

Bestimmung von exosomalem Hsp70 im Plasma von Patientinnen mit nicht metastasiertem Mammakarzinom im Therapieverlauf

Alexia Margarita Xanthopoulos

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Gabriele Multhoff
2. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen

Die Dissertation wurde am 06.06.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 10.11.2023 angenommen.

Zusammenfassung

Das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) ist ein hochkonserviertes Chaperon und kommt in fast allen subzellulären Kompartimenten vor [1]. Intrazellulär leistet es einen essentiellen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase [2]. In Folge von zellulärem Stress kann es durch Proteinaggregation, Proteinfehlfaltung oder der Störung von regulatorischen Prozessen zu einer inadäquaten Aktivierung von Signalwegen kommen. Hsp70 wird dann vermehrt exprimiert [3]. Im Gegensatz zu normalen Zellen überexprimieren Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten Hsp70 nicht nur im Zytosol, sondern auch auf ihrer Plasmamembran [4] [5] und setzen Hsp70 aktiv frei [6] [7]. Während freies Hsp70 vorwiegend von nekrotischen Tumorzellen sezerniert wird, stammt das exosomale Hsp70 von lebenden Tumorzellen [8]. Exosomales Hsp70 könnte daher als Biomarker dienen, der einen Rückschluss auf die lebenden Tumorzellen zulässt.

Ziel dieser Arbeit war es die Eignung von exosomalem Hsp70 als Biomarker für die Beurteilung von Therapieansprechen sowie Rezidivwahrscheinlichkeit beim Mammakarzinom zu untersuchen. Dazu wurde die Hsp70-Konzentration von 108 Gesundspender*innen sowie 40 Patientinnen mit nicht metastasiertem Mammakarzinom im Plasma bestimmt. Während herkömmliche ELISA-Verfahren nur das freie Hsp70 im Blut detektieren können, ist der hier verwendete compHsp70 ELISA in der Lage sowohl das freie als auch das exosomale Hsp70 zu messen [9].

Die Mammakarzinompatientinnen wiesen postoperativ eine signifikant höhere Hsp70-Konzentration auf als die Gesundspender*innen ($p < 0,001$). Auch konnte gezeigt werden, dass der compHsp70 ELISA im Blut der Patientinnen deutlich höhere Hsp70-Konzentrationen detektierte als der R&D ELISA ($p < 0,001$). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Risikofaktoren des Mammakarzinoms wie etwa Alter, BMI, Diabetes mellitus Typ 2 und Alkoholbeziehungsweise Nikotinabusus und der Hsp70-Konzentration zeigte sich nicht. Die Korrelation zwischen der Hsp70-Konzentration postoperativ und der Größe und Ausdehnung (TNM-Stadium) sowie dem Differenzierungsgrad (Grading) des Mammakarzinoms war nicht signifikant. Die Untersuchung der Eignung von exosomalem Hsp70 als möglicher Biomarker zur Beurteilung des Therapieansprechens und der Rezidivwahrscheinlichkeit ergab wegweisende Ergebnisse. Die Patientin mit Hsp70-positivem Phänotyp, welche im Verlauf ein kontralaterales Mammakarzinom entwickelte, wies bereits während dem Erhalt einer Radiochemotherapie steigende Hsp70-Werte auf. Diese lagen im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen 6 Wochen und 6 Monate nach Ende der Therapie bereits außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der rezidivfreien Vergleichsgruppe. [10]

Der Hsp70-Verlauf dieser Patientin könnte als früher Warnhinweis für ein fehlendes Therapieansprechen sowie eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit angesehen werden. Die Bestimmung von Hsp70 im Blut von Mammakarzinompatientinnen bietet zudem einige Vorteile. Die Gewinnung der Blutentnahme stellt einen minimalinvasiven Eingriff dar und kann jederzeit wiederholt werden. Dies ermöglicht eine genauere Patientinnenstratifizierung sowie die schnelle Adaptation von Therapieschemata. Weitere größer angelegte Studien zur Überprüfung der Eignung von exosomalem Hsp70 als Biomarker für das Mammakarzinom sowie die Ermittlung von Cut-off-Werten scheinen daher von großer Bedeutung zu sein. [10]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Hitzeschockproteine	1
1.1.1 Hitzeschockprotein 70	3
1.1.2 Hitzeschockprotein 70 im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen	5
1.2 Mammakarzinom	11
1.2.1 Epidemiologie	11
1.2.2 Ätiologie	11
1.2.3 Prävention und Früherkennung	12
1.2.4 Symptome und Klinik	12
1.2.5 Diagnostik	13
1.2.6 Pathologie	14
1.2.7 Stadieneinteilung mittels TNM-Klassifikation	15
1.2.8 Therapie	16
1.2.9 Prognose und Nachsorge	22
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Studienverlauf und Patient*innenkollektiv	25
2.2 Material	30
2.3 Methoden	34
2.3.1 Klinisch-experimentelle Versuchsmethode	34
2.3.2 Statistische Auswertung	38
3 Ergebnisse	41
3.1 Analyse des Studienverlaufs und Patient*innenkollektivs	41
3.2 Bestimmung von exosomalem Hsp70 versus freiem Hsp70	42
3.2.1 Vergleich von Gesundspender*innen und Mammakarzinompatientinnen	42
3.2.2 Analyse der Hsp70-Konzentrationen im Verlauf	43
3.2.3 Vergleich von R&D ELISA und compHsp70 ELISA	50
3.3 Korrelationen	50

3.3.1	Einfluss von Risikofaktoren des Mammakarzinoms auf die Hsp70- Konzentration	50
3.3.2	Einfluss von tumorspezifischen Parametern des Mammakarzinoms auf die Hsp70-Konzentration	55
3.4	Untersuchung von Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit	57
3.4.1	Vergleich der Hsp70-Konzentrationen mit dem Therapieansprechen	58
3.4.2	Vergleich der Hsp70-Konzentrationen mit der Rezidivwahrscheinlichkeit	62
4	Diskussion	65
4.1	Studienverlauf und Limitationen	65
4.2	Beurteilung der prädiktiven Aussage von exosomalem und freiem Hsp70	66
4.3	Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter mit der Hsp70-Konzentration	67
4.4	Exosomales Hsp70 als möglicher Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit	69
4.5	Zusammenfassung und Ausblick	74
	Quellen	75
	A Anhang	105

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC-Transporter	ARP-Binding Cassette Transporter
APC	Antigen-präsentierende Zellen
Apaf-1	Protease-Aktivierungsfaktor-1
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATM	Ataxia teleangiectasia
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Brustkrebsresistenzprotein
BET	Brusterhaltende Therapie
b-FGF	Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BMI	Body Mass Index
BRCA1, BRCA2	Breast Cancer 1/2 (Brustkrebsgen 1/2)
BSA	Bovine Serum Albumine
CAD	Caspase-activated DNase
CHEK-2	Checkpoint kinase 2
CTLA-4	Zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4
DISC	Death-inducing signaling complex (todesinduzierender Signaltransduktionskomplex)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GnRH-Analoga	Gonadotropin-Releasing-Hormone-Analoga
GTV	Gross tumour volume (Bruttotumorvolumen)
HER2	Epidermaler Wachstumsfaktor 2
HSF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1
Hsp	Hitzeschockprotein
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
ICAD	Inhibitor of Caspase-activated DNase
ICI	Immun-Checkpoint-inhibitoren
INF- γ	Interferon- γ
ISH	In-Situ-Hybridisierung
JNK1	C-Jun N-terminale Kinase 1

Abkürzung	Bedeutung
KDA	Kilodalton
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktanten-Protein-1
MDR	Multi Drug Resistance
MHC-I-Moleküle, MHC-II-Moleküle	Major Histocompatibility Complex-I/II (Haupthistokompatibilitätskomplex-I/II-Moleküle)
MRT	Magnetresonanztomographie
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NF-kappa-B	Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NIH	National Institutes of Health
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PALP2	Partner and Localizer of BRCA2
PARP	Polyadenosindiphosphat-ribosepolymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Programmed Cell Death protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein Ligand 1
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase and Tension Homolog
P53	Tumor Protein 53
RANTES	Regulated and Normal T Cell Expressed and Secreted
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SHR	Steroidhormonrezeptor
SLNB	Sentinel Node Biopsie
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
TNBC	Triple Negative Breast Cancer (triple-negatives Mammakarzinom)
TNF	Tumor Nekrose Faktor

Abbildungsverzeichnis

1.1	Hsp70-Domänenstruktur (modifiziert nach [58])	4
1.2	Intrinsischer und extrinsischer Apoptoseweg (modifiziert nach [79])	6
1.3	Interaktion von Hsp70-Peptid-Komplexen mit APCs [20]	9
2.1	Blutabnahmen im Zeitverlauf (modifiziert nach [10])	25
2.2	Klinisch-experimentelle und statistische Teilbereiche in chronologischer Reihenfolge	34
2.3	Immunologisches Grundkonzept ELISA (modifiziert nach [250])	35
3.1	Vergleich Gesundspender*innen und Mammakarzinom postoperativ. Die drei Sterne über der Gruppe Mammakarzinom postoperativ markieren die Signifikanz.	42
3.2	Hsp70-Konzentrationen im Verlauf. Abnahmezeitpunkt 1: postoperativ, Abnahmezeitpunkt 2: nach 30 Gy Strahlentherapie, Abnahmezeitpunkt 3: nach Ende der Strahlentherapie, Abnahmezeitpunkt 4: 6 Wochen nach Strahlentherapieende, Abnahmezeitpunkt 5: 6 Monate nach Strahlentherapieende	43
3.3	Hsp70-Verläufe der Patientinnen 1 bis 8	45
3.4	Hsp70-Verläufe der Patientinnen 9 bis 16	46
3.5	Hsp70-Verläufe der Patientinnen 17 bis 24	47
3.6	Hsp70-Verläufe der Patientinnen 25 bis 32	48
3.7	Hsp70-Verläufe der Patientinnen 33 bis 40	49
3.8	Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und Alter	52
3.9	Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und Nikotinabusus (links) und Alkoholabusus (rechts)	52
3.10	Einteilung nach BMI	53
3.11	Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und BMI	54
3.12	Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und Diabetes mellitus Typ 2	54
3.13	Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und T-Stadium	56
3.14	Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und N-Stadium	56
3.15	Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und Grading	57
3.16	Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der rezidivfreien Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Strahlentherapie (modifiziert nach [10])	59

3.17	Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der Rezidivpatientinnen sowie der rezidivfreien Patientinnen mit Erhalt einer Strahlentherapie	60
3.18	Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der rezidivfreien Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Chemotherapie (modifiziert [10])	60
3.19	Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der Rezidivpatientin 5 sowie der rezidivfreien Patientinnen mit Erhalt einer Chemotherapie	61
3.20	Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der rezidivfreien Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Antihormontherapie modifiziert nach [10])	62
3.21	Vergleich der Hsp70-Konzentration der Patientin 7 mit Fernmetastasen zur rezidivfreien Vergleichsgruppe	63
3.22	Vergleich der Hsp70-Konzentration der Patientin 5 mit kontralateralem Mammakarzinom zur rezidivfreien Vergleichsgruppe (modifiziert nach [10])	63

Tabellenverzeichnis

1.1	Die wichtigsten Hitzeschockproteinfamilien (modifiziert nach [20])	2
1.2	Die humane Hsp70-Familie (modifiziert nach [39])	3
1.3	Stadieneinteilung des Mammakarzinoms mittels TNM-Klassifikation (modifiziert nach [133])	16
2.1	Patientinnencharakteristika in Bezug auf Risikofaktoren	27
2.2	Patientinnencharakteristika in Bezug auf tumorspezifische Parameter	28
2.3	Patientinnencharakteristika in Bezug auf Therapieschemata	29
2.4	Reagenzien	30
2.5	Weitere Materialien	31
2.6	Antikörper	32
2.7	Blutentnahme	33
2.8	Technische Geräte	33
2.9	Verwendete Software	33
2.10	Verdünnung der Standardreihe	37
2.11	Test auf Normalverteilung der Gesamtgruppe Gesundspender*innen und Mammakarzinom postoperativ	39
3.1	Deskriptive Statistik Gesundspender*innen und Mammakarzinompatientinnen postoperativ	41
3.2	Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus der Hsp70-Konzentrationen im Verlauf. Vergleich von R&D ELISA [256] [257] und compHsp70 ELISA	50
3.3	Risikofaktoren	51
3.4	Tumorspezifische Parameter	55
3.5	Gesundheitszustand der Mammakarzinompatientinnen	58
3.6	Therapieschemata	58
A.1	Vergleich von Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Hsp70-Konzentrationen rezidivfreier Patientinnen mit und ohne Strahlentherapie	105
A.2	Vergleich von Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Hsp70-Konzentrationen rezidivfreier Patientinnen mit und ohne Chemotherapie	105

A.3 Vergleich von Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Hsp70-Konzentrationen rezidivfreier Patientinnen mit und ohne Antihormontherapie 106

1 Einleitung

Weltweit wurden 2020 schätzungsweise 19,3 Millionen Tumorerkrankungen erstdiagnostiziert und nahezu 10 Millionen krebsbedingte Todesfälle verzeichnet. Das Mammakarzinom ist dabei die häufigste Tumorentität bei Frauen und wies 2020 eine geschätzten Inzidenz von 2,3 Millionen Fälle auf. [11] Aufgrund der hohen Inzidenz ist die Krebsforschung in den letzten Jahrzehnten weltweit immer bedeutender geworden. Durch die frühzeitige Diagnosestellung sowie zielgerichtete Therapien hat sich sowohl die Überlebenschance als auch die Lebensqualität von erkrankten Patientinnen in Deutschland unverkennbar verbessert. [12] Trotz großer Fortschritte können die aktuellen Prognosekriterien das Rezidivrisiko sowie das Therapieansprechen der individuellen Mammakarzinompatientinnen jedoch nur schlecht voraussagen [13]. Der Bedarf an der Entwicklung von Biomarkern, welche in der Lage sind sowohl das Therapieansprechen als auch die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs vorherzusagen, ist groß [14].

1.1 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (Hsps) sind ubiquitär vorkommende Genprodukte, die sowohl unter normalen als auch unter Stressbedingungen vorkommen, wobei sie unter physiologischen Bedingungen in einer niedrigen Konzentration und bei Stress in einer höheren Konzentration exprimiert werden [15] [16] [17]. Stressproteine werden in Subklassen unterteilt. Die in der Namensgebung enthaltene Zahl gibt das jeweilige ungefähre Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) an. [18] Daraus ergeben sich in Abhängigkeit des geschätzten Molekulargewichts bei Säugetieren die Familien Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp47, Hsp40 und kleine Hsps [19] [20]. Jede Hitzeschockproteinfamilie besteht aus verschiedenen Mitgliedern, welche in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten vorkommen [3]. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Hsp-Familien sowie deren Mitglieder und intrazelluläre Lokalisation.

Tabelle 1.1: Die wichtigsten Hitzeschockproteinfamilien (modifiziert nach [20])

Hsp-Familie	Mitglieder	Intrazelluläre Lokalisation
Kleine Hsps	Hsp10, GROES, Hsp16, α -Crystallin, Hsp20, Hsp25, Hsp26, Hsp27	Zytosol
Hsp40	Hsp40, DnaJ, SIS1	Zytosol
Hsp47	Hsp47	Endoplasmatisches Retikulum
Calreticulin	Calreticulin, Calnexin	Endoplasmatisches Retikulum
Hsp60	Hsp60, Hsp65, GROEL	Zytosol und Endoplasmatisches Retikulum
Hsp70	Hsp72, Hsc70 (Hsp73), Hsp110/SSE, DnaK SSC1, SSQ1, ECM10 GRP78 (BiP), GRP170	Zytosol Mitochondrium Endoplasmatisches Retikulum
Hsp90	Hsc84, Hsp86, HTPG gp96 (GR94, Hsp108, Endoplasmin)	Zytosol Endoplasmatisches Retikulum
Hsp100	Hsp104, Hsp110 CLP Proteine Hsp78	Zytosol Zytosol Mitochondrium

Erstmals wurden Hitzeschockproteingene 1962 bei Experimenten an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt [21] [22]. Nach weiteren Untersuchungen konnten Hsps in unterschiedlichen Organismen nachgewiesen werden [23]. Die meisten Hsps zeichnen sich durch ihre starke zytoprotektive Wirkung aus und fungieren als molekulare Chaperone für andere zelluläre Proteine [24] [25] [3]. In Folge von zellulärem Stress kann es durch Proteinaggregation, Proteinfehlfaltung oder der Störung von regulatorischen Prozessen zu einer inadäquaten Aktivierung von Signalwegen kommen [3]. Hsps werden daraufhin vermehrt exprimiert [17] [18] [26]. Zu einer stressbedingten Hochregulierung von Hsps kommt es unter anderem durch Nährstoff- [23] oder ATP-Entzug [27], thermischen Stress [21] [28] [29] [30] [23], Ischämie [31] [23], Exsikkose [32], Hypoxie [33] oder bei Kontakt zu organischen Stoffen, Oxidantien [23] oder freien Radikalen [34]. Weitere Auslöser können Steroidhormone [35], Ethanol [36], Schwermetalle [23] oder verschiedene Infektionen oder Entzündungen durch virale, bakterielle oder parasitäre Erreger darstellen [37] [23]. Im Rahmen von Tumorthera-
pien kann die Durchführung einer Radiochemotherapie zu einer erhöhten Hsp-Konzentration führen [23] [38]. Durch diese vermehrte Expression wird das Überleben von Zellen, welches durch die genannten endogenen und exogenen Faktoren gefährdet werden kann, begünstigt

[39]. Der Abwehrmechanismus und die Wiederherstellung der Homöostase wird durch die Rückfaltung von denaturierten Proteinen erreicht oder weiterhin durch die Erleichterung der Synthese neuer Proteine zur Behebung von Schäden [40] [41] oder etwa der Hemmung von Proteinaggregationen [42] [43]. Unter physiologischen Bedingungen helfen Hsps unter anderem bei der Proteinfaltung [44] [45] [46] sowie beim Auf- und Abbau von Proteinkomplexen [47] und lenken neu gebildete Proteine zur endgültigen Verpackung, zum Abbau oder zur Reparatur zu den Zielorganen [48] [49].

1.1.1 Hitzeschockprotein 70

Unter allen humanen Hitzeschockproteinklassen ist die Hsp70-Familie am stärksten konserviert und am besten untersucht [3]. Sie besteht aus 13 Genen, welche sich durch ihre Aminosäuresequenz, ihr Expressionsniveau sowie ihre subzelluläre Lokalisation unterscheiden [39]. Die 13 Gene der humanen Hsp70-Familie inklusive ihrer zellulären Lokalisation können Tabelle 1.2 entnommen werden.

Tabelle 1.2: Die humane Hsp70-Familie (modifiziert nach [39])

Protein	Zelluläre Lokalisation	Stress induzierbar
HspA1A	Zytosol, Zellkern, Zellmembran, extrazellulär	Ja
HspA1B	Zytosol, Zellkern, extrazellulär	Ja
HspA1L	Zytosol, Zellkern	Nein
HspA2	Zytosol, Zellkern, Zellmembran, extrazellulär	Nein
HspA5	Endoplasmatisches Retikulum, extrazellulär	Nein
HspA6	Zytosol, extrazellulär	Ja
HspA7	Blutpartikel, extrazellulär	Ja
HspA8	Zytosol, Zellkern, Zellmembran, extrazellulär	Nein
HspA9	Mitochondrien, Zellkern	Nein
HspA12A	Intrazellulär, extrazellulär	Nein
HspA12B	Endothelzellen, intrazellulär, Blutplasma	Nein
HspA13	Endoplasmatisches Retikulum, extrazellulär, Mikrosomen	Nein
HspA14	Zytosol, Zellmembran	Ja

Dabei sind Hsp70-1 (HspA1A) und Hsp70-2 (HspA1B) die beiden wichtigsten stressinduzierbaren Hsp70-Proteine. Sie unterscheiden sich nur durch zwei Aminosäuren und werden gemeinsam unter dem Begriff Hsp70 oder Hsp70-1 zusammengefasst. [50] 70-kDa-Hitzeschockproteine, im Folgenden kurz Hsp70 genannt, sind als eine Familie von monomeren Proteinen definiert, die durch Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) getriggert Entfaltungsfunktionen besitzen [39]. Unterstützt werden sie hierbei neben ATP durch Co-Chaperone, Proteine der DnaJ-Familie, die bei der Substratbindung helfen sowie Bag-1-ähnliche Proteine, die den Nukleotidaustausch regulieren [2] [51]. Dabei beschränkt sich ihr Vorkommen nicht nur auf ATP-haltige eukaryotische und prokaryotische intrazelluläre Lokalisationen [52]. Man findet sie vielmehr in fast allen subzellulären Kompartimenten [1] auch in Zellmembranen [53] [54] [55] [56] und im Extrazellulärraum [57]. Hsp70 besteht aus einer stark konservierten Domänenstruktur, die sich aus vier Hauptdomänen zusammensetzt: Die zirka 44 kDa große N-terminale Nukleotid-bindende Domäne (NBD), die ATPase-Aktivität aufweist, die mittlere flexible Linkerregion, die zirka 15 kDa große Substratbindungsdomäne, die mit hydrophoben Aminosäuren in Peptiden interagiert sowie die zirka 10 kDa große α -helikale C-terminale Domäne, die die Co-Chaperonbindung vermittelt [58] [59] [60]. Abbildung 1.1 stellt die unterschiedlichen Domänen bildlich dar.

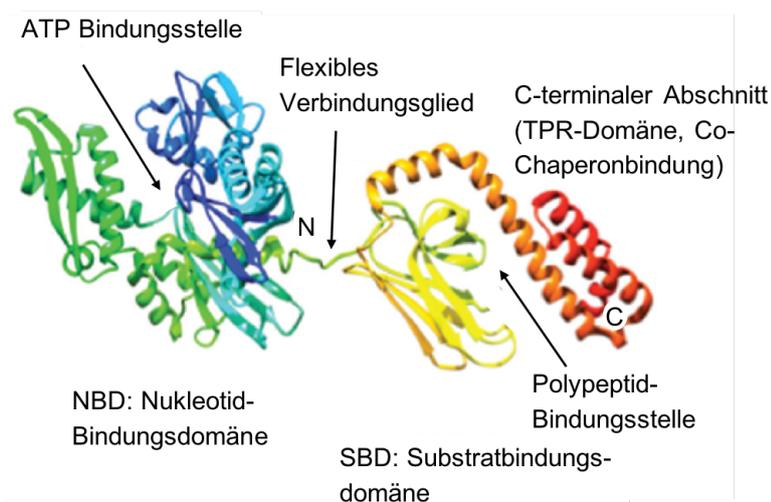


Abbildung 1.1: Hsp70-Domänenstruktur (modifiziert nach [58])

Die Hsp70-Familie erfüllt je nach Lokalisation eine Reihe von Aufgaben und wird sowohl im physiologischen Zustand als auch bei Krankheiten exprimiert [61]. Intrazellulär leisten sie als molekulare Chaperone einen essentiellen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase [2]. Durch die oben genannten Stimuli kommt es zu einer Hochregulierung des stressinduzierten Hsp70, um die sonst tödlichen Bedingungen zu überleben [3]. Neben ihrer zytoprotektiven Wirkung im Zytosol spielt Hsp70, wie auch Hsp90, im Extrazellulärraum sowie in der Plasmamembran eine entscheidende Rolle in der Stimulation des Immunsystems [19]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Hsp70 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen, aber auch von bakteriell oder viral infizierten Zellen exprimiert wird [55] [57]. Extrazellulär kann Hsp70 in unterschiedlichen Formen vorliegen, entweder in freier löslicher Form, ge-

bunden an antigene Peptide oder in Verbindung mit Exosomen [62] [8] [5]. Obwohl Hsp70 seit vielen Jahrzehnten im Fokus der Forschung steht, ist der Mechanismus zur Freisetzung von Hsp70 nach wie vor umstritten. Dies liegt daran, dass Hsp70 keine typischerweise N-terminal lokalisierten Signalpeptidsequenzen besitzt, welche für die Sekretion benötigt werden und die Plasmamembran daher nicht durch konventionelle Mechanismen passieren kann [57]. Der Transport von anderen Proteinen durch Lipidmembranen ist jedoch eine der zentralen Aufgaben von Hsp70. [19] Vega et al. [5] konnten zeigen, dass Hsp70 getriggert durch Stressfaktoren in die Plasmamembran transloziert und in einer membranassoziierten Form von lebenden Zellen freigesetzt wird. Im Unterschied zu freiem rekombinantem Hsp70 verursachten extrazelluläre Membranen, die Hsp70 enthielten, eine mindestens 260fach wirksamere Makrophagenaktivierung. Dies könnte als Warnsignal für die Aktivierung des Immunsystems dienen. Weitere mögliche Freisetzungsmechanismen könnten eine stressinduzierte exosomale Freisetzung durch $\text{INF-}\gamma$ [62], eine Beteiligung von Lipid Rafts, cholesterinreiche Membranmikrodomänen als Transportmöglichkeit von Proteinen zur Zellmembran [63], eine Freisetzung durch ein endolysosomales Kompartiment [64] oder etwa die Freisetzung durch sekretorische Granula sein [65]. Weitere Moleküle, die mit einem ER-Golgi-unabhängigen Weg in Verbindung gebracht werden, sind $\text{IL-1-}\beta$ einerseits, ein Entzündungsmediator und der Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (b-FGF) andererseits, welcher häufig sowohl in der Plasmamembran als auch im Extrazellulärraum zu finden ist [56]. Darüber hinaus konnte auch eine aktive Freisetzung von Hsp70 in Form von Lipidvesikeln in Verbindung mit Bag-4 durch lebende Tumorzellen nachgewiesen werden [8]. Einen weiteren Transportmechanismus könnte Nekrose darstellen. Aufgrund des geringen Anteils an freiem Hsp70 ist dieser Mechanismus eher unwahrscheinlich. [66] Das anschließend vorliegende extrazelluläre Hsp70 hat immunmodulatorische Funktionen [67] [38]. Hsp70 präsentiert immunogene Peptide über MHC-Antigene [68], stimuliert die angeborene und adaptive Immunität [68] oder fungiert als Stimulator und Zielstruktur für die angeborene Immunreaktion über natürliche Killerzellen [69] [67] [38].

1.1.2 Hitzeschockprotein 70 im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen

Eine Überexpression des stressinduzierten Hsp70 wurde bereits in zahlreichen Tumorentitäten beschrieben [70], darunter auch in Tumoren der weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane wie etwa beim Mamma-, Endometrium-, Ovarial- und Zervixkarzinom [71] [72] oder beim Prostatakarzinom [73]. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass durch die Überexpression von Hsp70 die stark zytoprotektiven und faltenden Eigenschaften genutzt werden, um während des Fortschreitens einer bösartigen Erkrankung das Wachstum sowie das Überleben der Tumorzellen zu fördern [71]. Sowohl Hsp70-1 als auch Hsp70-2 spielen eine entscheidende Rolle bei menschlichen Tumoren. Die vorherrschende Form ist jedoch Hsp70-1. [58] Die Überexpression von Hsp70 geht bei vielen Tumoren mit einem erhöhten Tumorstadium sowie einer schlechteren Prognose und einer Therapieresistenz einher. Die verstärkte Expression von Hitzeschockproteinen ist unter anderem auf den Verlust der p53-Funktion und die verstärkte Expression von Protoonkogenen wie HER2 oder c-Myc zurückzuführen.

[70] Durch die Assoziation mit verschiedenen Schlüsselproteinen des Apoptose-Signalwegs verfügt Hsp70 über starke anti-apoptotische Eigenschaften [74]. Hsp70 spielt aber auch eine Schlüsselrolle in der Stimulation des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems, wenn es extrazellulär in der Plasmamembran oder exosomal vorliegt [3].

Funktion von intrazellulärem Hsp70

Hohe zytosolische Hsp70-Konzentrationen verhindern Apoptose [75]. Die Apoptose ist ein wichtiger Bestandteil für die Embryogenese, die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase [76] [77]. Dabei werden zur Induktion der Apoptose zwei Wege unterschieden, einerseits der von den Mitochondrien abhängige intrinsische Signalweg und andererseits der extrinsische Signalweg durch einen Todesrezeptor (dargestellt in Abbildung 1.2). Die Caspase-3 ist an beiden Wegen beteiligt [78].

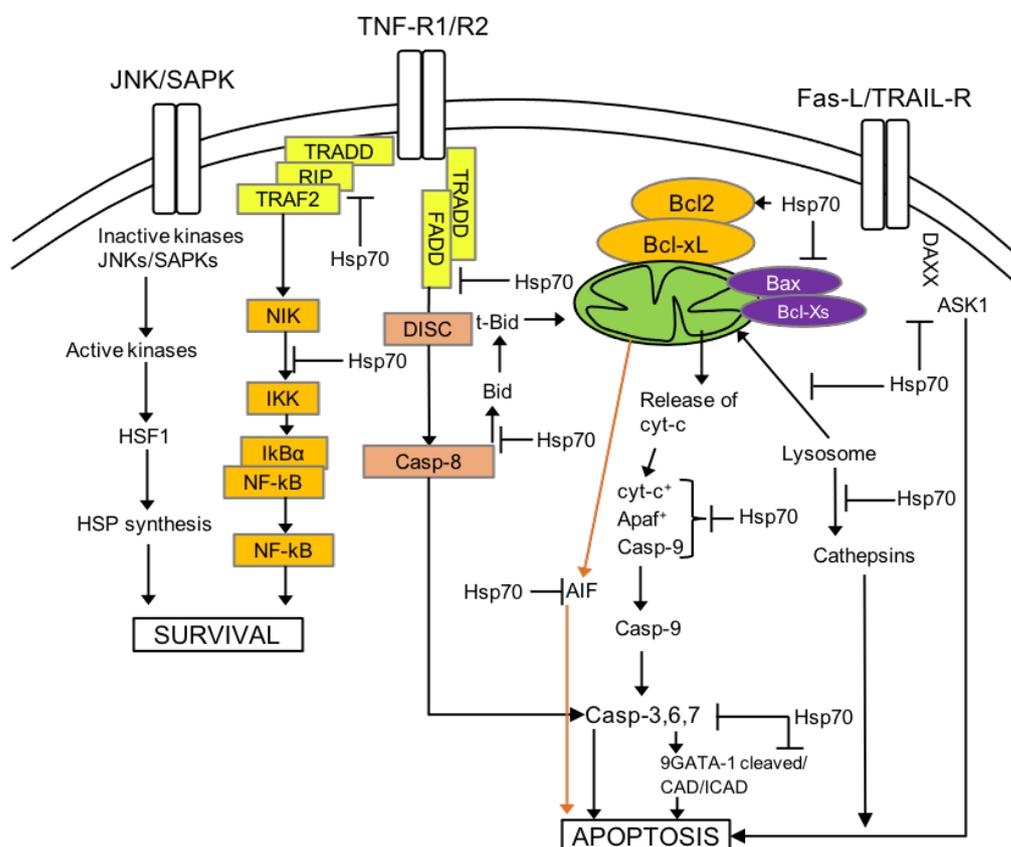


Abbildung 1.2: Intrinsischer und extrinsischer Apoptoseweg (modifiziert nach [79])

In Bezug auf das Mitochondrium kann man die drei Ebenen prämitochondrial, mitochondrial und postmitochondrial unterscheiden. Prämitochondrial verhindert Hsp70 die Apoptose etwa durch die Hemmung stressaktivierter Kinasen. Hsp70 fungiert hierbei als inhibitorisches Protein der C-Jun-N-terminalen Kinase 1 (JNK1), indem es an sie bindet und ihre Aktivierung verhindert. [80] Erste Hinweise sprechen auch für eine Beeinflussung des Bid-abhängigen

apoptotischen Signalwegs durch Hsp70, wobei der Mechanismus noch nicht vollständig dargestellt werden konnte [81]. Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung der Apoptose durch Hsp70 ist die Bindung an p53 [82]. P53 kann beispielsweise durch DNA-Schäden den tumorsuppressiven apoptotischen Zelltod einleiten. Ein Verlust der p53-Funktion ist somit ein starker Überlebensfaktor für Tumorzellen. [83] Auf mitochondrialer Ebene interagiert p53 mit Bcl2 und Bax [84]. Ohne die Beeinflussung durch Hsp70 wird als Reaktion auf DNA-Schäden die Transkription von Bcl2 unterdrückt und die von Bax induziert [85]. Um diesen Prozess zu verhindern, weisen Tumorzellen häufig ein mutiertes p53 auf, das einen stabilen Komplex mit Hsp70/Hsc70 bildet, wobei die stressinduzierte Hochregulierung von Hsp70 den Kernimport von p53 hemmt [83]. Auf mitochondrialer Ebene blockiert Hsp70 direkt die Translokation von Bax, wodurch die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran verhindert wird, was in weitere Folge dazu führt, dass die Freisetzung von Cytochrom-c sowie AIF gehemmt wird [86]. Freigesetztes Cytochrom-c interagiert mit dem zytosolischen apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1), um das Apoptosom mit Caspase-9 zu bilden. Dies führt im nächsten Schritt zur Aktivierung der Caspasen. [87] Auch postmitochondrial hemmt Hsp70 die Bildung dieses Apoptosoms. Hsp70 interagiert mit AIF und Apaf-1 [75] und schützt GATA-1 vor der Spaltung durch Caspase-3. [88] Eine andere Studie widerlegt die direkte Wirkung von Hsp70 auf die Aktivierung der Caspase jedoch [89]. Auch eine Interaktion mit CAD beziehungsweise mit ICAD, dem Inhibitor von CAD, und Hsp70 ist bereits beschrieben [90]. Hsp70 interagiert auch mit ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) und kann zusammen mit dem Co-Chaperon CHIP die TNF-alpha-induzierte Apoptose hemmen, indem es den Abbau von ASK1 durch die Bildung eines Komplexes aus Hsp70/CHIP/ASK1 fördert [91] [92]. Auslöser für die Einleitung einer extrinsischen Apoptose über den Todesrezeptorweg sind Plasmamembran-assoziierte Proteine der TNF-Rezeptorfamilie. Diese führen zur Aktivierung von Caspase-8/10 im todesinduzierenden Signalisierungskomplex (DISC). [93] Daraufhin aktiviert Caspase-8 entweder direkt die Ausführungscaspasen (Caspase-3/6/7) oder verbindet über die Spaltung von Bid in t-Bid den extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg [94]. Außerdem verhindert Hsp70 die Apoptose, indem es die lysosomale Membranpermeabilisierung hemmt, die ein Kennzeichen für einen stressinduzierten Tod darstellt [95]. Schließlich hemmt Hsp70 auch Kathepsine und lysosomale Proteasen, die ebenfalls an der Apoptose beteiligt sind [96]. Durch die Blockierung des apoptotischen Zelltods sowie die Autophagie kann es zu einem durch Nekrose verursachten Tod einiger Zellen kommen [97]. Es wird vermutet, dass dieser Todesweg weniger effizient ist und dadurch ein verstärktes Tumorstadium ermöglicht wird [98]. Die Nekrose, die aus der Hemmung des programmierten Zelltods sowie der Ischämie in schlecht durchbluteten Tumoren resultiert, verursacht die Freisetzung von Zellinhalten in das Tumormilieu. Infolgedessen entsteht ein entzündliches Milieu im Bereich des Tumors und begünstigt dadurch die Angiogenese, die Invasion von Tumorzellen und die Metastasierung. [98] [97] [99]

Neben der Fähigkeit vor dem Zelltod zu schützen gibt es auch Hinweise, dass Hsp70 Zellen auch für bestimmte apoptotische Stimuli sensibilisieren kann, wie beispielsweise für den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [100]. Die Funktion von Hsp70 in Bezug auf die durch Fas-ausgelöste Apoptose ist jedoch noch größtenteils unbekannt. Zytosolisches Hsp70 könnte

die NF- κ B-Expression hemmen und membrangebundenes Hsp70 könnte diesen Transkriptionsfaktor induzieren. [101] Auch die Rolle des HSF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor-1) in Verbindung mit Hitzeschockproteinen bei der Angiogenese ist noch wenig erforscht. Eine erhöhte Expression könnte die Angiogenese jedoch begünstigen, da der HSF-1 von Hsp70 als auch von Hsp90 abhängig ist. [102] Andere Hinweise sprechen für eine Beteiligung von HSF-1 an der Invasion und Metastasierung von Krebszellen [103]. Eine Korrelation zwischen erhöhten Hsp70-Werten und dem Metastasierungspotential wird angenommen [71] [70]. Zusammengefasst beeinflusst Hsp70 indirekt und direkt sowohl den intrinsischen wie auch den extrinsischen Apoptoseweg auf unterschiedlichen Ebenen. Durch die Umgehung des programmierten Zelltods kommt es zur Steigerung des Tumorwachstums sowie zur Aktivierung der Tumorprogression. [61] Daher ist die Verringerung oder Hemmung der intrazellulären Hsp70-Konzentration ein möglicher Ansatz, um Tumorzellen für eine Therapie zu sensibilisieren [104] [105] [75]. Methoden, die bereits Gegenstand der Forschung sind, sind beispielsweise RNAi-basierte Inhibitoren, CRISPR/Cas9 knock-out Technologien, Aptameren oder Hsp70-Inhibitoren [106]. Eine Einschränkung dieser Ansätze ergibt sich, da aufgrund der Redundanz des Chaperonsystems andere Stressproteine die Aufgaben von Hsp70 übernehmen können [107]. Ein weiterer Ansatz befasst sich mit der Störung des Sphingolipid-Stoffwechsels der lysosomalen Membranen. Im Mausmodell konnten bereits vielversprechende Ergebnisse zur Reduktion der Therapieresistenz gezeigt werden. [108]

Funktion von membrangebundenem Hsp70

In einem umfassenden Screening von über 1000 Tumoren konnte gezeigt werden, dass etwa 50 - 70% der Tumoren einen Hsp70-Membran-positiven (mHsp70-positiven) Phänotyp aufweisen [109]. Das Normalgewebe war hingegen in der Vergleichsgruppe Hsp70-Membran-negativ [110] [55] [19]. Die tumorspezifische Zelloberflächenlokalisation von Hsp70 konnte durch verschiedene Methoden bestimmt werden. Unter anderem durch die Multiparameter-Durchflusszytometrie mit dem Antikörper cmHsp70.1 beim compHsp70 ELISA. [9] Tumorzellen, die Hsp70 an ihrer Plasmamembran exprimieren, sind empfindlicher für den zytolytischen Angriff durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [111]. Granzym B, welches durch einen Perforin-unabhängigen, aber Hsp70-abhängigen Weg von Krebszellen aufgenommen wird, führt zur Apoptose selektiv in Tumorzellen, die Hsp70 auf der Zelloberfläche präsentieren [112]. Außerdem aktiviert membrangebundenes Hsp70 sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort. Dabei beruht die immunogene Funktion des vom Tumor stammenden exogenen Hsp70 auf seinen antigenen Peptiden. [79] Abbildung 1.3 zeigt die Konsequenzen der Interaktion von HSP70-Peptid-Komplexen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie etwa Makrophagen oder dendritischen Zellen. Einerseits kommt es zu adaptiven, antigenspezifischen Folgen. Der vom Tumor stammende Hsp-Peptid-Komplex wird von APCs mit Hilfe von Hsp-Rezeptoren wie etwa CD91 endozytotisch aufgenommen und nach der Kreuzpräsentation auf dem MHC-I-Molekül präsentiert. Dadurch kommt es in weiterer Folge zur CD8⁺-T-Zellreaktion. [113] [114] [115] [116] [117] [20] Tumorzellen, die Hsp70 auf ihrer

Membran exprimieren, verstärken auch die auf MHC-II beschränkte Peptidpräsentation und die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen [118].

