



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Analyse des Biomarkers Hsp70 im Serum von Brustkrebspatientinnen im Therapieverlauf

Anna Rothammer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Gabriele Multhoff
2. Prof. Dr. Lars Maegdefessel

Die Dissertation wurde am 03.03.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.08.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	9
1.1. Brustkrebs.....	9
1.1.1. Bedeutung in der Gesellschaft.....	9
1.1.2. Risikofaktoren	10
1.1.3. Symptome und Diagnostik.....	14
1.1.4. Subtypen.....	17
1.1.5. Therapie.....	20
1.1.5.1. Operative Therapie.....	20
1.1.5.2. Strahlentherapie.....	21
1.1.5.3. Chemotherapie	23
1.1.5.4. Endokrine Therapie	25
1.1.5.5. Antikörpertherapie bei HER-2 ⁺ Mammakarzinomen	26
1.1.5.6. Immuntherapie und zielgerichtete Therapie.....	26
1.1.5.7. Nachsorge	29
1.2. Hitzeschockproteine	30
1.2.1. Hitzeschockprotein 70.....	30
1.2.2. Hsp70 im Zusammenhang mit Krebs.....	32
1.3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	36
2. Material und Methoden	37
2.1. Material	37
2.1.1. Materialien zur Blutentnahme und -verarbeitung.....	37
2.1.2. Reagenzien	37

2.1.3. ELISA-Kit und Kitlösungen	37
2.1.4. Antikörper	38
2.1.5. Technische Geräte	38
2.1.6. Weitere Materialien	39
2.2. Methoden.....	40
2.2.1. Blutentnahme und Verarbeitung der Blutproben	40
2.2.2. Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA.....	40
2.2.3. Ermittlung des Outcomes der Patientinnen	44
2.2.4. Statistische Auswertung.....	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1. Patientenkollektiv	46
3.2. Hsp70 im Therapieverlauf	52
3.3. Assoziationen zwischen Hsp70 und klinikopathologischen Parametern	57
3.3.1. Alter der Patientinnen	57
3.3.2. Charakteristika des Tumors	58
3.3.3. Einfluss der Chemotherapie.....	63
3.3.4. Einfluss der Strahlendosis	65
3.4. Assoziation zwischen Hsp70 und dem klinischen Outcome	67
4. Diskussion.....	70
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis	84
7. Danksagung	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rezeptorexpression der einzelnen Subtypen des Mammakarzinoms	19
Tabelle 2: Übersicht über Zytostatika, die bei Brustkrebs eingesetzt werden.....	24
Tabelle 3: verschiedene Mitglieder der Hsp70-Familie, ihre Lokalisation und Induzierbarkeit durch zellulären Stress, modifiziert nach (Radons 2016).	30
Tabelle 4: Materialien zur Blutentnahme und -verarbeitung.....	37
Tabelle 5: Reagenzien zur Durchführung des ELISAs.	37
Tabelle 6: Zusammensetzung der für den ELISA verwendeten Lösungen.	38
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für den ELISA, deren Ursprung und Verdünnung.....	38
Tabelle 8: Verwendete technische Geräte für die Durchführung des ELISA.	38
Tabelle 9: Weitere verwendete Materialien.....	39
Tabelle 10: Verdünnungsreihe für den Standard.....	42
Tabelle 11: Charakteristika des Tumors bei den einzelnen Studienteilnehmerinnen.	48
Tabelle 12: Altersverteilung, Therapie und Charakteristika des Tumors der 35 in die Auswertung einbezogenen Patientinnen.	50
Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach Altersgruppen.....	57
Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach Tumorgröße, TNM-Staging und Grading.	62
Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach erhaltener Chemotherapie.	64
Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach erhaltener Gesamtdosis und Dosis einer eventuellen Teilbrustbestrahlung in Form eines Boosts.	67
Tabelle 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach dem Outcome der Patientinnen.	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sterbefälle in Deutschland 2016, abhängig von Todesursache und Geschlecht. Eigene Darstellung anhand von Daten des Statistischen Bundesamts (Statistisches Bundesamt 2019b).....	9
Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten für Frauen an Brustkrebs in verschiedenen Stadien inkl. in-situ-Karzinome (Robert Koch-Institut (RKI) 2016).....	10
Abbildung 3: Entstehung von ausdifferenziertem Gewebe aus gewebespezifischen Stammzellen. Die Proliferationsrate ist bei den TACs am höchsten, die Differenzierung nimmt von der Stammzelle zum ausdifferenzierten Gewebe kontinuierlich zu. Durch EGF werden Differenzierung und Apoptose der TACs gehemmt und deren Proliferation gefördert (Schneider und Yarden 2016).....	12
Abbildung 4: Möglichkeiten der Brustkrebsvorsorge und Früherkennung in Deutschland. Eigene Darstellung.....	15
Abbildung 5: Typischer Ablauf von Diagnostik und Therapie nach dem Auftreten von Symptomen oder einer auffälligen Screeninguntersuchung. Eigene Darstellung.....	17
Abbildung 6: Unterschiedlich differenzierte Mammakarzinome, eingeteilt anhand des Nottingham Grading Systems (Rakha et al. 2010).	18
Abbildung 7: Häufigkeit der unterschiedlichen Subtypen des Mammakarzinoms in den USA anhand des Hormonrezeptorstatus. Eigene Darstellung nach Daten von (Howlader et al. 2014).	19
Abbildung 8: Typische Lokalisationen von Hsp70 und entsprechende Funktionen in und um Tumorzellen, modifiziert nach (Shevtsov et al. 2018). Tumorfördernde Funktionen sind rot, tumorhemmende Funktionen grün dargestellt.	32
Abbildung 9: Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte des ELISAs. Eigene Darstellung. ..	44
Abbildung 10: Altersverteilung der Studienteilnehmerinnen. Eigene Darstellung.	46
Abbildung 11: Verteilung der Tumorgröße der Studienteilnehmerinnen. Eigene Darstellung.	47
Abbildung 12: Outcome der Patientinnen: 32 Frauen blieben mindestens drei Jahre tumorfrei, zwei erlitten ein Mammakarzinom der kontralateralen Brust oder Metastasen und eine Patientin entwickelte ein Endometriumkarzinom. Bei fünf Patientinnen ist das Outcome unbekannt. Eigene Darstellung.	50
Abbildung 13: Zeitverlauf von Therapie und Blutentnahmen. Eigene Darstellung.	52
Abbildung 14: Einzelne Hsp70-Verläufe aller Patientinnen mit bekanntem Outcome (n=35). Eigene Darstellung.....	54
Abbildung 15: Verteilung der Hsp70-Serumkonzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Eigene Darstellung.	56

