreased disease-free survival in patients with operable breast cancer. *Ann Surg Oncol.* **2009** Nov;16(11):3010-9.
- Garber K. Notch emerges as new cancer drug target. *J Natl Cancer Inst.* **2007** Sep 5;99(17):1284-5.
- Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jäger W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol.* **2001** Aug 15;19(16):3669-74.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* **1984** Oct;133(4):1710-5.

- Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, Starosławska E, de la Haba-Rodriguez J, Im SA, Pedrini JL, Poirier B, Morandi P, Semiglazov V, Srimuninnimit V, Bianchi GV, Magazzù D, McNally V, Douthwaite H, Ross G, Valagussa P. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol.* **2016** Jun;17(6):791-800.
- Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, Moliterni A, Vazquez F, Byakhov MJ, Lichinitser M, Climent MA, Ciruelos E, Ojeda B, Mansutti M, Bozhok A, Magazzù D, Heinzmann D, Steinseifer J, Valagussa P, Baselga J. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol.* **2014** May;15(6):640-7.
- Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, Starosławska E, de la Haba-Rodriguez J, Im SA, Pedrini JL, Poirier B, Morandi P, Semiglazov V, Srimuninnimit V, Bianchi G, Szado T, Ratnayake J, Ross G, Valagussa P. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2012** Jan;13(1):25-32.
- Ginestier C, Wicinski J, Cervera N, Monville F, Finetti P, Bertucci F, Wicha MS, Birnbaum D, Charafe-Jauffret E. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle.* **2009** Oct 15;8(20):3297-302.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* **2007** Nov;1(5):555-67.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members.. 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.* **2011** Aug;22(8):1736-47.
- Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol.* **2007** Jul;18(7):1133-44. Review.
- Groth C, Fortini ME. Therapeutic approaches to modulating Notch signaling: current challenges and future prospects. *Semin Cell Dev Biol.* **2012** Jun;23(4):465-72.

- Gruber I, Fehm T, Taran FA, Wallwiener M, Hahn M, Wallwiener D, Krawczyk N, Hoffmann J, Hartkopf AD. Disseminated tumor cells as a monitoring tool for adjuvant therapy in patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **2014** Apr;144(2):353-60.
- Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell.* **2009** Aug 21;138(4):645-59.
- Hall C, Krishnamurthy S, Lodhi A, Bhattacharyya A, Anderson A, Kuerer H, Bedrosian I, Singh B, Lucci A. Disseminated tumor cells predict survival after neoadjuvant therapy in primary breast cancer. *Cancer.* **2012** Jan 15;118(2):342-8.
- Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer.* **1994** Mar;69(3):566-71.
- Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M, Hahn M, Becker S, Solomayer EF, Brucker SY, Fehm TN, Wallwiener D. Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients - results from a large single-centre analysis. *Eur J Cancer.* **2014** Oct;50(15):2550-9.
- Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M, Hagenbeck C, Melcher C, Krawczyk N, Hahn M, Wallwiener D, Fehm T. The presence and prognostic impact of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells in the bone marrow of primary breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res.* **2013**;15(5):R94.
- Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.* **1988** Jan 15;48(2):246-53.
- Henderson BE, Ross RK, Pike MC, Casagrande JT. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res.* **1982** Aug;42(8):3232-9.
- Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, Nolte JA. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood.* **2004** Sep 15;104(6):1648-55.
- Hiatt RA. Alcohol consumption and breast cancer. *Med Oncol Tumor Pharmacother.* **1990**;7(2-3):143-51.
- Hirose H, Ishii H, Mimori K, Ohta D, Ohkuma M, Tsujii H, Saito T, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Notch pathway as candidate therapeutic target in Her2/Neu/ErbB2 receptor-negative breast tumors. *Oncol Rep.* **2010** Jan;23(1):35-43.
- Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Morrow M. The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* **2014** Mar;21(3):717-30.
- Hua BL, Fu XG, Hu WH, Yin L, Kang XL, Li HA, Jiang JF, Li F. [Notch1 mRNA and protein expression in human breast cancer and normal mammary gland tissues]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* **2009** Dec;38(12):806-9.