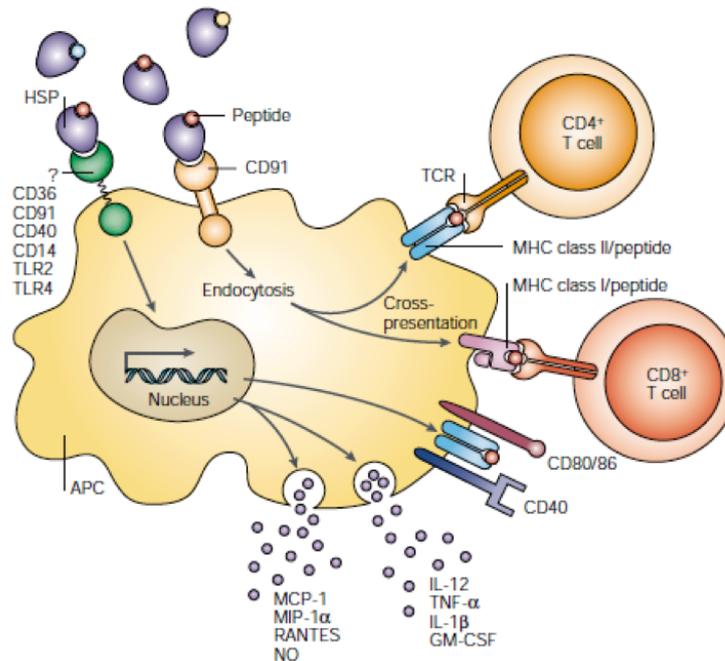


Abbildung 1.3: Interaktion von Hsp70-Peptid-Komplexen mit APCs [20]

Andererseits wird eine Kaskade von nicht antigenspezifischen Ereignissen ausgelöst, die in weiterer Folge Antigen-präsentierende Zellen (APCs) aktiviert und die Immunantwort fördert [20]. Die freigesetzten Zytokine führen zu einer unspezifischen Stimulation des angeborenen Immunsystems [3]. Außerdem wird die Produktion von Stickstoffmonoxid durch Makrophagen und dendritische Zellen angeregt [119]. Hsp70 wirkt also einerseits als endogenes Adjuvans und andererseits als immunologisches Gefahrensignal [120]. Auf der anderen Seite weisen Tumorzellen, die Hsp70 auf ihrer Plasmamembran exprimieren, eine hohe Resistenz gegenüber Chemo- und/oder Radiotherapien auf [121] [61]. Patient*innen mit mHsp70-positiven Phänotyp wiesen ein signifikant niedrigeres Gesamtüberleben als die mHsp70-negative Vergleichsgruppe auf [122]. Die hohe Resistenz gegen Radiochemotherapien von Hsp70-Membran-positiven Tumoren resultiert wahrscheinlich aus der Blockade der NF- κ B-, JNK- und ERK-Signalwege [123] [124].

Wie bereits erwähnt, könnte die gezielte Hemmung von mHsp70 hierbei einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen. Mithilfe des cmHsp70.1-Antikörpers wurde gezeigt, dass mHsp70 als Zielstruktur zur Vermittlung einer antikörperabhängigen Toxizität in Frage kommt. Das Epitop, welches durch den cmHsp70.1-Antikörper erkannt wird, ist spezifisch für Tumorzellen und kommt nicht auf isogenen Zellen oder normalem Gewebe vor. [125] Ein weiteres Forschungsfeld beschäftigt sich mit der Entwicklung von autologen anti-Tumor-Impfstoffen, wobei mHsp70 die tumorspezifische Zielstruktur darstellt. Das Interesse an der Entwicklung von Impfstoffen gegen Krebszellen ist groß, da Immunzellen Krebszellen nach erfolgter Impfung leichter angreifen können. Ein weiterer Vorteil besteht in der geringeren Toxizität eines

Impfstoffes im Vergleich zu einer Chemotherapie oder einer Bestrahlung. [126] Ein Impfstoff auf Basis von Hsp70 befindet sich in der klinischen Phase I. Das synthetische Hsp70-Peptid stimuliert NK-Zellen und bietet eine hohe Sicherheit und Bioverfügbarkeit. [127] Eine erhöhte Konzentration von membrangebundenem Hsp70 als tumorspezifische Zielstruktur für NK-Zellen zu nutzen geht jedoch auch mit der Gefahr einher, dass eine erhöhte Resistenz der Tumorzellen gegenüber Standardtherapien entsteht [107]. Da membrangebundenes Hsp70 nur auf der Zellmembran von Tumorzellen, nicht jedoch auf normalem Gewebe vorkommt, könnte Hsp70 auch als potentieller tumorspezifischer Biomarker dienen [122].

Funktion von extrazellulärem Hsp70

Extrazellulär vorkommendes Hsp70 kann entweder als freies oder Lipid-gebundenes vesikuläres Hsp70 vorliegen. Gemäß dem aktuellen Forschungsstand stammt freies Hsp70 von sterbenden Tumorzellen, während Lipid-gebundenes Hsp70 aktiv von lebenden Tumorzellen freigesetzt wird. [5] [63] [8] Diese extrazellulären Hsp70-haltigen Lipidvesikel werden als Exosomen charakterisiert. Die Sekretion dieser exosomalen Vesikel geschieht dabei nicht über das ER-Golgi-Kompartiment, sondern über einen alternativen lysosomalen beziehungsweise endosomalen Mechanismus. [107] Das exosomale Hsp70 erfüllt dann wiederum eine duale Rolle in Bezug auf die Stimulation des Immunsystems. Durch die komplexe Interaktion von Hsp70-haltigen Exosomen aus Tumorzellen [63] mit anderen Zelltypen kann es zur Inflammation und zum Tumorwachstum kommen [68]. Außerdem spielen die von Tumoren freigesetzten Exosomen eine wichtige Rolle in der intrazellulären Kommunikation des Immunsystems [8]. So können sie sowohl die Migration als auch die zytolytische Aktivität in NK-Zellen induzieren [111] [128]. Die durch Hsp70-haltige Exosomen stimulierte Apoptose von NK-Zellen wird durch Granzym B vermittelt [112]. Auch freies Hsp70 interagiert mit dem Immunsystem, insbesondere wenn immunogene Peptide an die sezernierenden sterbenden Tumorzellen gebunden sind [129]. Wie für membrangebundenes Hsp70 beschrieben, kann es auch hier durch die Kreuzpräsentation von Hsp70-positiven Peptiden auf MHC-Klasse-I Molekülen zur Initiierung einer CD8⁺-Antigen-spezifischen T-Zellreaktion kommen [130]. Auch peptidfreies Hsp70 kann über verschiedene Rezeptoren mit antigenpräsentierenden Zellen interagieren und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen über den NF- κ B-Signalweg initiieren [68].

In Abhängigkeit seiner intrazellulären, membranständigen oder extrazellulären Lokalisation erfüllt Hsp70 in Tumorzellen eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Erhöhte zytosolische und membranständige Hsp70-Konzentrationen führen zu Therapieresistenz und tragen damit zur Aggressivität von Tumorzellen bei. Extrazelluläres und membranständiges Hsp70 kann jedoch auch das Immunsystem stimulieren und als tumorspezifisches Ziel dienen. [107]

1.2 Mammakarzinom

Das nachfolgende Kapitel dient der Zusammenfassung aller für diese Arbeit relevanten Informationen zum Mammakarzinom.

1.2.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom, eine maligne Erkrankung der Brustdrüse, stellt mit einem Anteil von zirka 30% die häufigste Krebserkrankung der Frau dar [131] [132]. Sowohl in Bezug auf das Erkrankungs- als auch auf das Sterberisiko zeichnen sich deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede ab. Männer sind in nur ungefähr 1% aller Mammakarzinome betroffen, das Lebenszeitrisiko beträgt 0,1%. In Deutschland und anderen westlichen Industriestaaten erkrankt hingegen zirka jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens, das absolute Lebenszeitrisiko beträgt 12,8%. Da das Alter zu den wichtigsten Risikofaktoren für eine Brustkrebsentstehung zählt, korreliert die Inzidenz mit dem Lebensalter. [133] Frauen vor dem 30. Lebensjahr sind selten betroffen, das Erkrankungsrisiko steigt aber mit zunehmendem Alter und erreicht einen Erkrankungsgipfel zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Seit den 90er Jahren wird in den Industrieländern eine sinkende Mortalität beobachtet, ursächlich hierfür werden Fortschritte in der Früherkennung sowie Behandlung des Mammakarzinoms angenommen. [131] [133] [134]

1.2.2 Ätiologie

Zu den häufigsten Risikofaktoren, welche ursächlich dazu beitragen an einem Mammakarzinom zu erkranken, zählen unter anderem genetische, hormonelle und toxische Komponenten sowie eine positive Brustkrebsanamnese. Genetische Risikofaktoren machen etwa 5 - 10% aller Neuerkrankungen aus und unterscheiden sich in Keimbahnmutationen mit hohem und mit mittlerem Risiko. Dabei stellen Keimbahnmutationen in den BRCA1-, BRCA2-, RAD51C- oder PALP2-Genen die erste und Keimbahnmutationen in den ATM (Ataxia teleangiectasia)-, STK11 (Peutz-Jeghers-Syndrom)-, CHEK-2-, PTEN (Cowden-Syndrom)- und anderen Genen die zweite Risikogruppe dar. Außerdem kann eine familiäre Belastung ohne Mutationsnachweis vorliegen, also das vermehrte Auftreten von Mamma- oder Ovarialkarzinomen auf einer Familienseite. Den zweiten wichtigen Grundstein bilden hormonelle Faktoren wie etwa ein langer hormoneller Zyklus etwa durch eine frühe Menarche oder eine späte Menopause. Außerdem wurde beobachtet, dass Frauen, die eine späte oder keine Gravidität austragen eine höhere Erkrankungswahrscheinlichkeit aufweisen. Weitere Risikofaktoren sind das Vorliegen einer Adipositas oder eine postmenopausale Gewichtszunahme sowie eine postmenopausale Hormonersatztherapie. Die dritte entscheidende Rolle spielen toxische Faktoren. Dazu zählen eine stattgehabte Strahlenexposition der Brust im Kindes-, Jugend- und frühen Erwachsenenalter und ein Alkohol- oder Nikotinabusus. [135] [136]

1.2.3 Prävention und Früherkennung

Hierbei gilt es zwischen Primärprophylaxe und Früherkennung zu unterscheiden. Als Primärprophylaxe bezeichnet man vorbeugende medizinische Maßnahmen, die bei Vorliegen bestimmter Risikofaktoren das Auftreten einer Erkrankung verhindern sollen [137]. Zur Primärprophylaxe eines Mammakarzinoms beziehen sich die Empfehlungen auf die bisher bekannten oben genannten erworbenen beziehungsweise veränderbaren Risikofaktoren. Einerseits die regelmäßige körperliche Betätigung, um Übergewicht und eine postmenopausale Gewichtszunahme zu vermeiden und andererseits der Verzicht auf Alkohol- und Nikotinkonsum. Auch eine ballaststoffreiche Ernährung wird empfohlen. [138] [139] Als Früherkennung hingegen bezeichnet man: „den systematischen Einsatz verschiedener diagnostischer Verfahren zur frühzeitigen Entdeckung von Krankheiten – mit dem Ziel früher zu intervenieren und dadurch bessere therapeutische Ergebnisse zu erzielen“ [140]. Eine Früherkennungsmaßnahme zielt dabei auf die Früherkennung von Krankheiten ab, für die eine wirksame Therapie existiert und zwar mit einer Untersuchungstechnik, die so wenig invasiv wie möglich und für die Patient*innen akzeptabel ist [141]. Dabei ist es wichtig, dass eine regelmäßige Evaluierung eines jeden Früherkennungsprogramms in Bezug auf relevante Ergebnisse wie etwa Inzidenz, Mortalität, Morbidität und patientenbezogenes Outcome und dessen Risiken wie etwa falsch positive und falsch negative Befunde sowie Überdiagnosen und –therapie stattfindet [133]. Zu den Methoden der Früherkennung des Mammakarzinoms zählen neben der Tastuntersuchung der Brust, die Mammographie, die Sonographie sowie die Magnetresonanztomographie (Mamma-MRT). In Deutschland umfassen die Leistungen der gesetzlichen Krankenkassen bei Frauen einerseits die jährliche Tastuntersuchung der Brust und der Achselhöhlen durch einen Arzt beziehungsweise eine Ärztin ab dem 30. Lebensjahr sowie alle zwei Jahre die Durchführung einer Mammographie im Alter von 50 bis 69 Jahren (Mammographie-Screening-Programm). [142] [143] Die Brustkrebsmortalität konnte durch den Einsatz der Mammographie reduziert werden [133] [144]. Die Wirksamkeit der klinischen Brustuntersuchung sowie der Selbstuntersuchung ist deutlich geringer. Da das Mammakarzinom des Mannes eine sehr seltene Erkrankung darstellt, sollen asymptomatische Männer in Deutschland in keine speziellen Früherkennungsmaßnahmen eingebunden werden. Tritt jedoch eine brustkrebspezifische Symptomatik auf, erfolgt die Abklärung ebenfalls mittels Mammographie und Ultraschall. [133]

1.2.4 Symptome und Klinik

Die Symptome, welche im Rahmen einer Brustkrebserkrankung auftreten können, lassen sich in die zwei Gruppen spezifische versus unspezifische Symptome unterteilen. Spezifische Symptome treten im Bereich der Brust selbst auf. Viele neu aufgetretene Beschwerden oder Veränderungen an der Brust können als klinische Zeichen eines Mammakarzinoms fungieren. Das klinische Leitsymptom hierbei ist ein tastbarer Knoten in der Brust. Weitere mögliche Befunde umfassen Größen- oder Formveränderungen der Brust sowie Asymmetrien zur Gegenseite, lokale Zeichen einer Entzündung oder Infektion. Auch Hautunregelmäßigkeiten wie Hauteinziehungen, Hautödeme oder eine Orangenhaut (Peau d'orange) können

erste Symptome darstellen. Veränderungen können auch die Mamille betreffen und sich in Form einer Mamillenretraktion, -sekretion oder –entzündung äußern. Bedingt durch die Lymphabflussbahnen der Brust kann ebenso eine Vergrößerung der axillären beziehungsweise der supraklavikulären Lymphknoten auftreten. Selten beschreiben Betroffene auch lokalisierte Schmerzen. [131] [145] [141] Unspezifische Symptome umfassen die B-Symptomatik Müdigkeit, Nachtschweiß und Gewichtsverlust sowie muskuloskelettale Beschwerden [146].

1.2.5 Diagnostik

Patientinnen, die eines der oben genannten Symptome verspüren oder im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung einen auffälligen Befund in der Mammographie zeigen, benötigen eine weitere diagnostische Abklärung. Diese setzt sich aus den Bestandteilen Anamnese und klinische Untersuchung, Bildgebung und im Falle eines auffälligen Befundes einer Diagnosesicherung mittels Biopsie der Mamma zusammen. [141] Die klinische Untersuchung umfasst hierbei die Inspektion und Palpation der Brüste sowie ihrer Lymphabflussgebiete. Die Durchführung des Jackson-Tests, also das Zusammenschieben der Brust über einer zu tastenden Verhärtung, liefert erste Hinweise darüber, ob der Tumor benigne oder maligne ist. [131] Zusätzlich werden die axillären sowie supra- und infraklavikulären Lymphknoten palpiert. In der von Barton et al. [147] durchgeführten Metaanalyse ergab sich für die klinische Tastuntersuchung der Brust eine Sensitivität von 54% sowie eine Spezifität von 94%. Es zeigte sich außerdem eine große Schwankungsbreite, welche sich unter anderem durch das Fehlen von Konsistenz und standardisierten Untersuchungstechniken erklären lässt. Wichtige Bestandteile der Untersuchung stellen hierbei die richtige Positionierung der Patientinnen, die Gründlichkeit der Durchführung, eine systematische Vorgehensweise sowie eine Dauer von mindestens 3 Minuten pro Brust dar. [147] Zeigt sich in der klinischen Untersuchung ein pathologischer Befund kommen im nächsten Schritt bildgebende Verfahren zum Einsatz. Bei Patientinnen über 40 Jahren soll eine weitere Abklärung eines auffälligen Befundes mittels Mammographie erfolgen. Bei Frauen unter 40 Jahren soll in erster Linie die Sonographie verwendet werden und die Mammographie nur bei weiterhin bestehender Unklarheit zusätzlich hinzugezogen werden. Weitere Einsatzgebiete der Sonographie ergeben sich bei einer hohen mammographischen Dichte sowie bei klinisch unklaren mammographischen sowie MR-tomographischen Befunden der Beurteilungskategorie 0, III, IV und V. [133] Eine kontrastmittelgestützte Magnetresonanztomographie ist den Fällen vorbehalten, in denen eine sichere Diagnosestellung mithilfe konventioneller Diagnostik sowie perkutaner Biopsie nicht möglich ist. Der dritte Schritt beinhaltet die Biopsieentnahme. Diese kann sonographisch, mammographisch oder MRT-gesteuert erfolgen. Zusätzlich kann auch eine Lymphknoten-Stanzbiopsie durchgeführt werden. Stellt sich im Rahmen der Diagnostik die Diagnose eines Mammakarzinoms soll bei einem neu diagnostizierten Mammakarzinom ab dem UICC Stadium II mit erhöhtem Risiko sowie im Stadium III und IV ohne Symptomatik für das Vorliegen von Metastasen oder bei klinischem Verdacht auf eine Metastasierung ein Staging durchgeführt werden. Dieses beinhaltet eine Computertomographie des Thorax und Abdomens und je nach Höhe des Metastasierungsrisikos gegebenenfalls eine anschließende Skelettszintigraphie. Bei einem

nachgewiesenen Malignom soll prätherapeutisch außerdem eine beidseitige Mammographie erfolgen. [133]

1.2.6 Pathologie

Um ein optimales Patientinnenmanagement gewährleisten zu können, sollte ein standardisierter Pathologiebericht mit zusätzlicher Checkliste zur Anwendung kommen [148]. Im Falle eines invasiven Karzinoms sollten dabei folgende Informationen enthalten sein: der histologische Typ, das Grading, der Hormonrezeptor- und HER2-Status, die Tumorgroße und der Lymphknotenbefall. Dem Operationspräparat selbst können Angaben zur peritumoralen Gefäßinvasion sowie dem Status des Operationsrandes entnommen werden. [141]

Histologische Klassifikation

In der aktuellen und seit 2013 gültigen WHO-Klassifikation von Tumoren der Brust der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) spiegelt sich ein deutlicher Fortschritt im Verständnis der Pathologie und Molekularbiologie von Brustkrebs wider. Es werden 19 verschiedene Hauptuntertypen des Mammakarzinoms unterschieden, wobei die beiden Gruppen invasives Karzinom mit beziehungsweise ohne speziellen Typ unterschieden werden. Das invasive Karzinom ohne speziellen Typ stellt mit einem Anteil von zirka 70 - 75% den häufigsten Typ dar. Unter den Karzinomen mit speziellem Typ präsentiert sich das lobuläre Karzinom mit zirka 10 - 14% als häufigster Subtyp. Es folgen weitere 17 Karzinomsubtypen, die etwa Merkmale eines invasiven lobulären, tubulären, kribiformen, metaplastischen, apokrinen, muzinösen, papillären und mikropapillären Karzinoms aufweisen sowie Karzinome mit medullären, neuroendokrinen und Speicheldrüsen- oder Hautadnexen-Merkmalen. [149] [150] Die Klassifikation dieser unterschiedlichen Tumortypen erfolgt anhand der pathologischen Morphologie. Die Tumortypen korrelieren jedoch auch mit bestimmten klinischen, epidemiologischen und molekularen Merkmalen. [150] Während manche der speziellen Typen wie etwa das tubuläre, kribiforme oder muzinöse Karzinom eine gute Prognose aufweisen, werden andere Tumortypen wie etwa das pleomorphe lobuläre Karzinom, das high-grade metaplastische Karzinom oder das mikropapilläre Karzinom mit einem sehr schlechten klinischen Outcome verbunden [141].

Grading

Ein weiterer wichtiger Prognosemarker ist das Grading eines Tumors. Die aktuelle Leitlinie für invasive Mammakarzinome verwendet zur morphologischen Beurteilung des Differenzierungsgrades eines Tumors das von Elston und Ellis überarbeitete Bloom-Richardson-Grading. Diese Methode umfasst drei morphologische Merkmale für eine objektive Gestaltung der Kriterien. Die Dignitätskriterien umfassen dabei das Ausmaß der Kernpolymorphien, den Anteil an tubulären Strukturen sowie die Anzahl an Mitose. Daraus ergeben sich die drei Differenzierungsgrade G1 bis G3. Je höher der Grad, desto schlechter ist das Gewebe differenziert

und desto höher ist der Malignitätsgrad. Patientinnen mit Tumoren des Grades 1 zeigen eine signifikant bessere Prognose als Tumoren des Grades 2 oder 3. [151] [152]

Therapeutische Biomarker, Hormonrezeptor- und HER2-Status

Das Mammakarzinom kann anhand von Genexpressionsmustern in unterschiedliche molekulare Subtypen unterteilt werden [153] Die Unterteilung basiert dabei auf drei Tumormarkern: dem Östrogenrezeptor (ER), dem Progesteronrezeptor (PR) und dem humanen epidermalen Wachstumsfaktor 2 (HER2) [154]. Daraus ergeben sich wiederum vier verschiedene Typen. Einerseits der Subtyp Luminal A mit positivem Östrogen- und Progesteronrezeptor, aber HER2-negativem Status, sowie der Subtyp Luminal B mit Östrogen- und Progesteron als auch HER2-positivem Status. Der dritte Subtyp mit HER2 Überexpression ist definiert als eine Östrogen- und Progesteronrezeptornegativität bei HER2-Positivität. Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC) weist sowohl einen negativen Östrogen- und Progesteronrezeptor als auch einen negativen HER2-Status auf. [155] Die unterschiedlichen Subtypen korrelieren sowohl mit dem klinischen Outcome als auch mit den Therapiemöglichkeiten und dem Therapieansprechen [156].

Ki-67-Proliferationsindex

Durch den Ki-67-Proliferationsindex ist es möglich eine Unterscheidung zwischen den beiden molekularen Subtypen Lumina A und B vorzunehmen. Dabei spricht Lumina A für eine geringe Proliferationsrate und Lumina B für eine hohe Proliferationsrate, wobei ein hoher Proliferationsindex mit einem schnellen Tumorwachstum korreliert. [153] [157] Aufgrund fehlender internationaler Grenzwerte ist der Ki-67-Proliferationsindex jedoch einer der umstrittensten Biomarker, der für die Behandlungsentscheidung im Rahmen der Mammakarzinomtherapie herangezogen wird [158]. Die in den verschiedenen Studien veröffentlichten Cut-off-Werte für Ki-67 zur Unterscheidung der beiden Luminae schwanken zwischen 5 - 34% [159] [160]. Jedoch kann die Verwendung des Ki-67-Proliferationsindex einen Beitrag zur Vorhersage eines Luminal B-Phänotyps leisten. Dies erleichtert die Entscheidung, ob eine Patientin im Frühstadium der Tumorerkrankung von einer adjuvanten Chemotherapie profitiert. [161]

1.2.7 Stadieneinteilung mittels TNM-Klassifikation

Das TNM-System dient der Klassifizierung bösartiger Tumore und wurde zwischen 1943 und 1952 von Pierre Denoix entwickelt. Ziel ist es hierbei die anatomische Ausbreitung der Erkrankung zu definieren. Die Grundlage dafür bilden drei Komponenten[162]:

- T: Ausdehnung des Primärtumors
- N: Fehlen oder Vorhandensein und Ausmaß von regionalen Lymphknotenmetastasen
- M: Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen

Das Mammakarzinom wird nach der aktuellen Leitlinie von 2021, wie in Tabelle 1.3 beschrieben, in die TNM-Klassifikation eingepflegt:

Tabelle 1.3: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms mittels TNM-Klassifikation (modifiziert nach [133])

Stadium	Bedeutung
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Duktales Carcinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobuläres Carcinoma in situ
Tis (Paget)	Morbus Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T1	Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser
T1mi	Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger im größten Durchmesser
T1a	Größer 0,1 cm bis maximal 0,5 cm im größten Durchmesser
T1b	Größer 0,5 cm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser
T1c	Größer 1 cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor größer als 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor größer als 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, soweit unter T4a - T4d beschrieben
T4a	Ausdehnung auf Brustwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, vorderer Serratusmuskel, jedoch nicht die Pektoralismuskulatur)
T4b	Ödem (einschließlich "peau d'orange") oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust
T4c	Kriterien 4a und 4b
T4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

1.2.8 Therapie

Beim nicht metastasierten Mammakarzinom sind die Hauptziele der Therapie einerseits die Eradikation des Tumors aus der Brust sowie den regionalen Lymphknoten und andererseits die Verhinderung von Rezidiven. Beim metastasierten Mammakarzinom bestehen die therapeutischen Ziele in der Lebensverlängerung und Symptomlinderung. Dabei unterscheidet man die lokale Therapie von der systemischen Therapie. [163]

Lokale Therapie

Die lokale Therapie umfasst die chirurgische Therapie der Brust und gegebenenfalls der axillären Lymphknoten sowie eine neoadjuvante oder adjuvante Strahlentherapie.

Operative Therapie Die operative Therapie hat sich im zwanzigsten Jahrhundert deutlich weiterentwickelt und spiegelt einen Trend von der radikalen Mastektomie zur brusterhaltenden Therapie (BET) mit anschließender Bestrahlung wider [164]. Die beiden Ansätze haben sich in Bezug auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben als gleichwertig erwiesen [165]. Ziel der chirurgischen Therapie ist die Komplettresektion des Tumors, welche sich durch tumorfreie Resektionsränder auszeichnet (R0) [166]. Seit 1990 wird die brusterhaltende Therapie von den National Institutes of Health (NIH) als der bevorzugte chirurgische Behandlungsstandard für Frauen mit Brustkrebs im Frühstadium definiert [167] [168]. Durch die Etablierung von flächendeckenden Mammographie-Screenings konnte die Anzahl der Diagnosestellungen im Frühstadium deutlich erhöht werden. Dadurch können mindestens zwei Drittel aller erkrankten Patientinnen eine BET in Anspruch nehmen. [168] Absolute Kontraindikationen für eine BET stellen das multizentrische Karzinom, das inflammatorische Mammakarzinom, Kontraindikationen für die nach einer BET notwendige adjuvante Bestrahlung, eine R1-Resektion nach definitiver Operation, eine extensive intraduktale Komponente sowie der Patientinnenwunsch dar. Zu den relativen Kontraindikationen zählt unter anderem ein ungünstiges Tumor-Brust-Verhältnis. [164] [168] [166] Die BET führt sowohl durch die Verbesserung des kosmetischen Ergebnisses als auch durch das dadurch bedingte psychologische Wohlbefinden zu einer erhöhten Lebensqualität [169]. Neben der operativen Therapie der Mamma spielt die Sentinel-Node-Biopsie (SLNB) eine entscheidende Rolle in der Erfassung des Nodalstatus beim Mammakarzinom. Durch die Entnahme des Sentinel Lymphknotens kann eine hohe Staging-Genauigkeit gewährleistet werden. [170] Das axilläre Staging soll insbesondere bei palpatorisch sowie sonographisch unauffälligem Lymphknotenstatus durchgeführt werden, um die Planung der operativen sowie adjuvanten Therapie zu erleichtern [171] [172]. Wird ein Tumorbefall der Axilla durch die histologische Untersuchung nachgewiesen, kann eine Axilladisektion notwendig werden [170] [133]. Zu den möglichen Nebenwirkungen einer Axilladisektion zählen eine eingeschränkte Funktion des Lymphabflusses und das daraus resultierende Lymphödem sowie das Auftreten einer Schulter-Arm-Morbidität [173].

Strahlentherapie Die Strahlentherapie stellt einen der wichtigsten Grundpfeiler in der kurativen und palliativen Behandlungsstrategie von soliden Tumoren, wie etwa dem Mammakarzinom, dar. Der Zweck hierbei ist die selektive Tötung von Tumorzellen, während das umliegende normale Gewebe geschützt wird. [1] Erreicht werden die gewünschten DNA-Schäden entweder direkt oder indirekt durch die Generierung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese verursachen diverse DNA-Läsionen wie etwa Einzel- und Doppelstrangbrüche, DNA-Protein-Quervernetzungen und DNA-Basenschäden. [174] In weiterer Folge werden dadurch Unterbrechungen des Zellzyklus oder apoptotische Reaktionen ausgelöst [175]. In Bezug auf das Mammakarzinom verfolgt die postoperative Strahlentherapie zwei Ziele. Einerseits erfolgt die Strahlentherapie in den frühen Stadien I/II anschließend an eine BET und soll damit vergleichbare lokale Tumorkontroll- und Überlebensraten erzielen wie die radikale Mastektomie. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien trägt die Strahlentherapie zusätzlich zur radikalen Mastektomie zu einer Steigerung des Gesamtüberlebens bei [176] und kann im Falle einer palliativen Situation eine bessere Symptomkontrolle ermöglichen.

[133] Die adjuvante Strahlentherapie nach BET beim Mammakarzinom stellt die effektivste Therapieoption zur Senkung des intramammären Rezidivrisikos dar und führt daher zu einer erheblichen Reduktion der brustkrebsspezifischen Mortalität [177] [178]. Hierbei werden zwei Strahlentherapieschemata gegenübergestellt. Einerseits die Bestrahlung der Brust in Hypofraktionierungen (Gesamtdosis zirka 40 Gy über den Zeitraum von 3 bis 5 Wochen in zirka 15 - 16 Fraktionen) und andererseits die Bestrahlung in konventioneller Fraktionierung (Gesamtdosis zirka 50 Gy über den Zeitraum von 5 bis 6 Wochen in zirka 25 - 28 Fraktionen). [133] Vorteile der Hypofraktionierung sind verminderte akute Hautreaktionen, etwas geringere Spätfolgen [179] [180] sowie ein verkürzter Behandlungszeitraum [181]. Durch eine zusätzliche Boost-Bestrahlung des Tumorbettes wird die lokale Rezidivrate weiter gesenkt. Indiziert ist diese einerseits bei allen prämenopausalen Patientinnen und andererseits bei postmenopausalen Patientinnen mit Vorliegen von Risikofaktoren (G3, HER2-positiv, tripel-negativ, > T1). [133] [182] Bei Patientinnen mit niedrigem Rezidivrisiko kann ebenso eine alleinige Teilbrustbestrahlung durchgeführt werden [183], während bei lokal fortgeschrittenen und nodal-positiven Mammakarzinomen eine Indikation zur Postmastektomie-Strahlentherapie gegeben sein kann [133] [184]. Je nach Nodalstatus profitieren Patientinnen mit einem erhöhten Rezidivrisiko von der adjuvanten Bestrahlung der regionalen Lymphabflussgebiete, indem sowohl das krankheitsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben verbessert wird [185]. Die Ausprägung von radiogen bedingte Nebenwirkungen hängt unter anderem vom bestrahlten Volumen, der Region, der Gesamtdosis und der Gesamtbehandlungsdauer ab [186].

Systemische Therapie

Die systemische Therapie gliedert sich in die Kategorien endokrine Therapie, Chemotherapie, Antikörpertherapie sowie Immuntherapie und zielgerichtete Therapie. Hierbei wird unterschieden, ob die Therapie präoperativ, also neoadjuvant, oder postoperativ, adjuvant, erfolgt. Um eine für die erkrankte Person optimale Therapie gewährleisten zu können, werden die Faktoren Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Grading, HER2-Status, Hormonrezeptorstatus, Menopausenstatus und das Alter berücksichtigt [187] [161]. Eine neoadjuvante systemische Therapie kommt bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen, inflammatorischen oder primär inoperablen Mammakarzinomen zur Anwendung [188].

Endokrine Therapie Die endokrine Therapie wird standardmäßig adjuvant angewandt. Bei Patientinnen in der Postmenopause, welche an einem endokrin sensitiven Mammakarzinom erkrankt sind und die Möglichkeit einer Operation oder Chemotherapie nicht gegeben ist oder diese von der Patientin nicht gewollt ist, kann auch eine primäre endokrine Therapie durchgeführt werden. In speziellen Situationen wie etwa bei einem inoperablen Tumor oder einer multimorbiden Patientin kann eine neoadjuvante endokrine Therapie ebenfalls in Betracht gezogen werden. [133] Ziel der endokrinen Therapie ist es dem Östrogen-geförderten Tumorwachstum entgegenzuwirken, weshalb sie die primär systemische Therapie bei Hormonrezeptor-positiven/ HER2-negativen Mammakarzinomen ist. Standardmäßig besteht diese aus oralen Antiöstrogenen, welche täglich über fünf Jahre eingenommen werden. [163] Die Wahl

des Wirkstoffes richtet sich dabei nach dem Menopausenstatus. Die Einnahme von Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator, der die Bindung von Östrogen an den Östrogenrezeptor konkurrierend hemmt, ist sowohl prä- als auch postmenopausal möglich. Aromatasehemmer wie beispielsweise Anastrozol, Exemestan und Letrozol bewirken eine Senkung des zirkulierenden Östrogens, indem sie die Umwandlung von Androgenen in Östrogene hemmen und können in der Postmenopause eingesetzt werden. [189] Prämenopausal kann durch die Einnahme von GnRH-Analoga oder durch eine bilaterale Ovariectomie eine Ovarsuppression bewirkt werden [190]. Standardmäßig wird die endokrine Therapie nach dem Abschluss der Chemotherapie begonnen. Eine Einnahme parallel zur Strahlentherapie ist möglich. [133] Durch den Einsatz von Tamoxifen oder Aromatasehemmer konnte eine signifikante relative Reduktion des Rezidivrisikos um 40% und eine relative Reduktion der Mortalität um zirka 30% gezeigt werden [187] [191] [192].

Chemotherapie Trotz der zahlreichen kurz- als auch langfristigen Risiken der Chemotherapie bildet diese einen wichtigen Bestandteil der systemischen Therapie beim Mammakarzinom. Beim triple-negativen Mammakarzinom ist sie die einzige systemische Therapie mit nachgewiesener Wirksamkeit. Aber auch als Ergänzung zur Antihormontherapie beim hormonrezeptor-positiven Phänotyp sowie zur Antikörpertherapie beim HER2-positiven Phänotyp spielt sie eine entscheidende Rolle. [163] Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass beim Einsatz der gleichen Therapeutika, unabhängig ob neoadjuvant oder adjuvant, kein Unterschied in Bezug auf das Langzeitüberleben besteht [193]. Indikationen für eine adjuvante Chemotherapie sind [133]:

- HER2-positive Tumore: Kombination aus einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie mit einer simultanen Anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab über ein Jahr
- Hormonrezeptor-negative Tumoren (Östrogen und Progesteron)
- Fraglich endokrin-sensitive Tumoren
- Nodal-positive Tumoren
- G3
- Junges Erkrankungsalter (< 35 Jahre)

Die Therapieschemata unterscheiden sich je nach dem Risikoprofil der Patientinnen. Dabei muss das Nutzen-Risiko-Profil gut abgewogen werden. Die Indikation zur Verabreichung einer Chemotherapie stellt sich, wenn der erwartete Nutzen durch die Therapie die möglichen Nebenwirkungen und Spätschäden übersteigt. Als Standardchemotherapie wird eine Kombination aus Anthracyclin und Taxan angewandt, welche gegebenenfalls durch ein Platinderivat beim triple-negativen Mammakarzinom ergänzt werden kann. Eine Vielzahl weiterer Therapieschemata stehen zur Verfügung. Die Bedeutung von neuen Substanzen wie etwa Gemcitabine oder Capecitabine neben den etablierten Substanzen (Anthracyclinen, Taxanen, Cyclophosphamid) ist noch nicht abschließend geklärt. Die Dauer einer Standardchemotherapie beträgt in der Regel 18 - 24 Wochen. [133] [163] Der stärkste positive Effekt einer adjuvanten Chemotherapie sowohl in Bezug auf das Rezidiv- als auch auf das Mortalitätsrisiko

konnte für Frauen unter 50 Jahren gezeigt werden. Aber auch für postmenopausale Frauen ist ein Nutzen gegeben. [194] Eine neoadjuvante Chemotherapie kommt bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem, primär inoperablem oder inflammatorischem Mammakarzinom zur Anwendung und ist Teil eines multimodalen Therapiekonzeptes [133]. Die neoadjuvante und die adjuvante Chemotherapie können in Bezug auf das Gesamtüberleben als gleichwertig angesehen werden. Durch den Einsatz einer neoadjuvanten Chemotherapie kann das Tumorumfang reduziert und dadurch eine BET möglich werden. [188] [195] [196]

Antikörpertherapie Die Gruppe der humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (HER) besteht aus den vier Proteinen HER1, HER2, HER3 und HER4. Diese HER-Proteine können durch die Bildung von Heterodimeren und Homodimeren Signaltransduktionswege aktivieren und sind dadurch an der Regulation von zahlreichen Prozessen wie Wachstum, Proliferation und Überleben beteiligt. [197] [198] Sie stehen daher im Zusammenhang mit der Onkogenese [199]. Etwa 25% bis 30% der Mammakarzinome weisen eine Überexpression des HER2-Proteins auf [200] und werden mit einer aggressiven Erkrankung und einer schlechten Prognose assoziiert [201]. Bei HER2-positiven Mammakarzinomen mit einem Durchmesser ≥ 1 cm (immunhistochemisch Score 3+ und/oder positiver In-Situ-Hybridisierung) kommt eine Antikörpertherapie zur Anwendung [202]. Die Therapie der Wahl beim lokoregional begrenzten Mammakarzinom stellt dabei der monoklonale Antikörper Trastuzumab dar, der sich gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2) richtet [163]. Die Betroffenen erhalten in der Regel zunächst eine (neo-)adjuvante Behandlung mit Anthrazyklin und anschließend eine Kombination aus einem Taxan und Trastuzumab [202]. Die Dauer der Antikörpertherapie beträgt standardmäßig ein Jahr [203] [204] [205]. Beim metastasierten oder rezidierten Mammakarzinom wird eine duale Blockade aus den beiden Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab sowie Docetaxel empfohlen [206]. Die APHINITY-Studie zeigte eine signifikante Verbesserung des invasiven krankheitsfreien Überlebens bei der Kombination aus Pertuzumab mit adjuvanten Trastuzumab und Chemotherapie beim frühen Mammakarzinom mit nodal-positivem, HER2-negativem Phänotyp [207].

Immuntherapie und zielgerichtete Therapie Neben den etablierten Therapieschemata gibt es eine Vielzahl von Wirkstoffen die aktuell Gegenstand der Forschung sind. Das Ziel ist es hierbei Immuntherapiekombinationen zu entwickeln, die Non-Responder in Responder verwandeln, ein bereits bestehendes Therapieansprechen intensivieren und entstandene Resistenzen überwinden. Eine hohe Priorität hat die Identifizierung von Biomarkern, die das Potenzial haben, die für die jeweilige Patientin beste Therapiekombination zu identifizieren. [208]

Bereits zugelassene Wirkstoffe beim Mammakarzinom mit Fernmetastasierung beziehungsweise einem Rezidiv, Progress oder fehlendem Therapieansprechen einer endokrinen Therapie sind Cyclin-abhängige Kinase 4/6 (CDK4/6)-Inhibitoren. Die Wirkstoffe Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib dienen zusätzlich zur antihormonellen Therapie als Erstlinienoption für Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem und HER2-negativem Phänotyp im metasta-

sierten Stadium. [209] [210] [211] Obwohl die PALOMA-2 und PALOMA-3 Studien erste vielversprechende Ergebnisse in der Kombination von Palbociclib mit Letrozole beziehungsweise Fulvestrant gezeigt haben [212] [213], wird der klinische Einsatz von CDK4/6-Inhibitoren durch die Entwicklung von primären oder sekundären Resistenzen erschwert [209]. Die Phase-III-Studie PENELOPE-B zeigte keine Verbesserung des invasiven krankheitsfreien Überlebens in der Kombination von Palbociclib mit einer antihormonellen Therapie bei Patientinnen ohne vollständiges Ansprechen auf eine taxanhaltige Chemotherapie mit hohem Rezidivrisiko [214]. Die Immuntherapie stellt insbesondere beim triple-negativen Mammakarziom (TNBC) einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Diese führte bei anderen soliden Tumoren bereits zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens. [215] Der Wirkmechanismus von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) beruht auf der Blockade von inhibitorischen Interaktionen zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und T-Lymphozyten an den Checkpoints [216]. Ein verbessertes Therapieansprechen durch den Einsatz von ICI gegen das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA-4) (z.B.: Ipilimumab), programmed cell death protein 1 (PD-1) (z.B.: Pembrolizumab, Nivolumab) und den entsprechenden Liganden (PD-L1) (z.B.: Atezolizumab, Avelumab) konnte bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten gezeigt werden [217] [218] [219] [220]. Die Phase-III-Studie KEYNOTE-119 untersuchte den Effekt von Pembrolizumab als Monotherapie beim vorbehandelten metastasierten TNBC im Vergleich zur Chemotherapie. Eine signifikante Verbesserung der Ansprechrates oder des Gesamtüberlebens zeigte sich nicht. [221] Der Einsatz der PD-L1 Inhibitoren Avelumab und Atezolizumab als Monotherapie ergab ebenfalls eine begrenzte Wirksamkeit beim metastasierten TNBC [222] [223]. Die Kombination von Chemotherapeutika und PD-1/PD-L1 Inhibitoren führten jedoch zu vielversprechenderen Ergebnissen. Zahlreiche Studien untersuchen den Effekt von unterschiedlichsten Kombinationen aus Chemotherapeutika und Immun-Checkpoint-Inhibitoren als neoadjuvante und adjuvante Therapieregime. Die erste Immuntherapiezulassung erhielt Atezolizumab und nab-Paclitaxel bei PD-L1-positivem metastasiertem TNBC. [224] Um die Resistenzen gegen PD-1/PD-L1 Inhibitoren zu überwinden, werden weitere zielgerichtete Therapien gegen das mTNBC untersucht. Eine wichtige Rolle spielen hierbei Polyadenosindiphosphatribosylpolymerase (PARP)-Inhibitoren wie etwa Olaparib oder Niraparib. [225] [226] Bei Patientinnen mit BRCA-Mutation und metastasiertem HER2-negativem Mammakarzinom zeigte die Monotherapie mit Olaparib eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu Standardtherapien [227]. Eine zentrale Rolle spielt außerdem die Serin/Threonin-Kinase AKT als eine der Schlüsselkomponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs [228]. Die Beeinflussung von AKT bietet sich bei vielen Brustkebs-Subtypen zusätzlich zur Chemotherapie und Antihormontherapie als attraktive Behandlungsstrategie an [229]. Beispiele für AKT-Inhibitoren sind Capivasertib und Ipatasertib, die bereits in Studien der Phase I und II getestet wurden [230] [231] und aktuell Teil von Phase-III-Studien sind [232]. Weitere Möglichkeiten um eine günstigere Antitumor-Immunität zu bewirken könnte die Kombination aus Immun-Checkpoint-Inhibitoren mit MEK-Inhibitoren darstellen [233]. Die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien ist von großer Bedeutung und einige Wirkstoffe befinden sich bereits in der klinischen Entwicklung [215].