Abbildung 16: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentrationen bei Patientinnen mit präoperativ unterschiedlich großen Tumoren. Eigene Darstellung.....	58
Abbildung 17: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit als T1 und T2 eingestuft Tumoren. Eigene Darstellung.....	60
Abbildung 18: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit (N1) und ohne befallene Lymphknoten (N0). Eigene Darstellung.	61
Abbildung 19: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit Grade 1-3 Tumoren. Eigene Darstellung.....	61
Abbildung 20: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit und ohne Behandlung durch eine Chemotherapie. Eigene Darstellung.....	65
Abbildung 21: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen, die mit unterschiedlichen Strahlendosen bestrahlt wurden. Eigene Darstellung.....	66
Abbildung 22: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit unterschiedlichem Outcome. Eigene Darstellung.	68
Abbildung 23: Grenzkonzentrationen an DAMPs mit protektiver bzw. tumorfördernder Wirkung (Klee et al. 2017).	75

Abkürzungsverzeichnis

APZ:	antigenpräsentierende Zellen
ATP:	Adenosintriphosphat
BET:	Brusterhaltende Therapie
BRCA-1/BRCA-2:	breast cancer associated gene 1/2
BSA:	Bovines Serumalbumin
CDK:	Cyclinabhängige Kinase
CT:	Computertomographie
DAMP:	Damage associated molecular pattern
DCIS:	duktales Carcinoma in situ
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF:	epidermal growth factor
EGFR:	epidermal growth factor receptor
ELISA:	Ezyme-linked immunosorbent assay
ER:	Östrogenrezeptor
exHsp70:	exosomales Hitzeschockprotein 70
GnRH:	Gonadotropin-Releasing-Hormon
Gy:	Gray (Strahlendosis)
HER-2:	human epidermal growth factor
HMGB1:	high mobility group box 1 Protein
HR:	Hormonrezeptor
HSF-1:	Hitzeschockfaktor 1
Hsp:	Hitzeschockprotein
IFN-γ:	Interferon γ
IGF:	insulin-like growth factor
IL:	Interleukin
Ki67:	Proliferationsstatus
LCIS:	lobuläres Carcinoma in situ
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein 1
MHC I/MHC II:	major histocompatibility complex I und II

MIP-1β:	Macrophage inflammatory protein 1 β
MRT:	Magnetresonanztomographie
NFκB:	Nuclear Factor kappa B
NK-Zelle:	Natürliche Killerzelle
NO:	Stickstoffmonoxid
PARP:	Polyadenosindiphosphatribosepolymerase
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PD1:	programmed cell death Protein 1
PDL1:	Ligand für programmed cell death Protein 1
PR:	Progesteronrezeptor
R0:	vollständige Tumorresektion nach histologischer Untersuchung
ROS:	reaktive Sauerstoffspezies
RT:	Strahlentherapie
TAC:	transit amplifying cell
TDL4:	zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4
TGFβ:	transforming growth factor β
TLR:	Toll-like-receptor
TNBC:	triple-negative breast cancer
TNFα:	tumor necrosis factor α
TNM:	Tumor-Node-Metastasis, Tumorklassifikation mittels Ausdehnung des Primärtumors, Lymphknoten- und Fernmetastasen

1. Einleitung

1.1. Brustkrebs

1.1.1. Bedeutung in der Gesellschaft

Krebserkrankungen haben nach wie vor eine große gesellschaftliche Bedeutung. Nach Herz-Kreislauferkrankungen stellen sie mit 26,2 % (2016) die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Abbildung 1).

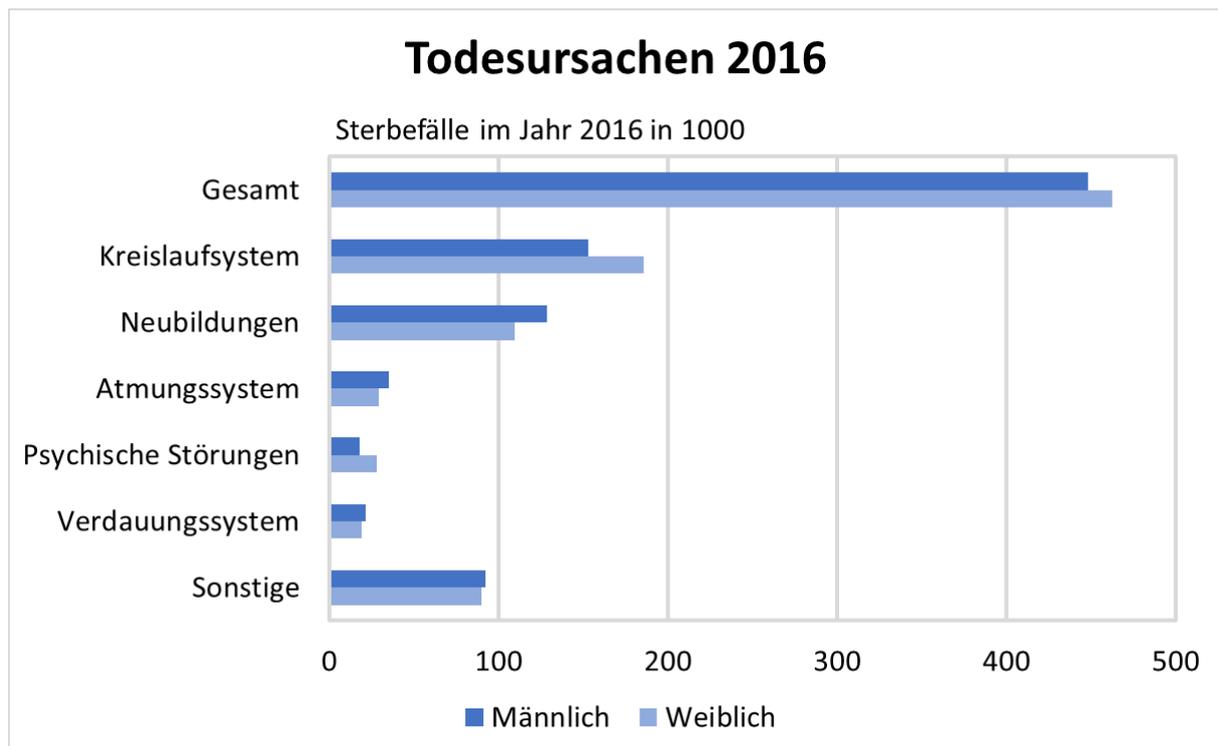


Abbildung 1: Sterbefälle in Deutschland 2016, abhängig von Todesursache und Geschlecht. Eigene Darstellung anhand von Daten des Statistischen Bundesamts (Statistisches Bundesamt 2019b).

Grundsätzlich besteht der Pathomechanismus bei allen malignen Erkrankungen aus einer unkontrollierten Zellproliferation. Durch zunehmende Raumforderung, Invasion und Metastasierung in andere Organe und Gewebe kommt es zur Organdysfunktion und letztendlich zum Tod.