- Huang YH, Luo MH, Ni YB, Tsang JY, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM. Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases. *Histopathology*. **2014** Mar;64(4):494-503.
- Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*. **2008** Jan;13(1):58-68.
- Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Langversion 3.0, Aktualisierung **2012** AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL Leitlinie. Herausgeber: Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.
- Jamshidi K, Swaim WR. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *J Lab Clin Med* **1971**; 77(2): 335-42.
- Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Jückstock J, Borgen E, Rack B, Braun S, Sommer H, Solomayer E, Pantel K, Nesland J, Friese K, Naume B. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. *Clin Cancer Res*. **2011** May 1;17(9):2967-76.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. **2009** Jun;119(6):1420-8.
- Kang EJ, Jung H, Woo OH, Park KH, Woo SU, Yang DS, Kim AR, Lee JB, Kim YH, Kim JS, Seo JH. Association of aldehyde dehydrogenase 1 expression and biologically aggressive features in breast cancer. *Neoplasma*. **2014**;61(3):352-62.
- Kang L, Mao J, Tao Y, Song B, Ma W, Lu Y, Zhao L, Li J, Yang B, Li L. MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. *Cancer Sci*. **2015** Jun;106(6):700-8.
- Kaufmann M, von Minckwitz G, Mamounas EP, Cameron D, Carey LA, Cristofanilli M, Denkert C, Eiermann W, Gnant M, Harris JR, Karn T, Liedtke C, Mauri D, Rouzier R, Ruckhaeberle E, Semiglazov V, Symmans WF, Tutt A, Pusztai L. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann Surg Oncol*. **2012** May;19(5):1508-16.
- Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*. **2008** Oct 16;27(47):6120-30.
- Kraeft SK, Ladanyi A, Galiger K, Herlitz A, Sher AC, Bergsrud DE, Even G, Brunelle S, Harris L, Salgia R, Dahl T, Kesterson J, Chen LB. Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system. *Clin Cancer Res*. **2004** May 1;10(9):3020-8.

- Krawczyk N, Banys M, Neubauer H, Solomayer EF, Gall C, Hahn M, Becker S, Bachmann R, Wallwiener D, Fehm T. HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor. *Anticancer Res.* **2009** Oct;29(10):4019-24.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* **1994** Feb 17;367(6464):645-8.
- Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, Chung IY, Kim IA, Kim EJ, Choi Y, Ryu HS, Park SY. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer.* **2011** May 24;104(11):1730-8.
- Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Müller F, Schneider F, Petersen K, Wallwiener D, Kanz L, Fend F, Perner S, Bareiss PM, Staebler A. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer.* **2011** Jan 28;11:42.
- Li L, Xie X, Luo J, Liu M, Xi S, Guo J, Kong Y, Wu M, Gao J, Xie Z, Tang J, Wang X, Wei W, Yang M, Hung MC, Xie X. Targeted expression of miR-34a using the T-VISA system suppresses breast cancer cell growth and invasion. *Mol Ther.* **2012** Dec;20(12):2326-34.
- Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* **2008** May 7;100(9):672-9.
- Lin X, Li J, Yin G, Zhao Q, Elias D, Lykkesfeldt AE, Stenvang J, Brünner N, Wang J, Yang H, Bolund L, Ditzel HJ. Integrative analyses of gene expression and DNA methylation profiles in breast cancer cell line models of tamoxifen-resistance indicate a potential role of cells with stem-like properties. *Breast Cancer Res.* **2013** Dec 19;15(6):R119.
- Liu P, Kumar IS, Brown S, Kannappan V, Tawari PE, Tang JZ, Jiang W, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer.* **2013** Oct 1;109(7):1876-85.
- Liu P, Brown S, Goktug T, Channathodiyil P, Kannappan V, Hugnot JP, Guichet PO, Bian X, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br J Cancer.* **2012** Oct 23;107(9):1488-97.
- Lock FE, McDonald PC, Lou Y, Serrano I, Chafe SC, Ostlund C, Aparicio S, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene.* **2013** Oct 31;32(44):5210-9.

- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* **1998** Sep;153(3):865-73.
- Magnifico A, Albano L, Campaner S, Delia D, Castiglioni F, Gasparini P, Sozzi G, Fontanella E, Menard S, Tagliabue E. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res.* **2009** Mar 15;15(6):2010-21.
- Makhoul I, Kiwan E. Neoadjuvant systemic treatment of breast cancer. *J Surg Oncol.* **2011** Mar 15;103(4):348-57.
- Malladi S, Macalinao DG, Jin X, He L, Basnet H, Zou Y, de Stanchina E, Massagué J. Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell.* **2016** Mar 24;165(1):45-60.
- Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet.* **1999** Jul 17;354(9174):197-202.
- Mansi JL, Berger U, McDonnell T, Pople A, Rayter Z, Gazet JC, Coombes RC. The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J Clin Oncol.* **1989** Apr;7(4):445-9.
- Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells.* **2011a** Jan;29(1):32-45.
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle.* **2011b** May 1;10(9):1378-84. Epub 2011 May 1. Review.
- Martz CA, Ottina KA, Singleton KR, Jasper JS, Wardell SE, Peraza-Penton A, Anderson GR, Winter PS, Wang T, Alley HM, Kwong LN, Cooper ZA, Tetzlaff M, Chen PL, Rathmell JC, Flaherty KT, Wargo JA, McDonnell DP, Sabatini DM, Wood KC. Systematic identification of signaling pathways with potential to confer anticancer drug resistance. *Sci Signal.* **2014** Dec 23;7(357):ra121.
- Mathiesen RR, Borgen E, Renolen A, Løkkevik E, Nesland JM, Anker G, Ostenstad B, Lundgren S, Risberg T, Mjaaland I, Kvalheim G, Lønning PE, Naume B. Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival. *Breast Cancer Res.* **2012** Aug 14;14(4):R117.
- Méhes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol.* **2001** Jul;159(1):17-20.

- Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, Frenkel E, Euhus D, Leitch M, Osborne C, Clifford E, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Lane N, Wang J, Uhr J. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2006** Nov 14;103(46):17361-5
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*. **2004** Dec 15;10(24):8152-62.
- Mittal S, Sharma A, Balaji SA, Gowda MC, Dighe RR, Kumar RV, Rangarajan A. Coordinate hyperactivation of Notch1 and Ras/MAPK pathways correlates with poor patient survival: novel therapeutic strategy for aggressive breast cancers. *Mol Cancer Ther*. **2014** Dec;13(12):3198-209.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **1982**; 31(1): 11-24.
- Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. **2008** Aug 6;3(8):e2888.
- Morimoto K, Kim SJ, Tanei T, Shimazu K, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Terada N, Noguchi S. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci*. **2009** Jun;100(6):1062-8.
- Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL. In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *Am J Pathol*. **2010** May;176(5):2131-8.
- NZGG. New Zealand Guidelines Group: Management of early breast cancer. Wellington: **2009**.
- Oak PS, Kopp F, Thakur C, Ellwart JW, Rapp UR, Ullrich A, Wagner E, Knyazev P, Roidl A. Combinatorial treatment of mammospheres with trastuzumab and salinomycin efficiently targets HER2-positive cancer cells and cancer stem cells. *Int J Cancer*. **2012** Dec 15;131(12):2808-19.
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. **2007** Jan 4;445(7123):106-10.
- Ohi Y, Umekita Y, Yoshioka T, Souda M, Rai Y, Sagara Y, Sagara Y, Sagara Y, Tanimoto A. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology*. **2011** Oct;59(4):776-80.