1.2.9 Prognose und Nachsorge

Prognosefaktoren sind definiert als Faktoren mit unabhängigem Einfluss sowohl auf den individuellen Krankheitsverlauf als auch das Gesamtüberleben. Sie sind zu Therapiebeginn bekannt und schließen die möglichen Komplikationen und Nebenwirkungen der Therapie nicht mit ein. [234] Sie geben darüber Aufschluss, mit welcher Wahrscheinlichkeit Metastasen oder Rezidive auftreten und wie hoch das Mortalitätsrisiko ist [235]. Hierzu zählen neben dem Alter insbesondere Faktoren zur Ausbreitung des Tumors (pTNM-Status, peritumorale Lymphgefäßinvasion) sowie histopathologische Kriterien (histologische Klassifikation, histopathologisches Grading, Hormonrezeptorstatus, HER2-Status, Proliferationsindex Ki-67) [236]. Die Prognose korreliert dabei mit dem Krankheitsstadium. Die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Metastasen oder einem Rezidiv ist bei Patientinnen mit einem kleinen Tumor ohne axillären Lymphknotenbefall am niedrigsten. [237] Durch die stetige Weiterentwicklung multimodaler Therapieoptionen hat sich die Prognose in allen Stadien über die letzten Jahrzehnte deutlich verbessert [133] [161]. Nach abgeschlossener Primärbehandlung wird allen Patientinnen empfohlen über mindestens zehn Jahre an einer speziellen Nachsorge teilzunehmen. Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Untersuchungen verlängern sich im Verlauf. In den ersten drei Jahren sollten diese vierteljährlich, im vierten und fünften Jahr halbjährlich und ab dem sechsten Jahr jährlich wahrgenommen werden. Die Nachsorgeuntersuchungen umfassen eine Anamneseerhebung, die körperliche Untersuchung sowie die Aufklärung der Patientinnen. Zusätzlich sollte über den Zehnjahreszeitraum jährlich eine Mammographie oder Mammasonographie durchgeführt werden. Laboruntersuchungen und weitere bildgebende Verfahren kommen nur im Falle eines klinischen Verdachts auf ein Rezidiv oder Metastasen zur Anwendung. [238] [239] [133] Im Vergleich zu anderen Karzinomen weist das Mammakarzinom mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von zirka 88% und einer 10-Jahres-Überlebensrate von zirka 82% eine relativ gute Prognose auf [240].

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Vorhersagen zufolge soll die weltweite Mammakarzinominzidenz bei Frauen bis 2050 3,2 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr betragen. Dadurch wird deutlich, welche erheblichen Ausmaße diese Erkrankung annimmt, welche gesellschaftlichen Auswirkungen sie mit sich bringt und welche Wichtigkeit Präventions- und Behandlungsmaßnahmen einnehmen. [241] Durch die Entdeckung von spezifischen prädiktiven und prognostisch nützlichen Biomarkern wurden die Behandlungsmöglichkeiten von Mammakarzinompatientinnen deutlich vorange-trieben [242]. Trotz großer Fortschritte in der Medizin gibt es noch eine Vielzahl offener Fragen [241]. Die Hauptmotivation bei der Erstellung dieser Doktorarbeit war es einen wissenschaftli-chen Beitrag zur Krebsforschung unter besonderer Berücksichtigung von exosomalem Hsp70 zu leisten. Dabei sollen in Bezug auf exosomales Hsp70 drei große Themengebiete unter-sucht werden:

- Unterscheidet sich die prädiktive Aussage von freiem Hsp70 (R&D ELISA) beziehungs-weise freiem und exosomalem Hsp70 (compHsp70 ELISA) im Blut von Mammakarzi-nompatientinnen?
- Besteht eine Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Parametern des Mammakar-zinoms und der exosomalen Hsp70-Konzentration?
- Eignet sich exosomales Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit beim Mammakarzinom?

In mehreren Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass das Vorliegen eines Mam-makarzinoms mit einer Überexpression von Hsp70 einhergehen kann [243] [244] und diese Hochregulierung mit einer erhöhten Therapieresistenz, einem erhöhten Metastasierungsri-siko sowie einer schlechten Prognose korreliert [245] [246]. Im Unterschied zu bereits be-stehenden Studien, welche den Zusammenhang zwischen dem Hitzeschockprotein 70 und klinisch-pathologischen Parametern des Mammakarzinoms bereits untersucht haben, bietet diese Doktorarbeit durch die Anwendung des compHsp70 ELISAs einen neuen Ansatzpunkt. Während herkömmliche ELISA-Verfahren nur freies Hsp70 bestimmen können, ist der neu entwickelte compHsp70 ELISA in der Lage sowohl freies als auch exosomales Hsp70 zu detektieren und könnte damit Rückschlüsse auf die lebende Tumormasse zulassen [9].

2 Material und Methoden

Dieses Kapitel dient zur näheren Erläuterung des Patient*innenkollektivs sowie der verwendeten Materialien und Methoden zur Durchführung des compHsp70 ELISA.

2.1 Studienverlauf und Patient*innenkollektiv

Die experimentellen Versuche zur Bestimmung der Hsp70-Konzentration wurden anhand von zuvor entnommenen Plasmaproben von insgesamt 40 Studienteilnehmerinnen ermittelt. Einschlusskriterien hierfür waren das weibliche Geschlecht und das Vorliegen eines unilateralen Mammakarzinoms. Als Ausschlusskriterien wurden in Bezug auf die Tumorerkrankung selbst das Vorliegen eines Zweitkarzinoms oder einer Fernmetastasierung definiert sowie in Bezug auf therapeutische Aspekte eine bereits vor der Brustkrebserkrankung durchgeführte Strahlentherapie, eine neoadjuvante Strahlentherapie oder eine operative Mastektomie. Alle eingeschlossenen Karzinome wurden als T1 oder T2 klassifiziert. Das gewählte Studiendesign entspricht einer Fall-Kontroll-Studie, welche definiert ist als eine retrospektive Studie, die einen Vergleich zwischen Erkrankten und Nicht-Erkrankten anhand von vergangenen Expositionen anstellt [247]. In dieser Doktorarbeit werden die oben genannten 40 an Brustkrebs erkrankten Patientinnen mit einer Anzahl von insgesamt 108 Gesundspender*innen verglichen. Zur Ermittlung der Hsp70-Konzentration der Mammakarzinompatientinnen beinhaltete der Versuchsablauf die Blutabnahme der Probandinnen zu den in der Abbildung 2.1 dargestellten sechs verschiedenen Zeitpunkten.



Abbildung 2.1: Blutabnahmen im Zeitverlauf (modifiziert nach [10])

Alle Patientinnen erhielten primär eine operative brusterhaltende Therapie (BET), die einer Kompletresektion des Tumors mit tumorfreien Resektionsrändern (R0) entspricht [166]. Um das Risiko eines Rezidives beziehungsweise einer Fernmetastase zu reduzieren sowie die krebspezifische Mortalität zu verringern schloss sich anschließend, mit Ausnahme von zwei Patientinnen, eine Strahlentherapie der betroffenen Brust an. Die ersten drei Blutabnahmen erfolgten während der therapeutischen Behandlung der Patientinnen jeweils unmittelbar nach der operativen Therapie, nach einer Bestrahlung mit 30 Gy und nach Vollendung der Strahlentherapie mit insgesamt 40 Gy, 60 Gy beziehungsweise 66 Gy. Drei weitere Blutabnah-

men wurden im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen nach jeweils sechs Wochen, sechs Monaten und einem Jahr nach abgeschlossener Strahlen- bzw. Chemotherapie entnommen. Die Antihormontherapie wird nach der aktuellen Leitlinie von 2021 über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren fortgesetzt [133] und erstreckt sich damit auch über die Abnahmezeitpunkte 4, 5 und 6. Vor der Blutabnahme erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Patientinnen über die Studie und diese stimmten der Teilnahme schriftlich zu. Zusätzlich wurde vor Studienbeginn die Genehmigung gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 durch das lokale Ethikkomitee des Klinikums Rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland eingeholt. Um den Gesundheitszustand der Patientinnen zu ermitteln, wurden diese 6 bis 8 Jahre nach Beendigung der Therapie telefonisch verständigt. Die Patientencharakteristika sind in den Tabellen 2.1, 2.2 und 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Patientinnencharakteristika in Bezug auf Risikofaktoren

Patientin Nr.	Risikofaktoren				
	Alter	Nikotin	Alkohol	BMI	D.M. Typ 2
1	71	0	1	20	0
2	69	0	0	22	0
3	56	0	1	20	0
4	66	1	1	17	0
5	54	1	0	24	0
6	68	1	0	27	1
7	44	0	0	20	0
8	52	0	1	24	0
9	44	0	1	19	0
10	57	1	1	20	0
11	57	0	1	28	0
12	48	0	1	19	0
13	65	1	1	38	1
14	51	1	1	21	0
15	67	0	1	26	0
16	43	0	1	25	0
17	76	0	1	25	0
18	60	1	0	31	0
19	62	0	1	19	0
20	72	0	0	23	0
21	69	1	0	24	1
22	46	0	0	21	0
23	46	0	0	20	0
24	53	0	0	-	0
25	57	0	1	28	0
26	52	0	0	27	0
27	64	0	0	33	0
28	60	0	1	18	0
29	83	0	1	24	0
30	52	0	1	24	0
31	75	0	1	25	0
32	45	1	1	20	0
33	49	0	0	31	0
34	63	0	0	20	0
35	72	1	1	26	0
36	33	1	0	24	0
37	55	1	1	34	0
38	65	1	1	23	0
39	49	0	0	29	0
40	66	1	0	23	0

Tabelle 2.2: Patientinnencharakteristika in Bezug auf tumorspezifische Parameter

Patientin Nr.	Tumorspezifische Parameter			
	T	N	M	Grading
1	2	0	0	1
2	1c	0	0	1
3	1b	0	0	2
4	1b	0	0	2
5	1c	1	0	1
6	1c	0	0	2
7	1a	0	0	2
8	1c	0	0	2
9	1c	0	0	2
10	1c	0	0	2
11	1a	0	0	3
12	1b	0	0	1
13	2	0	0	2
14	1b	0	0	2
15	1c	0	0	2
16	1c	0	0	2
17	2	0	0	2
18	1b	0	0	2
19	1b	0	0	2
20	2	0	0	2
21	2	0	0	1
22	1c	0	0	1
23	1b	0	0	2
24	1b	0	0	2
25	1c	1	0	1
26	1c	0	0	2
27	1a	0	0	2
28	1c	0	0	2
29	1c	0	0	2
30	1c	0	0	2
31	1a	0	0	3
32	1b	0	0	1
33	2	0	0	2
34	1b	0	0	2
35	1c	0	0	2
36	1c	0	0	2
37	2	0	0	2
38	1b	0	0	2
39	1b	0	0	2
40	2	0	0	2

Tabelle 2.3: Patientinnencharakteristika in Bezug auf Therapieschemata

Patientin Nr.	Therapieschemata		
	Strahlentherapie	Chemotherapie	Antihormontherapie
1	60	0	1
2	40	0	1
3	66	0	1
4	66	0	0
5	60	1	0
6	60	0	1
7	60	0	0
8	66	1	0
9	66	0	0
10	60	0	0
11	60	0	0
12	60	0	0
13	60	0	0
14	60	1	0
15	60	0	1
16	60	0	1
17	60	1	0
18	60	0	0
19	60	0	1
20	60	1	0
21	60	0	1
22	40	0	1
23	66	0	1
24	66	0	0
25	60	1	0
26	60	0	1
27	60	0	0
28	66	1	0
29	66	0	0
30	60	0	0
31	60	0	0
32	60	0	0
33	60	0	0
34	60	1	0
35	60	0	1
36	60	0	1
37	60	1	0
38	60	0	0
39	60	0	1
40	60	1	0

2.2 Material

Die verwendeten Materialien lassen sich sechs Kategorien zuordnen und werden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit Name, Hersteller und Katalognummer in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 2.4: Reagenzien

Name	Hersteller	Katalognr.
Alkopharm 80 (Ethanol)	Brüggemann Alcohol, Heilbronn, Deutschland	60880
BioFX TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrate	Surmodics, Inc., Eden Prairie, MN, USA	TMBS-0100-01
HRP-Protector	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland	222 500
Liquid Plate Sealer	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland	160 500
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland	1063920500
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	S6014
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	D8537
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	339741
StabilZyme SELECT® Stabilizer	Diarect, Freiburg, Deutschland	SZ03-1000
Standard (Rekombinantes Hsp70 Protein)	Im Labor hergestellt	-
Streptavidin-HRP	Senova GmbH, Weimar, Deutschland	Sonderanfertigung
Tween 20 Detergent (Tween 20)	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland	655205

Tabelle 2.5: Weitere Materialien

Name	Hersteller	Katalognr.
Cellstar Serological Pipette 5 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	606180
Cellstar Serological Pipette 10 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	607180
Cellstar Serological Pipette 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	768180
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	188271
Cellstar Tubes 25 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	760180
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	210270
Diamond D10 Tips 10 μ l	Gilson Inc., Middleton, WI, USA	F161631
Diamond D200 Tips 200 μ l	Gilson Inc., Middleton, WI, USA	F161931
Diamond D1000 Tips 1000 μ l	Gilson Inc., Middleton, WI, USA	F161671
Eppendorf Multipette ®plus		
epT.I.P.S. Standard/Bulk 2-200 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Z640093
epT.I.P.S. Standard/Bulk 20-300 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Z640107
Latex Powder-Free Examination Gloves Microtouch Coated	Ansell, Richmond, VIC, Australien	553303
Mehrkanalpipette Research plus 8-Kanal 30-300 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	3125000052
Nunc MaxiSorb®flat bottom 96 well plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	44-2404-21
Pipetman Classic P10 1-10 μ l	Gilson Inc., Middleton, WI, USA	F144802
Pipetman Classic P100 10-100 μ l	Gilson Inc., Middleton, WI, USA	F123615
Pipetman Classic P200 20-200 μ l	Gilson Inc., Middleton, WI, USA	F123601

Name	Hersteller	Katalognr.
Pipetman Classic P1000 100-1000 μ l	Gilson Inc., Middleton, WI, USA	F123602
Reagent Reservoir 50 ml	VWR International LLC, Radnor, PA, USA	89108-006
SafeSeal Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland	72.690.001
SealPlate Klebefolie	Excel Scientific Inc., Victorville, CA, USA	Z369659
Stripettor™ Ultra Pipet Controller	Corning Inc., Corning, NY, USA	4099

Tabelle 2.6: Antikörper

Antikörper	Ursprung	Isotyp	Konjugat	Hersteller	Katalognr.
Capture-Antikörper cmHsp70.2	Ratte	IgG1	-	multimmune, München, Deutschland	-
Detection-Antikörper cmHsp70.1	Maus	IgG1	Biotin	multimmune, München, Deutschland	-

Tabelle 2.7: Blutentnahme

Material	Hersteller	Katalognr.
Safety-Multifly®-Kanüle inkl. Multiadapter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	262275
S-Monovette® Clot Activator	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	011601
S-Monovette® EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	260545

Tabelle 2.8: Technische Geräte

Gerät	Hersteller
Combi-Spin PCV-2400 (Tischzentrifuge/ Vortex)	Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Shepreth, Vereinigtes Königreich
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank +4°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
VICTORTM X4 2030 Multilabel Reader	Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA

Tabelle 2.9: Verwendete Software

Software	Einsatz
LaTeX 2019	Texterstellung
Matlab R2020a	Datenauswertung und Visualisierung
Microsoft Office 2021	Datenauswertung
Perkin Elmer 2030	Probenanalyse
SPSS Statistics 28.0	Statistische Datenauswertung

2.3 Methoden

Die Durchführung dieser Doktorarbeit lässt eine Zweigliederung in einen klinisch-experimentellen sowie einen statistischen Teil zu. Beide Teilbereiche werden in weitere Unterpunkte aufgeteilt. Diese werden in chronologischer Reihenfolge angeführt und sind in dem nachfolgenden Prozessdiagramm 2.2 abgebildet.

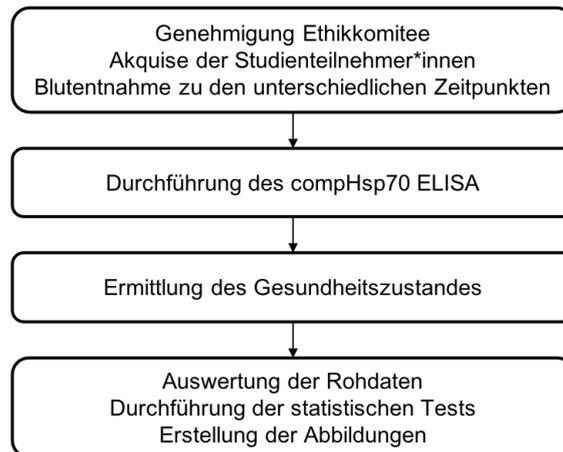


Abbildung 2.2: Klinisch-experimentelle und statistische Teilbereiche in chronologischer Reihenfolge

2.3.1 Klinisch-experimentelle Versuchsmethode

Blutentnahme und Aufbewahrung

Die 40 Blutabnahmen der Mammakarzinompatientinnen in jeweils 7,5 ml fassende EDTA-Röhrchen wurden dankenswerterweise von Dr. med. Eva Sage leitliniengerecht durchgeführt und für die Versuchsdurchführung zur Verfügung gestellt. Weitere 108 Blutproben zu jeweils 7,5 ml EDTA-Röhrchen von Gesundspender*innen wurden durch mich und weitere Labormitarbeiter*innen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gabriele Multhoff abgenommen. Es wurden anschließend sowohl Plasma- als auch Serumproben angefertigt. Um die Plasmaproben zu erhalten, wurden die EDTA-Röhrchen bei 1500 g für eine Dauer von 15 Minuten unter Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem das Blut nach zirka 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Serumseparatorröhrchen geronnen war, folgte eine weitere Zentrifugation bei 750 g für die Dauer von 10 Minuten. [9] Die Blutproben wurden in jeweils 150 μ l SafeSeal Reaktionsgefäße aliquotiert und bei einer Temperatur von -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

CompHsp70 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay, kurz ELISA genannt, wurde 1971 unabhängig voneinander von den beiden Forschungsgruppen Peter Perlmann und Eva Engvall an der Universität von Stockholm in Schweden und der Forschungsgruppe von Anton Schuurs und

Bake von Weemen in den Niederlanden entwickelt und hat seither eine bedeutende Rolle in der medizinischen Diagnostik eingenommen [248]. Um die nachfolgende Weiterentwicklung des herkömmlichen ELISAs verstehen zu können, wird zuerst das immunologische Grundkonzept dargelegt. Das Ziel ist es hierbei bereits minimale Mengen von Antigenen wie Peptiden, Proteinen, Antikörpern oder Hormonen in einer Flüssigkeit wie etwa in Blutplasma oder –serum nachzuweisen. Damit der Nachweis der biologischen Moleküle gelingt, werden sowohl enzymmarkierte Antigene, als auch Antikörper verwendet. Zunächst wird das Antigen auf eine 96-Well-Mikrotiterplatten aufgetragen. Im nächsten Schritt bindet dieses Antigen an einen spezifischen Antikörper. Dieser Antikörper wird anschließend durch einen weiteren Antikörper mit Enzymkopplung nachgewiesen. Bewirkt durch das Enzym kommt es mithilfe eines chromogenen Substrates zu einer makroskopisch sichtbaren Farbveränderung der Flüssigkeit und somit gelingt der Nachweis des Antigens. Durch den technischen Einsatz eines ELISA-Plattenlesers kann die Höhe der Antigenkonzentration in den unterschiedlichen Wells ermittelt werden. [249] Eine vereinfachte Erklärung des immunologischen Grundkonzeptes ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

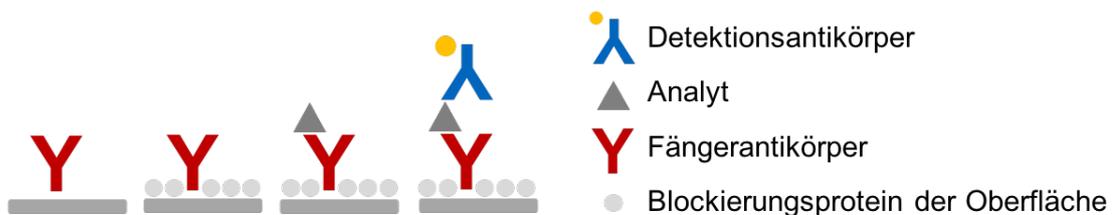


Abbildung 2.3: Immunologisches Grundkonzept ELISA (modifiziert nach [250])

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, überexprimieren viele Tumorzellen das Hitzeschockprotein 70 sowohl im Zytosol als auch auf ihrer Plasmamembran. Zusätzlich wird Hsp70 in Form von kleinen extrazellulären Vesikeln von mHsp70-positiven Tumoren freigesetzt. Durch die Konformitätsänderung von Hsp70 gelingt es den kommerziell erhältlichen ELISA-Verfahren lediglich das freie Hsp70, nicht jedoch das exosomale Hsp70 zu detektieren. [9] Die Detektion erfolgt hierbei durch Antikörper, welche Hsp70 auf der Oberfläche von präapoptotischen Zellen erkennen, die mit Phosphatidylserin auf der äußeren Membran interagieren. Weitere Detektionsmöglichkeiten ergeben sich, wenn eine Bindung zwischen Hsp70 und Rezeptoren wie etwa dem Scavenger-, dem C-Typ-Lektin-Rezeptor [251] oder den Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 bestehen [68] [252]. Der compHsp70 ELISA ermöglicht es diese Forschungslücke zu schließen und ist in der Lage Hsp70 sowohl in freier, als auch in exosomaler Form nachzuweisen [9]. Der Nachweis gelingt durch die Verwendung von zwei monoklonalen Antikörpern, cmHsp70.1 und cmHsp70.2, welche an die C-terminale Substratbindungsdomäne von Hsp70 binden [125] [253] [254]. Um zu beweisen, dass die beiden verwendeten Antikörper cmHsp70.1 und cmHsp70.2 freies und exosomales Hsp70 erkennen und binden können, wurde ein Vergleich mit zwei kommerziell erhältlichen Hsp70-Kontrollantikörpern, ctrlHsp70A und ctrlHsp70B, durchgeführt. Dabei wurden anhand von Western- und Dot-Blot-Analysen

das Hsp70-Protein und anhand von Durchflusszytometrien vitale Membran-Hsp70-positive Tumorzellen analysiert. Im Ergebnis zeigte sich, dass kommerzielle Hsp70-Antikörper nicht spezifisch Hsp70 (72 kDa) binden, sondern auch Hsc (73 kDa), CmHsp70.1 und cmHsp70.2 zeigten in beiden Analysen keine Kreuzreaktionen mit bovinen Serum Albuminen (BSA) oder anderen Hitzeschockproteinen wie etwa Hsp27, Hsp60 oder Hsc70. [9]

Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung lässt sich in zwei Teilbereiche gliedern. Der erste Teil wurde jeweils am Vortag des geplanten Versuchstages durchgeführt, der zweite Teil am Versuchstag selbst. Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Versuchsdurchführung. Zur Gewährleistung der Wiederholgenauigkeit (Präzision) wurden alle Proben mindestens zwei Mal und je nach Verfügbarkeit auch drei Mal oder öfter gemessen. Dabei versteht man unter Wiederholgenauigkeit die Reproduzierbarkeit, auch Reliabilität, von Ergebnissen. Diese entspricht der Übereinstimmung von gemessenen Werten in zwei oder mehreren aufeinanderfolgenden Versuchsdurchführungen. [255]

Zuerst erfolgte die Vorbereitung der für den Versuch benötigten Materialien. Dazu zählte unter anderem die Vorbereitung der Waschlösung, welche im Rahmen der Versuchsdurchführung mehrfach verwendet wurde. Um eine Konzentration von 0,05% Tween 20 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland) in Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zu erreichen, wurden 250 μ l Tween 20 in 500 ml PBS aufgelöst und die fertige Waschlösung beiseitegestellt. Im nächsten Schritt wurde der Natriumcarbonat-Puffer hergestellt. Dieser setzte sich aus den beiden Stammlösungen A und B zusammen. Zur Herstellung der Lösung A wurden unter stetiger pH-Wertkontrolle 0,53 g Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 50 ml H_2O gelöst, um einen pH-Wert von 11,4 zu erreichen. Zur Herstellung der Lösung B wurden ebenfalls unter pH-Wertkontrolle 0,42 g NaHCO_3 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 50 ml H_2O gelöst, um einen pH-Wert von 8,5 zu erreichen. Für den Versuch wurden anschließend 3,223 ml der Lösung A und 7,777 ml der Lösung B vermischt, um den 0,1 M Natriumcarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,6 zu erhalten. In den 11 ml Natriumcarbonat-Puffer wurden 3,67 μ l cmHsp70.2 (multimmune GmbH, München, Deutschland) in einer Arbeitskonzentration von 1 μ g/ml gelöst und damit erfolgte die Beschichtung der 96-well MaxiSorp Nunc-Immuno Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Durch die Verwendung einer Mehrkanalpipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurden pro Vertiefung eine Menge von 100 μ l aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde mithilfe einer Klebefolie (Excel Scientific Inc., Victorville, CA, USA) luftdicht abgeklebt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am Versuchstag wurden die bei -80°C eingefrorenen Plasmaproben zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Die Klebefolie (Excel Scientific Inc., Victorville, CA, USA) wurde abgezogen und die am Vortag aufgetragene Lösung verworfen. Anschließend folgte der erste Waschvorgang. Mithilfe der Mehrkanalpipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde insgesamt drei Mal jeweils 300 μ l der Waschlösung (250 μ l Tween 20 in 500 ml PBS) pro Vertiefung aufgetragen und anschließend durch mehrmaliges Klopfen der Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) auf saubere Tücher wieder entfernt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit jeweils 250 μl Liquid Plate Sealer (CANDOR Bioscience GmbH, Wangen i. Allgäu, Deutschland) geblockt und für 30 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die für den nächsten Schritt nötigen Vorbereitungen getroffen. Zunächst erfolgte die Verdünnung der Plasmaproben in StabileZyme Select Stabilizer (Diarect GmbH, Freiburg i. Breisgau, Deutschland) im Verhältnis 1:5 sowie die vorsichtige Vermengung mittels mehrmaligem Pipettieren. Außerdem wurde die 8-Punkt-Standardreihe des Hsp70-Proteins (0 – 100 ng/ml) nach der unten abgebildeten Tabelle 2.10 verdünnt. Um einen Standard mit einer Konzentration von 100 ng/ml zu erhalten wurden 10 μl Protein mit 9990 μl Buffer vermengt und von Schritt zu Schritt mit jeweils 250 μl weiter verdünnt.

Tabelle 2.10: Verdünnung der Standardreihe

Reaktionsgefäß	Benötigte Konzentration (ng/ml)	Inhalt
1	100	10 μl Hsp70 (c = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + 9990 μl StabileZyme Select Stabilizer
2	50	250 μl StabileZyme Select Stabilizer
3	25	250 μl StabileZyme Select Stabilizer
4	12,5	250 μl StabileZyme Select Stabilizer
5	6,25	250 μl StabileZyme Select Stabilizer
6	3,125	250 μl StabileZyme Select Stabilizer
7	1,5625	250 μl StabileZyme Select Stabilizer
8	0 / Blank	250 μl StabileZyme Select Stabilizer

Nach abgelaufener Inkubationszeit erfolgte der zweite Waschvorgang idem zum ersten Waschvorgang jeweils drei Mal. Jeweils 100 μl der verdünnten Plasmaproben als auch die Standardreihe wurden auf die Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgetragen und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde der dritte Waschvorgang durchgeführt. Daraufhin erfolgte das Auftragen von jeweils 100 μl pro Vertiefung des cmHsp70.1 Antikörpers (multimmune GmbH, München, Deutschland) in einer Arbeitskonzentration von 200 ng/ml. Dafür wurden 1,26 μl cmHsp70.1 (multimmune GmbH, München, Deutschland) in 12 ml HRP-Protector (CANDOR Bioscience GmbH, Wangen i. Allgäu, Deutschland) verdünnt und für eine Dauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der vierte und damit letzte Waschvorgang durchgeführt. Anschließend wurden die davor in 17,5 ml HRP-Protector (CANDOR Bioscience GmbH, Wangen i. Allgäu, Deutschland) gelösten 1 μl Streptavidin (Senova GmbH, Weimar, Deutschland) in einer daraus resultierenden Arbeitskonzentration von 57 ng/ml auf die Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgetragen und für eine Dauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Durchführung einer farbmetrischen Analyse wurden pro Vertiefung 100 μl Substratreagenz (BioFX TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrate, Surmodics, Inc., Eden Prairie, MN, USA) hinzugefügt.

Nach 15 Minuten wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von 50 μl 2N H_2SO_4 unterbrochen. Unmittelbar danach erfolgte die Messung der Lichtabsorption sowohl bei einer Wellenlänge von 450 nm, als auch bei 570 nm durch ein Mikrotiterplattenlesegerät (VICTORTM X4 2030 Multilabel Reader, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Ein marktreifes compHsp70 ELISA Kit wurde von der Firma DRG Instruments GmbH in Marburg, Deutschland entworfen [9].

Ermittlung des Gesundheitszustandes der Patientinnen

Während die Analyse der klinisch-pathologischen Faktoren anhand der bereits vorliegenden Informationen vorgenommen wurde, erfolgte zur Ermittlung des Gesundheitszustandes die telefonische Kontaktaufnahme der Patientinnen 6 - 8 Jahre nach Ende der Radiochemotherapie. Abgefragt wurden die Befunde, welche im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen seit der Brustkrebserkrankung erhoben wurden. Wie im Kapitel Prognose und Nachsorge beschrieben umfassen die Nachsorgeuntersuchungen beim Mammakarzinom sowohl eine Anamnese und klinische Untersuchung der Patientinnen als auch eine bildgebende Diagnostik mittels Mammographie und/oder Sonographie der Brust über mindestens zehn Jahre [133]. Insofern alle durchgeführten Untersuchungen ohne pathologischen Befund blieben, wurden die Patientinnen in die Kategorie kein Rezidiv eingeordnet. Im Falle eines Rezidives in die Kategorie Rezidiv. Von den 40 Studienteilnehmerinnen konnte das Gesundheitszustand in 36 Fällen ermittelt werden. Eine Verwendung der Ergebnisse der restlichen 4 Studienteilnehmerinnen hat nicht stattgefunden.

2.3.2 Statistische Auswertung

Nach Erfassung der Wellenlängen durch das Mikrotiterplattenlesegerät wurden diese mit Hilfe von Excel voneinander subtrahiert und die Endwerte in einer Tabelle erfasst. Nach der Aufreinigung des Hsp70-Proteins wurden die Werte anhand einer 8-Punkt-Standardkalibrierungskurve (0 - 100 ng/ml) berechnet und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor (1:5) multipliziert. Zur Durchführung der weiteren Berechnungen, welche anhand der generierten Rohwerte angestellt wurden, wurden die Programme IBM SPSS 26 und Microsoft Excel (Version 16.43) verwendet. Die Erstellung der graphischen Abbildungen erfolgte mit dem Programm Matlab 2020a. Der Kolmogorov-Smirnov-Test sowie der Shapiro-Wilk-Test zeigten, dass die Hsp70-Konzentrationen in der Patient*innengruppe nicht normalverteilt waren (jeweils $p < 0,001$). Die Ergebnisse der Berechnungen können Tabelle 2.11 entnommen werden. Anschließend wurde beim Vergleich zweier unverbundener Gruppen der Mann-Whitney-U-Test und beim Vergleich von mehr als zwei unverbundenen Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. Bei der Berechnung der Korrelation zwischen zwei metrischen Variablen wurde die Spearman-Korrelation eingesetzt. Hilfestellungen zur Durchführung der Berechnungen erfolgten durch das Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München. Schriftlich verfasst wurde die Arbeit mit dem Programm LaTeX 2021.

Tabelle 2.11: Test auf Normalverteilung der Gesamtgruppe Gesundspender*innen und Mammakarzinom postoperativ

Gruppe	n	p-Wert	Test
Gesundspender*innen, Mammakarzinom postoperativ	148	< 0,001	Kolmogorov-Smirnov
		< 0,001	Shapiro-Wilk

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Studienverlaufs und Patient*innenkollektivs

Insgesamt nahmen 108 Gesundspender*innen und 40 Patientinnen mit unilateralem Mammakarzinom an der Studie teil. Die Geschlechterverteilung der 108 Gesundspender*innen ist mit 57 Frauen und 51 Männern als Vergleichsgruppe relativ ausgeglichen. In Bezug auf das Alter ist der Mittelwert bei den Gesundspender*innen mit 43 Jahren niedriger als bei den Mammakarzinompatientinnen mit 58 Jahren. In beiden Gruppen wurde jedoch eine große Spannweite gewählt. Tabelle 3.1 zeigt die deskriptive Statistik von den Gesundspender*innen und den Mammakarzinompatientinnen postoperativ.

Tabelle 3.1: Deskriptive Statistik Gesundspender*innen und Mammakarzinompatientinnen postoperativ

Parameter		Gesundspender*innen	Mammakarzinom
Anzahl [n]		108	40
Geschlecht [w/m]		57/51	40/0
Alter [Jahre]	Mittelwert	43	58
	Median	44	57
	Spannweite	21 - 77	33 - 83
compHsp70 ELISA [ng/ml]	Mittelwert	35,1	663,3
	Median	16,4	263,0
	Spannweite	1,0 - 158,1	1,0 - 2333,0
	Standardfehler	4,0	121,6
	Standardabweichung	41,6	759,3

Die über die Patientinnen vorliegenden Informationen wurden auf ihre Relevanz in Bezug auf die Erkrankung und ihre Prognose überprüft und anschließend in drei Gruppen eingeteilt. Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms wurden das Alter, ein eventueller Alkohol- oder Nikotinkonsum, der BMI sowie das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 erfasst. In Bezug auf die Erkrankung selbst wurden Daten zur TNM-Klassifizierung und dem Grading analysiert. In der Therapie unterschieden sich die Patientinnen insofern, dass einige eine Chemo- und/oder Antihormontherapie erhielten, andere hingegen ausschließlich eine operative Versorgung sowie eine anschließende Bestrahlung. Hinsichtlich der Strahlentherapie kamen drei unterschiedliche Bestrahlungsschemata zur Anwendung. Bei zwei Patientinnen wurde auf eine Strahlentherapie verzichtet.

3.2 Bestimmung von exosomalem Hsp70 versus freiem Hsp70

3.2.1 Vergleich von Gesundspender*innen und Mammakarzinompatientinnen

Zunächst wurde mit Hilfe des compHsp70 ELISAs untersucht, ob sich die Hsp70-Konzentration der Mammakarzinompatientinnen ($n = 40$), unmittelbar postoperativ, von der Hsp70-Konzentration der Gesundspender*innen ($n = 108$) unterschied. Zur Ermittlung der Werte der Gesundspender*innen erfolgte die Blutabnahme zu einem einzigen Zeitpunkt. Durch das fehlende Vorliegen einer Erkrankung und der daraus resultierenden fehlenden Therapie bot eine Verlaufsbeobachtung keinen Mehrwert. Abbildung 3.1 zeigt die gemessenen Hsp70-Konzentrationen für beide Gruppen.

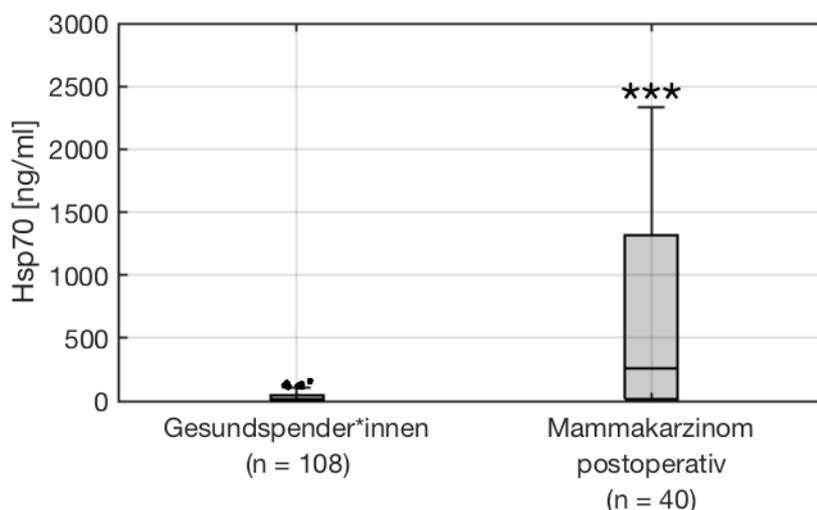


Abbildung 3.1: Vergleich Gesundspender*innen und Mammakarzinom postoperativ. Die drei Sterne über der Gruppe Mammakarzinom postoperativ markieren die Signifikanz.

Dabei zeigte sich ein Mittelwert der Hsp70-Konzentration der Mammakarzinompatientinnen postoperativ von 663,3 ng/ml mit einem Standardfehler von 121,6 ng/ml. Der Mittelwert der Gesundspender*innen befand sich bei 35,1 ng/ml bei einem Standardfehler von 4,0 ng/ml. Der Median lag bei den Gesundspender*innen bei 16,4 ng/ml, während er sich bei den Mammakarzinompatientinnen bei 254,3 ng/ml befand. Auch die Standardabweichung und damit Streuung der Daten unterschied sich erheblich voneinander. Während die niedrigen Hsp70-Konzentrationen in ähnlichen Bereichen lagen, waren Unterschiede insbesondere in den Maxima zu erkennen. Der Wertebereich der 40 Mammakarzinome postoperativ deutete auf eine rechtsschiefe Verteilung hin. Der Kolmogorov-Smirnov-Test sowie der Shapiro-Wilk-Test zeigten, dass die Hsp70-Konzentrationen in beiden Gruppen nicht normalverteilt waren (jeweils $p < 0,001$). Die postoperativen Hsp70-Konzentrationen der Mammakarzinompatientinnen sind signifikant höher als die Hsp70-Konzentrationen der Gesundspender*innen ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test).

3.2.2 Analyse der Hsp70-Konzentrationen im Verlauf

Abbildung 3.2 zeigt die Hsp70-Konzentrationen im Verlauf. Die Verteilung der Daten zeigt gleichermaßen rechtsschiefe Verteilungen mit konstanten Minima, Mittelwerten, Medianen und 75. Quartilen ohne signifikante Veränderungen. Lediglich die Whisker zeigen leichte Schwankungen.