Der Vergleich verschiedener Tumorentitäten hinsichtlich ihrer Mortalität zeigt, dass bei beiden Geschlechtern die meisten Todesfälle infolge von malignen Erkrankungen auf Tumore der Lunge und des Bronchialsystems zurückzuführen sind. Das Mammakarzinom ist die bei Frauen am häufigsten auftretende Tumorentität und findet sich an zweiter Stelle der krebsbedingten Todesursachen (Statistisches Bundesamt 2019a). Die Diskrepanz zwischen

Prävalenz und Mortalität beruht auf der vergleichsweise guten Prognose des Mammakarzinoms: die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 88 %, die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 82 % (Robert Koch-Institut (RKI) 2016).

Dennoch ist Brustkrebs nicht nur für die betroffene Person von großer Bedeutung, sondern spielt auch gesellschaftlich eine große Rolle. Durch Mammakarzinome werden hohe Kosten für das Gesundheitswesen verursacht, häufig ist zudem eine bleibende Erwerbsminderung oder Pflegebedürftigkeit die Folge.

Im Gegensatz zur rückläufigen Mortalität stieg die Inzidenz bis 2002 kontinuierlich an und stagniert seitdem bei ca. 120 Neuerkrankungen jährlich pro 100.000 Einwohner (Abbildung 2). Auffällig ist dabei, dass ab ca. 2007 deutlich mehr Karzinome in früheren Stadien diagnostiziert wurden, was auf die Einführung der gesetzlichen Früherkennung zurückzuführen ist (Robert Koch-Institut (RKI) 2016).

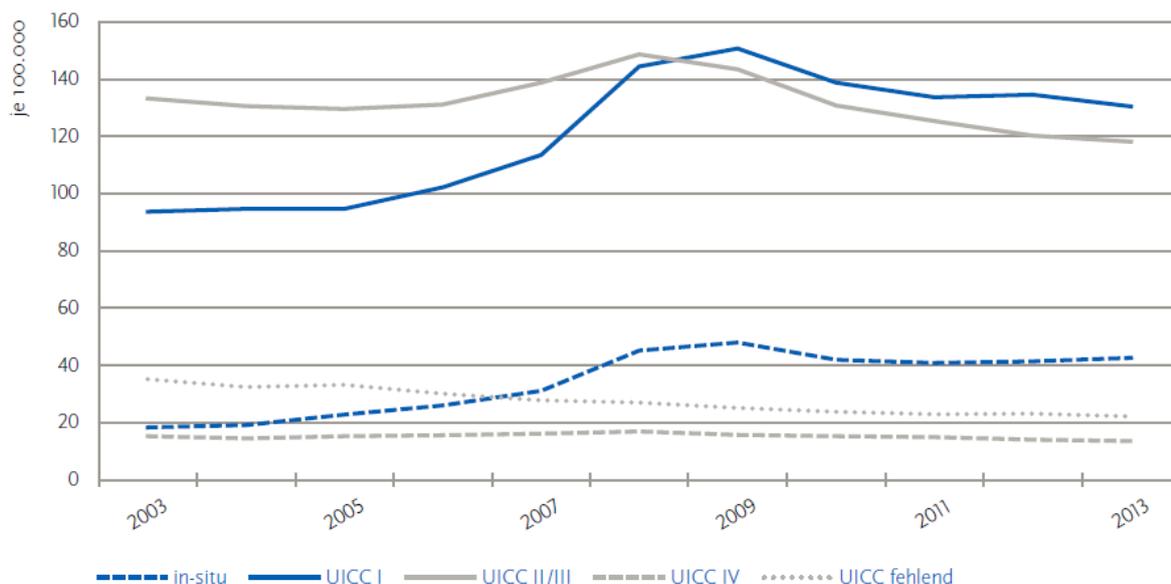


Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten für Frauen an Brustkrebs in verschiedenen Stadien inkl. in-situ-Karzinome (Robert Koch-Institut (RKI) 2016).

1.1.2. Risikofaktoren

Inzwischen sind diverse Faktoren bekannt, die das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, deutlich erhöhen. Besonders wichtig sind dabei genetische Mutationen, die das Auftreten oder den Progress von Brustkrebs begünstigen. Insbesondere die folgenden Gene und Rezeptoren sind in diesem Zusammenhang von Bedeutung: breast cancer associated gene

1 und 2 (BRCA-1 und BRCA-2), Human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und c-myc (Sun et al. 2017).

Bei BRCA-1 und BRCA-2 handelt es sich um Tumorsuppressorgene. Normalerweise reguliert das durch BRCA-1 codierte Protein auf vielfältige Weise den Zellzyklus und verhindert so eine fehlerhafte Zellteilung. Wird dieses Protein aufgrund einer vererbaren BRCA-1-Mutation vermindert oder fehlerhaft exprimiert, ist eine genetische Instabilität die Folge und das Risiko für die Entstehung maligner Erkrankungen, darunter insbesondere Brustkrebs, steigt (Deng 2006). Das Gen BRCA-2 codiert für ein Protein, das an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA beteiligt ist (Sánchez et al. 2017). Auch eine BRCA-2-Mutation führt zu einem erhöhten Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Beide Mutationen werden autosomal dominant vererbt und sind in 5-10 % aller Brustkrebsfälle die zugrunde liegende Ursache (Sun et al. 2017). Bei über 70-jährigen Trägerinnen beträgt das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, 57 % (BRCA-1) bzw. 49 % (BRCA-2), zudem ist auch das Risiko für die Entstehung von Ovarialkarzinomen deutlich erhöht gegenüber dem Bevölkerungsdurchschnitt (Chen und Parmigiani 2007).

Das Protoonkogen HER-2 codiert für eine Rezeptortyrosinkinase. Es wird in 15-20 % aller diagnostizierten Mammakarzinome überexprimiert und ist mit einem verstärkten Auftreten von Metastasen und davon ausgehend einem ungünstigen Outcome vergesellschaftet (Ross et al. 2009). Grundlage hierfür ist eine erhöhte Anzahl an Tumorstammzellen (Elizalde et al. 2016). Normalerweise entstehen durch Proliferation und Differenzierung aus gewebespezifischen Stammzellen über sogenannte transit amplifying cells (TACs) ausdifferenzierte Zellen des jeweiligen Gewebes. Durch ein Gleichgewicht aus Apoptose und Proliferation wird dabei die Homöostase gewahrt (Abbildung 3). Der Epidermal Growth Factor (EGF) aktiviert EGFR und HER-2, die als Heterodimer schließlich die Proliferation der TACs steigern und sowohl Apoptose als auch Differenzierung ihrer Tochterzellen hemmen. Bei einer Überexpression von HER-2 oder EGFR kann dadurch das Gleichgewicht gestört werden und zu einer unkontrollierten Proliferation führen bzw. die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Metastasen erhöhen (Schneider und Yarden 2016).