- Opdenaker LM, Arnold KM, Pohlig RT, Padmanabhan JS, Flynn DC, Sims-Mourtada J. Immunohistochemical analysis of aldehyde dehydrogenase isoforms and their association with estrogen-receptor status and disease progression in breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. **2014** Dec 12;6:205-9.
- Osipo C, Patel P, Rizzo P, Clementz AG, Hao L, Golde TE, Miele L. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor. *Oncogene*. **2008** Aug 28;27(37):5019-32.
- Pan H, Wu N, Huang Y, Li Q, Liu C, Liang M, Zhou W, Liu X, Wang S. Aldehyde dehydrogenase 1 expression correlates with the invasion of breast cancer. *Diagn Pathol*. **2015** Jun 13;10:66.
- Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, Miele L. Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. **2010** Jun 15;16(12):3141-52.
- Pantel K, Otte M. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, and phenotyping. *Recent Results Cancer Res*. **2001**;158:14-24.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmüller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*. **1993** Sep 1;85(17):1419-24.
- Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, Backmann R, Funke I, Riethmüller G. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res*. **1991** Sep 1;51(17):4712-5.
- Parr C, Watkins G, Jiang WG. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. *Int J Mol Med*. **2004** Nov;14(5):779-86.
- Peng GL, Tian Y, Lu C, Guo H, Zhao XW, Guo YW, Wang LQ, Du QL, Liu CP. Effects of Notch-1 down-regulation on malignant behaviors of breast cancer stem cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. **2014** Apr;34(2):195-200.
- Pham DL, Scheble V, Bareiss P, Fischer A, Beschorner C, Adam A, Bachmann C, Neubauer H, Boesmueller H, Kanz L, Wallwiener D, Fend F, Lengerke C, Perner S, Fehm T, Staebler A. SOX2 expression and prognostic significance in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. **2013** Jul;32(4):358-67.
- Piva M, Domenici G, Iriando O, Rábano M, Simões BM, Comaills V, Barredo I, López-Ruiz JA, Zabalza I, Kypta R, Vivanco Md. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med*. **2014** Jan;6(1):66-79.
- Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. **2009** Apr;9(4):265-73.
- Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res*. **1990** Dec 1;50(23):7415-21.

- Prud'homme GJ, Glinka Y, Toulina A, Ace O, Subramaniam V, Jothy S. Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist. *PLoS One*. **2010** Nov 3;5(11):e13831.
- Qiu Y, Pu T, Li L, Cheng F, Lu C, Sun L, Teng X, Ye F, Bu H. The expression of aldehyde dehydrogenase family in breast cancer. *J Breast Cancer*. **2014** Mar;17(1):54-60.
- Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, Margolese RG, Hoehn JL, Vogel VG, Dakhil SR, Tamkus D, King KM, Pajon ER, Wright MJ, Robert J, Paik S, Mamounas EP, Wolmark N. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. **2008** Feb 10;26(5):778-85.
- Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCready DR, Lockwood G, Egan SE. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res*. **2005** Sep 15;65(18):8530-7.
- Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* **2008**; 371(9612):569-78. Review.
- Renton SC, Gazet JC, Ford HT, Corbishley C, Sutcliffe R. The importance of the resection margin in conservative surgery for breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. **1996** Feb;22(1):17-22.
- Resetskova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H, Badve S. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat*. **2010** Aug;123(1):97-108.
- Reuben JM, Lee BN, Gao H, Cohen EN, Mego M, Giordano A, Wang X, Lodhi A, Krishnamurthy S, Hortobagyi GN, Cristofanilli M, Lucci A, Woodward WA. Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44⁺CD24^{lo} cancer stem cell phenotype. *Eur J Cancer*. **2011** Jul;47(10):1527-36.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. **2001** Nov 1;414(6859):105-11.
- Reynolds P, Hurley S, Goldberg DE, Anton-Culver H, Bernstein L, Deapen D, Horn-Ross PL, Peel D, Pinder R, Ross RK, West D, Wright WE, Ziogas A. Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study. *J Natl Cancer Inst*. **2004** Jan 7;96(1):29-37.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. **2007** Jan 4;445(7123):111-5.
- Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L. Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene*. **2008a** Sep 1;27(38):5124-31.