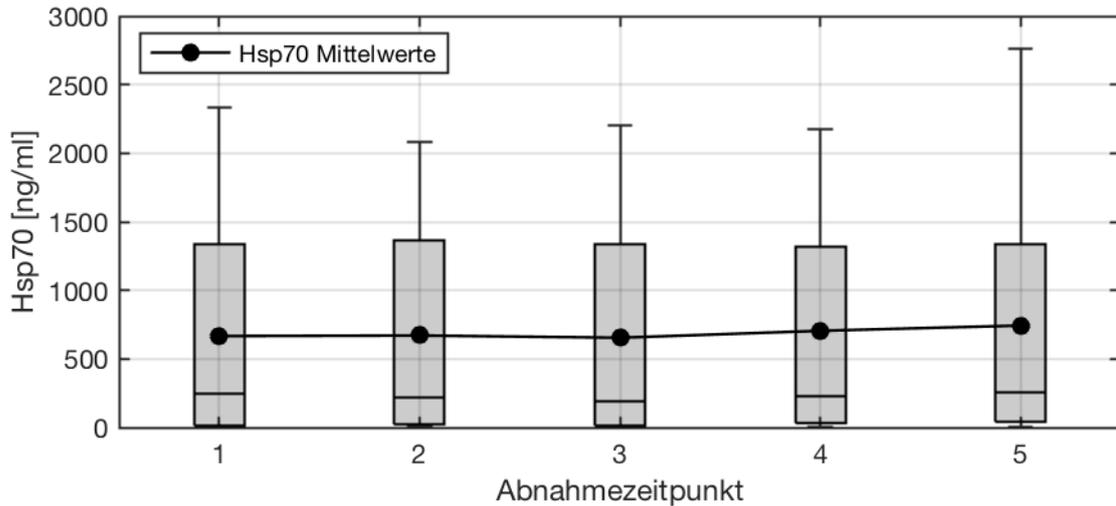


Abbildung 3.2: Hsp70-Konzentrationen im Verlauf. Abnahmezeitpunkt 1: postoperativ, Abnahmezeitpunkt 2: nach 30 Gy Strahlentherapie, Abnahmezeitpunkt 3: nach Ende der Strahlentherapie, Abnahmezeitpunkt 4: 6 Wochen nach Strahlentherapieende, Abnahmezeitpunkt 5: 6 Monate nach Strahlentherapieende

Unterschiede ergeben sich jedoch bei Betrachtung der einzelnen Hsp70-Verläufe der Patientinnen. Unter anderem ergeben sich Differenzen in der Anzahl der Abnahmezeitpunkte. Während 23 Patientinnen zu allen sechs vorgesehenen Terminen erschienen sind, nahmen 16 Patientinnen lediglich die Termine bis zum zweiten Nachsorgetermin, welcher dem Abnahmezeitpunkt 5 entspricht, wahr. Patientin 8 schied bereits während der Therapie aus. Um die Vergleichbarkeit der Messdaten gewährleisten zu können, wurden alle weiteren Korrelationen, mit Bezug auf den Beobachtungszeitraum, lediglich bis zum fünften Abnahmezeitpunkt analysiert. Auffallend sind die deutlichen Unterschiede in der Höhe der Hsp70-Konzentrationen. Die Patientinnen 4, 8, 29 und 31 wurden als Hsp70-negative Tumore charakterisiert, da die Hsp70-Konzentration nicht gemessen werden konnte. Zur Ermöglichung der graphischen Darstellung wurde für diese Patientinnen ein Wert von 1 ng/ml angenommen. Bei den restlichen 36 Patientinnen konnte die Hsp70-Konzentration gemessen werden. Der niedrigste Wert lag bei 1,2 ng/ml und der höchste bei 3101,7 ng/ml. Ungeachtet der absoluten Höhe der Hsp70-Konzentration zeigten sich bei den meisten Patientinnen keine großen Veränderungen über den Beobachtungszeitraum. Einen besonderen Verlauf zeigt Patientin 5. Über alle fünf Abnahmezeitpunkte ist ein progredienter Anstieg der Hsp70-Konzentration trotz Therapie zu erkennen. Zum Zeitpunkt 1 wies die Patientin einen Ausgangswert von 512,4 ng/ml auf, welcher stetig anstieg und zum Zeitpunkt 5 bereits bei 3101,7 ng/ml lag. Ebenso unterschied sich der Verlauf bei Patientin 22 von den anderen Patientinnen. Während die Hsp70-Konzentration

zwischen dem Zeitraum des ersten und dritten Abnahmezeitpunkts relativ konstant blieb, kam es in den beiden Nachbeobachtungszeitpunkten 4 und 5 ebenfalls zu einem progredienten Anstieg der Hsp70-Konzentration. Es zeigte sich über die ersten drei Abnahmezeitpunkte ein Wert zwischen 503,4 ng/ml bis 617,0 ng/ml, welcher sich zum Zeitpunkt 4 beinahe auf 1005,1 ng/ml verdoppelte und weiter auf 1584,0 ng/ml anstieg. Die einzelnen Verläufe können den nachfolgenden Abbildungen 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 und 3.7 entnommen werden.

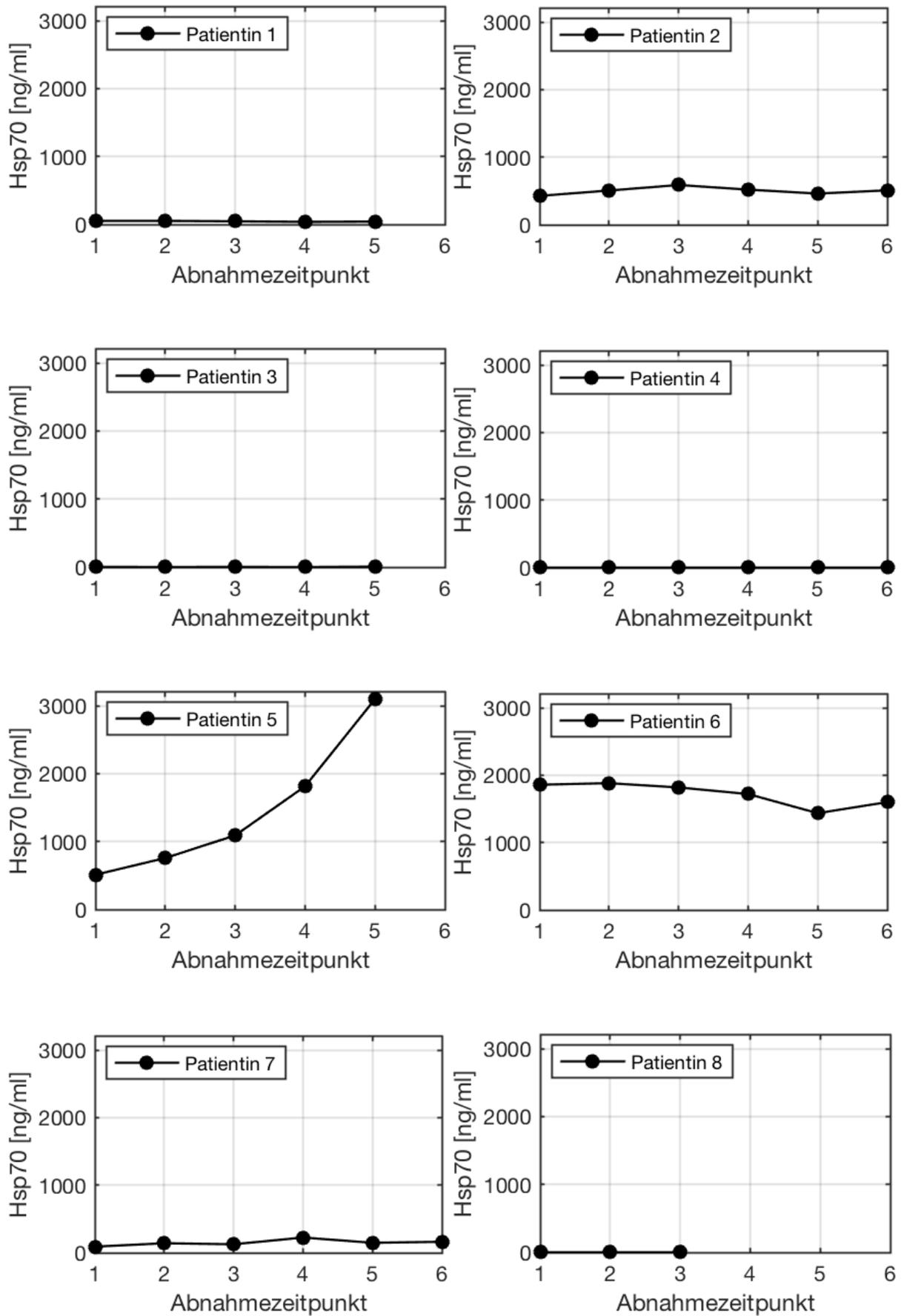


Abbildung 3.3: Hsp70-Verläufe der Patientinnen 1 bis 8

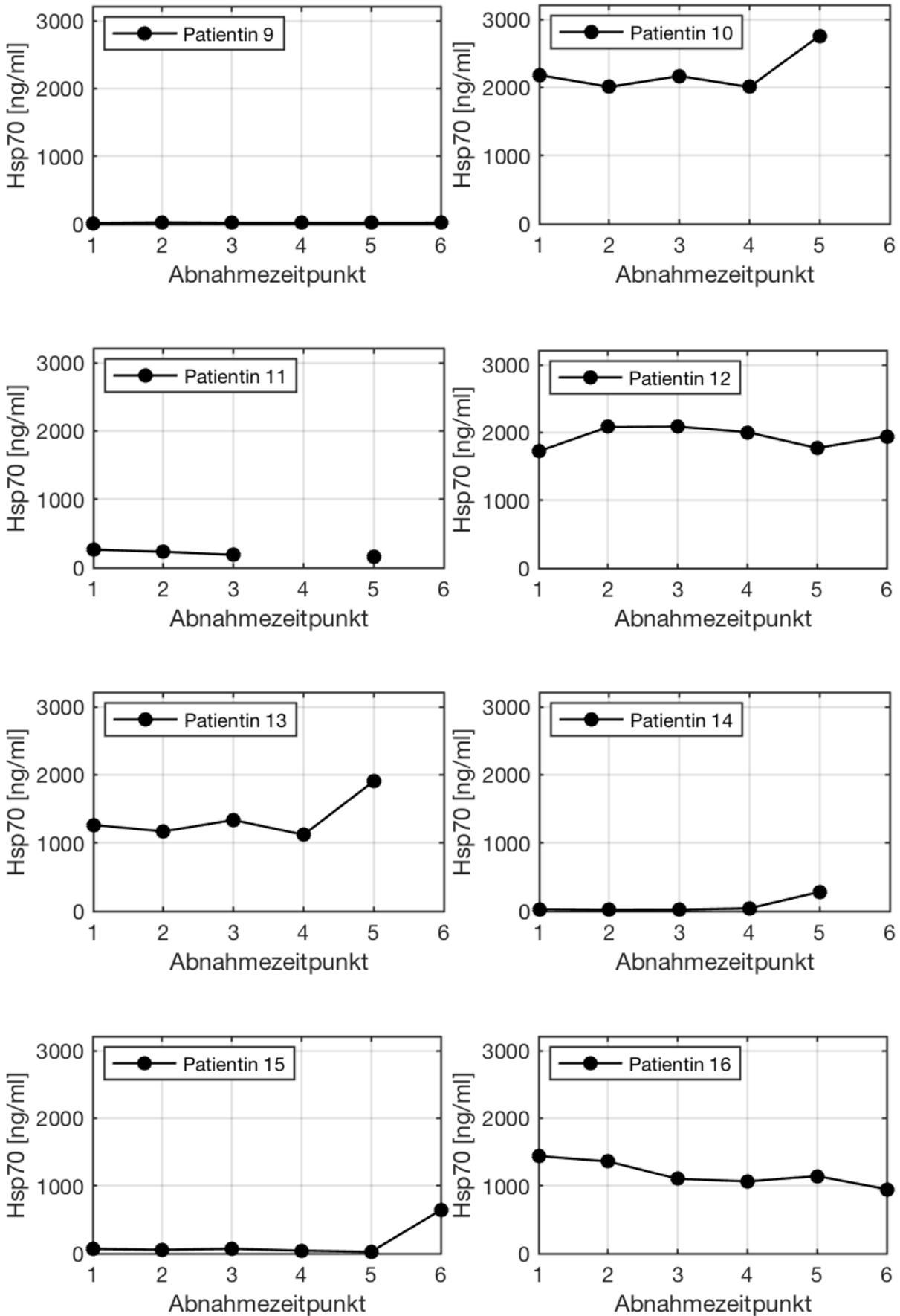


Abbildung 3.4: Hsp70-Verläufe der Patientinnen 9 bis 16

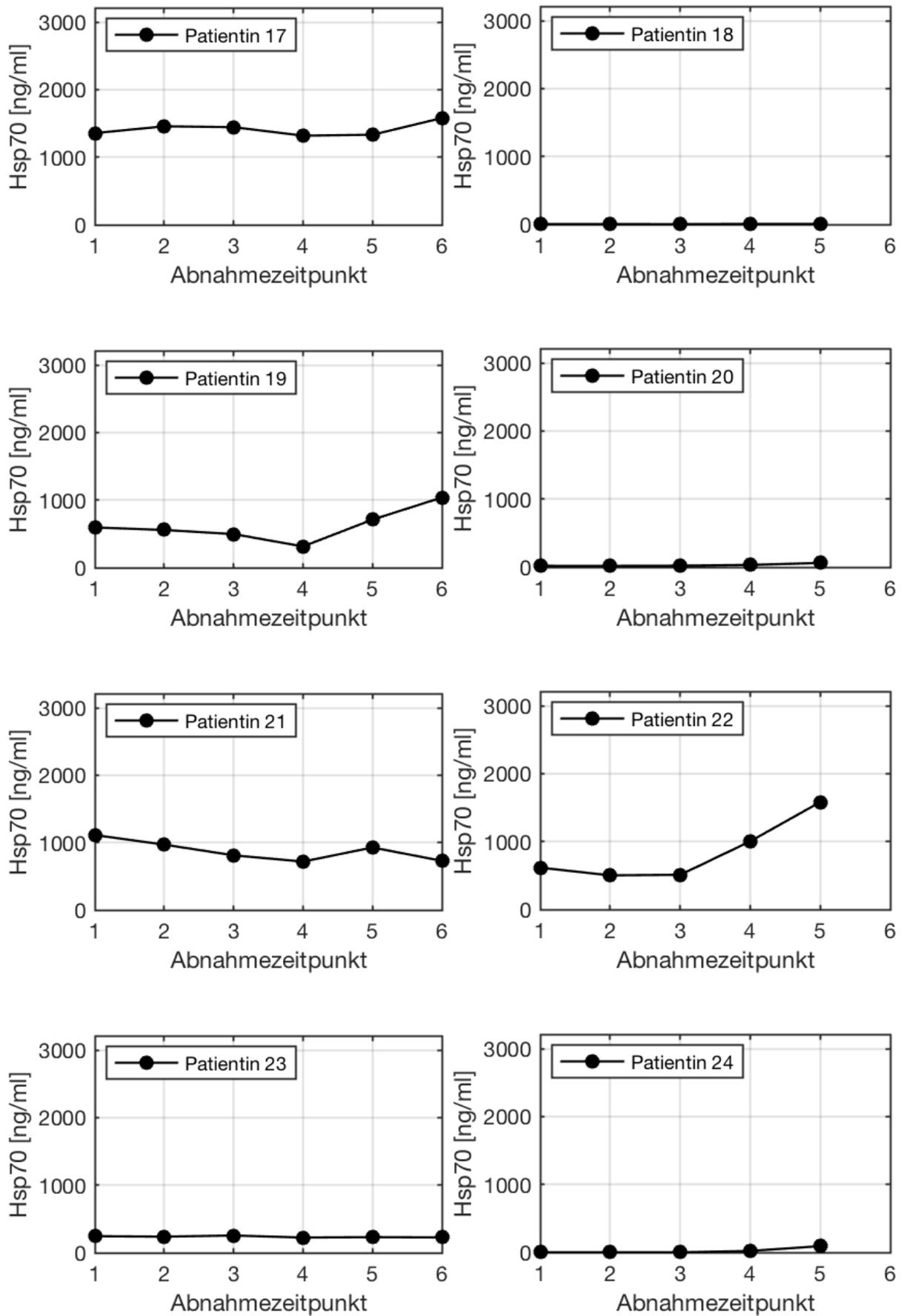


Abbildung 3.5: Hsp70-Verläufe der Patientinnen 17 bis 24

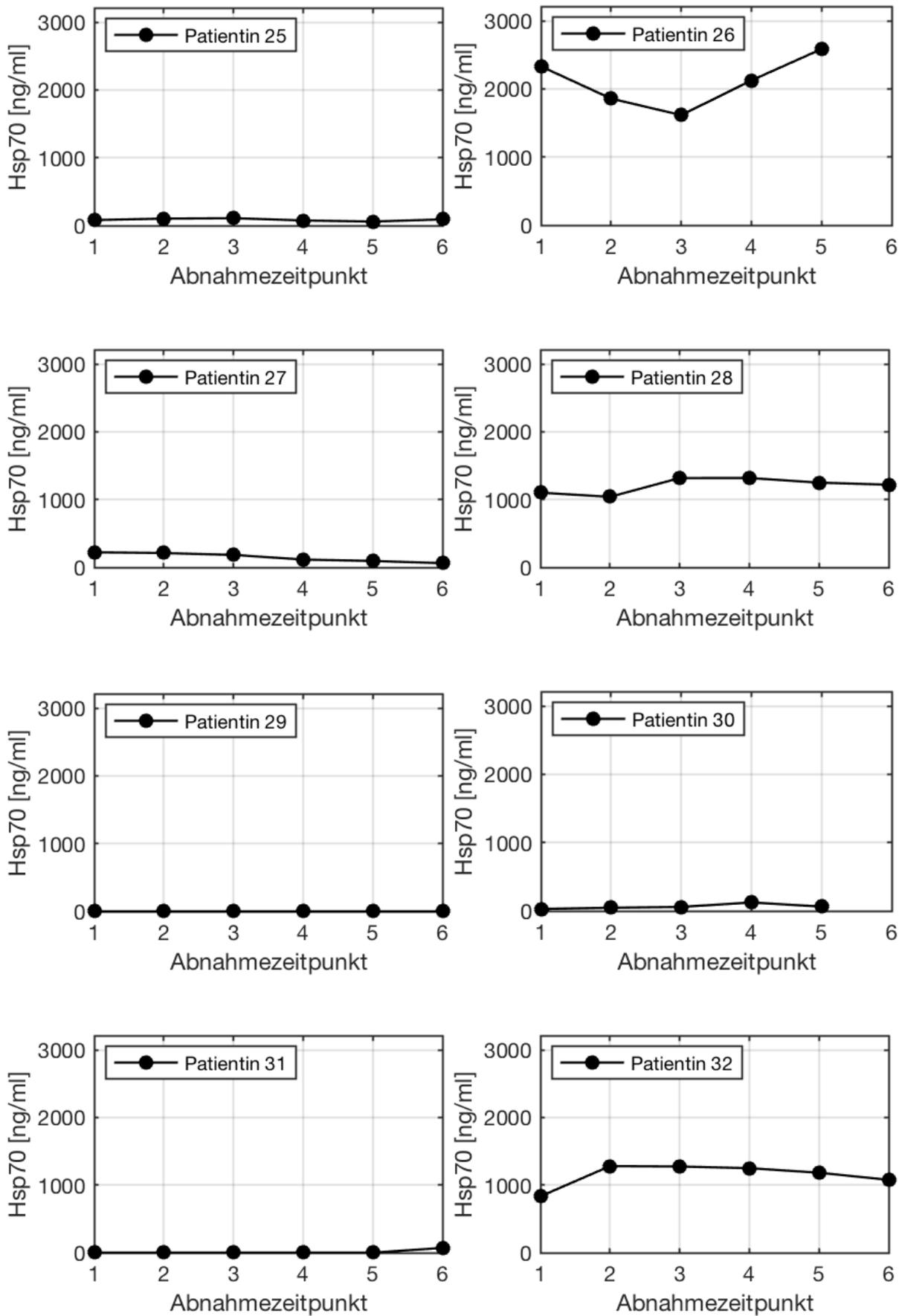


Abbildung 3.6: Hsp70-Verläufe der Patientinnen 25 bis 32

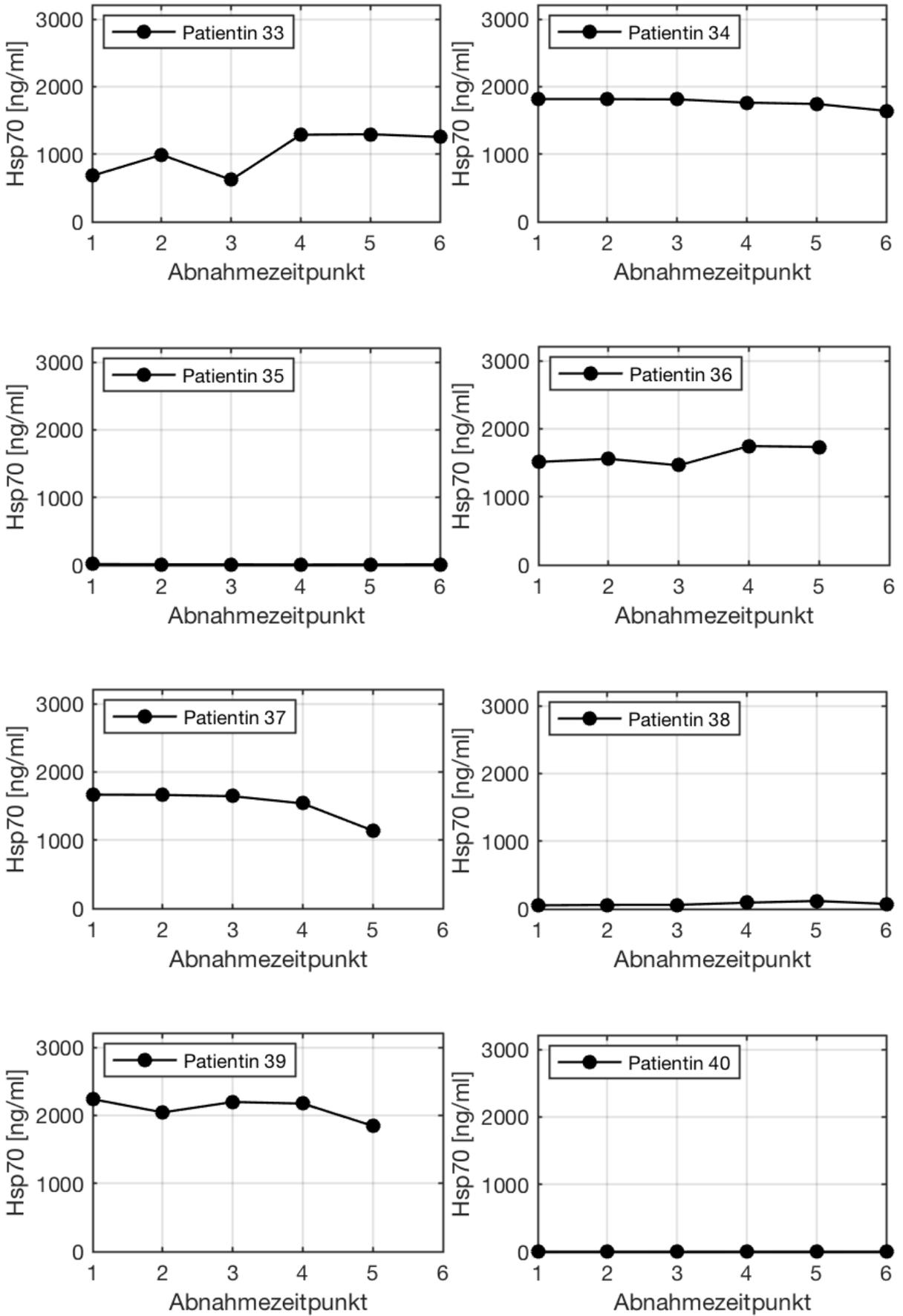


Abbildung 3.7: Hsp70-Verläufe der Patientinnen 33 bis 40

3.2.3 Vergleich von R&D ELISA und compHsp70 ELISA

Die Hsp70-Konzentrationen wurden einerseits von Dr. med. Anna Rothhammer mit dem herkömmlichen R&D ELISA [256] [257] und andererseits im Rahmen dieser Arbeit mit dem weiterentwickelten compHsp70 ELISA anhand von jeweils derselben Plasma- beziehungsweise Serumproben gemessen. Ein Vergleich zwischen Plasma- und Serumproben zeigte keine Unterschiede in den Messergebnissen. Wie anfangs beschrieben sind herkömmliche ELISA-Verfahren, bedingt durch die Konformationsänderung des Proteins, nicht in der Lage exosomal vorliegendes Hsp70 zu messen, welches insbesondere von lebenden Tumorzellen freigesetzt wird. Der compHsp70 ELISA hingegen detektiert sowohl freies als auch exosomales Hsp70. [9] Tabelle 3.2 stellt die Hsp70-Konzentrationen der eingesetzten Verfahren im Vergleich dar.

Tabelle 3.2: Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus der Hsp70- Konzentrationen im Verlauf. Vergleich von R&D ELISA [256] [257] und compHsp70 ELISA

Zeitpunkt	R&D ELISA	(ng/ml)	compHsp70 ELISA	(ng/ml)	p
	Mittelwert	Std.	Mittelwert	Std.	
1	2,4	1,0	663,3	769,3	< 0,001
2	2,0	0,7	673,5	756,8	< 0,001
3	2,0	0,5	665,7	751,2	< 0,001
4	2,2	0,7	734,8	784,7	< 0,001
5	2,3	1,0	804,4	894,5	< 0,001

Die anhand des compHsp70 ELISAs gemessenen Proben ergaben demzufolge deutlich höhere Hsp70-Konzentrationen als die anhand des R&D ELISAs gemessenen. Während die Mittelwerte beim R&D ELISA zwischen 2,0 - 2,4 ng/ml lagen [256] [257], detektierte der compHsp70 ELISA Konzentrationen zwischen 663,3 - 804,4 ng/ml. Die Werte unterscheiden sich mit einem p-Wert von < 0,001 (Mann-Whitney-U-Test) über alle Abnahmezeitpunkte signifikant voneinander.

3.3 Korrelationen

Um die unterschiedlich hohen Hsp70-Konzentrationen der Patientinnen erklären zu können, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Hsp70-Konzentrationen und den Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms sowie den tumorspezifischen Faktoren besteht.

3.3.1 Einfluss von Risikofaktoren des Mammakarzinoms auf die Hsp70-Konzentration

Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen den verschiedenen Risikofaktoren und der Hsp70-Konzentration besteht, wurde der erste Blutabnahmezeitpunkt unmittelbar postoperativ gewählt. Da die nachfolgenden Parameter über den Zeitverlauf konstant blieben und sich

die Verläufe der Hsp70-Konzentration bei den Patientinnen im Zeitverlauf nicht signifikant veränderten, war ein Vergleich zu allen fünf beziehungsweise sechs Abnahmezeitpunkten nicht sinnvoll. Tabelle 3.3 bildet die analysierten Risikofaktoren zur Entstehung eines Mammarkarzinoms mit den jeweiligen Fallzahlen ab.

Tabelle 3.3: Risikofaktoren

Risikofaktoren		n
Alter (Jahre)	< 40	1
	40 - 49	9
	50 - 59	11
	60 - 69	13
	70 - 79	5
	> 80	1
Nikotinabusus	Ja	14
	Nein	26
Alkoholabusus	Ja	23
	Nein	17
BMI	Untergewicht	2
	Normalgewicht	23
	Präadipositas	9
	Adipositas Grad I	4
	Adipositas Grad II	1
	Unbekannt	1
Diabetes mellitus Typ 2	Ja	3
	Nein	37

Alter

Das Alter der Studienteilnehmerinnen wies zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Spannweite von 50 Jahren auf. Dabei war die jüngste Patientin 33 Jahre, die älteste Patientin hingegen 83 Jahre alt. Der Mittelwert der Patientinnen lag bei 58 Jahren, der Median bei 57 Jahren. Die genaue Altersstruktur der Patientinnen ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Die Hsp70-Konzentration korreliert nicht mit dem Alter ($p = 0,092$, Spearman-Korrelation). Abbildung 3.8 verdeutlicht die Unabhängigkeit zwischen Alter und Hsp70-Konzentration mit einem R^2 von 0,051.

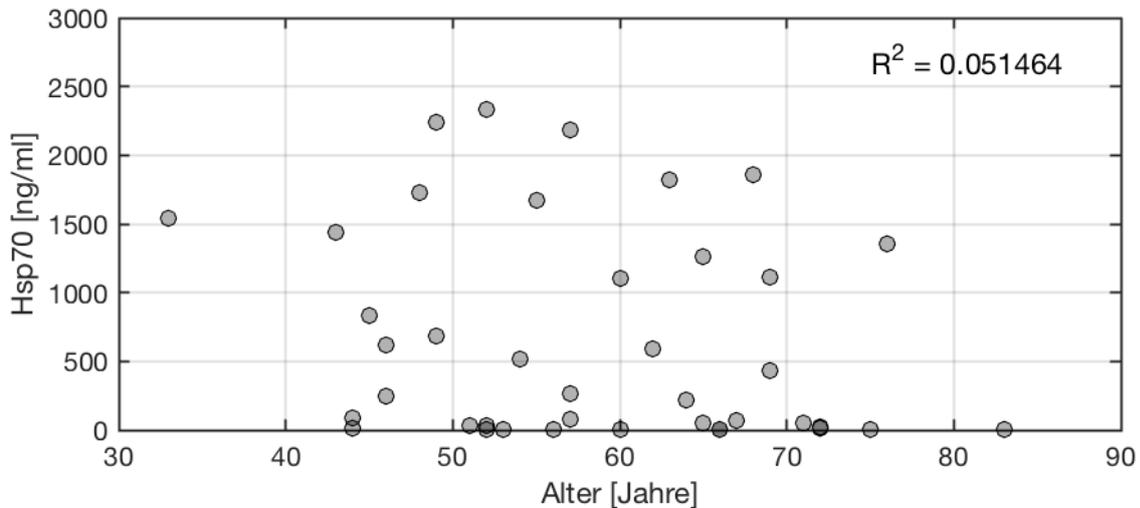


Abbildung 3.8: Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und Alter

Nikotin- und Alkoholabusus

Neben dem Risikofaktor stattgehabte Strahlenexposition der Brust zählen auch ein hoher Alkoholkonsum und Nikotinabusus zu den toxischen Risikofaktoren des Mammakarzinoms [134]. Da eine stattgehabte Strahlenexposition der Brust als Ausschlusskriterium der Studie definiert wurde, wurden nur die beiden verbleibenden toxischen Risikofaktoren untersucht. Von den 40 Studienteilnehmerinnen konsumierten 23 regelmäßig Alkohol und 14 rauchten oder haben in der Vergangenheit geraucht. Abbildung 3.9 zeigt die Hsp70-Konzentrationen für die jeweiligen Gruppen Nikotin (links) und Alkohol (rechts).

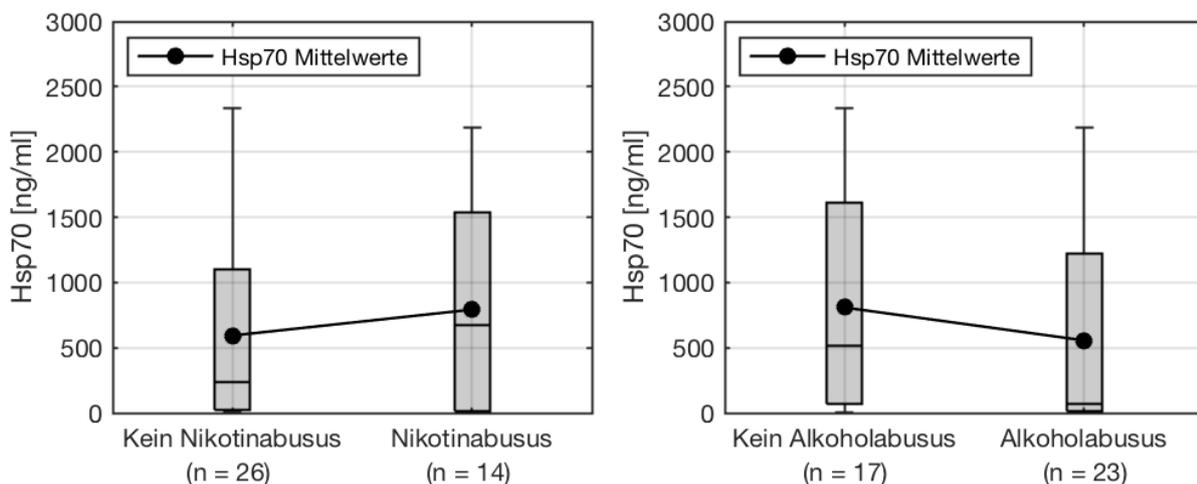


Abbildung 3.9: Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und Nikotinabusus (links) und Alkoholabusus (rechts)

Bei Raucherinnen zeigten sich höhere Mittelwerte und Mediane der Hsp70-Konzentrationen als bei Nichtraucherinnen. Ebenfalls ist eine Erhöhung des 75. Quartils und damit eine Verschiebung des Wertebereichs zu höheren Hsp70-Konzentrationen sichtbar. Von einem Zu-

sammenhang zwischen der Hsp70-Konzentration und dem Parameter Nikotinkonsum kann bei einem p-Wert von 0,600 (Mann-Whitney-U-Test) nicht ausgegangen werden. Hinsichtlich des Konsums von Alkohol wurden umgekehrte Ergebnisse verzeichnet. Patientinnen, die angaben keinen Alkohol zu konsumieren, zeigten etwas höhere Hsp70-Konzentrationen als Patientinnen, die Alkohol konsumierten. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Parameter Alkoholabusus und der Hsp70-Konzentration ($p = 0,175$) konnte mittels Mann-Whitney-U-Test nicht nachgewiesen werden.

Body Mass Index

Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms ist ein erhöhter Body Mass Index (BMI), welcher aus der Größe sowie dem Gewicht einer Person berechnet wird [258]. Dabei gibt es sechs unterschiedliche Kategorien. Diese definieren sich wie folgt: ein BMI $< 18,5$ entspricht der Kategorie Untergewicht, ein BMI von $18,5 - 24,9$ der des Normalgewichts und ein BMI von $25,0 - 29,9$ der Kategorie Präadipositas. Ab einem BMI von $30,0$ beginnen die drei Grade der Adipositas. Zwischen einem BMI von $30,0 - 34,9$ ist Adipositas Grad I definiert, von $35,0 - 39,9$ Adipositas Grad II und ab einem BMI > 40 Adipositas Grad III. [259] Die Aufteilung der Patientinnen in die unterschiedlichen BMI-Kategorien ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Mit knapp 60% war der größte Anteil der Patientinnen normalgewichtig, knapp 25% befanden sich in der Kategorie Präadipositas und knapp 15% litten unter Adipositas Grad I und II.

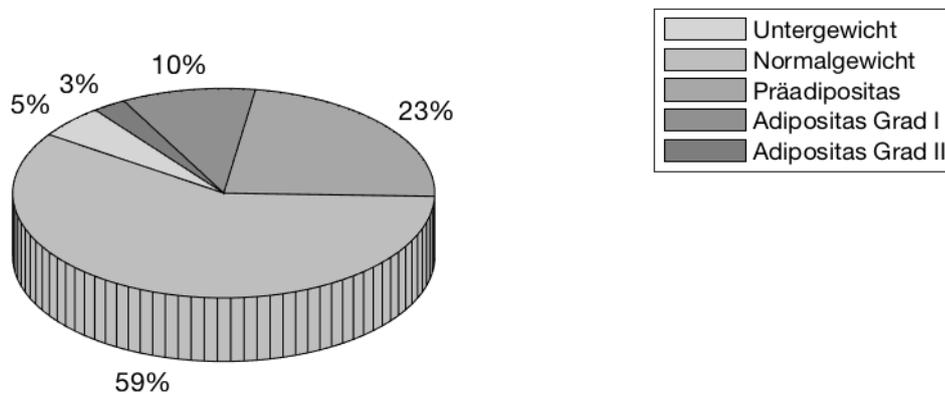


Abbildung 3.10: Einteilung nach BMI

Eine Korrelation der Hsp70-Konzentration mit dem BMI nach Spearman ergab einen p-Wert von 0,350. Damit lässt sich kein Zusammenhang zwischen den beiden genannten Parametern folgern. Abbildung 3.11 verdeutlicht deren Unabhängigkeit mit einem R^2 von 0,027.

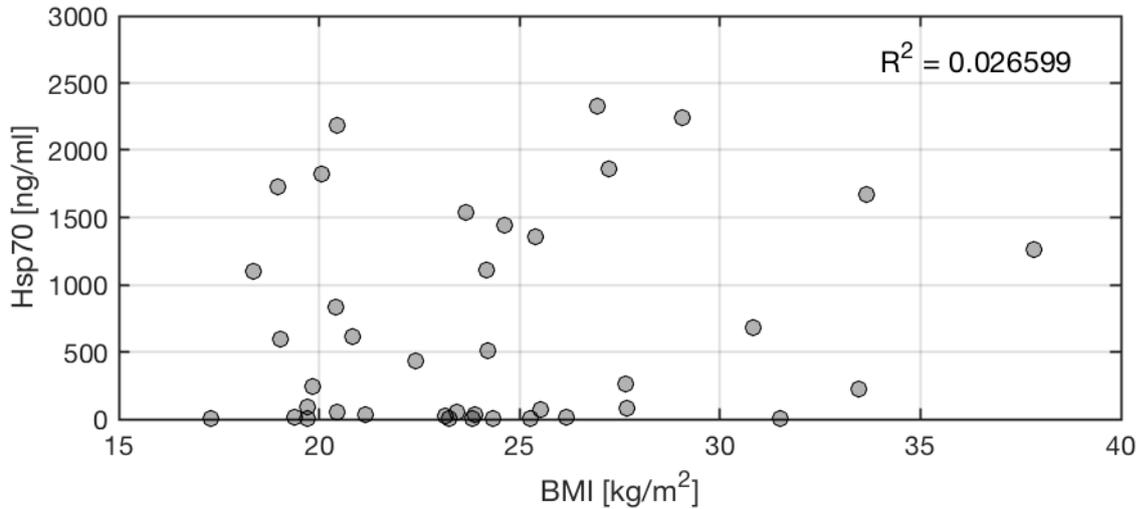


Abbildung 3.11: Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und BMI

Diabetes mellitus Typ 2

Die Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Hsp70-Konzentration und dem Vorhandensein eines Diabetes mellitus Typ 2 wurde mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dieser war bei einem p-Wert von 0,076 nicht signifikant. Abbildung 3.12 zeigt einen Vergleich der beiden Gruppen.

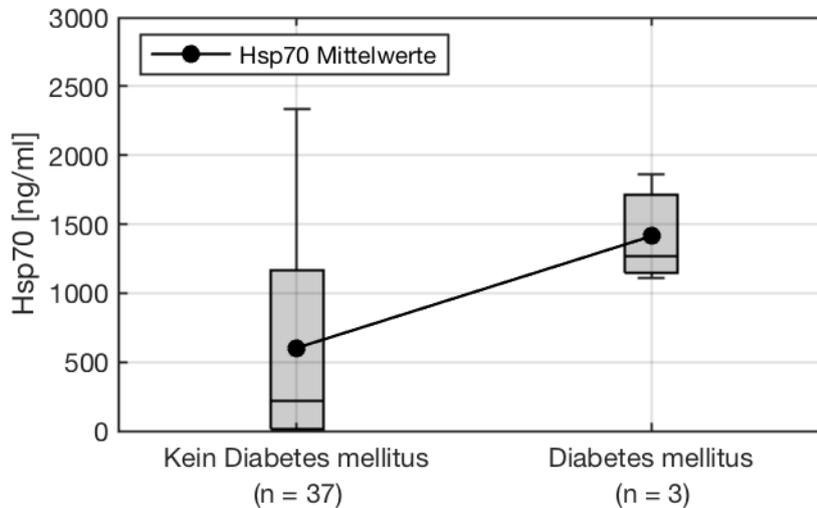


Abbildung 3.12: Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und Diabetes mellitus Typ 2

Während für Patientinnen ohne Diabetes mellitus Typ 2 einen Mittelwert von 602,4 ng/ml gemessen wurde, ergab sich bei Patientinnen mit einem Diabetes mellitus Typ 2 ein Mittelwert von 1413,6 ng/ml. Diese Betrachtung lässt die Beschreibung eines Trends zu. Auch der Median der Gruppe mit Diabetes mellitus Typ 2 liegt oberhalb des 75. Quartils der Gruppe ohne Diabetes mellitus. Aussagekräftig ist zudem die untere Grenze der Werteverteilung der Diabetes mellitus Typ 2-Gruppe, die im Vergleich zu den Hsp70-Konzentrationsverläufen

der Vergleichsgruppe erst ab einem Hsp70-Wert von zirka 1150 ng/ml beginnt und deutlich geringer streut. Die geringe Fallzahl der Diabetikerinnen (n = 3) ist für eine gesicherte Aussage zu gering.

3.3.2 Einfluss von tumorspezifischen Parametern des Mammakarzinoms auf die Hsp70-Konzentration

In Bezug auf die tumorspezifischen Parameter des Mammakarzinoms wurde das TNM-Stadium sowie das Grading mit der Hsp70-Konzentration korreliert. Die jeweilige Patientinnenanzahl der unterschiedlichen Kategorien kann Tabelle 3.4 entnommen werden.