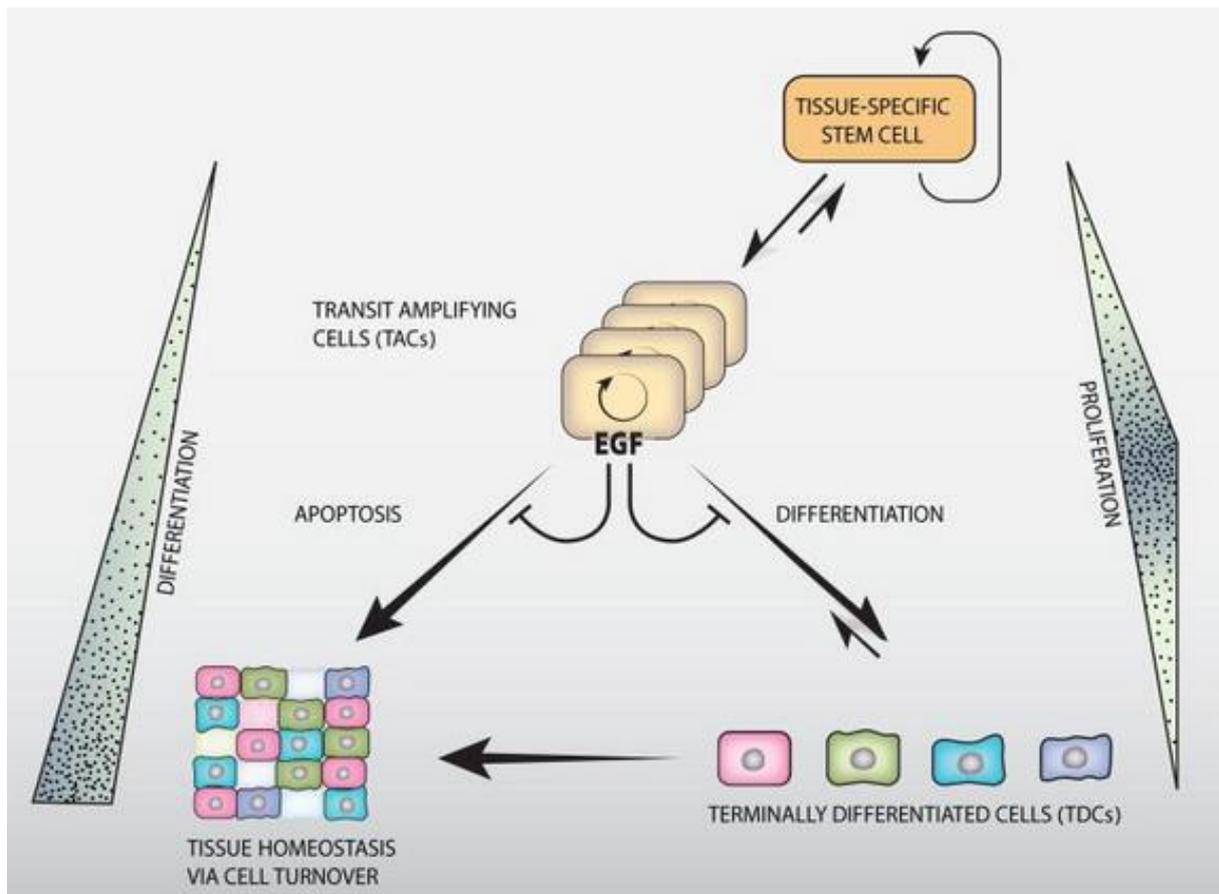


Abbildung 3: Entstehung von ausdifferenziertem Gewebe aus gewebespezifischen Stammzellen. Die Proliferationsrate ist bei den TACs am höchsten, die Differenzierung nimmt von der Stammzelle zum ausdifferenzierten Gewebe kontinuierlich zu. Durch EGF werden Differenzierung und Apoptose der TACs gehemmt und deren Proliferation gefördert (Schneider und Yarden 2016).

Myc ist ein Protein, das als Transkriptionsfaktor fungiert und durch das Gen *c-myc* codiert wird. Die Transkription vieler verschiedener Gene wird über die Bindung von Myc an die entsprechende E-Box reguliert (Sun et al. 2017). Eine Überexpression ist mit ungünstigem Outcome und raschem Tumorprogress assoziiert und findet sich bei Mammakarzinomen insbesondere in höhergradigen Stadien. Verschiedene Signalkaskaden spielen hier eine Rolle, wobei sowohl die initiale Entstehung von Brustkrebs gefördert wird, als auch durch eine gesteigerte Angiogenese die Metastasenbildung (Chen und Olopade 2008).

Neben diesen genetischen Veränderungen gibt es weitere Faktoren, die das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, erhöhen können. Sowohl das normale Brustgewebe, als auch viele Mammakarzinome sind hormonabhängig. Eine hohe endogene oder exogene Östrogenzufuhr erhöht daher das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Endogen bringt beispielsweise eine lange hormonell aktive Phase im Sinne einer frühen Menarche und späten Menopause ein erhöhtes Risiko mit sich. Exogene Östrogene werden dagegen vor allem im Rahmen einer

Hormonersatztherapie bei Wechseljahresbeschwerden zugeführt (Sun et al. 2017; Akram et al. 2017). Dagegen wirken viele Geburten ebenso wie eine frühe erste Geburt protektiv (Akram et al. 2017).

Einer der größten Risikofaktoren ist jedoch das Alter. Während junge Frauen sehr selten an Brustkrebs erkranken, steigt das Risiko mit zunehmendem Alter, wobei das Lebenszeitrisko insgesamt bei ca. 12 % liegt (DeSantis et al. 2017).

Zusätzlich zu den genannten Faktoren beeinflusst auch der Lebensstil die Gefahr, an Krebs im Allgemeinen und auch speziell an Brustkrebs zu erkranken. Eine große Rolle spielt dabei der Alkoholkonsum, insbesondere bei jungen Frauen vor der ersten Schwangerschaft. Durch Alkoholkonsum kommt es zu einer höheren Konzentration an zirkulierendem Östrogen, außerdem wirken einige Abbauprodukte des Alkohols kanzerogen (Liu et al. 2015; Shield et al. 2016).

Auch durch das Rauchen von Zigaretten wird das Risiko, später an Brustkrebs zu erkranken, erhöht. Ähnlich wie im Zusammenhang mit Alkohol ist ein früher Beginn des Rauchens besonders gefährlich. Zudem wurde bei Frauen, die über einen langen Zeitraum Tabak konsumierten oder besonders viele Zigaretten pro Tag rauchten, ein erhöhtes Risiko festgestellt (Catsburg et al. 2015). Nach der Diagnose eines Mammakarzinoms konnte eine erhöhte brustkrebsassoziierte Mortalität bei Raucherinnen gegenüber Frauen, die nie geraucht hatten, gezeigt werden. Auch Frauen, die nach der Diagnose weiterhin rauchten, starben häufiger im Zusammenhang mit Brustkrebs, als diejenigen, die daraufhin das Rauchen einstellten (Passarelli et al. 2016).