- Rizzo P, Miao H, D'Souza G, Osipo C, Song LL, Yun J, Zhao H, Mascarenhas J, Wyatt D, Antico G, Hao L, Yao K, Rajan P, Hicks C, Siziopikou K, Selvaggi S, Bashir A, Bhandari D, Marchese A, Lendahl U, Qin JZ, Tonetti DA, Albain K, Nickoloff BJ, Miele L. Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Res.* **2008b** Jul 1;68(13):5226-35.
- Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Gil Y, Martinez MA, Hernandez L, Hardisson D, Reis-Filho JS, Palacios J. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol.* **2007** Apr;20(4):474-81.
- Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M, Seifalian A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell Int.* **2007** Jun 4;7:9.
- Schmidt M. Chemotherapy in early breast cancer: when, how and which one? *Breast Care (Basel).* **2014** Jul;9(3):154-60.
- Schmidt-Mattiesen, Wallwiener. Gynäkologie und Geburtshilfe: Schattauer-Verlag, **2004**.
- Schott AF, Landis MD, Dontu G, Griffith KA, Layman RM, Krop I, Paskett LA, Wong H, Dobrolecki LE, Lewis MT, Froehlich AM, Paraniham J, Hayes DF, Wicha MS, Chang JC. Preclinical and clinical studies of gamma secretase inhibitors with docetaxel on human breast tumors. *Clin Cancer Res.* **2013** Mar 15;19(6):1512-24.
- Sharma A, Paranjape AN, Rangarajan A, Dighe RR. A monoclonal antibody against human Notch1 ligand-binding domain depletes subpopulation of putative breast cancer stem-like cells. *Mol Cancer Ther.* **2012** Jan;11(1):77-86.
- Simmons MJ, Serra R, Hermance N, Kelliher MA. NOTCH1 inhibition in vivo results in mammary tumor regression and reduced mammary tumorsphere-forming activity in vitro. *Breast Cancer Res.* **2012** Sep 19;14(5):R126.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* **1990** Jul 19;346(6281):240-4.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* **2004** Nov 18;432(7015):396-401.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* **1987** Jan 9;235(4785):177-82.

- Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sánchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ; HERA study team. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*. **2007** Jan 6;369(9555):29-36.
- Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Krämer B, Vogel U, Neubauer H, Wallwiener D, Huober J, Fehm TN. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. **2006** Jul;98(2):179-84.
- Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schütz F, Bastert G. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. **2001** Dec;7(12):4102-8.
- Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bode S, Wallwiener D, Bastert G. Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. **1998** May;49(2):145-54.
- Solomayer EF, Diel IJ, Wallwiener D, Bode S, Meyberg G, Sillem M, Gollan C, Kramer MD, Krainick U, Bastert G. Prognostic relevance of urokinase plasminogen activator detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Br J Cancer*. **1997**;76(6):812-8.
- Speiser J, Foreman K, Drinka E, Godellas C, Perez C, Salhadar A, Erşahin Ç, Rajan P. Notch-1 and Notch-4 biomarker expression in triple-negative breast cancer. *Int J Surg Pathol*. **2012** Apr;20(2):139-45.
- Stolzenburg S, Rots MG, Beltran AS, Rivenbark AG, Yuan X, Qian H, Strahl BD, Blancafort P. Targeted silencing of the oncogenic transcription factor SOX2 in breast cancer. *Nucleic Acids Res*. **2012** Aug;40(14):6725-40.
- Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res*. **2006** Feb 1;66(3):1517-25.
- Suman S, Das TP, Damodaran C. Silencing NOTCH signaling causes growth arrest in both breast cancer stem cells and breast cancer cells. *Br J Cancer*. **2013** Nov 12;109(10):2587-96.
- Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, Assad L, Poniecka A, Hennessy B, Green M, Buzdar AU, Singletary SE, Hortobagyi GN, Pusztai L. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. **2007** Oct 1;25(28):4414-22.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. **2006** Aug 25;126(4):663-76.

- Tan EY, Thike AA; Breast Surgical Team at Outram, Tan PH. ALDH1 expression is enriched in breast cancers arising in young women but does not predict outcome. *Br J Cancer*. **2013** Jul 9;109(1):109-13.
- Tögel F, Datta C, Badbaran A, Kröger N, Renges H, Giesekeing F, Jänicke F, Zander AR, Krüger W. Urokinase-like plasminogen activator receptor expression on disseminated breast cancer cells. *J Hematother Stem Cell Res*. **2001** Feb;10(1):141-5.
- Tsang JY, Huang YH, Luo MH, Ni YB, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. **2012** Nov;136(2):407-17.
- Untch M, Rezaei M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, Bauerfeind I, Hilfrich J, Eidtmann H, Gerber B, Hanusch C, Kühn T, du Bois A, Blohmer JU, Thomssen C, Dan Costa S, Jackisch C, Kaufmann M, Mehta K, von Minckwitz G. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol*. **2010** Apr 20;28(12):2024-31.
- Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. **2012** Apr;44(4):573-7.
- Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J, Jackisch C, Kaufmann M, Konecny GE, Denkert C, Nekljudova V, Mehta K, Loibl S. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. **2012** May 20;30(15):1796-804.
- Von Minckwitz G, Kümmel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, Gerber B, Huober J, Costa SD, Jackisch C, Loibl S, Mehta K, Kaufmann M; German Breast Group. Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: phase III randomized GeparTrio trial. *J Natl Cancer Inst*. **2008a** Apr 16;100(8):542-51.
- Von Minckwitz G, Kümmel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, Gerber B, Huober J, Costa SD, Jackisch C, Loibl S, Mehta K, Kaufmann M; German Breast Group.. Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. *J Natl Cancer Inst*. **2008b** Apr 16;100(8):552-62.
- Von Minckwitz G, Raab G, Caputo A, Schütte M, Hilfrich J, Blohmer JU, Gerber B, Costa SD, Merkle E, Eidtmann H, Lampe D, Jackisch C, du Bois A, Kaufmann M. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPARDUO study of the German Breast Group. *J Clin Oncol*. **2005** Apr 20;23(12):2676-85.