Tabelle 3.4: Tumorspezifische Parameter

Tumorspezifische Faktoren		n
T	T1a	4
	T1b	15
	T1c	15
	T2	6
	T3	0
	T4	0
N	N0	35
	N1	5
M	M0	40
	M1	0
Grading	G1	8
	G2	29
	G3	3

TNM-Stadium

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt wie bei den meisten Karzinomen durch die TNM-Klassifikation. Das T steht dabei für die Größe des Primärtumors und NM für die Ausbreitung des Tumors. N charakterisiert einen möglichen Lymphknotenbefall und M eine mögliche Metastasierung. [162] Der kleinste Primärtumor war 0,2 cm und der größte 2,2 cm groß. Die Tumorausbreitung ist dabei entscheidend für die weitere Unterteilung der T-Klassifikation. Alle Studienteilnehmerinnen konnten der Kategorien T1 oder T2 zugeordnet werden. 4 Patientinnen wurden dem Stadium T1a zugeordnet, 15 Patientinnen dem Stadium T1b und weitere 15 Patientinnen dem Stadium T1c. Die verbleibenden 6 Patientinnen befanden sich im Stadium T2. Abbildung 3.13 gruppiert die Patientinnen anhand ihrer exakten T-Klassifikation und gibt die jeweilige Hsp70-Konzentration an. Dabei fällt ein Unterschied zwischen der Kategorie T1a und den weiteren Kategorien auf. Da die Anzahl der Patientinnen in dieser Kategorie sehr klein war, ließ sich keine Signifikanz ermitteln, dennoch ist eine Tendenz

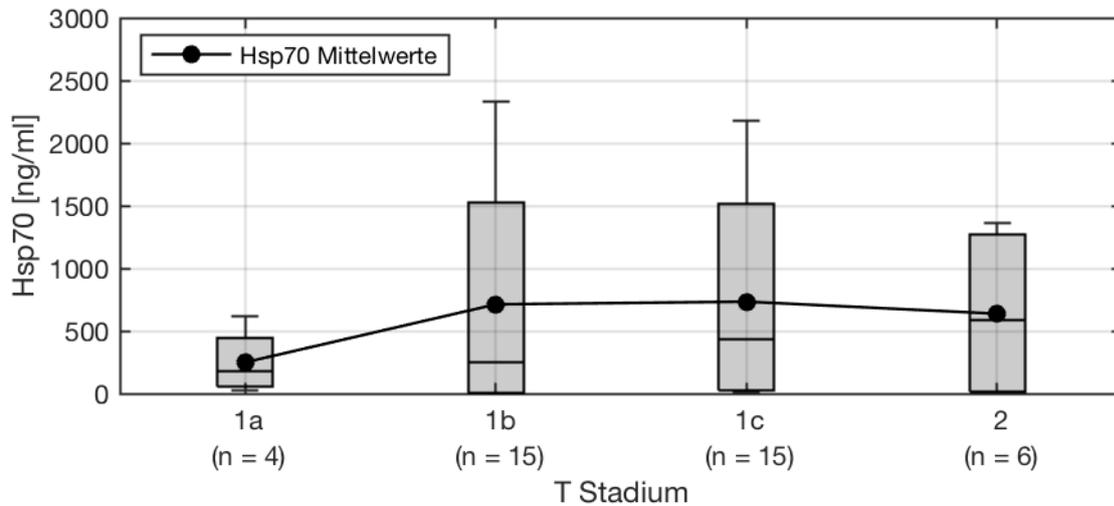


Abbildung 3.13: Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und T-Stadium

zu erkennen. Der Tukey-HSD-Test ergab einen p-Wert von 0,647. Die T-Stadien 1b und 1c zeigen mit leichtem Unterschied des Medians sehr vergleichbare Hsp70-Konzentrationen. In Stadium 2 reduziert sich die Streuung und obere Grenze der Hsp70-Werte. Ebenfalls ist ein leichter Anstieg des Medians mit Annäherung an den Mittelwert zu erkennen. Anschließend wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Höhe der Hsp70-Konzentration bezüglich des N-Stadiums vorlag. Bei 5 Patientinnen fanden sich Lymphknotenmetastasen, bei den restlichen 35 Patientinnen wurden hingegen keine diagnostiziert. Ein Vergleich der beiden Gruppen ist in Abbildung 3.14 dargestellt.

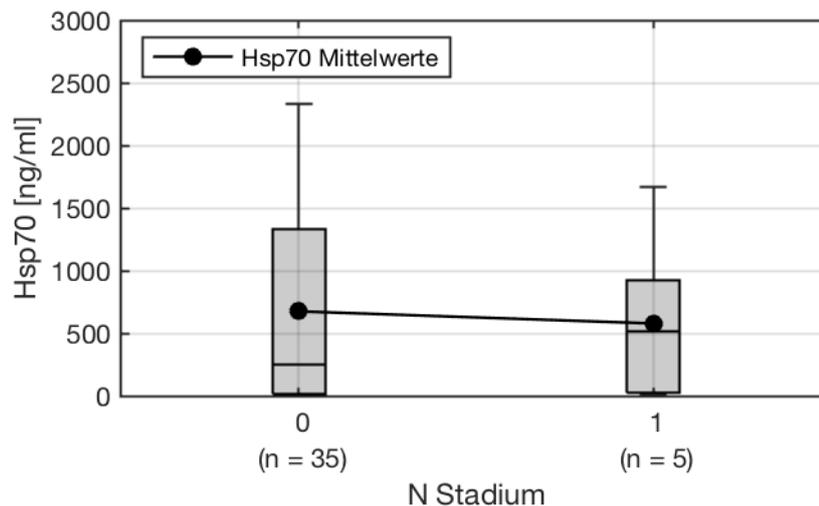


Abbildung 3.14: Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und N-Stadium

Beide N-Stadien zeigten mit einem p-Wert von 0,838 (Mann-Whitney-U-Test) keine signifikanten Unterschiede, lediglich eine leichte Erhöhung des Medians und eine Reduktion der oberen Hsp70-Konzentrationen in der Gruppe N1. Fernmetastasen, M, lagen bei keiner der Patientinnen vor.

Grading

Bei dem untersuchten Patientinnenkollektiv wurden 8 Tumoren als G1 eingestuft, 29 Tumoren als G2 und 3 Tumoren als G3. In der Abbildung 3.15 kann ein Anstieg des Hsp70-Mittelwerts mit zunehmender Malignität beobachtet werden. Eine Signifikanz konnte mit einem p-Wert von 0,237 (Tukey-HSD-Test) nicht gezeigt werden.

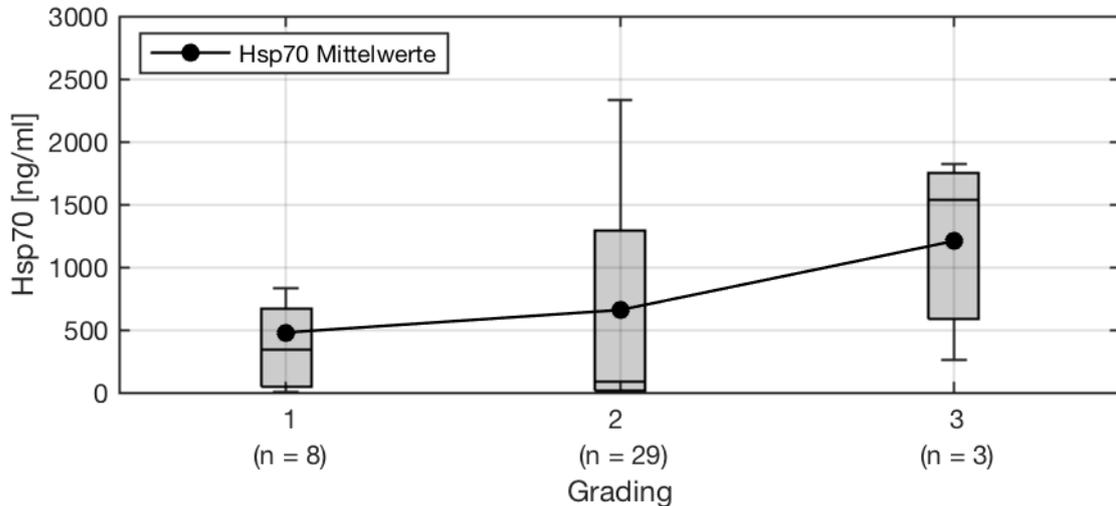


Abbildung 3.15: Korrelation zwischen Hsp70-Konzentration und Grading

3.4 Untersuchung von Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit

Eine der Hauptzielsetzungen dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern sich exosomales Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit beim Mammakarzinom eignet. Hierfür wurden die Hsp70-Konzentrationen der Mammakarzinompatientinnen über die Abnahmezeitpunkte 1 – 5 bestimmt. Zur weiteren Untersuchung wurden die Studienteilnehmerinnen sechs bis acht Jahre nach dem letzten Abnahmezeitpunkt telefonisch kontaktiert, um den gesundheitlichen Status zu erfragen. 36 der 40 Patientinnen erklärten sich dazu bereit, Informationen bezüglich ihres Gesundheitszustandes bekanntzugeben und wurden somit in die Analyse eingeschlossen. Von den 36 Patientinnen blieben 33 ohne Rezidiv des Mammakarzinoms oder neuerliche Tumorerkrankung anderer Genese. Eine Patientin erkrankte an einem kontralateralen Mammakarzinom, eine Patientin entwickelte Fernmetastasen und eine Patientin erkrankte an einem Endometriumkarzinom. Tabelle 3.5 fasst den jeweiligen Gesundheitszustand der Patientinnen zusammen.

Tabelle 3.5: Gesundheitszustand der Mammakarzinompatientinnen

Gesundheitszustand	n
Unbekannt	4
Rezidivfrei	33
Rezidiv des Mammakarzinoms	2
Endometriumkarzinom	1

3.4.1 Vergleich der Hsp70-Konzentrationen mit dem Therapieansprechen

Zunächst erfolgte ein Vergleich der Hsp70-Konzentrationen der Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Therapie. Alle Patientinnen erhielten vor dem Zeitpunkt 1 eine operative brusterhaltende Therapie sowie, bis auf zwei Patientinnen, eine anschließende Strahlentherapie. Im weiteren Verlauf erhielten die Patientinnen eine Chemo- und/oder Antihormontherapie. Da nicht alle Patientinnen zum dritten Nachsorgetermin, welcher dem sechsten Abnahmezeitpunkt entsprach, erschienen sind, wurden zur Vermeidung von Verfälschungen der Daten nur die ersten fünf Abnahmezeitpunkt berücksichtigt. Eine Normalverteilung der Daten lag nicht vor (Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Schmirnoff-Test: $p < 0,001$). Die jeweilige Anzahl der Patientinnen mit bekanntem Outcome in den einzelnen Therapieschemata sind Tabelle 3.6 zu entnehmen. Außerdem wurden die beiden Patientinnen, welche im Verlauf an einem Rezidiv erkrankten beziehungsweise Fernmetastasen entwickelten sowie die Patientin, welche an einem Endometriumkarzinom erkrankte getrennt von den rezidivfreien Patientinnen beurteilt.

Tabelle 3.6: Therapieschemata

Therapieschemata	n	
Strahlentherapie	Keine	2
	40 Gray	3
	60 Gray	25
	66 Gray	6
Chemotherapie	Ja	8
	Nein	28
Antihormontherapie	Ja	12
	Nein	24

Strahlentherapie

In Bezug auf die Strahlentherapie wurden vier Gruppen differenziert. Zwei Patientinnen erhielten keine postoperative Strahlentherapie. Die restlichen Patientinnen erhielten eine Strahlentherapie, wobei sich die Gesamtdosis, gemessen in Gray (kurz Gy), unterschied. 3 Patientinnen wurden mit einer Intensität von 40 Gy bestrahlt, 25 Patientinnen mit 60 Gy und die restlichen 6 Patientinnen mit 66 Gy. In Abbildung 3.16 sind die Hsp70-Konzentrationen zu den

fünf Abnahmezeitpunkten für die rezidivfreien Bestrahlungsgruppen dargestellt. Die schwarze Linie spiegelt den Hsp70-Verlauf der beiden rezidivfreien Patientinnen ohne Strahlentherapie wider. Zunächst kommt es zu einem leichten Abfall der Hsp70-Konzentration, während sich in den Nachsorgeuntersuchungen zum Abnahmezeitpunkt 4 und 5 ein erneuter Anstieg der Hsp70-Konzentration andeutet.

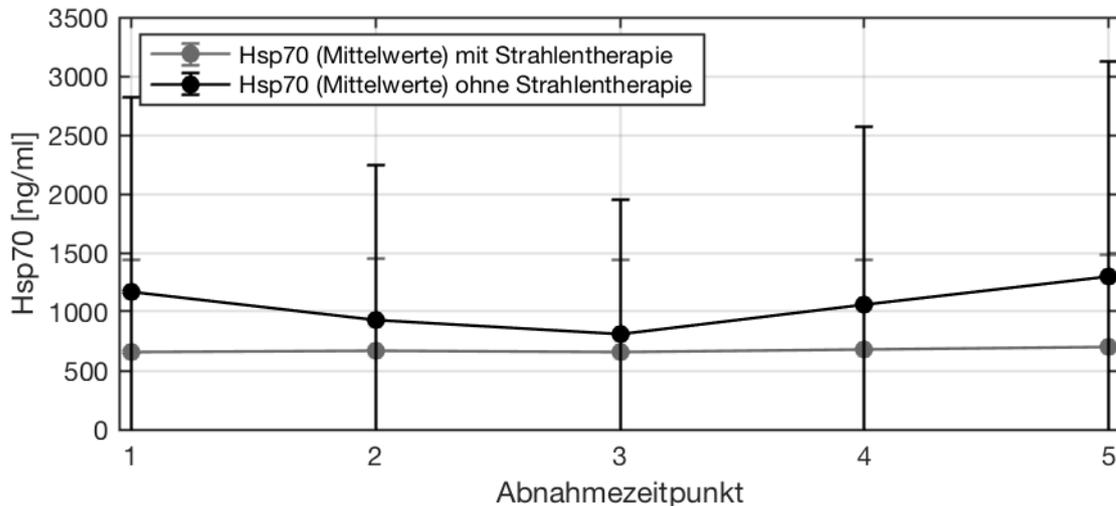


Abbildung 3.16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der rezidivfreien Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Strahlentherapie (modifiziert nach [10])

Die Hsp70-Konzentration der rezidivfreien Patientinnen mit Erhalt einer Strahlentherapie ($n = 31$) in der Intensität 40 Gy, 60 Gy und 66 Gy blieb über den gesamten Verlauf während der Therapie und im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen konstant. Dabei war die Hsp70-Konzentration der Patientinnen mit Therapie zu jedem Zeitpunkt niedriger als die Hsp70-Konzentration der Patientinnen ohne Therapie. Ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Hsp70-Konzentration zwischen den Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Strahlentherapie zeigte sich zu keinem Zeitpunkt (1: $p=0,910$, 2: $p=0,907$, 3: $p=0,763$, 4: $p=1,000$; 5: $p=1,000$, Mann-Whitney-U-Test). Die jeweiligen Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus können Tabelle A.1 im Anhang entnommen werden. Die beiden Patientinnen mit Rezidiv, Patientin 5 mit kontralateralem Mammakarzinom sowie Patientin 7 mit der Entwicklung von Fernmetastasen, erhielten eine Strahlentherapie mit einer Gesamtdosis von 60 Gy. In Abbildung 3.17 werden die Verläufe der beiden Patientinnen mit dem Verlauf der rezidivfreien Patientinnen mit Erhalt einer Strahlentherapie dargestellt. Patientin 7 weist deutlich niedrigere und relativ konstante Hsp70-Konzentrationen auf. Die Hsp70-Konzentrationen der Patientin 5 steigen trotz dem Erhalt einer Strahlentherapie an.

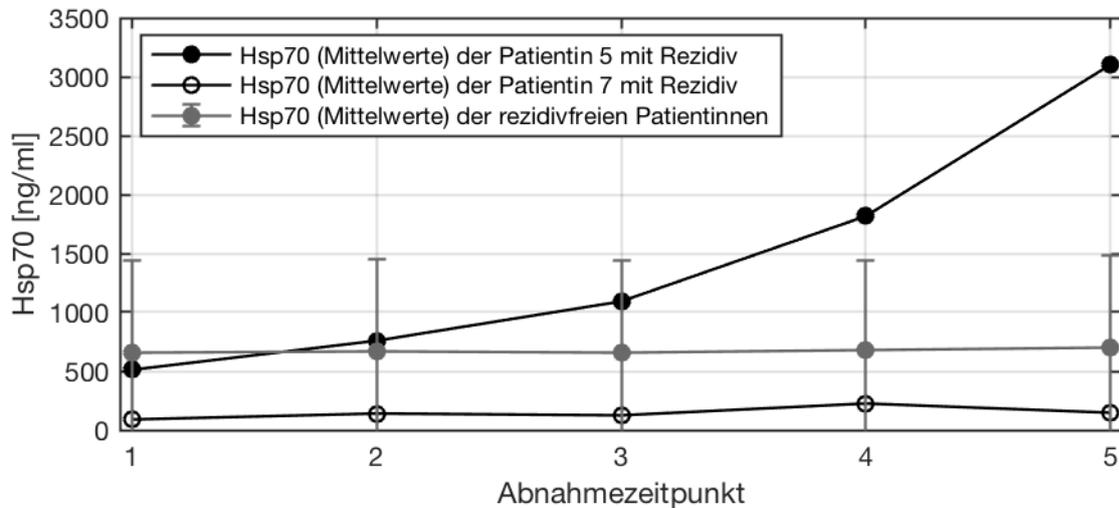


Abbildung 3.17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der Rezidivpatientinnen sowie der rezidivfreien Patientinnen mit Erhalt einer Strahlentherapie

Chemotherapie

Unter den rezidivfreien Patientinnen erhielten 7 eine Chemotherapie, während bei 26 Patientinnen darauf verzichtet wurde. Tabelle A.2 im Anhang zeigt, dass zu keinem Abnahmezeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den rezidivfreien Patientinnen mit und ohne Chemotherapie nachgewiesen werden konnte (1: $p=0,134$, 2: $p=0,100$, 3: $p=0,123$, 4: $p=0,409$, 5: $p=0,828$, Mann-Whitney-U-Test). Während der Hsp70-Verlauf der Patientinnen ohne Chemotherapie konstant auf einem Niveau verläuft, ist ein leichter Anstieg der Hsp70-Konzentration der Patientinnen mit Chemotherapie nach dem Therapieende zum Abnahmezeitpunkt 4 und 5 angedeutet. Erneut zeigte sich, wie auch bei der Strahlentherapie, eine über den gesamten Beobachtungszeitraum vorliegende niedrigere Hsp70-Konzentration der Patientinnen mit Erhalt einer Chemotherapie. Die beiden Gruppen sind in Abbildung 3.18 visualisiert.

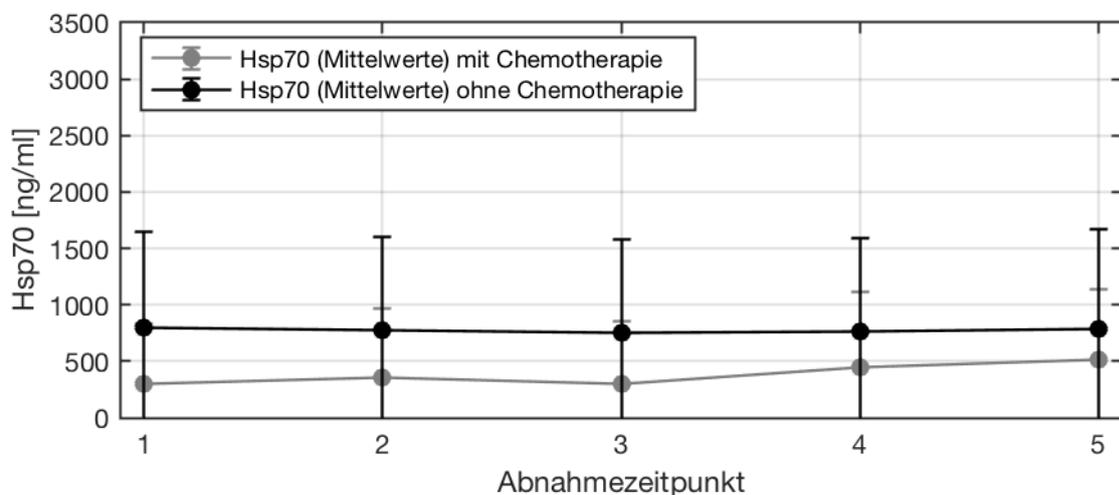


Abbildung 3.18: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der rezidivfreien Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Chemotherapie (modifiziert [10])

Unter den beiden Rezidivpatientinnen erhielt Patientin 5 eine Chemotherapie, Patientin 7 hingegen nicht. Die Hsp70-Konzentrationen der Patientin 5, welche im Verlauf ein kontralaterales Mammakarzinom entwickelte, wurden in Abbildung 3.19 den Hsp70-Konzentrationen der rezidivfreien Patientinnen mit Erhalt einer Chemotherapie gegenübergestellt. Wie in Abbildung 3.18 beschrieben, weisen die rezidivfreien Patientinnen einen konstanten Hsp70-Verlauf auf. Bei der Patientin kommt es bereits während dem Erhalt der Chemotherapie zu einer progredienten Zunahme der Hsp70-Konzentration, die zu den Abnahmezeitpunkten 3 - 5 bereits höher liegt als die Standardabweichungen der rezidivfreien Vergleichsgruppe. Da in dieser Abbildung eine einzelne Patientin mit einer Gruppe verglichen wird, ist eine Signifikanzprüfung nicht möglich.

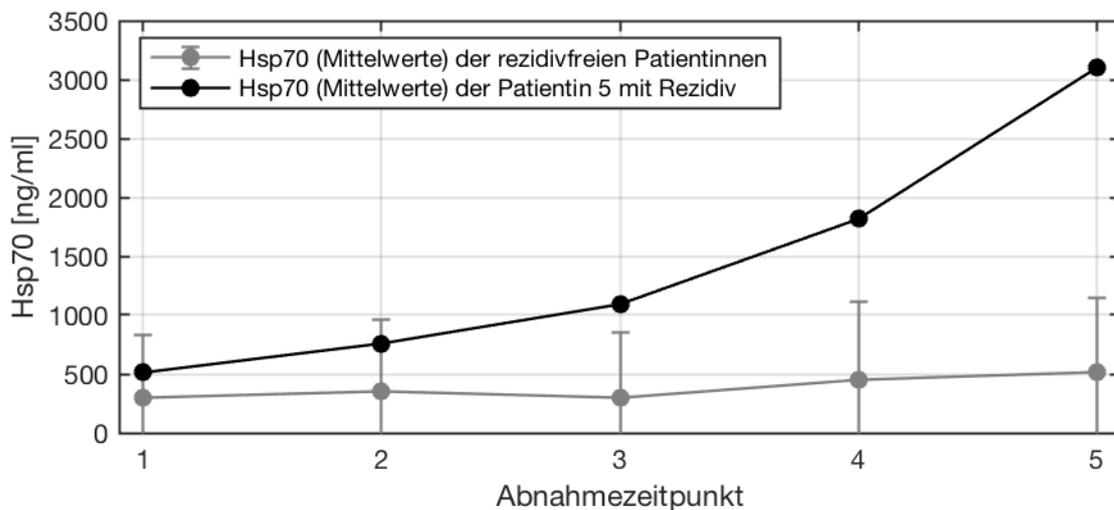


Abbildung 3.19: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der Rezidivpatientin 5 sowie der rezidivfreien Patientinnen mit Erhalt einer Chemotherapie

Antihormontherapie

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Hsp70-Konzentration und dem Erhalt einer Antihormontherapie besteht, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Abbildung 3.20 stellt die Hsp70-Konzentrationen der Patientinnen mit und ohne Antihormontherapie gegenüber. Von den 33 rezidivfreien Patientinnen erhielten 12 eine Antihormontherapie. Anhand des Verlaufs ist ersichtlich, dass sich die Hsp70-Konzentrationen der beiden Gruppen mit beziehungsweise ohne Antihormontherapie über den Abnahmezeitpunkt 1 bis 3 kaum unterscheiden. Die graue Linie, welche die Hsp70-Konzentrationen der rezidivfreien Patientinnen mit Erhalt einer Antihormontherapie abbildet, liegt über diesen Beobachtungszeitraum knapp über der schwarzen Linie. Ein leichter Trend zeigt sich dagegen in den beiden Nachsorgeuntersuchungen zu den Abnahmezeitpunkten 4 und 5.

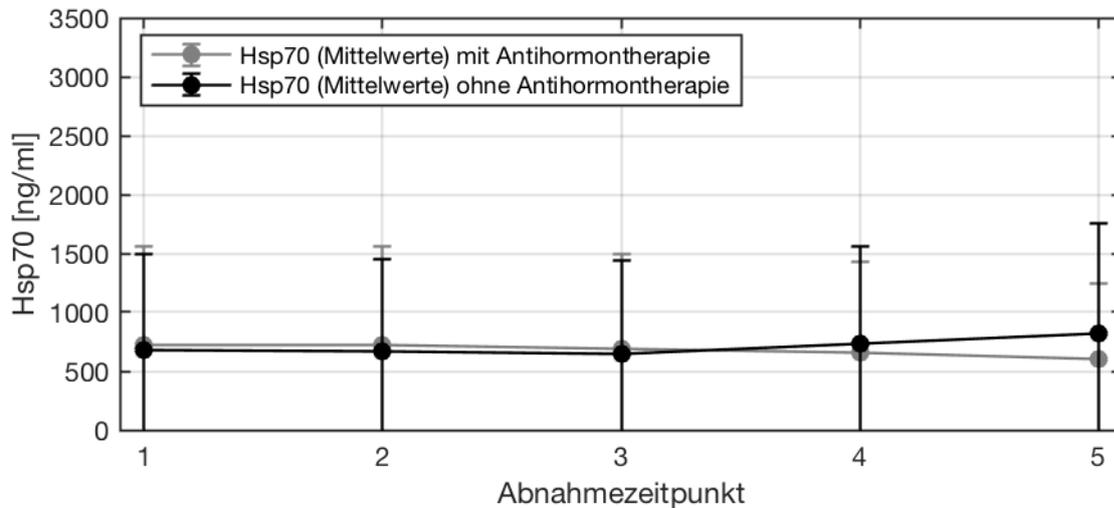


Abbildung 3.20: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentrationen der rezidivfreien Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Antihormontherapie modifiziert nach [10])

In diesem Zeitraum findet ein Abfall der Hsp70-Konzentration in der Gruppe der Patientinnen, welche eine Antihormontherapie erhalten, statt. Dagegen kann in der Gruppe ohne Antihormontherapie ein Anstieg der Hsp70-Werte beobachtet werden. Die genauen Hsp70-Konzentrationen inklusive Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzniveau können der Tabelle A.3 entnommen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich zu keinem Abnahmezeitpunkt (1: $p=0,512$, 2: $p=0,450$, 3: $p=0,488$, 4: $p=0,730$, 5: $p=0,860$, Mann-Whitney-U-Test). Die beiden Rezidivpatientinnen erhielten keine Antihormontherapie.

3.4.2 Vergleich der Hsp70-Konzentrationen mit der Rezidivwahrscheinlichkeit

Die Hsp70-Konzentrationen der Studienteilnehmerinnen, bei welchen sich das Krankheitsbild verschlechterte, wurden mit den Hsp70-Konzentrationen der 33 rezidivfreien Patientinnen verglichen. Bei Patientin 5 wurde im Verlauf ein Rezidiv der kontralateralen Brust diagnostiziert. Patientin 7 entwickelte Fernmetastasen. Beide Verläufe unterscheiden sich deutlich von der rezidivfreien Vergleichsgruppe. Die Hsp70-Konzentrationen der Patientin 7 sind über den gesamten Beobachtungszeitraum niedriger als die der Vergleichsgruppe und liegen außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der Vergleichsgruppe. Abbildung 3.21 zeigt einen Vergleich der beiden Verläufe über die fünf Abnahmezeitpunkte.

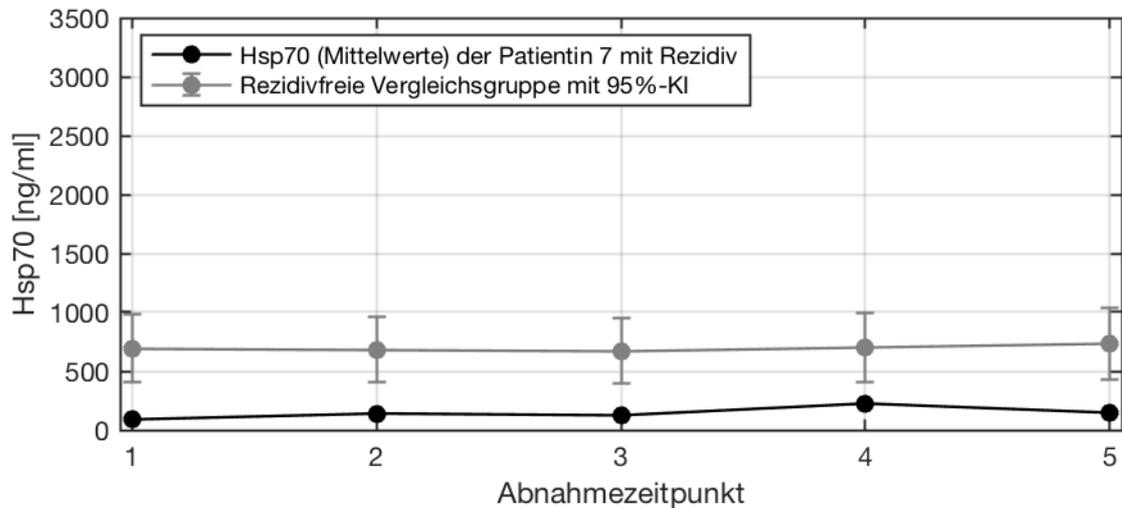


Abbildung 3.21: Vergleich der Hsp70-Konzentration der Patientin 7 mit Fernmetastasen zur rezidivfreien Vergleichsgruppe

Insbesondere auffallend ist jedoch der Verlauf der Patientin, welche an einem kontralateralen Mammakarzinom erkrankte. Ein Vergleich zur rezidivfreien Vergleichsgruppe kann Abbildung 3.22 entnommen werden. Während es bei allen anderen Patientinnen mit bekanntem Gesundheitszustand zu keinen relevanten Veränderungen der Hsp70-Konzentration über die unterschiedlichen Zeitpunkte kommt, zeigt sich bei dieser Patientin eine konstante Steigerung über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die anfängliche Hsp70-Konzentration lag bei 512,4 ng/ml und erhöhte sich trotz laufender Therapie auf 759,3 ng/ml und am Ende der Strahlen- und Chemotherapie auf 1092,7 ng/ml. Im Rahmen der Nachsorgeuntersuchung wurde sechs Wochen nach Strahlentherapieende, zum Abnahmezeitpunkt 4, eine Hsp70-Konzentration von 1816,7 ng/ml festgestellt. Sechs Monate später, zum Abnahmezeitpunkt 5, stieg diese auf 3101,7 ng/ml an, was dem höchsten Wert der Studie entspricht.

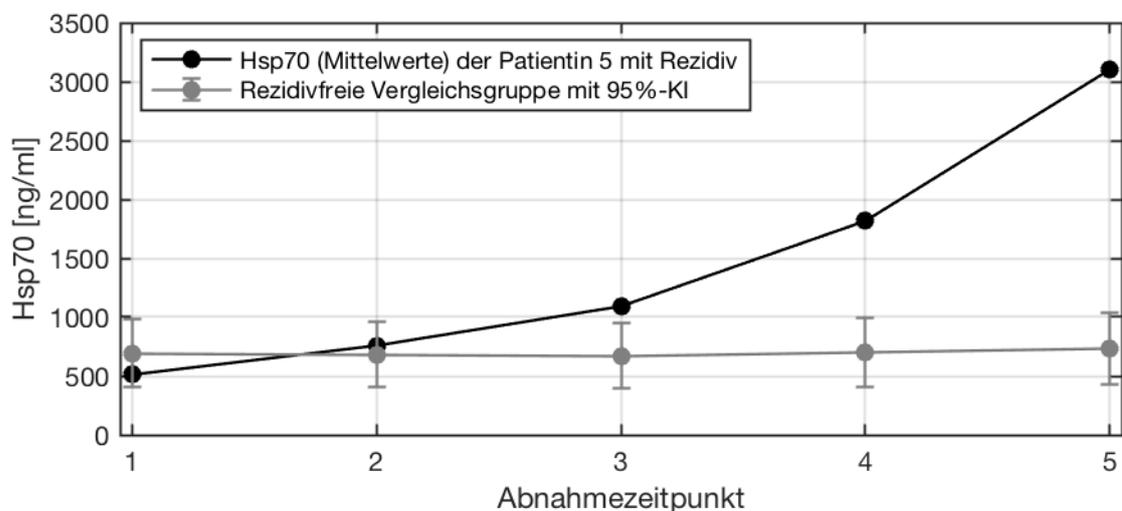


Abbildung 3.22: Vergleich der Hsp70-Konzentration der Patientin 5 mit kontralateralem Mammakarzinom zur rezidivfreien Vergleichsgruppe (modifiziert nach [10])

Während sich der zweite Hsp70-Wert der Patientin 5 durch seinen Anstieg von der Vergleichsgruppe unterscheidet, liegt dieser im Bereich des 95%-Konfidenzintervalls dieser. Bereits zum Abnahmezeitpunkt 3, welcher dem Ende der Radiochemotherapie entspricht, liegt der Wert bereits außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der rezidivfreien Vergleichsgruppe. Im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen sechs Wochen sowie sechs Monaten nach Abschluss der Radiochemotherapie steigt die Hsp70-Konzentration dieser Patientin konstant an.

4 Diskussion

Die vorliegende Doktorarbeit befasst sich mit der Bestimmung von exosomalem Hsp70 im Blut von Patientinnen mit nicht metastasiertem Mammakarzinom im Therapieverlauf. Dabei verfolgt diese Arbeit drei große Ziele. Zunächst wurde untersucht inwiefern sich die Hsp70-Konzentrationen in der Messung mit dem R&D ELISA im Vergleich zum compHsp70 ELISA unterscheiden. Im zweiten Schritt wurden die Hsp70-Konzentrationen mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Das Hauptaugenmerk war die Untersuchung der Eignung von exosomalem Hsp70 als möglicher Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit beim Mammakarzinom.

4.1 Studienverlauf und Limitationen

Für die Studie wurden das weibliche Geschlecht sowie das Vorliegen eines unilateralen Mammakarzinoms als Einschluss- und das Vorhandensein eines Zweitkarzinoms oder Fernmetastasen inklusive der dann leitliniengerechten Therapie als Ausschlusskriterien definiert. Die Studie umfasst neben den 108 Gesunder*innen 40 Mammakarzinompatientinnen. Bei diesen erfolgte die Blutentnahme jeweils dreimal während des Therapieverlaufs sowie auch im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen. Während das Mammakarzinom bei Männern sehr selten auftritt [260], ist es bei Frauen sowohl in Bezug auf die Inzidenz als auch auf die Mortalität das häufigste Karzinom und die häufigste Krebstodesursache [11] [261]. Die Berücksichtigung von ausschließlich weiblichen Probandinnen in der Studie lässt sich damit rechtfertigen. Die Anzahl von 40 Mammakarzinompatientinnen mit Einteilung in Untergruppen führte je nach Merkmal zu unterschiedlich großen Stichprobenumfängen. Bei kleineren Umfängen ermöglichte dies die Beurteilung eines Trends, erschwerte aber Aussagen zur Signifikanz. Anhand der erhobenen Daten zeigten sich erste Hinweise, welche anhand von größeren Stichproben gemessen und auf ihre Signifikanz geprüft werden müssen. Neben einer größeren Stichprobe wären außerdem Mammakarzinompatientinnen in fortgeschrittenen Tumorstadien von besonderem Interesse. Diese entwickeln im Verlauf häufiger Metastasen beziehungsweise Rezidive und könnten eine genauere Aussage zur Eignung von exosomalem Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit zulassen. Ein wesentlicher Nachteil bestand darin, dass keine Blutentnahme präoperativ stattgefunden hat. Ein Vergleich der Hsp70-Konzentrationen prä- und postoperativ ist somit nicht möglich. Bestünde ein präoperativer Ausgangswert, könnten die tumorspezifischen Parameter aussagekräftiger beurteilt werden. Eine weitere Limitation stellte der Beobachtungszeitraum dar, da die Blutentnahmen nur bis ein Jahr nach dem Ende der Strahlentherapie durchgeführt

wurden. Die Eignung von exosomalem Hsp70 als tumorspezifischer Biomarker könnte durch einen längeren Beobachtungszeitraum zuverlässiger nachgewiesen werden. Da die Kontaktaufnahme der Probandinnen telefonisch erfolgte, konnte der Gesundheitszustand lediglich durch eine mündlichen Stellungnahme der Patientinnen erfragt werden. Zudem fanden die Nachsorgeuntersuchungen der Patientinnen bei unterschiedlichen Ärztinnen und Ärzten in unterschiedlichen Zeitintervallen statt. In einer optimalen Studie würde die Nachsorge aller Patientinnen in einem spezialisierten Zentrum stattfinden und zur Ermittlung eines Rezidivs die jeweilig ärztlich dokumentierten Ergebnisse der Nachsorgeuntersuchungen herangezogen werden.

4.2 Beurteilung der prädiktiven Aussage von exosomalem und freiem Hsp70

Das Hitzeschockprotein 70 lässt sich sowohl im Intrazellulärraum, in der Plasmamembran von diversen Tumorentitäten und im Extrazellulärraum nachweisen. Je nach Lokalisation beeinflusst es die Resistenz von Tumorzellen, kann jedoch ebenso als Stimulator des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems wirken. [107] Die Konzentration von zirkulierendem Hsp70, welches im Plasma und Serum von Tumorpatient*innen gemessen werden kann, könnte daher als tumorspezifischer Biomarker bei der Bestimmung der lebenden Tumormasse von hoher klinischer Relevanz sein. Das extrazellulär vorliegende Hsp70 kann einerseits als freies Hsp70 und andererseits gebunden an Lipidvesikel wie etwa Exosomen [8] oder in Form von lysosomalen Endosomen vorliegen [64]. Dabei stellt freies Hsp70 nur einen geringen Prozentanteil des gesamten extrazellulären Hsp70 dar und wird hauptsächlich von sterbenden Tumorzellen sezerniert [262]. Exosomales Hsp70 wird hingegen aktiv von lebenden Tumorzellen freigesetzt, die Hsp70 auf ihrer Plasmamembran exprimieren und metabolisch aktiv sind [8] [5]. Während die meisten kommerziell erhältlichen ELISA-Verfahren nur das freie Hsp70 detektieren, ist der compHsp70 ELISA in der Lage sowohl freies als auch exosomales Hsp70 zu bestimmen und könnte daher Rückschlüsse auf die lebende Tumormasse zulassen [9]. Um eine Aussage bezüglich der Prädiktion des neuen compHsp70 ELISA im Vergleich zum herkömmlichen R&D ELISA treffen zu können, erfolgte die Messung der gleichen Blutproben einerseits durch Dr. med. Anna Rothhammer mit dem R&D ELISA [256] [257] und andererseits im Rahmen dieser Arbeit mit dem compHsp70 ELISA. Im Vergleich der jeweiligen Mittelwerte über die fünf Abnahmezeitpunkte lag der niedrigste Wert beim R&D ELISA bei 2,0 ng/ml und der höchste bei 2,4 ng/ml [256] [257]. Der compHsp70 ELISA detektierte hingegen deutlich höhere Werte. Der niedrigste Mittelwert lag bei 663,3 ng/ml und der höchste bei 804,4 ng/ml. Die Ergebnisse scheinen darauf hinzuweisen, dass die signifikanten Unterschiede in der Hsp70-Konzentration der Mammakarzinompatientinnen am ehesten auf die Fähigkeit des neuen compHsp70 ELISA zurückzuführen sind, sowohl freies als auch exosomales Hsp70 bestimmen zu können. Diese Messeigenschaft wird durch die beiden monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 und cmHsp70.2 ermöglicht. Diese können in unbegrenzter Menge hergestellt werden und weisen eine hohe reproduzierbare Sensitivität

und Spezifität auf. Der compHsp70 ELISA könnte daher genauere Rückschlüsse auf die tatsächlich zirkulierende Hsp70-Konzentration zulassen [9]. Darüber hinaus könnte die signifikant erhöhte Hsp70-Konzentration der Mammakarzinompatientinnen postoperativ im Vergleich zu den Gesundspender*innen durch den Nachweis von exosomalem Hsp70 begründet werden. Während das Normalgewebe einen Hsp70-Membran-negativen Phänotyp aufweist [110] [55] [19], zeigten rund 60% von etwa 1000 Tumoren unterschiedlicher Entitäten einen positiven Phänotyp [109]. Beispiele für erhöhte Hsp70-Konzentrationen beim Vorliegen einer Tumorerkrankung wurden nicht nur bei Tumoren der weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane nachgewiesen [71] [72] [73], sondern auch bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts, wie dem kolorektalen Karzinom [263] und dem Leberzellkarzinom [264]. Weitere Beispiele sind hämatoonkologische Krankheitsbilder wie die akute myeloische Leukämie [265]. Aktuell ist noch ungeklärt in welchem Zeitraum nach operativer Entfernung des Mammakarzinoms die im Blut messbare Hsp70-Konzentration abfällt. Aufgrund der fehlenden präoperativen Bestimmung der Hsp70-Konzentration kann kein Vergleich von prä- und postoperativen Werten angestellt werden. Da die erste Blutabnahme der Probandinnen unmittelbar postoperativ erfolgte könnten die erhöhten Hsp70-Konzentrationen zum ersten Abnahmezeitpunkt aber auch im Zusammenhang mit der Inflammation der brusterhaltenden Operation stehen. In einer Studie von Kimura et al. [266] zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von Hsp70 und der Rate an postoperativer Infektion und Organdysfunktion nach Leberresektion [266]. Aufgrund der anhaltend hohen Hsp70-Konzentrationen über den gesamten Beobachtungszeitraum erscheint diese Hypothese allerdings nicht zutreffend. Weitere Ursachen für anhaltend hohe Hsp70-Werte zeigten sich unter anderem bei Patient*innen mit Nieren- und peripheren Gefäßerkrankungen sowie bei Personen mit grenzwertigem Bluthochdruck [267] [268]. Weiterhin können chronische Infektionen wie etwa eine chronische Hepatitis oder Leberzirrhose [7] oder eine Erkrankung mit Diabetes mellitus Typ 1 mit erhöhten Hsp70-Plasmakonzentrationen einhergehen [269].