Ein weiterer Risikofaktor ist eine fettreiche Ernährung und Übergewicht. Verschiedenste Faktoren beeinflussen dabei die Entstehung und den Progress von Brustkrebs, darunter erhöhte Östrogenspiegel durch die Aromataseaktivität des Fettgewebes, erhöhter oxidativer Stress, Insulinresistenz und erhöhte Aktivität von insulin-like growth factors (IGF) (Engin 2017; Maliniak et al. 2018). Eine Lebensstiländerung im Zusammenhang mit Gewichtsabnahme senkt das Brustkrebsrisiko (Picon-Ruiz et al. 2017). Protektiv wirkt dagegen körperliche Aktivität: Moderater Ausdauersport reduziert die Inzidenz (Chlebowski 2013) und auch nach diagnostiziertem Mammakarzinom wirkt sich Bewegung günstig auf das Überleben und die Rezidivrate aus (Lahart et al. 2015).

1.1.3. Symptome und Diagnostik

Trotz der regelmäßigen gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen, die in Deutschland angeboten und durch die Krankenkassen finanziert werden, stellen viele Brustkrebspatientinnen selbst Veränderungen fest, die letztendlich zur Diagnose eines Mammakarzinoms führen. Das häufigste Symptom, mit dem sich Patientinnen vor einer Brustkrebsdiagnose beim Gynäkologen vorstellen, ist ein tastbarer Knoten in der Brust (Koo et al. 2017; Walker et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko einer Brustkrebsdiagnose siebenfach erhöht war, wenn Frauen bei einer Screening-Mammographie von einem Knoten in der Brust berichteten. In Kombination mit Einziehungen der Haut war das Risiko sogar 23-fach erhöht gegenüber den Frauen, die im Vorfeld keine Symptome bemerkt hatten (Singh et al. 2015). Weitere Veränderungen der Brust, wie beispielsweise Spannungsgefühle, Entzündungen, Einziehungen von Haut oder Brustwarze oder ungewöhnliche Sekretion aus der Mamille können ebenfalls bei Mammakarzinomen auftreten (Koo et al. 2017; Ryerson et al. 2015). Zusammengefasst werden die beschriebenen Veränderungen unter dem Begriff Brustsymptom.

Allerdings findet sich nicht bei allen Frauen ein Brustsymptom, in einigen Fällen werden stattdessen unspezifische Symptome wie Rückenschmerzen, vergrößerte Lymphknoten oder axilläre Schmerzen beschrieben. Zudem können wie bei anderen malignen Erkrankungen Fieber, Nachtschweiß, Müdigkeit oder Gewichtsverlust im Sinne einer B-Symptomatik auftreten (Koo et al. 2017). Problematisch ist, dass viele Frauen diese Symptome nicht mit Brustkrebs in Verbindung bringen und daher erst spät einen Arzt aufsuchen. Dadurch vergeht häufig viel Zeit zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnose bzw. dem Beginn einer Therapie, wodurch sich die Prognose verschlechtert (Webber et al. 2017). Durch gezielte Aufklärung kann diese Verzögerung reduziert und dadurch das Outcome der betroffenen Patientinnen verbessert werden (Dodd et al. 2017).

Die Therapiemöglichkeiten und die Prognose von nahezu allen malignen Erkrankungen sind stark abhängig von dem Stadium, in dem die Erkrankung diagnostiziert wird. Für eine verbesserte Früherkennung von Brustkrebs werden in Deutschland alle Frauen im Alter von 50-69 Jahren schriftlich zu einer durch die gesetzlichen Krankenkassen finanzierten Screening-Untersuchung in Form einer Mammographie eingeladen. Dabei handelt es sich um eine Röntgenuntersuchung der Brust, durch die Verkalkungen und Verdichtungen erkannt werden

können, die häufig bei Mammakarzinomen auftreten. Durch diese Untersuchung konnte bei den teilnehmenden Frauen eine Reduktion der Mortalität infolge von Brustkrebs um 40 % erreicht werden (Sardanelli et al. 2017). Zu bedenken ist allerdings, dass die Sensitivität bei Frauen mit dichterem Brustgewebe, das tumorverdächtige Stellen möglicherweise verdecken kann, deutlich reduziert ist (Mandelson et al. 2000). Bei den betroffenen Patientinnen wird ein Mammakarzinom dann wesentlich häufiger im Intervall als im Rahmen einer Screeninguntersuchung festgestellt und befindet sich oft bereits in einem fortgeschritteneren Stadium (Strand et al. 2019). Zusätzlich zur Mammographie können sich Frauen ab 30 Jahren jährlich in einer gynäkologischen Praxis vorstellen und ihre Brüste inspizieren und abtasten lassen. Einen Überblick über die Vorsorgeuntersuchungen bietet die Abbildung 4.



Abbildung 4: Möglichkeiten der Brustkrebsvorsorge und Früherkennung in Deutschland. Eigene Darstellung.

Zusätzlich zu den beschriebenen Vorsorgeuntersuchungen stehen Frauen mit erhöhtem Brustkrebsrisiko weitere Untersuchungen zur Früherkennung zur Verfügung. Betroffen sind dabei Frauen, auf deren Familie zumindest einer der folgenden Punkte zutrifft (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020):

- mindestens drei Frauen an Brustkrebs erkrankt
- mindestens zwei Frauen an Brustkrebs erkrankt, davon eine vor dem 51. Lebensjahr
- mindestens eine Frau an Brustkrebs und eine Frau an Eierstockkrebs erkrankt
- mindestens zwei Frauen an Eierstockkrebs erkrankt
- mindestens eine Frau an Brust- und Eierstockkrebs erkrankt
- mindestens eine Frau mit 35 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt
- mindestens eine Frau mit 50 Jahren oder jünger an bilateralem Brustkrebs erkrankt
- mindestens ein Mann an Brustkrebs und eine Frau an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt

In diesen Fällen wird eine Mammographie bereits ab dem 40. Lebensjahr angeboten. Zusätzlich sind MRT-Untersuchungen bei Vorliegen einer BRCA-1 oder BRCA-2 Mutation sowie

bei einem Lebenszeitrisko über 30 %, an einem Mammakarzinom zu erkranken, möglich. Bei gesunden Trägerinnen einer BRCA-1 oder BRCA-2 Mutation kann außerdem eine prophylaktische Mastektomie zur Risikoreduktion erwogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Bei Verdacht auf ein Mammakarzinom besteht die Basisuntersuchung neben der Anamnese aus einer klinischen Untersuchung der Brust und ihrer Lymphabflussgebiete. Zusätzlich wird eine Bildgebung mittels Mammographie, Sonographie und bei Bedarf auch Kontrastmittel-MRT durchgeführt (McDonald et al. 2016). Zeigt sich hierbei ein verdächtiger Befund, so wird durch eine Stanz-, Vakuum-, oder in Ausnahmefällen offene Exzisionsbiopsie die Diagnose überprüft und gesichert. Um Fernmetastasen zu detektieren, können verschiedene bildgebende Untersuchungen wie CT, MRT oder Sonographie eingesetzt und kombiniert werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Bei Vorliegen einer malignen Veränderung, wird diese im Allgemeinen reseziert. Die genauen Möglichkeiten sind in Kapitel 1.1.5. dargestellt. Die Zusammenschau aus Bildgebung und pathologischem Befund des Resektats erlaubt eine Einordnung des Mammakarzinoms nach der TNM-Klassifikation. Anhand dieser lässt sich die Ausbreitung eines Tumors quantifizieren, wobei sowohl der Primärtumor als auch mögliche Lymphknoten- und Fernmetastasen einbezogen werden. Die Ausdehnung des Primärtumors und dessen Invasion in angrenzende Organe wird dabei mit T1-T4 angegeben. Das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen wird als N0-N3 codiert und das Vorhandensein von Fernmetastasen mit M1. Fehlende Fernmetastasen werden mit M0 angegeben (Brierley et al. 2017; Webber et al. 2014).