- Wang F, Zhai S, Liu X, Li L, Wu S, Dou QP, Yan B. A novel dithiocarbamate analogue with potentially decreased ALDH inhibition has copper-dependent proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activity in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **2011** Jan 1;300(1):87-95.
- Wang Z, Li Y, Sarkar FH. Notch signaling proteins: legitimate targets for cancer therapy. *Curr Protein Pept Sci.* **2010** Sep;11(6):398-408.
- Wicha MS. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds. *Clin Cancer Res.* **2006** Oct 1;12(19):5606-7.
- Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res.* **2004** Aug 15;10(16):5342-8.
- Woodward WA, Krishnamurthy S, Lodhi A, Xiao L, Gong Y, Cristofanilli M, Buchholz TA, Lucci A. Aldehyde dehydrogenase1 immunohistochemical staining in primary breast cancer cells independently predicted overall survival but did not correlate with the presence of circulating or disseminated tumors cells. *J Cancer.* **2014** Apr 7;5(5):360-7.
- Wu MY, Fu J, Xiao X, Wu J, Wu RC. MiR-34a regulates therapy resistance by targeting HDAC1 and HDAC7 in breast cancer. *Cancer Lett.* **2014** Nov 28;354(2):311-9.
- Yao K, Rizzo P, Rajan P, Albain K, Rychlik K, Shah S, Miele L. Notch-1 and notch-4 receptors as prognostic markers in breast cancer. *Int J Surg Pathol.* **2011** Oct;19(5):607-13.
- Yip NC, Fombon IS, Liu P, Brown S, Kannappan V, Armesilla AL, Xu B, Cassidy J, Darling JL, Wang W. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NFκB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br J Cancer.* **2011** May 10;104(10):1564-74.
- Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* **1995** Nov 1;9(21):2635-45.
- Yuan X, Zhang M, Wu H, Xu H, Han N, Chu Q, Yu S, Chen Y, Wu K. Expression of Notch1 Correlates with Breast Cancer Progression and Prognosis. *PLoS One.* **2015** Jun 29;10(6):e0131689.
- Zang S, Chen F, Dai J, Guo D, Tse W, Qu X, Ma D, Ji C. RNAi-mediated knockdown of Notch-1 leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer. *Oncol Rep.* **2010** Apr;23(4):893-9.
- Zang S, Ji Ch, Qu X, Dong X, Ma D, Ye J, Ma R, Dai J, Guo D. A study on Notch signaling in human breast cancer. *Neoplasma.* **2007**;54(4):304-10.

- Zardawi SJ, Zardawi I, McNeil CM, Millar EK, McLeod D, Morey AL, Crea P, Murphy NC, Pinese M, Lopez-Knowles E, Oakes SR, Ormandy CJ, Qiu MR, Hamilton A, Spillane A, Soon Lee C, Sutherland RL, Musgrove EA, O'Toole SA. High Notch1 protein expression is an early event in breast cancer development and is associated with the HER-2 molecular subtype. *Histopathology*. **2010** Feb;56(3):286-96.
- Zhong Y, Lin Y, Shen S, Zhou Y, Mao F, Guan J, Sun Q. Expression of ALDH1 in breast invasive ductal carcinoma: an independent predictor of early tumor relapse. *Cancer Cell Int*. **2013** Jun 15;13(1):60.
- Zhou L, Li K, Luo Y, Tian L, Wang M, Li C, Huang Q. Novel prognostic markers for patients with triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. **2013** Oct;44(10):2180-7.
- Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z, Lu J. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat*. **2010** Aug;122(3):795-801.