4.3 Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter mit der Hsp70-Konzentration

Zur Beantwortung der zweiten Forschungsfrage, ob ein Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Parametern und der exosomalen Hsp70-Konzentration besteht, wurden die zwei Untergruppen Risikofaktoren und tumorspezifische Parameter gebildet.

Unter den bekannten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms spielt das Alter eine entscheidende Rolle, da die Inzidenz mit dem Alter ansteigt [133]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in Westeuropa bei 63 Jahren [270]. Somit ist der Altersdurchschnitt der Patientinnen dieser Studie mit 58 Jahren etwas niedriger. In Einklang mit den Daten von Breuninger et al. [271] und Werner et al. [9] zeigte sich keine Korrelation der Hsp70-Konzentration mit dem Alter der Patientinnen. Der Vergleich der Patientinnen mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 zeigte einen nicht signifikanten Unterschied in der Hsp70-Konzentration. Bei Patientinnen, welche an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt waren,

wurden höhere Hsp70-Werte gemessen. Aufgrund der niedrigen Fallzahl der erkrankten Patientinnen ($n = 3$) sowie der großen Standardabweichungen zeigte sich keine Signifikanz. Dieser Trend wurde jedoch bereits in früheren Studien beobachtet, welche eine erhöhte Hsp70-Konzentration im Serum von Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 beschreiben [272] [273]. Neue Erkenntnisse geben erste Hinweise darauf, dass Hsp70 eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der β -Zell-Dysfunktion, der Insulinresistenz und verschiedener diabetischer Komplikationen einnimmt [274]. Auch in Bezug auf Diabetes mellitus erfüllt Hsp70 je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen. Intrazellulär wirkt Hsp70 schützend, antiapoptotisch sowie entzündungshemmend und geht mit einer normalen Insulinsensitivität einher. Das extrazelluläre Hsp70 steht im Zusammenhang mit proinflammatorischen Reaktionen, einer Verminderung der Expression des intrazellulären Hsp70 sowie mit einer verminderten Insulinsensitivität. [275] Weitere größer angelegte Studien zur Untersuchung dieser Prozesse im Zusammenhang mit dem compHsp70 ELISA scheinen daher interessant zu sein. Obwohl Adipositas einer der entscheidenden Risikofaktoren für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 darstellt [276], zeigte sich kein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen BMI-Klassen und der Hsp70-Konzentration. Die Daten stimmen mit der Studie von Rodrigues-Krause et al. [273] überein, aus welcher kein signifikanter Unterschied der Hsp70-Konzentration zwischen adipösen und nicht-adipösen Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 hervorgeht. Um die Relevanz toxischer Risikofaktoren hinsichtlich der Entstehung eines Mammakarzinoms zu überprüfen, wurden die Patientinnen nach ihrem Konsum von Alkohol und/oder Nikotin befragt. Hierbei zeichneten sich leicht erhöhte Hsp70-Werte in der Gruppe der Raucherinnen und ehemaligen Raucherinnen im Vergleich zu den Nichtraucherinnen ab. Nikotinabusus spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung unterschiedlicher Erkrankungen. Im Gegensatz dazu leisten Antioxidantien einen erheblichen Beitrag in der Prävention von Nikotin-assoziierten Krankheiten. Eine chronische Exposition gegenüber Zigarettenrauch führt zu einer Hochregulierung von Hsp70. [277] Die Patientinnen, die angaben, keinen Alkohol zu konsumieren hatten hingegen etwas niedrigere Werte als ihre Vergleichsgruppe. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant. Zusammenfassend zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den postoperativen Hsp70-Konzentrationen und den untersuchten Risikofaktoren.

Um eine mögliche Korrelation zwischen tumorspezifischen Parametern und der Hsp70-Konzentration zu überprüfen, wurde die gemessene Hsp70-Konzentration jeweils mit dem TNM-Stadium sowie dem Grading in Verbindung gesetzt. Die Analyse dieser Faktoren ist aufgrund der Tatsache, dass die Hsp70-Konzentrationen postoperativ gemessen wurden, nur eingeschränkt möglich. Unter der Hypothese, dass die erhöhten Hsp70-Werte auch postoperativ auf das Mammakarzinom zurückzuführen sind, zeigten sich folgende Beobachtungen. In Bezug auf das T-Stadium zeigte sich ein niedrigerer Mittelwert im Stadium T1a als in den Stadien T1b, T1c und T2, welche ähnliche Mittelwerte aufwiesen. Der Median stieg von T1a bis T2 an. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Hsp70-Konzentration und der Tumorgöße konnte bereits im Mausmodell bei Tumoren im Kopf-Halsbereich und beim Pankreaskarzinom gezeigt werden [278]. Da exosomales Hsp70 vorwiegend von lebenden Tumorzellen stammt, zeigte sich ebenfalls ein signifikan-

ter Zusammenhang zwischen der Hsp70-Konzentration und dem Bruttotumorvolumen (GTV) beim Bronchialkarzinom [279]. Im Vergleich der N-Stadien zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit und ohne Lymphknotenbefall. Da das Vorliegen von Fernmetastasen (M) als Ausschlusskriterium definiert wurde, konnte dieser Aspekt nicht untersucht werden. Eine Assoziation zwischen der Hsp70-Konzentration und der Tumorgröße sowie dem Differenzierungsgrad beim Mammakarzinom wurde bereits in anderen Studien beschrieben [71] [280]. Noguchi et al. [281] wiesen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Überexpression von Hsp70 und der Lymphknotenmetastasierung beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus nach. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Untersuchung von Bauer et al. [282] keine signifikante Korrelation zwischen der Hsp-Expression und dem Vorhandensein beziehungsweise Fehlen von Lymphknotenmetastasen. Die jeweiligen Hsp70-Konzentrationen der drei Differenzierungsgrade G1 bis G3 wurden ebenfalls untersucht. Der Mittelwert in der Gruppe G1 war hierbei am niedrigsten und in der Gruppe G3 am höchsten. Signifikant war der Unterschied jedoch nicht. Um eine sichere Aussage bei den untersuchten Patientinnen treffen zu können, wäre eine präoperative Blutentnahme zum Diagnosezeitpunkt sowie ein größerer Stichprobenumfang erforderlich.

4.4 Exosomales Hsp70 als möglicher Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit

In den letzten Jahren besteht ein steigendes Interesse an der individuellen Patientinnenstratifizierung sowie der Entwicklung von zielgerichteten Therapien zur Behandlung des Mammakarzinoms. Einen unverzichtbaren Bestandteil stellt hierbei die frühzeitige Beurteilbarkeit des Therapieansprechens sowie der Rezidivwahrscheinlichkeit dar. Biomarker, die im Blut von Tumorpatientinnen nachgewiesen werden können, haben das Potenzial die Effektivität der verabreichten Therapieschemata abzuschätzen und eine individuelle Therapieanpassung zuzulassen. Diese Doktorarbeit untersucht die Eignung von exosomalem Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung des Therapieansprechens (Strahlentherapie, Chemotherapie und Antihormontherapie) sowie der Rezidivwahrscheinlichkeit beim Mammakarzinom. Mitglieder der Hsp-Familie leisten einen wesentlichen Beitrag zum Zellüberleben und verhindern die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen. Sie können durch unterschiedliche Mechanismen Resistenzen gegen Strahlen-, Chemo- und Antihormontherapien verursachen. [61] Während ein intaktes p53 dafür sorgt, dass geschädigte Zellen in die Apoptose und Seneszenz eintreten, können Hsp27 und Hsp70 die Aktivität von p53 unterdrücken und damit eine Reduktion der Apoptose und Seneszenz von Tumorzellen bewirken [61]. Außerdem ist Hsp70 in der Lage sowohl die intrinsische und die extrinsische Apoptose als auch die Seneszenz von Krebszellen zu verhindern und so eine Resistenz gegen diese Prozesse zu vermitteln. Krebszellen, welche Hsp70 überexprimieren neigen zu einer höheren Resistenz gegenüber Strahlentherapie. [61] [79] Sowohl in vivo als auch in vitro konnte gezeigt werden, dass Hsp70.1 und Hsp70.3 eine entscheidende Rolle spielen, um die genomische Stabilität unter Stressbedingungen wie etwa Strahlentherapie aufrechtzuerhalten. Zellen von Mäusen mit Hsp70.1- und Hsp70.3-Knockout wiesen

eine deutlich höhere Rate an Restchromosomenaberrationen, erhöhter Zelltötung und letztlich verstärkter, durch ionisierende Strahlung verursachter, onkogener Transformation auf. [283] Da HSF-1 die Angiogenese von Tumorzellen fördert und sowohl von Hsp70 als auch Hsp90 abhängig ist, führt die vermehrte Expression dieser Hitzeschockproteine ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz gegen Strahlentherapie [102]. Während durch Radio(chemo)therapien DNA-Schäden in Tumorzellen verursacht werden, können Hitzeschockproteine diesem Prozess durch die Förderung der DNA-Reparaturmechanismen entgegenwirken [61] [284]. Die Hemmung von Hsp27 und Hsp70 führte beim Urothelkarzinom zu einer positiven Wirkung auf die Radio(chemo)therapie [285]. In Bezug auf die Chemotherapie stellt die Multidrug Resistenz (MDR), die erworbene Resistenz von Krebszellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, einen weiteren limitierenden Faktor für den Erfolg der Krebsbehandlung dar [286]. Liegt eine MDR vor, weisen Tumorzellen nicht nur eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber den verwendeten Chemotherapeutika auf, sondern auch gegenüber einer Vielzahl von Arzneimitteln, die weder eine offensichtliche strukturelle Homologie noch gemeinsame Ziele besitzen. Herbeigeführt wird die MDR unter anderem durch strukturelle oder funktionelle Veränderungen an der Plasmamembran oder innerhalb des Zytoplasmas, der Zellkompartimente oder des Zellkerns. [287] Ein Beispiel hierfür ist der verstärkte zelluläre Efflux von Chemotherapeutika aufgrund einer Überexpression von ATP-Binding Cassette (ABC)-Transportern wie beispielsweise dem ABCB1/P-Glykoprotein (MDR1), die ABCC/Multidrug Resistenzproteinfamilie oder dem ABCG2/Brustkrebsresistenzprotein (BCRP) [286] [288]. Die vermehrte Sekretion von Chemotherapeutika führt dabei zu einer Verringerung des intrazellulären Arzneimittelspiegels, welche eine Arzneimittelunempfindlichkeit bedingt [289]. Hitzeschockproteine als auch die pleiotrope Arzneimittelresistenz verfügen über überlappende regulatorische Transkriptionsnetzwerke wie etwa HSF, Yap1 und Pdr3, weshalb ein Zusammenhang zwischen Stressreaktionen und MDR vermutet wird [290]. Ist das Mammakarzinom Hormonrezeptor-positiv wird außerdem eine antihormonelle Therapie angewandt [133]. Steroidhormonrezeptoren (SHRs) sind intrazelluläre, ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren. Zu ihren Aufgaben zählt die Wahrnehmung endogener Steroidhormone, die durch die Zellmembran diffundieren [291]. Die für das Mammakarzinom relevanten Östrogen- und Progesteronrezeptoren gehören unter anderem zu den Steroidhormonrezeptoren, welche am besten erforscht wurden [292] [293]. Hitzeschockproteine sind wiederum an der Faltung, der Aktivierung, dem Transport und der Transkriptionsaktivität der meisten Steroidrezeptoren beteiligt [294]. Es erscheint daher naheliegend, dass ein Zusammenhang zwischen Hsps und der Resistenz gegen eine Antihormontherapie besteht [295].

Neben der Vermittlung von Resistenzen der beim Mammakarzinom verwendeten Therapie-schemata könnte exosomales Hsp70 im Therapieverlauf als Parameter zur Beurteilung des Therapieansprechens dienen. Werner et al. [9] zeigten, dass exosomales Hsp70 für die Abschätzung des Erfolgs einer Strahlentherapie beim Bronchialkarzinom geeignet sein könnte. Patient*innen, welche auf die Strahlentherapie ansprachen, wiesen eine Senkung der Hsp70-Konzentration auf. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen dem Bruttotumorvolumen (GTV) und der Höhe der exosomalen Hsp70-Konzentration gezeigt werden [279]. Um eine Aussage bezüglich der Eignung von exosomalem Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung

des Therapieansprechens beim Mammakarzinom treffen zu können, wurden die rezidivfreien Patientinnen getrennt nach den drei verwendeten Therapieschemata (Strahlentherapie, Chemotherapie und Antihormontherapie) mit den Patientinnen ohne Erhalt der jeweiligen Therapie verglichen. Die Bestimmung der exosomalen Hsp70-Konzentration erfolgte unmittelbar nach BET, nach der Bestrahlung mit 30 Gy, nach dem Ende der Radiochemotherapie und 6 Wochen beziehungsweise 6 Monate nach dem Ende der Radiochemotherapie. Unter laufender Therapie konnte bei allen drei Therapieschemata eine niedrigere Hsp70-Konzentration gemessen werden, als bei der jeweiligen Vergleichsgruppe ohne Therapie. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte sich unter anderem durch die niedrige Fallzahl sowie die breiten Standardabweichungen erklären. Trotz fehlender Signifikanz in allen drei Untersuchungen lassen die hier erhobenen Daten an die Möglichkeit denken, dass eine niedrigere beziehungsweise fallende Hsp70-Konzentration auf ein gutes Therapieansprechen hinweisen könnte. [10] Chanteloup et al. [14] wiesen bereits einen Zusammenhang zwischen der exosomalen Hsp70-Konzentration von Mammakarzinompatientinnen und dem Therapieansprechen nach. Die Patientin, welche im Verlauf an einem kontralateralen Mammakarzinom erkrankte, zeigte bereits während dem Erhalt der Radiochemotherapie einen progredienten Anstieg der Hsp70-Konzentration. Während sich die Höhe der Hsp70-Werte bei den rezidivfreien Patientinnen stark unterschieden, blieben die jeweiligen Hsp70-Konzentration der einzelnen Patientinnen jedoch relativ konstant auf einem Level. Der progrediente Anstieg der Hsp70-Konzentration könnte als Hinweis für ein fehlendes Therapieansprechen dienen. [10] Durch die Analyse der Hsp70-Dynamik zusammen mit anderen Biomarkern während der Therapie könnte eine schnellere Therapieanpassung erfolgen und sich der Outcome für Patientinnen verbessern [9]. Zudem spielt Hsp70 in Bezug auf eine Immuntherapie eine bedeutende Rolle. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Hsp70 als Teil seiner molekularen Chaperonfunktion Tumor-assoziierte Antigene binden und diese professionellen Antigen-präsentierenden Zellen über MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren kann. Hitzeschockproteine könnten somit eine wichtige Rolle als mögliche Adjuvantien für Tumorimpfstoffe zur Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen spielen. [126]

Neben dem Therapieansprechen wurde auch die Eignung von exosomalem Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung der Rezidivwahrscheinlichkeit untersucht. Dabei stellte sich vor allem die Frage, ob exosomales Hsp70 ein Mammakarzinomrezidiv früher detektieren kann als herkömmliche Methoden im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen. Von den insgesamt 40 an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen waren 36 bereit eine Auskunft bezüglich ihres Gesundheitszustandes zu geben. Von 4 Patientinnen war der Gesundheitszustand unklar, weswegen sie von der Beurteilung der Eignung von exosomalem Hsp70 als Prognoseparameter exkludiert wurden. Von den 36 Patientinnen erkrankten zwei Patientinnen an einem Rezidiv und eine Patientin an einem Endometriumkarzinom. Aufgrund der fehlenden Bestimmung der Hsp70-Konzentration zum Zeitpunkt der Diagnose des Endometriumkarzinoms können keine Rückschlüsse gezogen werden, ob dieses einen Hsp70-positiven oder negativen Phänotyp aufwies. Die Bewertung von Hsp70 als Biomarker ist in diesem Fall nicht möglich. Beide Patientinnen (Patientin 7 und 5), die ein Rezidiv erlitten, unterschieden sich deutlich von der Vergleichsgruppe. Patientin 7 hatte deutlich niedrigere Hsp70-Werte als die restlichen Patient-

innen und lag über allen Abnahmezeitpunkten unterhalb des 95%-Konfidenzintervalls der rezidivfreien Patientinnen. Unter der Hypothese, dass die erhöhten Hsp70-Konzentrationen der Patientinnen postoperativ auf das Mammakarzinom zurückzuführen sind, scheinen die Ergebnisse dieser Patientin darauf hinzuweisen, dass das Mammakarzinom einen Hsp70-negativen Phänotyp aufweist. Die Eignung von Hsp70 als Biomarker kann daher nicht beurteilt werden. Im Vergleich dazu wies Patientin 5, welche im Verlauf an einem kontralateralen Mammakarzinom erkrankte, bereits initial erhöhte Hsp70-Werte auf, die während der Therapie konstant anstiegen und ab dem dritten Abnahmezeitpunkt bereits über dem 95%-Konfidenzintervall der Werte der rezidivfreien Patientinnen lagen. Es erscheint, als ob der deutliche Anstieg der exosomalen Hsp70-Konzentration bereits vor den aktuellen zur Nachsorgeuntersuchung verwendeten Methoden als Warnhinweis dienen könnte. [10] Es wurde bereits gezeigt, dass Hsp70-Exosomen im Blut mit der Hsp70-Expression im Tumor übereinstimmen. Dies dient als Indikator dafür, dass zirkulierende Exosomen Merkmale des Hsp70-Status im Tumor reproduzieren. [14] Außerdem haben Human- und Mausmodelle gezeigt, dass Metastasen eine höhere Hsp70-Membrandichte aufweisen als Primärtumore [296]. Unter den insgesamt 40 Patientinnen existiert ein weiterer Verlauf, welcher dem der Patientin 5 ähnelt. Die Hsp70-Konzentration der Patientin 22 stieg zu den Abnahmezeitpunkten 4 und 5 ebenfalls deutlich an. Da der Gesundheitszustand dieser Patientin nicht bekannt ist, kann jedoch keine Aussage über die Ursache des Anstiegs getroffen werden. Möglicherweise könnte ein Rezidiv bei dieser Patientin vorliegen. Exosomales Hsp70 ist in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert, weshalb es in der diagnostischen Immunpathologie nicht nützlich erscheint, da stärker eingeschränkte Marker zur Identifizierung der Herkunftslinie von Krebsgeweben existieren [71]. Dennoch könnte exosomales Hsp70, welches durch den compHsp70 ELISA im Blut von Patientinnen gemessen werden kann, einen Beitrag sowohl in der Bewertung des Therapieansprechens als auch als Indikator für die Rezidivwahrscheinlichkeit beim Mammakarzinom leisten. Die Möglichkeit, eine Krebsdiagnose möglichst früh zu stellen, trägt erheblich zur Verbesserung der Prognose bei. Dies gilt bei der Erstdiagnose, insbesondere aber auch im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen. Treten im Rahmen der Tumorerkrankung Metastasen auf, so sind diese oft ursächlich für die krebspezifische Mortalität [14]. Nach abgeschlossener Primärbehandlung des Mammakarzinoms sollten die Patientinnen mindestens zehn Jahre lang an einem Nachsorgeprogramm teilnehmen. Dieses beinhaltet neben der Anamnese und körperlichen Untersuchung insbesondere die Diagnostik mittels bildgebender Verfahren. [133] Aufgrund der unzureichenden Sensitivität der herkömmlichen bildgebenden Diagnostik um Metastasen frühzeitig zu detektieren, ist das Interesse an der Etablierung neuer Methoden zur Früherkennung von Rezidiven und Metastasen groß. Unter den bereits bekannten Tumormarkern des Mammakarzinoms können nur wenige zur Überwachung des Therapieansprechens sowie der Beurteilung der Rezidivwahrscheinlichkeit genutzt werden. [14] In dieser Arbeit könnte der progrediente Anstieg der Hsp70-Konzentration als Hinweis für ein fehlendes Therapieansprechen und eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit angesehen werden. Dieser Anstieg fand bereits vor der Detektion des Rezidivs durch bildgebende Verfahren statt. Nachteile der radiologischen Bildgebung sind unter anderem höhere finanzielle Kosten sowie auch eine Strahlenbelastung für die Patientinnen. Die Bestimmung von Hsp70 bietet hingegen

einige Vorteile. Die Gewinnung mittels Blutentnahme stellt einen minimalinvasiven Eingriff dar und kann jederzeit wiederholt werden. Damit einhergehen könnte eine genauere Patientinnenstratifizierung sowie die Anwendung von besser abgestimmten Therapieschemata. [10] Das Mammakarzinom stellt zunächst eine lokale Erkrankung dar, kann aber in Lymphknoten und andere Organe metastasieren. Die aktuell bestehenden Prognoseparameter können das Metastasierungsrisiko für die einzelnen Patientinnen jedoch nur schlecht vorhersagen, was in weiterer Folge auch dazu führen kann, dass Patientinnen eine nicht notwendige zytotoxische Chemotherapie erhalten. [13] Die Bestimmung von exosomalem Hsp70 im Therapieverlauf könnte daher als früher Biomarker zur Beurteilung des Therapieansprechens sowie der Rezidivwahrscheinlichkeit dienen. Weitere größer angelegte Studien zur Überprüfung der Eignung von exosomalem Hsp70 als Biomarker für das Mammakarzinom sowie die Ermittlung von Cut-off-Werten scheinen daher von großer Bedeutung zu sein. [10]

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Eine Korrelation zwischen hohen Hsp70-Werten und klinischen Parametern wie der Diagnose [297], dem Therapieansprechen [14] [298] sowie der Prognose [299] [300] konnten bereits für eine Vielzahl von Krebserkrankungen gezeigt werden [58]. Hitzeschockproteine werden dabei mit Krebsmerkmalen wie etwa Zellproliferation, Invasion und Metastasierung in Verbindung gebracht [301]. Der neu entwickelte compHsp70 ELISA basiert auf zwei monoklonalen Antikörpern, welche in unbegrenzter Menge produziert werden können und eine hohe Spezifität sowie Sensitivität aufweisen. Beide Antikörper cmHsp70.1 und cmHsp70.2 können sowohl freies als auch exosomales Hsp70 nachweisen und kreuzreagieren nicht mit anderen Hitzeschockproteinen wie Hsp27, Hsp60 oder Hsc70 (HSPA8). [9] Während freies Hsp70 vorwiegend von sterbenden Tumorzellen stammt, wird exosomales Hsp70 von lebenden Tumorzellen mit Hsp70-positivem Phänotyp freigesetzt [8]. Durch die Fähigkeit des compHsp70 ELISAs auch das exosomale Hsp70 zu detektieren, könnte es durch eine Blutentnahme möglich sein auf die lebende Tumormasse zu schließen [9]. Im Vergleich zwischen den Gesunder*innen und den Mammakarzinompatientinnen postoperativ zeigt sich ein signifikanter Unterschied der gemessenen Hsp70-Konzentration. Auch konnten mit dem compHsp70 ELISA deutlich höhere Hsp70-Konzentrationen detektiert werden als mit dem herkömmlichen R&D ELISA. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hsp70-Konzentration und den untersuchten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms (Alter, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Alkohol- und Nikotinabusus) konnte nicht gezeigt werden. Der Zusammenhang zwischen den tumorspezifischen Parametern (TNM-Stadium und Grading) sowie der gemessenen Hsp70-Konzentration postoperativ war ebenfalls nicht signifikant. Interessante Ergebnisse zeigten sich bei der Analyse von exosomalem Hsp70 als Biomarker zur Beurteilung von Therapieansprechen und Rezidivwahrscheinlichkeit der Patientinnen. Obwohl kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientinnen mit und ohne Erhalt einer Therapie (Strahlentherapie, Chemotherapie, Antihormontherapie) nachgewiesen werden konnte, wiesen die rezidivfreien Patientinnen mit der jeweiligen Therapie stets niedrigere Hsp70-Werte auf als die Patientinnen ohne Therapie. Die Patientin, welche im Verlauf ein kontralaterales Mammakarzinom entwickelte, zeigte bereits während der Radiochemotherapie einen progredienten Anstieg der Hsp70-Konzentration. Am Ende der Radiochemotherapie sowie im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen 6 Wochen und 6 Monate danach lag der Wert bereits außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der rezidivfreien Vergleichsgruppe. Der Hsp70-Verlauf dieser Patientin könnte als Warnhinweis für ein fehlendes Therapieansprechen sowie eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit angesehen werden. Weitere Studien mit einer größeren Probandinnenanzahl sind nötig, um die Sensibilität und Sensitivität von exosomalem Hsp70 als Biomarker für das Therapieansprechen sowie die Prognose des Mammakarzinoms zu evaluieren und einen genauen Cut-off-Wert festlegen zu können. [10]

Quellen

- [1] E. T. SCHMID und G. MULTHOFF: *Radiation-induced stress proteins - the role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses*. *Current medicinal chemistry*, 19(12):1765–1770, 2012. DOI: 10.2174/092986712800099767.
- [2] F. U. HARTL und M. HAYER-HARTL: *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. *Science*, 295(5561):1852–1858, 2002. DOI: 10.1126/science.1068408.
- [3] E. SCHMITT, M. GEHRMANN, M. BRUNET, G. MULTHOFF und C. GARRIDO: *Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy*. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1):15–27, 2007. DOI: 10.1189/jlb.0306167.
- [4] G. MULTHOFF, C. BOTZLER, L. JENNEN, J. SCHMIDT, J. ELLWART und R. ISSELS: *Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells*. *Journal of Immunology*, 158(9):4341–4350, 1997. DOI: 10.4049/jimmunol.158.9.4341.
- [5] V. L. VEGA, M. RODRÍGUEZ-SILVA, T. FREY, M. GEHRMANN, J. C. DIAZ, C. STEINEM, G. MULTHOFF, N. ARISPE und A. DE MAIO: *Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages*. *The Journal of Immunology*, 180(6):4299–4307, 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4299.
- [6] A. DE MAIO: *Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams*. *Shock (Augusta, Ga.)*, 11(1):1–12, 1999. DOI: 10.1097/00024382-199901000-00001.
- [7] M. GEHRMANN, M. CERVELLO, G. MONTALTO, F. CAPPELLO, A. GULINO, C. KNAPE, H. M. SPECHT und G. MULTHOFF: *Heat shock protein 70 serum levels differ significantly in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma*. *Frontiers in Immunology*, 5:307, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00307.
- [8] R. GASTPAR, M. GEHRMANN, M. A. BAUSERO, A. ASEA, C. GROSS, J. A. SCHROEDER und G. MULTHOFF: *Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells*. *Cancer Research*, 65(12):5238–5247, 2005. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3804.
- [9] C. WERNER, S. STANGL, L. SALVERMOSER, M. SCHWAB, M. SHEVTSOV, A. XANTHOPOULOS, F. WANG, A. B. DEZFOULI, D. THÖLKE, D. MEDENWALD, C. OSTHEIMER, M. WINDBERG, M. BACHE, M. SCHLAPSCHY, A. SKERRA

- und G. MULTHOFF: *Hsp70 in Liquid Biopsies—A Tumor-Specific Biomarker for Detection and Response Monitoring in Cancer*. *Cancers*, 13(15):3706, 2021. DOI: 10.3390/cancers13153706.
- [10] A. XANTHOPOULOS, A.-K. SAMT, C. GUDER, N. TAYLOR, E. ROBERTS, H. HERF, V. MESSNER, A. TRILL, K. L. K. HOLZMANN, M. KIECHLE, V. SEIFERT-KLAUS, S. ZSCHAECK, I. SCHATKA, R. TAUBER, R. SCHMIDT, K. ENSTE, A. G. POCKLEY, D. LOBINGER und G. MULTHOFF: *Hsp70—A Universal Biomarker for Predicting Therapeutic Failure in Human Female Cancers and a Target for CTC Isolation in Advanced Cancers*. *Biomedicines*, 11(8):2276, 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11082276.
- [11] H. SUNG, J. FERLAY, R. L. SIEGEL, M. LAVERSANNE, I. SOERJOMATARAM, A. JEMAL und F. BRAY: *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3):209–249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [12] BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG: *Krebsforschung*. <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/krebsforschung-8541.php>, (Stand: 31.10.2022).
- [13] B. WEIGELT, J. L. PETERSE und L. J. VAN'T VEER: *Breast cancer metastasis: markers and models*. *Nature Reviews Cancer*, 5(8):591–602, 2005. DOI: 10.1038/nrc1670.
- [14] G. CHANTELOUP, M. CORDONNIER, N. ISAMBERT, A. BERTAUT, A. HERVIEU, A. HENNEQUIN, M. LUU, S. ZANETTA, B. COUDERT, L. BENGRINE, I. DESMOULINS, L. FAVIER, A. LAGRANGE, P.-B. PAGES, I. GUTIERREZ, J. LHERMINIER, L. AVOSCAN, C. JANKOWSKI, C. RÉBÉ, A. CHEVRIAUX, M.-M. PADEANO, C. COUTANT, S. LADOIRE, S. CAUSERET, L. ARNOULD, C. CHARON-BARRA, V. COTTET, J. BLANC, C. BINQUET, M. BARDOU, C. GARRIDO und J. GOBBO: *Monitoring HSP70 exosomes in cancer patients' follow up: a clinical prospective pilot study*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 2020. DOI: 10.1080/20013078.2020.1766192.
- [15] E. A. CRAIG und C. A. GROSS: *Is hsp70 the cellular thermometer?* *Trends in Biochemical Sciences*, 16:135–140, 1991. DOI: 10.1016/0968-0004(91)90055-Z.
- [16] D. S. LATCHMAN: *Stress proteins: An Overview*. *Stress proteins*, Seiten 1–7, 1999. DOI: 10.1007/978-3-642-58259-2_1.
- [17] K. R. DILLER: *Stress protein expression kinetics*. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8:403–424, 2006. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100449.
- [18] K. C. KREGEL: *Invited review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance*. *Journal of Applied Physiology*, 92(5):2177–2186, 2002. DOI: 10.1152/jappphysiol.01267.2001.
- [19] G. MULTHOFF: *Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance*. *Methods*, 43(3):229–237, 2007. DOI: 10.1016/j.jymeth.2007.06.006.

-
- [20] P. SRIVASTAVA: *Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity*. Nature reviews immunology, 2(3):185–194, 2002. DOI: 10.1038/nri749.
- [21] F. RITOSSA: *A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila*. Experientia, 18(12):571–573, 1962. DOI: 10.1007/BF02172188.
- [22] F. RITOSSA: *Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of Drosophila*. Experimental Cell Research, 35(3):601–607, 1964. DOI: 10.1016/0014-4827(64)90147-8.
- [23] S. LINDQUIST und E. A. CRAIG: *The heat-shock proteins*. Annual Review of Genetics, 22(1):631–677, 1988. DOI: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.
- [24] J. G. KIANG AND G. C. TSOKOS: *Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology*. Pharmacology & therapeutics, 80(2):183–201, 1998. DOI: 10.1016/S0163-7258(98)00028-X.
- [25] B. C. FREEMAN, A. MICHELS, J. SONG, H. H. KAMPINGA und R. I. MORIMOTO: *Analysis of Molecular Chaperone Activities Using In Vitro and In Vivo Approaches*. Stress Response, 99:393–419, 2000. DOI: 10.1385/1-59259-054-3:393.
- [26] S.-H. PARK, S.-J. LEE, H.-Y. CHUNG, T.-H. KIM, C.-K. CHO, S. Y. YOO und Y.-S. LEE: *Inducible Heat-Shock Protein 70 Is Involved in the Radioadaptive Response*. Radiation Research, 153(3):318–326, 2000. DOI: 10.1667/0033-7587(2000)153[0318:IHSP]2.0.CO;2.
- [27] A. E. KABAKOV und V. L. GABAI: *Heat Shock Proteins and Cytoprotection: ATP-deprived Mammalian Cells*. Springer, 1997.
- [28] R. I. MORIMOTO, A. TISSIÈRES und C. GEORGOPOULOS: *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1990.
- [29] J. R. OSTBERG, K. C., KAPLAN und E. A. REPASKY: *Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia*. International Journal of Hyperthermia, 18(6):552–562, 2002. DOI: 10.1080/02656730210166168.
- [30] X.-M. YANG, G. F. BAXTER, R. J. HEADS, D. M. YELLON, J. M. DOWNEY und M. V. COHEN: *Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model*. Cardiovascular Research, 31(5):777–783, 1996. DOI: 10.1016/S0008-6363(96)00026-0.
- [31] V. RICHARD, N. KAEFFER und C. THUILLEZ: *Delayed protection of the ischemic heart – from pathophysiology to therapeutic applications*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 10(5):409–415, 1996. DOI: 10.1111/j.1472-8206.1996.tb00595.x.
- [32] R. K. RAVINDRAN, F. TABLIN, J. H. CROWE und A. E. OLIVER: *Resistance to Dehydration Damage in HeLa Cells Correlates with the Presence of Endogenous Heat Shock Proteins*. Cell Preservation Technology, 3(3):155–164, 2005. DOI: 10.1089/cpt.2005.3.155.
- [33] B. PATEL, A. KHALIQ, J. JARVIS-EVANS, M. BOULTON, S. ARROL, M. MACKNESS und

- D. McLEOD: *Hypoxia induces HSP 70 gene expression in human hepatoma (HEP G2) cells*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 36(4):907–912, 1995.
- [34] R. C. KUKREJA, M. C. KONTOS, K. E. LOESSER, S. K. BATRA Y.-Z., QIAN, C. J. GBUR JR, S. A. NASEEM, R. L. JESSE und M. L. HESS: *Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 267(6):H2213–H2219, 1994. DOI: 10.1152/ajpheart.1994.267.6.H2213.
- [35] P. M. NORTON und D. S. LATCHMAN: *Levels of the 90kd heat shock protein and resistance to glucocorticoid - mediated cell killing in a range of human and murine lymphocyte cell lines*. *Journal of steroid biochemistry*, 33(2):149–154, 1989. DOI: 10.1016/0022-4731(89)90288-4.
- [36] J. PLESSET, C. PALM und C. S. McLAUGHLIN: *Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 108(3):1340–1345, 1982. DOI: 10.1016/0006-291X(82)92147-7.
- [37] P. L. COLLINS und L. E. HIGHTOWER: *Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins*. *Journal of Virology*, 44(2):703–707, 1982. DOI: 10.1128/jvi.44.2.703-707.19.
- [38] G. MULTHOFF, A. G. POCKLEY, T. E. SCHMID und D. SCHILLING: *The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation*. *Cancer Letters*, 368(2):179–184, 2015. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.02.013.
- [39] J. RADONS: *The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?* *Cell Stress and Chaperones*, 21(3):379–404, 2016. DOI: 10.1007/s12192-016-0676-6.
- [40] J. MARTIN, A. L. HORWICH und F. U. HARTL: *Prevention of Protein Denaturation Under Heat Stress by the Chaperonin Hsp60*. *Science*, 258(5084):995–998, 1992. DOI: 10.1126/science.1359644.
- [41] H. WIECH, J. BUCHNER, R. ZIMMERMANN und U. JAKOB: *Hsp90 chaperones protein folding in vitro*. *Nature*, 358(6382):169–170, 1992. DOI: 10.1038/358169a0.
- [42] R. J. ELLIS: *Molecular chaperones: Avoiding the crowd*. *Current Biology*, 7(9):R531–R533, 1997. DOI: 10.1016/S0960-9822(06)00273-9.
- [43] K. OHTSUKA und M. HATA: *Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40 - a review*. *International Journal of Hyperthermia*, 16(3):231–245, 2000. DOI: 10.1080/026567300285259.
- [44] S. B. ZIMMERMAN und A. P. MINTON: *Macromolecular Crowding: Biochemical, Biophysical, and Physiological Consequences*. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22(1):27–65, 1993. DOI: 10.1146/annurev.bb.22.060193.000331.
- [45] S. R. LAMANDE und J. F. BATEMAN: *Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones*. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Band 10, Seiten 455–464. Elsevier, 1999. DOI:

- 10.1006/scdb.1999.0317.
- [46] H. SAIBIL: *Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins*. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(2):251–258, 2000. DOI: 10.1016/S0959-440X(00)00074-9.
- [47] M. SCHRÖDER und R. J. KAUFMAN: *The mammalian unfolded protein response*. *Annual Review of Biochemistry*, 74:739–789, 2005. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134.
- [48] I. G. HAAS: *BiP—A heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 167:71–82, 1991. DOI: 10.1007/978-3-642-75875-1_4.
- [49] S. GOTTESMAN: *Proteolysis Bacterial Regulatory Circuits*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19:565–587, 2003. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153228.
- [50] M. DAUGAARD, M. ROHDE und M. JÄÄTTELÄ: *The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions*. *FEBS Letters*, 581(19):3702–3710, 2007. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039.
- [51] J. C. YOUNG, J. M. BARRAL und F. U. HARTL: *More than folding: localized functions of cytosolic chaperones*. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(10):541–547, 2003. DOI: 10.1016/j.tibs.2003.08.009.
- [52] A. BARRETO, J. M. GONZALEZ, E. KABINGU, A. ASEA und S. FIORENTINO: *Stress-induced release of HSC70 from human tumors*. *Cellular Immunology*, 222(2):97–104, 2003. DOI: 10.1016/S0008-8749(03)00115-1.
- [53] M. GEHRMANN, J. MARIENHAGEN, H. EICHHOLTZ-WIRTH, E. FRITZ, J. ELLWART, M. JÄÄTTELÄ, T. ZILCH und G. MULTHOFF: *Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells*. *Cell Death & Differentiation*, 12(1):38–51, 2005. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401510.
- [54] M. HANTSCHHEL, K. PFISTER, A. JORDAN, R. SCHOLZ, R. ANDREESEN, G. SCHMITZ, H. SCHMETZER, W. HIDDEMANN und G. MULTHOFF: *Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients*. *Cell Stress & Chaperones*, 5(5):438–442, 2000. DOI: 10.1379/1466-1268(2000)005<0438:hpmeop>2.0.co;2.
- [55] G. MULTHOFF, C. BOTZLER, M. WIESNET, E. MÜLLER, T. MEIER, W. WILMANN und R. D. ISSELS: *A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells*. *International Journal of Cancer*, 61(2):272–279, 1995. DOI: 10.1002/ijc.2910610222.
- [56] G. MULTHOFF und L. E. HIGHTOWER: *Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response*. *Cell Stress & Chaperones*, 1(3):167–176, 1996. DOI: 10.1379/1466-1268(1996)001<0167:cseohs>2.3.co;2.