Neben der Ausbreitung des Tumors beeinflusst auch der Grad an Differenzierung die Therapie und Prognose (Elston und Ellis 1991). Deshalb werden invasive Mammakarzinome histologisch in Grade 1-3 eingeteilt, wobei die Differenzierung der Zellen mit steigendem Grad abnimmt (Lakhani et al. 2012).

Um die Diagnostik abzuschließen, wird der Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptorstatus (PR), der HER-2-Status und der Ki67-Proliferationsindex bestimmt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020). Das übliche Vorgehen wird in Abbildung 5 vereinfacht dargestellt.

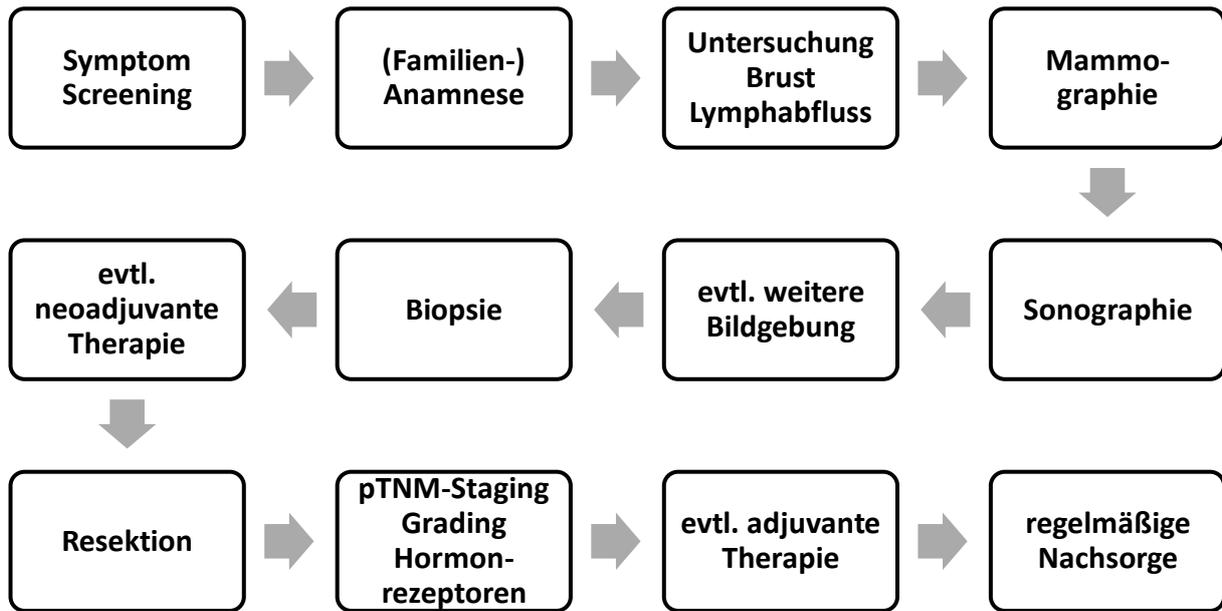


Abbildung 5: Typischer Ablauf von Diagnostik und Therapie nach dem Auftreten von Symptomen oder einer auffälligen Screeninguntersuchung. Eigene Darstellung.

1.1.4. Subtypen

Mammakarzinome können histologisch anhand ihres Ursprungsgewebes unterschieden werden, wobei mit 70-80 % am häufigsten duktales und mit ca. 10 % am zweithäufigsten lobuläre Karzinome sowie Mischformen vorkommen (Dieci et al. 2014; Li et al. 2005). Grundsätzlich muss bei der histologischen Klassifikation immer zwischen invasiven Karzinomen und deren Vorstufen, Carcinomata in situ unterschieden werden. Die Carcinomata in situ werden in duktales (DCIS) und lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) unterteilt, wobei unter dem Überbegriff DCIS mehrere histologische Subtypen zusammengefasst werden.

Duktales Karzinome und DCIS entstammen dem Gewebe der Milchgänge, wohingegen das lobuläre Karzinom und LCIS ihren Ursprung in den Milchdrüsen haben. Karzinome, die verschiedenen Ursprungsgeweben entstammen, bringen eine unterschiedliche Prognose mit sich (Northridge et al. 1997). Der Vergleich von duktales und lobuläres Karzinomen zeigt beispielsweise eine deutlich höhere Mortalität des duktales Mammakarzinoms (Li et al. 2003). Lobuläre Karzinome sind häufiger Hormonrezeptor-positiv (HR⁺), sodass die bessere Prognose möglicherweise dadurch bedingt ist (Li et al. 2005). Weitere, seltene Subtypen sind

beispielsweise muzinöse, tubuläre, neuroendokrine, mikropapilläre, pleomorph-lobuläre, medulläre, inflammatorische, apokrine, adenoidzystische, metaplastische und sekretorische Karzinome, deren Prognose sehr unterschiedlich ist (Dieci et al. 2014; Malhotra et al. 2010).

Allerdings kann nicht nur der histologische Subtyp bestimmt werden, sondern auch der Grad der Differenzierung. Anhand verschiedener morphologischer Charakteristika wird dabei untersucht, wie ähnlich das Tumorgewebe in seiner Differenzierung gegenüber dem ursprünglichen Brustgewebe ist und das Karzinom in Grade 1-3 eingeteilt. Evaluiert werden dabei die Drüsen- bzw. Tubulusformation, die Kernmorphologie und die Mitoserate (Abbildung 6).