9 Erklärung zum Eigenanteil

Kathrin Janowski: Unter wissenschaftlicher Leitung von Prof Dr. Tanja Fehm erfolgte Studiendesign, Rekrutierung des Archivmaterials, die Erfassung der Daten für das Patientenkollektiv und Follow-up Daten, sowie die Etablierung, Färbung und Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen für Sox2 und die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für Aldh1, Notch1 und Sox2. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig, unterstützt durch die Arbeitsgruppe von Dr. biol. hum. M.A. C. Meisner (Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen).

PD Dr. Annette Staebler: Sichten der histologischen Schnitte, Zweitbefundung der immunhistochemischen Färbungen für Aldh1, Notch1 und Sox.

PD Dr. Ulrich Vogel: Zusammenstellung und Erstellung des TMAs.

Silke Dürr-Storzer: Zweitbefundung der Immunfluoreszenz-Färbung für Sox2.

AG Meisner (Leitung Dr. Christoph Meisner): Unterstützung bei der statistische Auswertung und Überlebensanalyse.

Anne Adam: Etablierung der immunhistochemischen Aldh1-, Notch1- und Sox2-Färbung.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 08.08.2017

10 Danksagung

Schreiben musste ich diese Arbeit zwar allein – doch an ihrem guten Gelingen beteiligt waren viele mir nahestehende Menschen, denen ich Dank schulde.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Diethelm Wallwiener, unter dessen Leitung als Ärztlicher Direktor der Universitätsfrauenklinik Tübingen die Untersuchungen für diese Arbeit erst möglich waren.

Zu außerordentlichem Dank bin ich insbesondere Prof. Dr. Tanja Fehm verpflichtet, die diese Arbeit als Doktormutter, Betreuerin und Ideengeberin erst realisierbar machte. Sie unterstützte mich zu jeder Zeit mit ihrer fachlichen Kompetenz und Begeisterung für die Forschung. hat mich aufgebaut und mir immer geholfen, auch wenn es mal eine schwerere Phase gegeben hat.

Herzlichen Dank möchte ich auch dem ehemaligen Team der AG Tumorprogression der Universitätsfrauenklinik Tübingen sagen, vor allem Herrn Prof. Dr. Hans Neubauer, der mir die ganzen Jahre über geholfen hat und mich immer wieder aufgebaut hat wenn es mal eine schwerere Phase gab. Ein besonderer Dank geht auch an Ute Hilcher, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Natalia Krawczyk, die mich vor allem in der Endphase mit Rat und Tat unterstützte.

Zu großem Dank bin ich auch Frau PD Dr. Anette Staebler verpflichtet, die mir bei der Sichtung der histologischen Schnitte und als unabhängige Zweitbegutachterin der immunhistochemischen Färbungen eine große Hilfe war.

Herrn PD Dr. Ulrich Vogel danke ich für die Zusammenstellung und die Erstellung des TMAs. Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern des immunhistochemischen Labors des Pathologischen Instituts, die mich bei den immunhistochemischen Färbungen unterstützten, insbesondere Anne Adam.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Silke Dürr-Storzer für die Zweitbefundung der Immunfluoreszenz-Färbung für Sox2.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Christoph Meisner des Instituts für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Überlebensanalyse.

Darüber hinaus gilt mein Dank meiner Familie, die mein Jammern und Klagen jahrelang ertragen und mich immer wieder aufgerichtet hat. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Inge Meese und Roland Meese, die mir durch ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht, inklusive Kinderbetreuung, mein Studium ermöglicht und mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet haben. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Schwester Dr. Stefanie Meese für die Word-Crash-Kurse, mit deren Hilfe das Formatieren sich deutlich leichter gestaltete. Ein besonderer Dank geht auch an meinen Ehemann David Janowski, der mich in der ganzen Zeit moralisch unterstützt hat. Zum Schluss möchte ich mich noch bei zwei ganz besonderen Menschen bedanken: Meinen beiden Töchtern Lisa und Marlene Janowski.