- [57] A. G. POCKLEY, B. HENDERSON und G. MULTHOFF: *Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease*. *Biochemical Society Transactions*, 42(6):1744–1751, 2014. DOI: 10.1042/BST20140205.
- [58] M. E. MURPHY: *The HSP70 family and cancer*. *Carcinogenesis*, 34(6):1181–1188, 2013. DOI: 0.1093/carcin/bgt111.
- [59] K. M. FLAHERTY, C. DELUCA-FLAHERTY und D. B. MCKAY: *Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein*. *Nature*, 346(6285):623–628, 1990. DOI: 10.1038/346623a0.
- [60] E. B. BERTELSEN, L. CHANG, J. E. GESTWICKI und E. R. P. ZUIDERWEG: *Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21):8471–8476, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0903503106.
- [61] D. R. CIOCCA, A. P. ARRIGO und S. K. CALDERWOOD: *Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update*. *Archives of Toxicology*, 87(1):19–48, 2013. DOI: 10.1007/s00204-012-0918-z.
- [62] M. A. BAUSERO, R. GASTPAR, G. MULTHOFF und A. ASEA: *Alternative Mechanism by which IFN- γ Enhances Tumor Recognition: Active Release of Heat Shock Protein 72*. *The Journal of Immunology*, 175(5):2900–2912, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.175.5.2900.
- [63] A. H. BROQUET, G. THOMAS, J. MASLIAH, G. TRUGNAN und M. BACHELET: *Expression of the Molecular Chaperone Hsp70 in Detergent-resistant Microdomains Correlates with Its Membrane Delivery and Release*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24):21601–21606, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M302326200.
- [64] S. S. MAMBULA AND S. K. CALDERWOOD: *Heat Shock Protein 70 Is Secreted from Tumor Cells by a Nonclassical Pathway Involving Lysosomal Endosomes*. *The Journal of Immunology*, 177(11):7849–7857, 2006. DOI: 10.4049/jimmunol.177.11.7849.
- [65] A. L. EVDONIN, M. G. MARTYNOVA, O. A. BYSTROVA, I. V. GUZHOVA, B. A. MARGULIS und N. D. MEDVEDEVA: *The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules*. *European Journal of Cell Biology*, 85(6):443–455, 2006. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.02.008.
- [66] K. SAITO, Y. DAI und K. OHTSUKA: *Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells*. *Experimental Cell Research*, 310(1):229–236, 2005. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.07.014.
- [67] G. MULTHOFF, A. G. POCKLEY, C. STREFFER und U. S. GAUPL: *Dual Role of Heat Shock Proteins (HSPs) in Anti-Tumor Immunity*. *Current Molecular Medicine*, 12(9):1174–1182, 2012. DOI: 10.2174/156652412803306666.
- [68] A. ASEA, S.-K. KRAEFT, E. A. KURT-JONES, M. A. STEVENSON, L. B. CHEN, R. W. FINBERG, G. C. KOO und S. K. CALDERWOOD: *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and*

- cytokine*. *Nature Medicine*, 6(4):435–442, 2000. DOI: 10.1038/74697.
- [69] B. HENDERSON und A. G. POCKLEY: *Molecular chaperones and protein-folding catalysts as intercellular signaling regulators in immunity and inflammation*. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(3):445–462, 2010. DOI: 10.1189/jlb.1209779.
- [70] S. K. CALDERWOOD, M. A. KHALEQUE, D. B. SAWYER und D. R. CIOCCA: *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis*. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(3):164–172, 2006. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.01.006.
- [71] D. R. CIOCCA und S. K. CALDERWOOD: *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. *Cell stress & chaperones*, 10(2):86–103, 2005. DOI: 10.1379/CSC-99r.1.
- [72] P. ATHANASSIADOU, E. PETRAKAKOU, V. SAKELARIOU, C. ZERVA, A. LIOSSI, S. MICHALAS und P. ATHANASSIADES: *Expression of p53, bcl-2 and heat shock protein (hsp72) in malignant and benign ovarian tumours*. *European Journal of Cancer Prevention*, 7(3):225–231, 1998.
- [73] M. ABE, J. B. MANOLA, W. K. OH, D. L. PARLOW, D. J. GEORGE, C. L. AUSTIN und P. W. KANTOFF: *Plasma Levels of Heat Shock Protein 70 in Patients with Prostate Cancer: A Potential Biomarker for Prostate Cancer*. *Clinical Prostate Cancer*, 3(1):49–53, 2004. DOI: 10.3816/CGC.2004.n.013.
- [74] D. LANNEAU, A. DE THONEL, S. MAUREL, C. DIDELOT und C. GARRIDO: *Apoptosis Versus Cell Differentiation: Role of Heat Shock Proteins HSP90, HSP70 and HSP27*. *Prion*, 1(1):53–60, 2007. DOI: 10.4161/pri.1.1.4059.
- [75] L. RAVAGNAN, S. GURBUXANI, S. A. SUSIN, C. MAISSE, E. DAUGAS, N. ZAMZAMI, T. MAK, M. JÄÄTTELÄ, J. M. PENNINGER, C. GARRIDO und G. KROEMER: *Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor*. *Nature Cell Biology*, 3(9):839–843, 2001. DOI: 10.1038/ncb0901-839.
- [76] J. F. R. KERR: *A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br. J. Cancer*, 26:239–257, 1972.
- [77] E. H. BAEHRECKE: *How death shapes life during development*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(10):779–787, 2002. DOI: 10.1038/nrm931.
- [78] C. J. HESS, J. BERKHOF, F. DENKERS, G. J. OSSENKOPPELE, J. P. SCHOUTEN, J. J. OUDEJANS, Q. WAISFISZ und G. J. SCHUURHUIS: *Activated Intrinsic Apoptosis Pathway Is a Key Related Prognostic Parameter in Acute Myeloid Leukemia*. *Journal of Clinical Oncology*, 25(10):1209–1215, 2007. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.4061.
- [79] S. KUMAR, J. STOKES III, U. P. SINGH, K. S. GUNN, A. ACHARYA, U. MANNE und M. MISHRA: *Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer*. *Cancer Letters*, 374(1):156–166, 2016. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.056.
- [80] H.-S. PARK, J.-S. LEE, S.-H. HUH, J.-S. SEO und E.-J. CHOI: *Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase*. *The EMBO Journal*, 20(3):446–456, 2001. DOI: 10.1093/emboj/20.3.446.

- [81] V. L. GABAI, J. A. YAGLOM, V. VOLLOCH, A. B. MERIIN, T. FORCE, M. KOUTROUMANIS, B. MASSIE, D. D. MOSSER und M. Y. SHERMAN: *Hsp72-Mediated Suppression of c-Jun N-terminal Kinase Is Implicated in Development of Tolerance to Caspase-Independent Cell Death*. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18):6826–6836, 2000. DOI: 10.1128/MCB.20.18.6826-6836.2000.
- [82] R. WADHWA, T. YAGUCHI, M. K. HASAN, Y. MITSUI, R. R. REDDEL und S. C. KAUL: *Hsp70 Family Member, mot-2/mthsp70/GRP75, Binds to the Cytoplasmic Sequestration Domain of the p53 Protein*. *Experimental Cell Research*, 274(2):246–253, 2002. DOI: 10.1006/excr.2002.5468.
- [83] M. ZYLICZ, F. W. KING und A. WAWRZYNOW: *Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein*. *The EMBO Journal*, 20(17):4634–4638, 2001. DOI: 10.1093/emboj/20.17.4634.
- [84] B. JIANG, P. LIANG, G. DENG, Z. TU, M. LIU und X. XIAO: *Increased stability of Bcl-2 in HSP70-mediated protection against apoptosis induced by oxidative stress*. *Cell Stress and Chaperones*, 16(2):143–152, 2011. DOI: 10.1007/s12192-010-0226-6.
- [85] D. L. CROWE AND U. K. SINHA: *p53 apoptotic response to DNA damage dependent on bcl2 but not bax in head and neck squamous cell carcinoma lines*. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 28(1):15–23, 2006. DOI: 10.1002/hed.20319.
- [86] A. R. STANKIEWICZ, G. LACHAPELLE, C. P. Z. FOO, S. M. RADICIONI und D. D. MOSSER: *Hsp70 Inhibits Heat-induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46):38729–38739, 2005. DOI: 10.1074/jbc.M509497200.
- [87] P. LI, D. NIJHAWAN, I. BUDIARDJO, S. M. SRINIVASULA, M. AHMAD, E. S. ALNEMRI und X. WANG: *Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade*. *Cell*, 91(4):479–489, 1997. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80434-1.
- [88] J.-A. RIBEIL, Y. ZERMATI, J. VANDEKERCKHOVE, S. CATHELIN, J. KERSUAL, M. DUSSIOT, S. COULON, I. CRUZ MOURA, A. ZEUNER, B. VARET T. KIRKEGAARD-SØRENSEN, E. SOLARY, C. GARRIDO und O. HERMINE: *Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1*. *Nature*, 445(7123):102–105, 2007. DOI: 10.1038/nature05378.
- [89] R. STEEL, J. P. DOHERTY, K. BUZZARD, N. CLEMONS, C. J. HAWKINS und R. L. ANDERSON: *Hsp72 Inhibits Apoptosis Upstream of the Mitochondria and Not through Interactions with Apaf-1*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49):51490–51499, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M401314200.
- [90] E. J. DUNCAN, M. E. CHEETHAM, J. P. CHAPPLE und J. VAN DER SPUY: *The Role of HSP70 and Its Co-chaperones in Protein Misfolding, Aggregation and Disease*. *The Networking of Chaperones by Co-chaperones*, 78:243–273, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-11731-7_12.

- [91] H.-S. PARK, S.-G. CHO, C. K. KIM, H. S. HWANG, K. T. NOH, M.-S. KIM, S.-H. HUH, M. J. KIM, K. RYOO, E. K. KIM, W. J. KANG, J.-S. LEE, J.-S. SEO, Y.-G. KO, S. KIM und E.-J. CHOI: *Heat Shock Protein Hsp72 Is a Negative Regulator of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22):7721–7730, 2002. DOI: 10.1128/MCB.22.22.7721-7730.2002.
- [92] Y. GAO, C. HAN, H. HUANG, Y. XIN, Y. XU, L. LUO und Z. YIN: *Heat shock protein 70 together with its co-chaperone CHIP inhibits TNF- α induced apoptosis by promoting proteasomal degradation of apoptosis signal-regulating kinase1*. *Apoptosis*, 15(7):822–833, 2010. DOI: 10.1007/s10495-010-0495-7.
- [93] F. GUO, C. SIGUA, P. BALI, P. GEORGE, W. FISKUS, A. SCUTO, S. ANNAVARAPU, A. MOUTTAKI, G. SONDARVA, S. WEI, J. WU, J. DJEU und K. BHALLA: *Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells*. *Blood*, 105(3):1246–1255, 2005. DOI: 10.1182/blood-2004-05-2041.
- [94] X. LUO, I. BUDIARDJO, H. ZOU, C. SLAUGHTER und X. WANG: *Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors*. *Cell*, 94(4):481–490, 1998. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81589-5.
- [95] N. H. T. PETERSEN, T. KIRKEGAARD, O. D. OLSEN und M. JÄÄTTELÄ: *Connecting Hsp70, sphingolipid metabolism and lysosomal stability*. *Cell Cycle*, 9(12):2305–2309, 2010. DOI: 10.4161/cc.9.12.12052.
- [96] J. NYLANDSTED, M. GYRD-HANSEN, A. DANIELEWICZ, N. FEHRENBACHER, U. LADEMANN, M. HØYER-HANSEN, E. WEBER, G. MULTHOFF, M. ROHDE und M. JÄÄTTELÄ: *Heat Shock Protein 70 Promotes Cell Survival by Inhibiting Lysosomal Membrane Permeabilization*. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(4):425–435, 2004. DOI: 10.1084/jem.20040531.
- [97] S. Y. PROSKURYAKOV, A. G. KONOPLYANNIKOV und V. L. GABAI: *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* *Experimental Cell Research*, 283(1):1–16, 2003. DOI: 10.1016/S0014-4827(02)00027-7.
- [98] D. A. NELSON AND E. WHITE: *Exploiting different ways to die*. *Genes & Development*, 18(11):1223–1226, 2004. DOI: 10.1101/gad.1212404.
- [99] P. VIATOUR, M.-P. MERVILLE, V. BOURS und A. CHARIOT: *Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation*. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(1):43–52, 2005. DOI: 10.1016/j.tibs.2004.11.009.
- [100] R. RAN, A. LU, L. ZHANG, Y. TANG, H. ZHU, H. XU, Y. FENG, C. HAN, G. ZHOU, A. C. RIGBY und F. R. SHARP: *Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK γ and impairing NF- κ B survival signaling*. *Genes & Development*, 18(12):1466–1481, 2004. DOI: 10.1101/gad.1188204.
- [101] H. CHEN, Y. WU, Y. ZHANG, L. JIN, L. LUO, B. XUE, C. LU, X. ZHANG und

- Z. YIN: *Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination*. FEBS Letters, 580(13):3145–3152, 2006. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.066.
- [102] L. NECKERS AND S. P. IVY: *Heat shock protein 90*. Current Opinion in Oncology, 15(6):419–424, 2003.
- [103] M. A. KHALEQUE, A. BHARTI, J. GONG, P. J. GRAY, V. SACHDEV, D. R. CIOCCA, A. STATI, M. FANELLI und S. K. CALDERWOOD: *Heat shock factor 1 represses estrogen-dependent transcription through association with MTA1*. Oncogene, 27(13):1886–1893, 2008. DOI: 10.1038/sj.onc.1210834.
- [104] A. R. GOLOUDINA, O. N. DEMIDOV und C. GARRIDO: *Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy*. Cancer Letters, 325(2):117–124, 2012. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.06.003.
- [105] J. NYLANDSTED, M. ROHDE, K. BRAND, L. BASTHOLM, F. ELLING und M. JÄÄTTELÄ: *Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(14):7871–7876, 2000. DOI: 10.1073/pnas.97.14.7871.
- [106] M. ISHAQ, R. OJHA, K. SHARMA, G. SHARMA, S. K. SINGH und S. MAJUMDAR: *Functional inhibition of Hsp70 by Pifithrin- μ switches Gambogic acid induced caspase dependent cell death to caspase independent cell death in human bladder cancer cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1863(11):2560–2573, 2016. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.07.001.
- [107] M. SHEVTSOV, G. HUILE und G. MULTHOFF: *Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 373(1738), 2018. DOI: 10.1098/rstb.2016.0526.
- [108] N. H. T. PETERSEN, O. D. OLSEN, L. GROTH-PEDERSEN, A.-M. ELLEGAARD, M. BILGIN, S. REDMER, M. S. OSTENFELD, D. ULANET, T. H. DOVMARK, A. LØNBORG, S. D. VINDELØV, D. HANAHAN, C. ARENZ, C. S. EJSING, T. KIRKEGAARD, M. RHODE, J. NYLANDSTED und M. JÄÄTTELÄ: *Transformation-Associated Changes in Sphingolipid Metabolism Sensitize Cells to Lysosomal Cell Death Induced by Inhibitors of Acid Sphingomyelinase*. Cancer Cell, 24(3):379–393, 2013. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.003.
- [109] M. GEHRMANN, J. RADONS, M. MOLLS und G. MULTHOFF: *The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells*. Cell Stress and Chaperones, 13(1):1–10, 2008. DOI: 10.1007/s12192-007-0006-0.
- [110] M. GEHRMANN, H. SCHMETZER, G. EISSNER, T. HAFERLACH, W. HIDDEMANN und G. MULTHOFF: *Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) in acute myeloid leukemia: a tumor specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells*. Haematologica, 88(4):474–476, 2003.

- [111] G. MULTHOFF, L. MIZZEN, C. C. WINCHESTER, C. M. MILNER, S. WENK, G. EISSNER, H. H. KAMPINGA, B. LAUMBACHER und J. JOHNSON: *Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells*. *Experimental Hematology*, 27(11):1627–1636, 1999. DOI: 10.1016/S0301-472X(99)00104-6.
- [112] C. GROSS, W. KOELCH, A. DE MAIO, N. ARISPE und G. MULTHOFF: *Cell Surface-bound Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Mediates Perforin-independent Apoptosis by Specific Binding and Uptake of Granzyme B*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42):41173–41181, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M302644200.
- [113] A. D. H. DOODY, J. T. KOVALCHIN, M. A. MIHALYO, A. T. HAGYMASI, C. G. DRAKE und A. J. ADLER: *Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I-and class II-restricted epitopes for in vivo Presentation, but Selectively Primes CD8+ T Cell Effector Function*. *The Journal of Immunology*, 172(10):6087–6092, 2004. DOI: 10.4049/jimmunol.172.10.6087.
- [114] D. ARNOLD-SCHILD, D. HANAU, D. SPEHNER, C. SCHMID, H.-G. RAMMENSEE, H. DE LA SALLE und H. SCHILD: *Cutting Edge: Receptor-Mediated Endocytosis of Heat Shock Proteins by Professional Antigen-Presenting Cells*. *The Journal of Immunology*, 162(7):3757–3760, 1999. DOI: 10.4049/jimmunol.162.7.3757.
- [115] S. BASU, R. J. BINDER, T. RAMALINGAM und P. K. SRIVASTAVA: *CD91 Is a Common Receptor for Heat Shock Proteins gp96, hsp90, hsp70, and Calreticulin*. *Immunity*, 14(3):303–313, 2001. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00111-X.
- [116] H. SINGH-JASUJA, R. E. M. TOES, P. SPEE, C. MÜNZ, N. HILF, S. P. SCHOENBERGER, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, J. NEEFJES, H.-G. RAMMENSEE, D. ARNOLD-SCHILD und H. SCHILD: *Cross-Presentation of Glycoprotein 96 - Associated Antigens on Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Requires Receptor-Mediated Endocytosis*. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(11):1965–1974, 2000. DOI: 10.1084/jem.191.11.1965.
- [117] J. B. FLECHTNER, K. P. COHANE, S. MEHTA, P. SLUSAREWICZ, A. K. LEONARD, B. H. BARBER, D. L. LEVEY und S. ANDJELIC: *High-Affinity Interactions between Peptides and Heat Shock Protein 70 Augment CD8+ T Lymphocyte Immune Responses*. *The Journal of Immunology*, 177(2):1017–1027, 2006. DOI: 10.4049/jimmunol.177.2.1017.
- [118] R. WANG, J. T. KOVALCHIN, P. MUHLENKAMP und R. Y. CHANDAWARKAR: *Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens*. *Blood*, 107(4):1636–1642, 2006. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2559.
- [119] N. N. PANJWANI, L. POPOVA und P. K. SRIVASTAVA: *Heat Shock Proteins gp96 and hsp70 Activate the Release of Nitric Oxide by APCs*. *The Journal of Immunology*, 168(6):2997–3003, 2002. DOI: 10.4049/jimmunol.168.6.2997.
- [120] S. M. TODRYK, A. A. MELCHER, A. G. DALGLEISH und R. G. VILE: *Heat shock proteins refine the danger theory*. *Immunology*, 99(3):334–337, 2000. DOI:

- 10.1046/j.1365-2567.2000.00002.x.
- [121] N. MURAKAMI, A. KÜHNEL, T. E. SCHMID, K. ILICIC, S. STANGL, I. S. BRAUN, M. GEHRMANN, M. MOLLS, J. ITAMI und G. MULTHOFF: *Role of membrane Hsp70 in radiation sensitivity of tumor cells*. Radiation Oncology, 10(1):1–13, 2015. DOI: 10.1186/s13014-015-0461-1.
- [122] K. PFISTER, J. RADONS, R. BUSCH, J. G. TIDBALL, M. PFEIFER, L. FREITAG, H.-J. FELDMANN, V. MILANI, R. ISSELS und G. MULTHOFF: *Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: Association with different routes of metastasis*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 110(4):926–935, 2007. DOI: 10.1002/cncr.22864.
- [123] V. L. GABAI, K. R. BUDAGOVA und M. Y. SHERMAN: *Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents*. Oncogene, 24(20):3328–3338, 2005. DOI: 10.1038/sj.onc.1208495.
- [124] M. POCALY, V. LAGARDE, G. ETIENNE, J. A. RIBEIL, S. CLAVEROL, M. BONNEU, F. MOREAU-GAUDRY, V. GUYONNET-DUPERAT, O. HERMINE, J. V. MELO, M. DUPOUY, B. TURCQ, F.-X. MAHON und J.-M. PASQUET: *Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia*. Leukemia, 21(1):93–101, 2007. DOI: 10.1038/sj.leu.2404463.
- [125] S. STANGL, M. GEHRMANN, J. RIEGGER, K. KUHS, I. RIEDERER, W. SIEVERT, K. HUBE, R. MOCIKAT, R. DRESSEL, E. KREMMER, A. G. POCKLEY, L. FRIEDRICH, L. VIGH, A. SKERRA und G. MULTHOFF: *Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(2):733–738, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1016065108.
- [126] D. R. CIOCCA, N. CAYADO-GUTIERREZ, M. MACCIONI und F. D. CUELLO-CARRION: *Heat Shock Proteins (HSPs) Based Anti-Cancer Vaccines*. Current Molecular Medicine, 12(9):1183–1197, 2012. DOI: 10.2174/156652412803306684.
- [127] H. M. SPECHT, N. AHRENS, C. BLANKENSTEIN, T. DUELL, R. FIETKAU, U. S. GAUPL, C. GÜNTHER, S. GUNTHER, G. HABL, H. HAUTMANN, R. M. HUBER, M. MOLLS, R. OFFNER, C. RÖDEL, F. RÖDEL, M. SCHÜTZ, S. E. COMBS und G. MULTHOFF: *Heat shock protein 70 (Hsp70) peptide activated natural killer (NK) cells for the treatment of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) after radiochemotherapy (RCTx)–from preclinical studies to a clinical phase II trial*. Frontiers in Immunology, 6:162, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00162.
- [128] R. GASTPAR, C. GROSS, L. ROSSBACHER, J. ELLWART, J. RIEGGER und G. MULTHOFF: *The Cell Surface-Localized Heat Shock Protein 70 Epitope TKD Induces Migration and Cytolytic Activity Selectively in Human NK Cells*. The Journal of Immunology, 172(2):972–980, 2004. DOI: 10.4049/jimmunol.172.2.972.
- [129] A. MURSHID, J. THERIAULT, J. GONG und S. K. CALDERWOOD: *Investigating Receptors for Extracellular Heat Shock Proteins*. Molecular Chaperones, 787:289–302,

2011. DOI: 10.1007/978-1-61779-295-3_22.
- [130] R. J. BINDER, N. E. BLACHERE und P. K. SRIVASTAVA: *Heat Shock Protein-chaperoned Peptides but Not Free Peptides Introduced into the Cytosol Are Presented Efficiently by Major Histocompatibility Complex I Molecules*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20):17163–17171, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M011547200.
- [131] M. KIECHLE: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2. Auflage. Elsevier, Urban und Fischer, 2011.
- [132] ROBERT KOCH INSTITUT, ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN: *Brustkrebs (Mammakarzinom)*. <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs.html>, (Stand: 30.09.2022).
- [133] *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, AWMF Registernummer: 032-045OL*, 2021.
- [134] Y.-S. SUN, Z. ZHAO, Z.-N. YANG, F. XU, H.-J. LU, Z.-Y. ZHU, W. SHI, J. JIANG, P.-P. YAO und H.-P. ZHU: *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11):1387–1397, 2017. DOI: 10.7150/ijbs.21635.
- [135] T. J. KEY, P. K. VERKASALO und E. BANKS: *Epidemiology of breast cancer*. *The Lancet Oncology*, 2(3):133–140, 2001. DOI: 10.1016/S1470-2045(00)00254-0.
- [136] ONKOPEDIA: *Mammakarzinom der Frau*. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.html>, (Stand: 14.05.2023).
- [137] DOCHECK (F. ANTWERPES): *Primärprophylaxe*. <https://flexikon.doccheck.com/de/Primärprophylaxe>, (Stand: 14.05.2023).
- [138] GYNÄKOLOGISCHE ARBEITSGEMEINSCHAFT ONKOLOGIE E.V.: *Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs*. https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2017/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2017.pdf, 2017.
- [139] B. WÖRMANN, S. AEBI, M. BALIC, T. DECKER, T. FEHM, R. GREIL, N. HARBECK, B. KRUG, F. OVERKAMP, O. RICK, F. WENZ und D. LÜFTNER: *Mammakarzinom der Frau*. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.html>, 2018.
- [140] DOCHECK (F. ANTWERPES): *Früherkennung*. <https://flexikon.doccheck.com/de/Früherkennung>, (Stand: 14.05.2023).
- [141] N. HARBECK, F. PENAULT-LLORCA, J. CORTES, M. GNANT, N. HOUSSAMI, P. POORTMANS, K. RUDDY, J. TSANG und F. CARDOSO: *Breast cancer*. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1):66, 2019. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2.
- [142] B. WÖRMANN: *Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014. Evidenz – aktueller Stand – Perspektiven*. <https://www.onkopedia.com/de/wissensdatenbank/wissensdaten->

- bank/melanom/FrherkennungMelanom.pdf, 2014.
- [143] DEUTSCHE KREBSHILFE: *Brustkrebs: Ein Ratgeber für Betroffene, Angehörige und Interessierte: Die blauen Ratgeber*, 2016.
- [144] D. A. BERRY, K. A. CRONIN, S. K. PLEVritis, D. G. FRYBACK, L. CLARKE, M. ZELEN, J. S. MANDELBLATT, A. Y. YAKOVLEV, J. D. F. HABBEMA und E. J. FEUER: *Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 353(17):1784–1792, 2005. DOI: 10.1056/NEJMoa050518.
- [145] A. B. RYERSON, J. MILLER und C. R. EHEMAN: *Reported breast symptoms in the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program*. *Cancer Causes & Control*, 26(5):733–740, 2015. DOI: 10.1007/s10552-015-0544-1.
- [146] M. M. KOO, C. VON WAGNER, G. A. ABEL, S. MCPHAIL, G. P. RUBIN und G. LYRATZOPOULOS: *Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis*. *Cancer Epidemiology*, 48:140–146, 2017. DOI: 10.1016/j.canep.2017.04.010.
- [147] M. B. BARTON, R. HARRIS und S. W. FLETCHER: *Does This Patient Have Breast Cancer?: The Screening Clinical Breast Examination: Should It Be Done? How?* *JAMA*, 282(13):1270–1280, 1999. DOI: 10.1001/jama.282.13.1270.
- [148] J. R. SRIGLEY, T. MCGOWAN, A. MACLEAN, M. RABY, J. ROSS, S. KRAMER und C. SAWKA: *Standardized synoptic cancer pathology reporting: A population-based approach*. *Journal of Surgical Oncology*, 99(8):517–524, 2009. DOI: 10.1002/jso.21282.
- [149] S. A. HODA AND K. R. E. KAPLAN: *World Health Organization (WHO) Classification of Breast Tumours, 4th ed*. *The American Journal of Surgical Pathology*, 37(2):309–310, 2013. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318273b19b.
- [150] H.-P. SINN AND H. KREIPE: *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition*. *Breast Care*, 8(2):149–154, 2013. DOI: 10.1159/000350774.
- [151] C. W. ELSTON AND I. O. ELLIS: *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. *Histopathology*, 19(5):403–410, 1991. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
- [152] L. P. HOWELL, R. GANDOUR-EDWARDS und D. O’SULLIVAN: *Application of the Scarff-Bloom-Richardson Tumor Grading System to Fine-needle Aspirates of the Breast*. *American Journal of Clinical Pathology*, 101(3):262–265, 1994. DOI: 10.1093/ajcp/101.3.262.
- [153] C. M. PEROU, T. SØRLIE, M. B. EISEN, M. VAN DE RIJN, S. S. JEFFREY, C. A. REES, J. R. POLLACK, D. T. ROSS, H. JOHNSEN, L. AKSLEN, Ø. FLUGE, A. PERGAMENSCHIKOV, C. WILLIAMS, S. X. ZHU, P. E. LØNNING, A.-L.

- BØRRESEN-DALE, P. O. BROWN und D. BOTSTEIN: *Molecular Portraits of Human Breast Tumours*. *Nature*, 406(6797):747–752, 2000. DOI: 10.1038/35021093.
- [154] A. PRAT, M. C. U. CHEANG, M. MARTIN, J. S. PARKER, E. CARRASCO, R. CABALLERO, S. TYLDESLEY, K. GELMON, P. S. BERNARD, T. O. NIELSEN und C. M. PEROU: *Prognostic Significance of Progesterone Receptor–Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 31(2):203, 2013. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.4134.
- [155] L.-A. HALDOSÉN, C. ZHAO und K. DAHLMAN-WRIGHT: *Estrogen Receptor Beta in Breast Cancer*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1):665–672, 2014. DOI: 10.1016/j.mce.2013.08.005.
- [156] K. E. HUBER, L. A. CAREY und D. E. WAZER: *Breast Cancer Molecular Subtypes in Patients With Locally Advanced Disease: Impact on Prognosis, Patterns of Recurrence, and Response to Therapy*. *Seminars in Radiation Oncology*, 19(4):204–210, 2009. DOI: 10.1016/j.semradonc.2009.05.004.
- [157] T. SØRLIE, C. M. PEROU, R. TIBSHIRANI, T. AAS, S. GEISLE, H. JOHNSEN, T. HASTIE, M. B. EISEN, M. VAN DE RIJN, S. S. JEFFREY, T. THORSEN, H. QUIST, J. C. MATESE, P. O. BROWN, D. BOTSTEIN, P. E. LØNNING und A.-L. BØRRESEN-DALE: *Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19):10869–10874, 2001. DOI: 10.1073/pnas.191367098.
- [158] E.C. INWALD, M. KLINKHAMMER-SCHALKE, F. HOFSTÄDTER, F. ZEMAN, M. KOLLER, M. GERSTENHAUER und O. ORTMANN: *Ki-67 is a Prognostic Parameter in Breast Cancer Patients: Results of a Large Population-Based Cohort of a Cancer Registry*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(2):539–552, 2013. DOI: 10.1007/s10549-013-2560-8.
- [159] A. URRUTICOECHEA, I. E. SMITH und M. DOWSETT: *Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 23(28):7212–7220, 2005. DOI: 10.1200/JCO.2005.07.501.
- [160] C. DENKERT, J. BUDCZIES, G. VON MINCKWITZ, S. WIENERT, S. LOIBL und F. KLAUSCHEN: *Strategies for Developing Ki67 as a Useful Biomarker in Breast Cancer*. *The Breast*, 24(2):S67–S72, 2015. DOI: 10.1016/j.breast.2015.07.017.
- [161] A. GOLDBIRSCH, W. C. WOOD, A.S. COATES, R. D. GELBER, B. THÜRLIMANN und H.-J. SENN: *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*. *Annals of Oncology*, 22(8):1736–1747, 2011. DOI: 10.1093/annonc/mdr304.
- [162] J. D. BRIERLEY, M. K. GOSPODAROWICZ und C. WITTEKIND: *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons, 2017.
- [163] A. G. WAKS, E. P. WINER: *Breast Cancer Treatment a Review*. *Jama*, 321(3):288–

- 300, 2019. DOI:10.1001/jama.2018.19323.
- [164] S. A. McLAUGHLIN: *Surgical Management of the Breast Conservation Therapy and Mastectomy*. *Surgical Clinics*, 93(2):411–428, 2013. DOI: 10.1016/j.suc.2012.12.006.
- [165] B. FISHER, S. ANDERSON, J. BRYANT, R. G. MARGOLESE, M. DEUTSCH, E. R. FISHER, J.-H. JEONG und N. WOLMARK: *Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer*. *The New England Journal of Medicine*, 347(16):1233–1241, 2002. DOI: 10.1056/nejmoa022152.
- [166] K.-J. WINZER: *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms*. *Chirurg*, 76(8):803–818, 2005. DOI: 10.1007/s00104-005-1056-4.
- [167] NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH: *Treatment of Early Stage Breast Cancer*. In: *NIH Consensus Development Conference*, 1991.
- [168] J. R. BENSON, I. J. JATOI, M. KEISCH, F. J. ESTEVA, A. MAKRIS und V. C. JORDAN: *Early Breast Cancer*. *The Lancet*, 373(9673):1463–1479, 2009. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60316-0.
- [169] TAYLOR, M. E., C. A. PEREZ, K. J. HALVERSON, R. R. KUSKE, G. W. PHILPOTT, D. M. GARCIA, J. E. MORTIMER, R. J. MYERSON, D. RADFORD und C. RUSH: *Factors Influencing Cosmetic Results after Conservation Therapy for Breast Cancer*. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 31(4):753–764, 1995. DOI: 10.1016/0360-3016(94)00480-3.
- [170] G. H. LYMAN, S. TEMIN, S. B. EDGE, L. A. NEWMAN, R. R. TURNER, D. L. WEAVER, A. B. BENSON, L. D. BOSSERMAN, H. J. BURSTEIN, H. CODY, J. HAYMAN, C. L. PERKINS, D. A. PODOLOFF und A. E. GIULIANO: *Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update*. *Journal of Clinical Oncology*, 32(13):1365–1383, 2014. DOI: 10.1200/JCO.2013.54.1177.
- [171] N. MURRAY, M. BRUNT und F. MACBETH: *Advanced Breast Cancer: Diagnosis and Treatment. National Institute for Health and Clinical Excellence Guideline 2009 — a Solid Basis for Good Clinical Practice*. *Clinical Oncology*, 21(5):368–370, 2017. DOI: 10.1016/j.clon.2009.04.002.
- [172] D. N. KRAG, S. J. ANDERSON, T. B. JULIAN, A. M. BROWN, S. P. HARLOW, J. P. COSTANTINO, T. ASHIKAGA, D. L. WEAVER, E. P. MAMOUNAS, L. M. JALOVEC, T. G. FRAZIER, R. D. NOYES, A. ROBIDOUX, H. MC. SCARTH und N. WOLMARK: *Sentinel-Lymph-Node Resection Compared with Conventional Axillary-Lymph-Node Dissection in Clinically Node-Negative Patients with Breast Cancer: Overall Survival Findings from the NSABP B-32 Randomised Phase 3 Trial*. *The Lancet Oncology*, 11(10):927–933, 2010. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70207-2.
- [173] R. BELMONTE, O. GARIN, M. SEGURA, A. PONT, F. ESCALADA und M. FERRER:

- Quality-of-Life Impact of Sentinel Lymph Node Biopsy Versus Axillary Lymph Node Dissection in Breast Cancer Patients.* Value in Health, 15(6):907–915, 2012. DOI: 10.1016/j.jval.2012.06.003.
- [174] J. KOBAYASHI, K. IWABUCHI, K. MIYAGAWA, E. SONODA, K. SUZIKU, M. TAKATA und H. TAUCHI: *Current Topics in DNA Double-Strand Break Repair.* Journal of Radiation Research, 49(2):93–103, 2008. DOI: 0.1269/jrr.07130.
- [175] L. LI, M. STORY und R. J. LEGERSKI: *Cellular Responses to Ionizing Radiation Damage.* International Journal of Radiation Oncology*Biophysics, 49(4):1157–1162, 2001. DOI: 10.1016/S0360-3016(00)01524-8.
- [176] T. HEHR, M. WEINMANN, J. CLASSEN und W. BUDACH: *Strahlentherapie des Mammarkarzinoms.* Der Onkologe, 8(8):853–866, 2002. DOI: 10.1007/s00761-002-0349-1.
- [177] 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.* The Lancet, 366(9503):2087–2106, 2005. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67887-7.
- [178] EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG): *Effect of Radiotherapy After Breast-Conserving Surgery on 10-Year Recurrence and 15-Year Breast Cancer Death: Meta-Analysis of Individual Patient Data for 10801 Women in 17 Randomised Trials.* The Lancet, 378(9804):1707–1716, 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61629-2.
- [179] J. S. HAVILAND, J. R. OWEN, J. A. DEWAR, R. K. AGRAWAL, J. BARRETT, P. J. BARRETT-LEE, H. J. DOBBS, P. HOPWOOD, P. A. KAWTON, B. J. MAGEE, J. MILLS, S. SIMMONS, M. A. SYDENHAM, K. VENABLES und J. M. BLISS: *The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) Trials of Radiotherapy Hypofractionation for Treatment of Early Breast Cancer: 10-Year Follow-up Results of Two Randomised Controlled Trials.* The Lancet Oncology, 14(11):1086–1094, 2013. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70386-3.
- [180] Z. ZHOU, X. MEI, X. CHEN, Z. YANG, J. HOU, L. ZHANG, X. YU und X. GUO: *Systematic Review and Meta-analysis Comparing Hypofractionated with Conventional Fraction Radiotherapy in Treatment of Early Breast Cancer.* Surgical Oncology, 24(3):200–211, 2015. DOI: 10.1016/j.suronc.2015.06.005.
- [181] A. L. BANE, T. J. WHELAN, G. R. POND, S. PARPIA, G. GOHLA, A. W. FYLES, J.-P. PIGNOL, K.I. PRITCHARD, S. CHAMBERS und M. N. LEVINE: *Tumor Factors Predictive of Response to Hypofractionated Radiotherapy in a Randomized Trial Following Breast Conserving Therapy.* Annals of Oncology, 25(5):992–998, 2014. DOI: 10.1093/annonc/mdu090.
- [182] H. BARTELINK, P. MAINGON, P. POORTMANS, C. WELTENS, A. FOURQUET, J. JAGER, D. SCHINAGL, B. OEI, C. RODENHUIS, J.-C. HORIOT, H. STRUIKMANS, E. VAN LIMBERGEN, Y. KIROVA, P. ELKHUIZEN, R. BONGARTZ, R. MIRALBELL, D. MORGAN, J.-B. DUBOIS, V. REMOUCHAMPS, R.-O. MIRIMANOFF, S. COLLETTE

- und L. COLLETTE: *Whole-breast Irradiation with or without a Boost for Patients Treated with Breast-conserving Surgery for Early Breast Cancer: 20-Year Follow-up of a Randomised Phase 3 Trial*. *The Lancet Oncology*, 16(1):47–56, 2015. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)71156-8.
- [183] C. POLGÁR, J. FODOR, T. MAJOR, Z. SULYOK und M. KÁSLER: *Breast-Conserving Therapy with Partial or Whole Breast Irradiation: Ten-Year Results of the Budapest Randomized Trial*. *Radiotherapy and Oncology*, 108(2):197–202, 2013. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.05.008.
- [184] P. MCGALE, C. CORREA, D. CUTTER, F. DUANE, M. EWERTZ, R. GRAY, G. MANNU, R. PETO, T. WHELAN, S. DARBY und EBCTCG (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS’ COLLABORATIVE GROUP): *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*. *The Lancet*, 383(9935):2127–35, 2014. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60488-8.
- [185] W. BUDACH, E. BÖLKE, K. KAMMERS, P. A. GERBER, C. NESTLE-KRÄMLING und C. MATUSCHEK: *Adjuvant Radiation Therapy of Regional Lymph Nodes in Breast Cancer - A Meta-Analysis of Randomized Trials - An Update*. *Radiation Oncology*, 10(258):1–7, 2015. DOI: 10.1186/s13014-015-0568-4.
- [186] F. SCHÜTZ, C. SOHN: *Strahlentherapie*. Erste Hilfe bei Brustkrebs. *WissenKompakt Medizin*, Seiten 75–78, 2018. DOI: 10.1007/978-3-662-55703-7_12.
- [187] 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*. *The Lancet*, 365(9472):1687–1717, 2005. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0.
- [188] M. KAUFMANN, G. N. HORTOBAGYI, A. GOLDBIRSCHE, S. SCHOLL, A. MAKRIS, P. VALAGUSSA-UWE BLOHMER, W. EIERMANN, R. JACKESZ, W. JONAT, A. LEBEAU, S. LOIBL, W. MILLER, S. SEEBER, V. SEMIGLAZOV, R. SMITH, R. SOUCHON, V. STEARNS, M. UNTCH und G. VON MINCKWITZ: *Recommendations From An International Expert Panel on the Use of Neoadjuvant (Primary) Systemic Treatment of Operable Breast Cancer: An Update*. *Journal of Clinical Oncology*, 24(12):1940–1949, 2006. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.6187.
- [189] H. JOSHI, M. F. PRESS: *Molecular Oncology of Breast Cancer*. *The Breast (Fifth Edition)*, 5:282–307, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2.
- [190] P. A. FRANCIS, O. PAGANI, G. F. FLEMING, B. A. WALLEY, M. COLLEONI, I. LÁNG, H. L. GÓMEZ, C. TONDINI, E. CIRUELOS, H. J. BURSTEIN, H. R. BONNEFOI und M. BELLET: *Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 379(2):122–137, 2018. DOI: 10.1056/NEJMoa1803164.
- [191] EARLY BREAST CANCER TRIALISTS’ COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG): *Relevance of Breast Cancer Hormone Receptors and Other Factors to the Efficacy*

- of Adjuvant Tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials* patient-Level Meta-Analysis of Randomised Trials. *The Lancet*, 378(9793):771–784, 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8.
- [192] A. EISEN, G. G. FLETCHER, S. GANDHI, M. MATES, O. C. FREEDMAN, S. F. DENT und M. E. TRUDEAU: *Optimal Systemic Therapy for Early Breast Cancer in Women: A Clinical Practice Guideline*. *Current Oncology*, 22:67–81, 2015. DOI: 10.3747/co.22.2320.
- [193] D. MAURI, N. PAVLIDIS und J. P. A. IOANNIDIS: *Neoadjuvant Versus Adjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer: A Meta-Analysis*. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(3):188–194, 2005. DOI: 10.1093/jnci/dji021.
- [194] EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG): *Comparisons Between Different Polychemotherapy Regimens for Early Breast Cancer: Meta-Analyses of Long-Term Outcome Among 100.000 Women in 123 Randomised Trials*. *The Lancet*, 379(9814):432–444, 2012. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61625-5.
- [195] P. CORTAZAR, L. ZHANG, M. UNTCH, K. MEHTA, J. P. COSTANTINO, NORMAN WOLMARK, H. BONNEFOI, D. CAMERON, L. GIANNI, P. VALAGUSSA, S. M. SWAIN, M. T. PROWELL, S. LOIBL, D. L. WICKERHAM, J. BOGAERTS, J. BASELGA, C. PEROU, G. BLUMENTHAL, J. BLOHMER, E. P. MAMOUNAS, J. BERGH, V. SEMIGLAZOV, R. JUSTICE, H. EIDTMANN, S. PAIK, M. PICCART, R. SRIDHARA, P. A. FASCHING, L. SLAETS, S. TANG B. GERBER, C. E. GEYER JR, R. PAZDUR, N. DITSCH, P. RASTOGI, W. EIERMANN und G. VON MINCKWITZ: *Pathological Complete Response and Long-Term Clinical Benefit in Breast Cancer: The CTNeoBC Pooled Analysis*. *The Lancet*, 384(9938):164–172, 2014. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62422-8.
- [196] G. MINCKWITZ, M. UNTCH, E. NÜESCH, S. LOIBL, M. KAUFMANN, S. KÜMMEL, P. A. FASCHING, W. EIERMANN, J.-U. BLOHMER, S. DAN COSTA, K. MEHTA, J. HILFRICH, C. JACKISCH, B. GERBER, A. DU BOIS, J. HUOBER ANS C. HANUSCH, G. KONECNY, W. FETT, E. STICKELER, N. HARBECK, V. MÜLLER und PETER JÜNI: *Impact of Treatment Characteristics on Response of Different Breast Cancer Phenotypes: Pooled Analysis of the German Neo-Adjuvant Chemotherapy Trials*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 125:145–156, 2011. DOI: 10.1007/s10549-010-1228-x.
- [197] W. SCHEUER, T. FRIESS, H. BURTSCHER, B. BOSSENMAIER, J. ENDL und M. HASMANN: *Strongly Enhanced Antitumor Activity of Trastuzumab and Pertuzumab Combination Treatment on HER2-Positive Human Xenograft Tumor Models*. *Cancer research*, 69(24):9330–9336, 2009. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4597.
- [198] Y. YARDEN, M. X. SLIWKOWSKI: *Untangling the ErbB Signalling Network*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Volume, 2(2):127–137, 2001. DOI: 10.1038/35052073.
- [199] Y. YARDEN: *The EGFR Family and its Ligands in Human Cancer: Signalling Mechanisms and Therapeutic Opportunities*. *European Journal of Cancer*, 37(4):3–8, 2001. DOI: 10.1016/S0959-8049(01)00230-1.