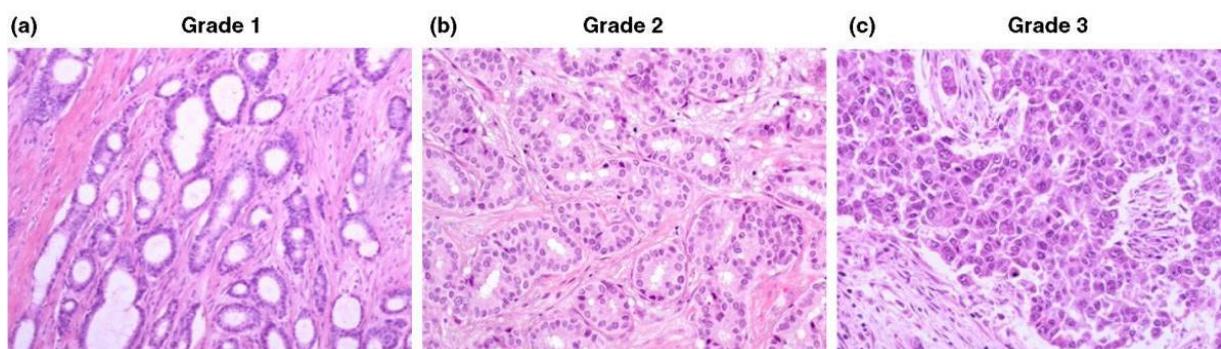


Abbildung 6: Unterschiedlich differenzierte Mammakarzinome, eingeteilt anhand des Nottingham Grading Systems (Rakha et al. 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass die prognostische Relevanz des Gradings der des Lymphknotenstatus entspricht und insbesondere die Kombination aus beidem prädiktiv für das klinische Outcome ist (Rakha et al. 2010). Auch für die Klassifikation des DCIS kann das histologische Grading genutzt werden (Allred 2010).

Unterschieden wird außerdem zwischen verschiedenen Kombinationen der exprimierten Rezeptoren und dem Ki67-Proliferationsstatus. Der Subtyp Luminal A ist dabei ER α ⁺, PR⁺ und HER-2⁻, Luminal B ER α ⁺, PR⁺ und HER-2^{+/-}. Von einer HER-2 Überexpression spricht man bei ER α ⁻, PR⁻ und HER-2⁺ Tumoren und die mit einer ungünstigen Prognose einhergehenden triple-negative breast cancers (TNBC) sind ER α ⁻, PR⁻ und HER-2⁻ (Haldosén et al. 2014). Ungünstig ist auch ein hoher Ki67-Proliferationsindex, der für ein schnelles Tumorstadium spricht.

Tabelle 1: Rezeptorexpression der einzelnen Subtypen des Mammakarzinoms

	ER α	PR	HER-2	Ki67
Luminal A	+	+	-	Niedrig
Luminal B	+	+	+/-	Hoch
HER-2 Überexpression	-	-	+	-
TNBC	-	-	-	-

Die meisten Mammakarzinome exprimieren Hormonrezeptoren, sind aber HER-2⁻. Am zweithäufigsten treten TNBC auf, anschließend folgen HR⁺ und HER-2⁺ und am seltensten ist ein Tumor HR⁻ und HER-2⁺ (Howlader et al. 2014), dargestellt in Abbildung 7.

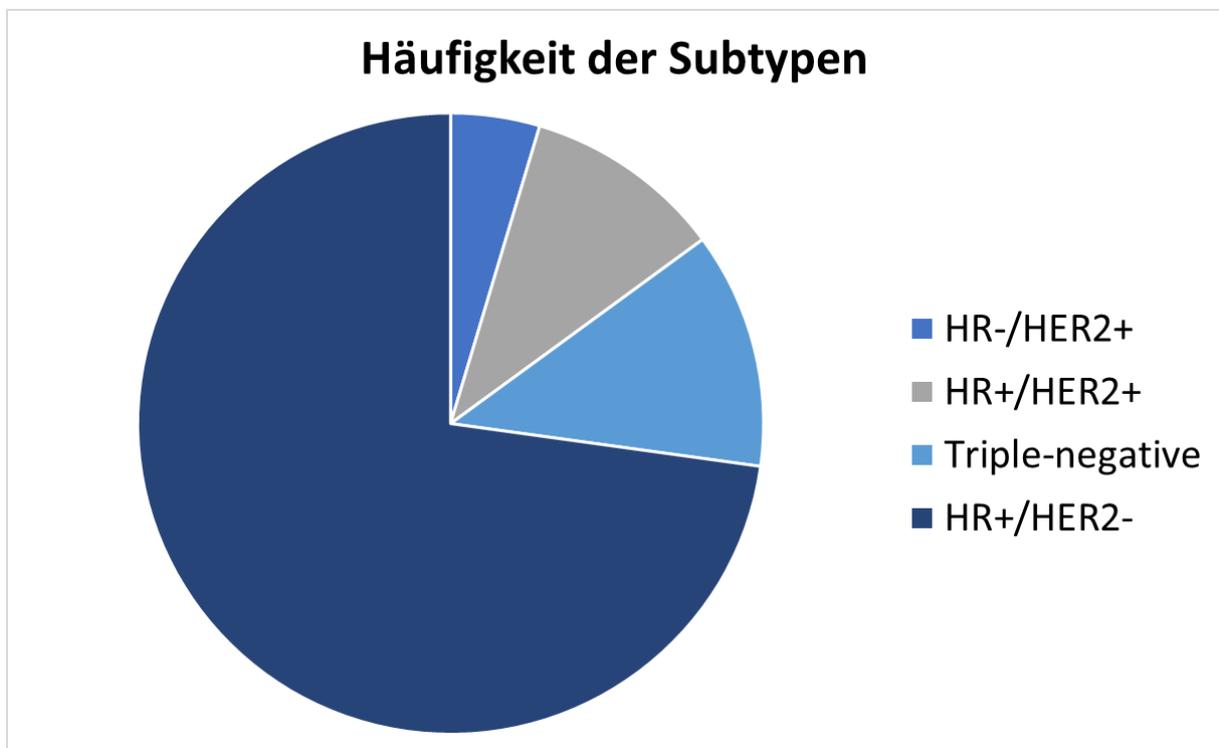


Abbildung 7: Häufigkeit der unterschiedlichen Subtypen des Mammakarzinoms in den USA anhand des Hormonrezeptorstatus. Eigene Darstellung nach Daten von (Howlader et al. 2014).

Interessant ist dabei vor allem die Verteilung der verschiedenen Subtypen: Beispielsweise sind Mammakarzinome, die bei jüngeren Patientinnen in einem Alter um 50 Jahre auftreten, häufiger ER α ⁻ und PR⁻, wohingegen die bei älteren Frauen mit ca. 70 Jahren auftretenden Karzinome eher eine Hormonabhängigkeit aufweisen (Anderson et al. 2014). Weiterhin konnte eine Abhängigkeit der Subtypen vom Körpergewicht gezeigt werden, wobei übergewichtige Frauen eher unter TNBC und normalgewichtige Patientinnen häufiger unter HER-2⁺ Karzinomen litten (Gershuni et al. 2017).

Der jeweilige Subtyp eines Mammakarzinoms beeinflusst auch die Diagnostik. Es konnte gezeigt werden, dass schnell proliferierende, höhergradige und hormonrezeptorneegative Karzinome weniger gut durch das Mammographie-Screening erfasst werden (Porter et al. 1999). Zudem spielt die Klassifikation eines Mammakarzinoms auch für die Entscheidung bezüglich des therapeutischen Vorgehens eine entscheidende Rolle. Je nachdem, ob und welche Rezeptoren exprimiert werden, kann beispielsweise eine antihormonelle Therapie oder eine Behandlung mit Antikörpern gegen HER-2 erfolgen, wodurch die Prognose stark beeinflusst wird (Prat et al. 2015).