- [200] D. J. SLAMON, W. GODOLPHIN, L. A. JONES, J. A. HOLT, S. G. WONG, D. E. KEITH, W. J. LEVIN, S. G. STUART, J. UDOVE, A. ULLRICH und M. F. PRESS: *Studies of the HER-2/neu Proto-Oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer*. *Science*, 244(4905):707–712, 1989. DOI: 10.1126/science.2470152.
- [201] D. J. SLAMON, G. M. CLARK, S. G. WONG, W. J. LEVIN, A. ULLRICH und W. L. MCGUIRE: *Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene*. *Science*, 235(4785):177–182, 1987. DOI: 10.1126/science.3798106.
- [202] L. MOJA, L. TAGLIABUE, S. BALDUZZI, E. PARMELLI, V. PISTOTTI, V. GUARNERI und R. D’AMICO: *Trastuzumab Containing Regimens for Early Breast Cancer*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), 2012. DOI: 10.1002/14651858.CD006243.pub2.
- [203] X. PIVOT, G. ROMIEU, M. DEBLED, J.-Y. PIERGA, P. KERBRAT, T. BACHELOT, A. LORTHOLARY, M. ESPIÉ, P. FUMOLEAU, D. SERIN, J.-P. JACQUIN, C. JOUANNAUD, M. RIOS, S. ABADIE-LACOURTOISIE, N. TUBIANA-MATHIEU, L. CANY, S. CATALA, D. KHAYAT, I. PAUपोर्टÉ und A. KRAMAR: *6 Months Versus 12 Months of Adjuvant Trastuzumab for Patients with HER2-Positive Early Breast Cancer (PHARE): A Randomised Phase 3 Trial*. *The Lancet Oncology*, 14(8):741–748, 2013. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70225-0.
- [204] M. J. PICCART-GEHBART, M. PROCTER, B. LEYLAND-JONES, A. GOLDBIRSCHE, M. UNTCH, I. SMITH, L. GIANNI, JOSE BASELGA, R. BELL, C. JACKISCH, D. CAMERON und M. DOWSETT: *Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 353(16):1659–1672, 2005. DOI: 10.1056/NEJMoa052306.
- [205] H. M. EARL, L. HILLER, A.-L. VALLIER, S. LOI, D. HOWE, H. B. HIGGINS, K. MCADAM, L. HUGHES-DAVIES, A. N. HARNETT, M.-L. AH-SEE, R. SIMCOCK, D. W. REA, J. MANSI, J. ABRAHAM, C. CALDAS, C. HULME, D. MILES, A. M. WARDLEY, D. A. CAMERON und J. DUNN: *Persephone: 6 Versus 12 Months (m) of Adjuvant Trastuzumab in Patients (pts) with HER2 Positive (+) Early Breast Cancer (EBC): Randomised Phase 3 Non-Inferiority Trial with Definitive 4-Year (yr) Disease-free Survival (DFS) Results*. *Journal of Clinical Oncology*, 36(15), 2018. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.506.
- [206] S. H. GIORDANO, S. TEMIN, J. J. KIRSHNER, S. CHANDARLAPATY, J. R. CREWS, N. E. DAVIDSON, F. J. ESTEVA, A. M. GONZALEZ-ANGULO, I. KROP, J. LEVINSON, N. U. LIN, S. MODI, D. A. PATT, E. A. PEREZ, J. PERLMUTTER, N. RAMAKRISHNA und E. P. WINER: *Systemic Therapy for Patients With Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline*. *Journal of Clinical Oncology*, 32(19):2078, 2014. DOI: 10.1200/JCO.2013.54.0948.
- [207] M. PICCART, M. PROCTER, D. FUMAGALLI, E. DE AZAMBUJA, E. CLARK, M. S. EWER, E. RESTUCCIA, G. JERUSALEM, S. DENT und L. REABY: *Adjuvant Pertuzumab*

- and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer in the APHINITY Trial: 6 Years' Follow-Up.* Journal of Clinical Oncology, 39(13):1448–1457, 2021. DOI: 10.1200/JCO.20.01204.
- [208] L. A. EMENS: *Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes.* Clinical Cancer Research, 24(3):511–520, 2018. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3001.
- [209] S. F. SCHONINGER, S. W. BLAIN: *The Ongoing Search for Biomarkers of CDK4/6 Inhibitor Responsiveness in Breast Cancer.* Molecular Cancer Therapeutics, 19(1):3–12, 2020. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0253.
- [210] W. J. GRADISHAR, B. O. ANDERSON, R. BALASSANIAN, S. L. BLAIR, H. J. BURSTEIN, A. CYR, A. D. ELIAS, W. B. FARRAR, A. FORERO, S. H. GIORDANO, M. P. GOETZ, L. J. GOLDSTEIN, S. J. ISAKOFF, J. LYONS, P. K. MARCOM, I. A. MAYER, B. MCCORMICK, M. S. MORAN, R. M. O'REGAN, S. A. PATEL, L. J. PIERCE, E. C. REED, K. E. SALERNO, L. S. SCHWARTZBERG, A. SITAPATI, K. L. SMITH, M. L. SMITH, H. SOLIMAN, G. SOMLO, M. L. TELLI, J. H. WARD, R. KUMAR und D. A. SHEAD: *Clinical Practice Guidelines in Oncology.* Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 16(3):310–320, 2018. DOI: 10.6004/jnccn.2018.0012.
- [211] S. PERNAS, S. M. TOLANEY, E. P. WINER und S. GOEL: *CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer: Current Practice and Future Directions.* Therapeutic Advances in Medical Oncology, 10, 2018. DOI: 10.1177/1758835918786451.
- [212] R. S. FINN, M. MARTIN, H. S. RUGO, S. JONES, S.-A. IM, K. GELMON, N. HARBECK, O. N. LIPATOV, J. M. WALSH, S. MOULDER, E. GAUTHIER, D. PHARM und D. R. LU: *Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer.* New England Journal of Medicine, 375(20):1925–1936, 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1607303.
- [213] M. CRISTOFANILLI, N. C. TURNER, I. BONDARENKO, S.-A. IM, J. RO, N. MASUDA, M. COLLEONI, A. DEMICHELE, S. LOI, S. VERMA, H. IWATA, N. HARBECK, K. ZHANG, K. P. THEALL, Y. JIANG, C. H. BARTLETT, M. KOEHLER und D. SLAMON: *Fulvestrant Plus Palbociclib Versus Fulvestrant Plus Placebo for Treatment of Hormone-Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer that Progressed on Previous Endocrine Therapy (PALOMA-3): Final Analysis of the Multicentre, Double-Blind, Phase 3 Randomised Controlled Trial.* The Lancet Oncology, 17(4):425–439, 2016. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00613-0.
- [214] S. LOIBL, F. MARMÉ, M. MARTIN, M. UNTCH, H. BONNEFOI, S.-B. KIM, H. BEAR, N. MCCARTHY, M. MELÉ OLIVÉ und K. GELMON: *Palbociclib for Residual High-Risk Invasive HR-Positive and HER2-Negative Early Breast Cancer - The Penelope-B Trial.* Journal of Clinical Oncology, 39(14):1518–1530, 2021. DOI: 10.1200/JCO.20.03639.
- [215] T. E. KEENAN, S. M. TOLANEY: *Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer.* Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 18(4):479–489, 2020. DOI: 10.6004/jnccn.2020.7554.
- [216] A. RIBAS, J. D. WOLCHOK: *Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade.* Science, 359(6382):1350–1355, 2018. DOI: 10.1126/science.aar4060.

- [217] E. B. GARON, N. A. RIZVI, R. HUI, N. LEIGHL, A. S. BALMANOUKIAN, J. P. EDER, A. PATNAIK, C. AGGARWAL, M. GUBENS, L. HORN, E. CARCERENY und M.-J. AHN: *Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 372(21):2018–2028, 2015. DOI: 10.1056/NEJMoa1501824.
- [218] R. J. MOTZER, B. I. RINI, D. F. McDERMOTT, B. G. REDMAN, T. M. KUZEL, M. R. HARRISON, U. N. VAISHAMPAYAN, H. A. DRABKIN, S. GEORGE, T. F. LOGAN, K. A. MARGOLIN, E. R. PLIMACK, A. M. LAMBERT, I. M. WAXMAN und H. J. HAMMERS: *Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial*. *Journal of Clinical Oncology*, 33(13):1430, 2015. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.0703.
- [219] J. E. ROSENBERG, J. HOFFMAN-CENSITS, T. POWLES, M. S. VAN DER HEIJDEN, A. V. BALAR, A. NECCHI, N. DAWSON, P. H. O'DONNELL, A. BALMANOUKIAN, Y. LORIOT, S. SRINIVAS, M. M. RETZ, P. GRIVAS und R. W. JOSEPH: *Atezolizumab in Patients With Locally Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma Who Have Progressed Following Treatment With Platinum-Based Chemotherapy: A Single-Arm, Multicentre, Phase 2 Trial*. *The Lancet*, 387(10031):1909–1920, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4.
- [220] J. D. WOLCHOK, V. CHIARION-SILENI, R. GONZALEZ, P. RUTKOWSKI, J.-J. GROB, C. L. COWEY, C. D. LAO, J. WAGSTAFF, D. SCHADENDORF, P. F. FERRUCCI, M. SMYLIÉ und R. DUMMER: *Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. *New England Journal of Medicine*, 377(14):1345–1356, 2017. DOI: 10.1056/NEJMoa1709684.
- [221] J. CORTÉS, O. LIPATOV, S.-A. IM, A. GONÇALVES, K.S. LEE, P. SCHMID, K. TAMURA, L. TESTA, I. WITZEL, S. OHTANI, S. ZAMBELLI, N. HARBECK, F. ANDRÉ, R. DENT, X. ZHOU, V. KARANTZA, J.A. MEJIA und E.P. WINER: *LBA21 - Keynote -119: Phase III Study of Pembrolizumab (Pembro) Versus Single-Agent Chemotherapy (Chemo) for Metastatic Triple Negative Breast Cancer (mTNBC)*. *Annals of Oncology*, 30(5):v851–v934, 2019. DOI: 10.1093/annonc/mdz394.010.
- [222] L. Y. DIRIX, I. TAKACS, G. JERUSALEM, P. NIKOLINAKOS, H.-T. ARKENAU, A. FORERO-TORRES, R. BOCCIA, M. E. LIPPMAN, R. SOMER, M. SMAKAL, L. A. EMENS, B. HRINCZENKO, W. EDENFIELD, A. VON HEYDEBRECK J. GURTLER, H. J. GROTE, K. CHIN und E. P. HAMILTON: *Avelumab, an Anti-PD-L1 Antibody, in Patients With Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer: A Phase 1b JAVELIN Solid Tumor Study*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 167:671–686, 2018. DOI: 10.1007/s10549-017-4537-5.
- [223] L. A. EMENS, C. CRUZ, J. P. EDER, F. BRAITEH, C. CHUNG, S. M. TOLANEY, I. KUTER, R. NANDA, P. A. CASSIER, J.-P. DELORD, M. S. GORDON, E. ELGABRY, C.-W. CHANG, I. SARKAR, W. GROSSMAN, C. O'HEAR, M. FASSÒ, L. MOLINERO und P. SCHMID: *Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer*. *JAMA Oncology*, 5(1):74–82, 2019. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.4224.

- [224] P. SCHMID, S. ADAMS, H. S. RUGO, A. SCHNEEWEISS, C. H. BARRIOS, H. IWATA, V. DIÉRAS, R. HEGG, S.-A. IM, G. S. WRIGHT, V. HENSCHEL und L. MOLINERO: *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 379(22):2108–2121, 2018. DOI: 10.1056/NEJMoa1809615.
- [225] S. VINAYAK, S. M. TOLANEY, L. SCHWARTZBERG, M. MITA, G. MCCANN, A. R. TAN, A. E. WAHNER-HENDRICKSON, A. FORERO, C. ANDERS, G. M. WULF, P. DILLON, F. LYNCE, C. ZARWAN, J. K. ERBAN, Y. ZHOU, N. BUERSTATTE, J. R. GRAHAM, S. ARORA, B. J. DEZUBE und M. L. TELLI: *Open-label Clinical Trial of Niraparib Combined With Pembrolizumab for Treatment of Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer*. *JAMA Oncology*, 5(8):1132–1140, 2019. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.1029.
- [226] E. SENKUS-KONEFKA, S. DOMCZEK, S. IM, B. XU, A. C. ARMSTRONG, N. MASUDA, S. DELALOGUE, W. LI, N. TUNG, P. CONTE, W. WU, C. GOESSL, S. RUNSWICK und M. ROBSON: *Subgroup Analysis of Olaparib Monotherapy Versus Chemotherapy by Hormone Receptor and BRCA Mutation Status in Patients with HER2-negative Metastatic Breast Cancer and a Germline BRCA mutation: OlympiAD*. *European Journal of Cancer*, 04, 2018. DOI: 10.1016/S0959-8049(18)30285-5.
- [227] M. ROBSON, S.-A. IM, E. SENKUS, B. XU, S. M. DOMCZEK, N. MASUDA, S. DELALOGUE, W. LI, N. TUNG, A. ARMSTRONG, W. WU und C. GOESSL: *Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation*. *New England Journal of Medicine*, 377(6):523–533, 2017. DOI: 10.1056/NEJMoa1706450.
- [228] B. MANNING, A. TOKER: *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. *Cell*, 169(3):381–405, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
- [229] T. W. MILLER, B. N. REXER, J. T. GARRETT und C. L. ARTEAGA: *Mutations in the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway: Role in Tumor Progression and Therapeutic Implications in Breast Cancer*. *Breast Cancer Research*, 13(224):1–12, 2011. DOI: 10.1186/bcr3039.
- [230] S.-B. KIM, R. DENT, M. ESPIÉ S.-A. IM, S. BLAU, A. R. TAN, S. J. ISAKOFF, M. OLIVEIRA, C. SAURA, M. J. WONGCHENKO, A. V. KAPP, W. Y. CHAN, S. M. SINGEL, D. J. MASLYAR, J. BASELGA, S.-B. KIM, K. S. LEE, S.-A. IM, M. ESPIÉ, H.-C. WANG und S. BLAU: *Ipatasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel as First-line Therapy for Metastatic Triple-negative Breast Cancer (LOTUS): A Multicentre, Randomised, Double-blind, Placebo-controlled, Phase 2 Trial*. *The Lancet Oncology*, 18(10):1360–1372, 2017. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30450-3.
- [231] P. SCHMID, J. ABRAHAM, S. CHAN, D. WHEATLEY, A. M. BRUNT, G. NEMSADZE, R. D. BAIRD, Y. H. PARK, P. S. HALL und T. PERREN: *Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial*. *Journal of Clinical Oncology*, 38(5):423–433, 2020. DOI: 10.1200/jco.19.00368.

- [232] P. SCHMID, J. CORTES, M. ROBSON, H. IWATA, R. HEGG, S. VERMA, M. NECHAEVA, B. XU, V. HADDAD, E. RODRIGO IMEDIO, G. SCHIAVON, A. FOXLEY und Y. H. PARK: *Abstract OT2-08-02: Capivasertib and Paclitaxel in First-line Treatment of Patients with Metastatic Triple-negative Breast Cancer: A Phase III Trial (CAPItello-290)*. *Cancer Research*, 80(4), 2020. DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS19-OT2-08-02.
- [233] S. LOI, S. DUSHYANTHEN, P. A. BEAVIS, R. SALGADO, C. DENKERT, P. SAVAS, S. COMBS, D. L. RIMM und J. M. GILTNANE: *RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors*. *Clinical Cancer Research*, 22(6):1499–1509, 2016. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1125.
- [234] P. HERMANEK, U. MANSMANN: *Kriterien der Wertung von Prognosefaktoren*. *Der Chirurg*, 72(5):474–480, 2001. DOI: 10.1007/s001040051335.
- [235] V. MÜLLER und F. JÄNICKE: *Prognostische und prädiktive Faktoren bei Patientinnen mit Mammakarzinom*. Springer, 2006.
- [236] ARBEITSGEMEINSCHAFT GYNÄKOLOGISCHE ONKOLOGIE E.V.: *Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome*. https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2022/Einzeldateien/AGO_2022D_05_Prognostische_und_praediktive_Faktoren.pdf, (Stand: 14.05.2023).
- [237] M. FREUND, D. LÜFTNER und M. WILHELM: *Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014*. <https://www.onkopedia.com/de/wissensdatenbank/wissensdatenbank/kolorektaleskarzinom/FrherkennungKolorektalesKarzinom.pdf>, (Stand 14.05.2023).
- [238] J. L. KHATCHERESSIAN, P. HURLEY, E. BANTUG, J. L. J. ESSERMAN, E. GRUNFELD, F. HALBERG, A. HANTEL, N. L. HENRY, H. B. MUSS, T. J. SMITH, V. G. VOGEL, A. C. WOLFF, M. R. SOMERFIELD und N. E. DAVIDSON: *Breast Cancer Follow-Up and Management After Primary Treatment: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update*. *Journal of Clinical Oncology*, 2012. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.9859.
- [239] J. DONNELLY, P. MACK und L.A. DONALDSON: *Follow-up of Breast Cancer: Time for a New Approach?* *International Journal of Clinical Practice*, 55(7):431–433, 2001. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2001.tb11084.x.
- [240] ROBERT KOCH INSTITUT, ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN: *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_node.html, (Stand: 07.11.2022).
- [241] Z. TAO, A. SHI, C. LU, T. SONG, Z. ZHANG und J. ZHAO: *Breast Cancer: Epidemiology and Etiology*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2):333–338, 2015. DOI: 10.1007/s12013-014-0459-6.
- [242] C. L. SAWYERS: *The Cancer Biomarker Problem*. *Nature*, 452(7187):548–552, 2008.

- [243] M. DAUGAARD, T. KIRKEGAARD-SØRENSEN, M. STAMPE OSTENFELD, M. AABOE, M. HØYER-HANSEN, T. F. ØRNTOFT, M. ROHDE und M. JÄÄTTELÄ: *Lens Epithelium-Derived Growth Factor Is an Hsp70-2 Regulated Guardian of Lysosomal Stability in Human Cancer*. *Cancer Research*, 67(6):2559–2567, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4121.
- [244] M. GUNALDI, C. U. AFSAR, Y. OKUTURLAR, A. GEDIKBASI, H. KOCOGLU, A. KURAL, C. AKARSU, U. GUNDUZ und E. E. TIKEN: *Elevated Serum Levels of Heat Shock Protein 70 are Associated with Breast Cancer*. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 236(2):97–102, 2015. DOI: 10.1620/tjem.236.97.
- [245] M. YANO, Z. NAITO, S. TANAKA und G. ASANO: *Expression and Roles of Heat Shock Proteins in Human Breast Cancer*. *Japanese Journal of Cancer Research*, 87(9):908–915, 1996. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1996.tb02119.x.
- [246] L. M. VARGAS-ROIG, F. E. GAGO, O. TELLO, J. C. AZNAR und D. R. CIOCCA: *Heat Shock Protein Expression and Drug Resistance in Breast Cancer Patients Treated with Induction Chemotherapy*. *International Journal of Cancer*, 79(5):468–475, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19981023)79:5<468::AID-IJC4>3.0.CO;2-Z.
- [247] GESUNDHEIT.GV.AT ÖFFENTLICHES GESUNDHEITSPORTAL ÖSTERREICHS: *Fall-Kontroll-Studie*. <https://www.gesundheit.gv.at/lexikon/F/lexikon-fall-kontroll-studie.html>, (Stand: 14.05.2023).
- [248] R. M. LEQUIN: *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. *Clinical Chemistry*, 51(12):2415–2418, 2005. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051532.
- [249] S. D. GAN, K. R. PATEL: *Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 2013. DOI: 10.1038/jid.2013.287.
- [250] CANDOR - THE ELISA EXPERTS: *ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)*. <https://www.candor-bioscience.de/methoden/elisa/>, (Stand: 03.11.2022).
- [251] S. K. CALDERWOOD, S. S. MAMBULA, P. J. GRAY JR. und J. R. THERIAULT: *Extracellular Heat Shock Proteins in Cell Signaling*. *FEBS Letters*, 581(19):3689–3694, 2007. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.044.
- [252] M. TRIANTAFILOU, K. TRIANTAFILOU: *Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide*. *Biochemical Society Transactions*, 32(4):636–639, 2004. DOI: 10.1042/BST0320636.
- [253] R. FRANK: *The SPOT-synthesis technique: synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications*. *Journal of Immunological Methods*, 267(1):13–26, 2002. DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00137-0.
- [254] H. ZANDER, U. REINEKE, J. SCHNEIDER-MERGENER und A. SKERRA: *Epitope mapping of the neuronal growth inhibitor Nogo -A for the Nogo receptor and the cognate monoclonal antibody IN-1 by means of the SPOT technique*. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 20(3):185–196, 2007. DOI: 10.1002/jmr.823.

- [255] *Auswertung analytischer Daten*. <https://link.springer.com/content/pdf/bbm:978-3-662-07916-4/1.pdf>, (Stand: 05.11.2022).
- [256] A. ROTHAMMER, E. K. SAGE, C. WERNER, S. E. COMBS und G. MULTHOFF: *Increased heat shock protein 70 (Hsp70) serum levels and low NK cell counts after radiotherapy–potential markers for predicting breast cancer recurrence?* *Radiation Oncology*, 14(1):1–9, 2019. DOI: 10.1186/s13014-019-1286-0.
- [257] A. ROTHAMMER: *Analyse des Biomarkers Hsp70 im Serum von Brustkrebspatientinnen im Therapieverlauf*, 2021.
- [258] H. M. FRANKEL, J. C. STAEHELI: *Calculating Body Mass Index*. *Annals of Internal Medicine*, 117(8):698–699, 1992. DOI: 10.7326/0003-4819-117-8-698_2.
- [259] R. AN: *Prevalence and Trends of Adult Obesity in the US, 1999–2012*. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 2014. DOI: 0.1155/2014/185132.
- [260] I. S. FENTIMAN, A. FOURQUET und G. N. HORTOBAGYI: *Male breast cancer*. *The Lancet*, 367(9510):595–604, 2006. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68226-3.
- [261] ROBERT KOCH INSTITUT, ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN: *Krebsarten*. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html, (Stand: 29.11.2021).
- [262] P. SCHILDKOPF, B. FREY O. J., OTT, Y. RUBNER, G. MULTHOFF, R. SAUER, R. FIETKAU und U. S. GAUPL: *Radiation combined with hyperthermia induces HSP70-dependent maturation of dendritic cells and release of pro-inflammatory cytokines by dendritic cells and macrophages*. *Radiotherapy and Oncology*, 101(1):109–115, 2011. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.05.056.
- [263] T. S. HWANG, H. S. HAN, H. K. CHOI, Y. J. LEE, Y.-J. KIM, M.-Y. HAN und Y.-M. PARK: *Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18(6):690–700, 2003. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2003.03011.x.
- [264] M. CHUMA, M. SAKAMOTO, K. YAMAZAKI, T. OHTA, M. OHKI, M. ASAKA und S. HIROHASHI: *Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 37(1):198–207, 2003. DOI: 10.1053/jhep.2003.50022.
- [265] X. THOMAS, L. CAMPOS, C. MOUNIER, J. CORNILLON, P. FLANDRIN, Q.-H. LE, S. PISELLI und D. GUYOTAT: *Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia*. *Leukemia Research*, 29(9):1049–1058, 2005. DOI: 10.1016/j.leukres.2005.02.010.
- [266] F. KIMURA, H. ITOH, S. AMBIRU, H. SHIMIZU, A. TOGAWA, H. YOSHIDOME, M. OHTSUKA, F. SHIMAMURA, A. KATO und M. MIYAZAKI Y. NUKUI: *Circulating heat-shock protein 70 is associated with postoperative infection and organ dysfunction after liver resection*. *The American Journal of Surgery*, 187(6):777–784, 2004. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2003.08.029.

- [267] A. G. POCKLEY, U. DE FAIRE, R. KIESSLING, C. LEMNE, T. THULIN und J. FROSTEGÅRD: *Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension*. *Journal of Hypertension*, 20(9):1815–1820, 2002.
- [268] B. H. WRIGHT, J. M. CORTON, A. M. EL-NAHAS, R. F. M. WOOD und A. G. POCKLEY: *Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease*. *Heart and Vessels*, 15(1):18–22, 2000. DOI: 10.1007/s003800070043.
- [269] P. FINOTTI, A. PAGETTA: *A heat shock protein70 fusion protein with α 1-antitrypsin in plasma of Type 1 diabetic subjects*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(2):297–305, 2004. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.01.058.
- [270] A. POURZAND, M. B. A. FAKHREE, S. HASHEMZADEH, M. HALIMI und A. DARYANI: *Hormone Receptor Status in Breast Cancer and its Relation to Age and Other Prognostic Factors*. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 5:87–92, 2011. DOI: 10.4137/BCBCR.S7199.
- [271] S. BREUNINGER, J. ERL, C. KNAPE, S. GUNTHER, I. REGEL, F. RODEL, U. S. GAIPL, J. THORSTEINSDOTTIR, L. GIANNITRAPANI, A. M. DICKINSON und G. MULTHOFF: *Quantitative Analysis of Liposomal Heat Shock Protein 70 (Hsp70) in the Blood of Tumor Patients Using a Novel LipHsp70 ELISA*. *Clinical & Cellular Immunology*, 5(5), 2014. DOI: 0.4172/2155-9899.1000264.
- [272] M. NAKHJAVANI, A. MORTEZA, L. KHAJEALI, A. ESTEGHAMATI, O. KHALILZADEH, F. ASGARANI und T. F. OUTEIRO: *Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes*. *Cell Stress and Chaperones*, 15(6):959–964, 2010. DOI: 10.1007/s12192-010-0204-z.
- [273] J. RODRIGUES-KRAUSE, M. KRAUSE, C. O’HAGAN, G. DE VITO, C. BOREHAM, C. MURPHY, P. NEWSHOLME und G. COLLERAN: *Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter?* *Cell Stress and Chaperones*, 17(3):293–302, 2012. DOI: 10.1007/s12192-011-0319-x.
- [274] A. OLIVEIRA, V. O. MENDOZA, S. RASTOGI und K. P. NUNES: *New insights into the role and therapeutic potential of HSP70 in diabetes*. *Pharmacological Research*, 178:106173, 2022. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106173.
- [275] M. KRAUSE, T. G. HECK, A. BITTENCOURT, S. P. SCOMAZZON, P. NEWSHOLME, R. CURI und P. I. HOMEM DE BITTENCOURT: *The Chaperone Balance Hypothesis: The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes, the Effect of Exercise, and the Implications for Clinical Management*. *Mediators of Inflammation*, 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/249205.
- [276] T. TUOMI, N. SANTORO, S. CAPRIO, M. CAI, J. WENG und L. GROOP: *The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity*. *The Lancet*, 383(9922):1084–1094, 2014. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62219-9.
- [277] K. ANBARASI, G. KATHIRVEL, G. VANI, G. JAYARAMAN und C. S. S. DEVI:

- Cigarette smoking induces heat shock protein 70 kDa expression and apoptosis in rat brain: Modulation by bacoside A.* Neuroscience, 138(4):1127–1135, 2006. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.11.029.
- [278] C. BAYER, M. E. LIEBHARDT, T. E. SCHMID, M. TRAJKOVIC-ARSIC, K. HUBE, H. M. SPECHT, D. SCHILLING, M. GEHRMANN, S. STANGL, J. T. SIVEKE, J. J. WILKENS und G. MULTHOFF: *Validation of Heat Shock Protein 70 as a Tumor-Specific Biomarker for Monitoring the Outcome of Radiation Therapy in Tumor Mouse Models.* International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 88(3):694–700, 2014. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2013.11.008.
- [279] S. GUNTHER, C. OSTHEIMER, S. STANGL, H. M. SPECHT, P. MOZES, M. JESINGHAUS, D. VORDERMARK, S. E. COMBS, F. PELTZ, M. P. JUNG und G. MULTHOFF: *Correlation of Hsp70 serum levels with gross tumor volume and composition of lymphocyte subpopulations in patients with squamous cell and adeno non-small cell lung cancer.* Frontiers in Immunology, 6, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00556.
- [280] A. C. LAZARIS, E. B. CHATZIGIANNI, D. PANOUSSOPOULOS, G. N. TZIMAS, P. S. DAVARIS und B. C. GOLEMATIS: *Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immuno-localization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified.* Breast Cancer Research and Treatment, 43(1):43–51, 1997. DOI: 10.1023/A:1005706110275.
- [281] T. NOGUCHI, S. TAKENO, T. SHIBATA, Y. UCHIDA, S. YOKOYAMA und W. MÜLLER: *Expression of Heat Shock Protein 70 in Grossly Resected Esophageal Squamous Cell Carcinoma.* The Annals of Thoracic Surgery, 74(1):222–226, 2002. DOI: 10.1016/S0003-4975(02)03641-X.
- [282] K. BAUER, U. NITSCHKE, J. SLOTTA-HUSPENINA, E. DRECOLL, C. H. VON WEYHERN, R. ROSENBERG, H. HÖFLER und R. LANGER: *High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer.* Cellular Oncology, 35:197–205, 2012. DOI: 10.1007/s13402-012-0079-3.
- [283] C. R. HUNT, D. J. DIX, G. G. SHARMA, R. K. PANDITA, A. GUPTA, M. FUNK und T. K. PANDITA: *Genomic Instability and Enhanced Radiosensitivity in Hsp70. 1-and Hsp70. 3-Deficient Mice.* Molecular and Cellular Biology, 24(2):899–911, 2004. DOI: 10.1128/MCB.24.2.899-911.2004.
- [284] S. B. NADIN und D. R. CIOCCA: *Participation of heat shock proteins in DNA repair mechanisms in cancer.* Repositorio Institucional CONICET Digital, 2010.
- [285] M. MOLLS, M. S. ANSCHER, C. NIEDER und P. VAUPEL: *The Impact of Tumor Biology on Cancer Treatment and Multidisciplinary Strategies.* Springer, 2009.
- [286] M. M. GOTTESMAN, T. FOJO und S. E. BATES: *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.* Nature Reviews Cancer, 2(1):48–58, 2002. DOI: doi.org/10.1038/nrc706.
- [287] S. M. SIMON AND M. SCHINDLER: *Cell biological mechanisms of multidrug resistance*

- in tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(9):3497–3504, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.9.3497.
- [288] K. TAKARA, K. YAMAMOTO, M. MATSUBARA, T. MINEGAKI, M. TAKAHASHI, T. YOKOYAMA und K. OKUMURA: *Effects of α -Adrenoceptor Antagonists on ABCG2/BCRP-Mediated Resistance and Transport*. PLOS ONE, 7(2), 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0030697.
- [289] J. I. FLETCHER, M. HABER, M. J. HENDERSON und M D. NORRIS: *ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps*. Nature Reviews Cancer, 10(2):147–156, 2010. DOI: 10.1038/nrc2789.
- [290] J.-S. HAHN, D. W. NEEF und D. J. THIELE: *A stress regulatory network for co-ordinated activation of proteasome expression mediated by yeast heat shock transcription factor*. Molecular Microbiology, 60(1):240–251, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05097.x.
- [291] J. M. OLEFSKY: *Nuclear Receptor Minireview Series*. Journal of Biological Chemistry, 276(40):36863–36864, 2001. DOI: 10.1074/jbc.R100047200.
- [292] A. K. SHIAU, D. BARSTAD, P. M. LORIA, L. CHENG, P. J. KUSHNER, D. A. AGARD und G. L. GREENE: *The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen*. Cell, 95(7):927–937, 1998. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81717-1.
- [293] S. P. WILLIAMS und P. B. SIGLER: *Atomic structure of progesterone complexed with its receptor*. Nature, 393(6683):392–396, 1998. DOI: 10.1038/30775.
- [294] Y. J. TAO und W. ZHENG: *Chaperones and the maturation of steroid hormone receptor complexes*. Oncotarget, 2(3):104, 2011. DOI: 10.18632/oncotarget.238.
- [295] D. R. CIOCCA, M. A. FANELLI, F. D. CUELLO-CARRION und G. N. CASTRO: *Heat shock proteins in prostate cancer: from tumorigenesis to the clinic*. International Journal of Hyperthermia, 26(8):737–747, 2010. DOI: 10.3109/02656731003776968.
- [296] C. BOTZLER, J. SCHMIDT, A. LUZ, L. JENNEN, R. ISSELS und G. MÜLTHOFF: *Differential Hsp70 plasma-membrane expression on primary human tumors and metastases in mice with severe combined immunodeficiency*. International Journal of Cancer, 77(6):942–948, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980911)77:6<942::AID-IJC25>3.0.CO;2-1.
- [297] K. SUZUKI, Y. ITO, K. WAKAI, M. KAWADO, S. HASHIMOTO, N. SEKI, M. ANDO, Y. NISHINO, T. KONDO, Y. WATANABE, K. OZASA, T. INOUE und A. TAMAKOSHI: *Serum Heat Shock Protein 70 Levels and Lung Cancer Risk: A Case-Control Study Nested in a Large Cohort Study*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 15(9):1733–1737, 2006. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0005.
- [298] S. STANGL, N. TONTCHEVA, W. SIEVERT, M. SHEVTSOV, M. NIU, T. E. SCHMID, S. PIGORSCH, S. E. COMBS, B. HALLER, P. BALERMPAS, F. RÖDEL, C. RÖDEL, E. FOKAS, M. KRAUSE, A. LINGE, F. LOHAUS, M. BAUMANN, I. TINGHOFER,

- V. BUDACH, M. STUSCHKE, A.-L. GROSU, A. ABDOLLAHI, J. DEBUS, C. BELKA, C. MAIHÖFER, D. MÖNNICH, D. ZIPS und G. MULTHOFF: *Heat shock protein 70 and tumor-infiltrating NK cells as prognostic indicators for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck after radiochemotherapy: A multicentre retrospective study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG)*. International Journal of Cancer, 142(9):1911–1925, 2018. DOI: 10.1002/ijc.31213.
- [299] J. KOCSIS, B. MADARAS, E. K. TÓTH, G. FÜST und Z. PROHÁSZKA: *Serum level of soluble 70-kD heat shock protein is associated with high mortality in patients with colorectal cancer without distant metastasis*. Cell Stress and Chaperones, 15:143–151, 2010. DOI: 10.1007/s12192-009-0128-7.
- [300] H. W. LEE, E. H. LEE, S.-H. KIM, M. S. ROH, S. B. JUNG und Y. C. CHOI: *Heat shock protein 70 (HSP70) expression is associated with poor prognosis in intestinal type gastric cancer*. Virchows Archiv, 463:489–495, 2013. DOI: 10.1007/s00428-013-1461-x.
- [301] J. SAINI und P. K. SHARMA: *Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer*. Current Drug Targets, 19(13):1478–1490, 2018. DOI: 10.2174/1389450118666170823121248.

A Anhang

Tabelle A.1: Vergleich von Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Hsp70-Konzentrationen rezidivfreier Patientinnen mit und ohne Strahlentherapie

Zeitpunkt	Strahlentherapie (ng/ml)		Keine Strahlentherapie (ng/ml)		p
	Mittelwert	Std.	Mittelwert	Std.	
1	662,7	772,4	1167,0	1649,0	0,910
2	670,0	778,9	930,4	1314,3	0,907
3	660,6	781,9	809,1	1142,9	0,763
4	679,3	765,4	1064,2	1503,6	1,000
5	699,3	781,3	1294,4	1829,2	1,000

Tabelle A.2: Vergleich von Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Hsp70-Konzentrationen rezidivfreier Patientinnen mit und ohne Chemotherapie

Zeitpunkt	Chemotherapie (ng/ml)		Keine Chemotherapie (ng/ml)		p
	Mittelwert	Std.	Mittelwert	Std.	
1	301,4	528,4	798,8	849,8	0,134
2	358,1	607,8	778,2	823,3	0,100
3	303,9	552,6	768,1	816,6	0,123
4	452,8	660,5	764,5	823,9	0,409
5	513,3	628,2	788,0	880,3	0,828

Tabelle A.3: Vergleich von Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test) der Hsp70-Konzentrationen rezidivfreier Patientinnen mit und ohne Antihormontherapie

Zeitpunkt	Antihormon- therapie (ng/ml)		Keine Antihormon- therapie (ng/ml)		p
	Mittelwert	Std.	Mittelwert	Std.	
1	720,1	838,6	677,9	816,8	0,512
2	720,4	838,7	668,5	787,2	0,450
3	692,6	797,6	656,5	796,3	0,488
4	652,6	771,5	736,7	828,1	0,730
5	599,8	644,8	818,6	939,8	0,860

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit begleitet haben.

Großer Dank gebührt zuerst meiner Doktormutter, Prof. Dr. Gabriele Multhoff, die mir auf meinem Weg stets mit Rat und produktiven Gesprächen zur Seite gestanden ist. Danke für die ausgezeichnete fachliche und motivierende Betreuung. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. med. Eva Sage für die Durchführung der Blutabnahmen. Besonders danken möchte ich außerdem Caroline Werner, die mich während der gesamten Versuchsdurchführung mit viel Know-how und Zuspruch unterstützt hat.

Bei dieser Gelegenheit muss ich zudem meinem geliebten Freund Paul, meiner guten Freundin Sophie, meiner Mama sowie meiner restlichen Familie von ganzem Herzen den größten Dank für ihre unermüdliche Geduld und Unterstützung während des gesamten Prozesses aussprechen. Ohne sie wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.