1.1.5. Therapie

Das therapeutische Vorgehen hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der TNM-Klassifikation, dem Grading, dem Rezeptorstatus, der Genetik sowie Alter und Therapiewunsch der Patientin.

Die verschiedenen Therapieoptionen setzen sich zusammen aus Operation, Strahlentherapie und systemischen Therapieverfahren, worunter vor allem endokrine Therapie, neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie und Antikörpertherapie zusammengefasst sind. Beim rezidivierten oder metastasierten Mammakarzinom wird abhängig von Prognose und Wunsch der Patientin eine individuelle Therapie mit kurativem oder palliativem Ziel eingesetzt.

1.1.5.1. Operative Therapie

Die operative Therapie des invasiven Mammakarzinoms sowie von Risikoläsionen wie beispielsweise eines DCIS hat die R0-Resektion der Läsion zum Ziel. Dabei ist eine Brusterhaltende Operation (BET) oder eine Mastektomie möglich. Insbesondere in frühen Stadien des invasiven Karzinoms und bei kleinen Tumoren ist die BET mit anschließender Strahlentherapie der Mastektomie überlegen, da das Überleben und die Lokalrezidivrate vergleichbar sind und die BET mit wesentlich geringeren Nebenwirkungen vergesellschaftet ist (Boniface et al. 2018; van Maaren et al. 2016; Lagendijk et al. 2018). Auch für Tumore > 5 cm konnte gezeigt werden, dass die BET mit anschließender Strahlentherapie der Mastektomie bezüglich des Outcomes nicht unterlegen ist (Bleicher et al. 2016). Bei jungen

Patientinnen, deren Risiko für Lokalrezidive größer ist, war die BET mit Bestrahlung ebenfalls gleichwertig gegenüber der Mastektomie (Vila et al. 2015).

Eine Mastektomie ist dagegen dann sinnvoll, wenn keine R0-Resektion erfolgt ist, beim inflammatorischen Mammakarzinom, bei Kontraindikationen gegen die Strahlentherapie nach BET und wenn die Patientin eine Mastektomie bevorzugt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Bei der Therapie des DCIS ist die chirurgische Therapie der konservativen Behandlung ohne Operation überlegen (Sagara et al. 2015). Abhängig vom Alter der Patientin, Ausdehnung der Läsion und histologischem Grading ist auch eine adjuvante Strahlentherapie sinnvoll (Sagara et al. 2016). Chirurgisch wird ein DCIS in den meisten Fällen brusterhaltend versorgt.

Neben der Resektion des eigentlichen Tumors ist häufig auch die Entfernung von befallenen Lymphknoten der Axilla erforderlich. Meist wird dazu der Sentinel-Lymphknoten ermittelt und entfernt, dieser ist der erste Lymphknoten im Lymphabflussgebiet des Tumors. Die ersten Mikrometastasen bilden sich normalerweise im Sentinel-Lymphknoten, sodass von einer N0-Situation ausgegangen werden kann, wenn dieser nicht von Tumorzellen befallen ist. Sofern möglich, wird bei negativem Sentinel-Lymphknoten oder wenn nur Mikrometastasen vorliegen, auf eine Axilladisektion verzichtet, wodurch die Überlebenschancen nicht verschlechtert, aber Nebenwirkungen reduziert werden (Galimberti et al. 2013). Wenn allerdings eine Mastektomie erfolgt oder die axillären Lymphknoten klinisch auffällig bzw. mit Tumorzellen befallen sind, ist eine Axilladisektion oder Strahlentherapie der Axilla erforderlich (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020). Diese geht jedoch häufig mit langfristigen Nebenwirkungen und einer Einschränkung der Lebensqualität einher, insbesondere durch Störungen des Lymphabflusses und das resultierende Lymphödem sowie eine eingeschränkte Funktion der Schulter (Belmonte et al. 2012).

1.1.5.2. Strahlentherapie

Im Rahmen einer Strahlentherapie wird die Brust mit γ -Strahlung bestrahlt, wodurch Strangbrüche in der DNA der bestrahlten Zellen verursacht werden und vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die wiederum weitere Schäden auslösen. Letztendlich soll

dadurch ein Rückgang des Tumors erzielt werden, bzw. in der adjuvanten Situation verbleibende Tumorzellen abgetötet werden, die nicht durch die Operation entfernt worden sind.

Diese Art der Therapie wird bei Mammakarzinomen in den unterschiedlichsten Stadien eingesetzt: in der adjuvanten Situation findet standardmäßig eine Bestrahlung des verbleibenden Gewebes nach einer BET statt und bei Lymphknotenmetastasen können die Lymphabflusswege anstelle einer operativen Axilladisektion bestrahlt werden. Sogar in der palliativen Situation findet die Strahlentherapie ihre Anwendung, beispielsweise in der Schmerzreduktion bei Knochenmetastasen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Die adjuvante Bestrahlung der Brust findet insbesondere nach BET statt, wobei die Therapie entweder hypofraktioniert (Gesamtdosis 40 Gy, 15-16 Fraktionen in 3-5 Wochen) oder konventionell fraktioniert (Gesamtdosis 50 Gy, 25-28 Fraktionen in 5-6 Wochen) werden kann. Zusätzlich ist eine lokale Dosisaufsättigung in Form einer Boostbestrahlung des Tumorbettes möglich. Diese wirkt sich auf die Rezidivrate positiv aus, nicht aber auf das Überleben, und wird daher bei jüngeren Patientinnen und Frauen mit einem erhöhten Rezidivrisiko bevorzugt eingesetzt. Nach Mastektomie bei lokal fortgeschrittenen Mammakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen wird die Brustwand bestrahlt, um das Rezidivrisiko zu reduzieren. (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020). Die Boostbestrahlung ebenso wie eine mögliche alleinige Teilbrustbestrahlung wird häufig mittels Multikatheter-Brachytherapie durchgeführt. Hierbei wird die Strahlungsquelle mithilfe eines Afterloading-Geräts über mehrere im Vorfeld operativ eingebrachte Katheter eingeführt und dort platziert, wo die Strahlung appliziert werden soll (Polgár et al. 2013). Dadurch wird die Dosis sehr genau verabreicht und umliegende Gewebe und die Haut geschont.

Bei ausgewählten Patientinnen mit geringem Rezidivrisiko kann eine alleinige Teilbrustbestrahlung sinnvoll sein, die der konventionellen Ganzbrustbestrahlung in frühen Stadien nicht unterlegen ist (Polgár et al. 2013; Strnad et al. 2016). Die konventionelle externe Bestrahlung der Brust birgt aufgrund der nicht vollständig vermeidbaren Mitbestrahlung von Herz und Lunge ein erhöhtes Risiko für die spätere Entwicklung von Lungenkrebs oder kardialen Erkrankungen (Taylor et al. 2017). Weitere typische Nebenwirkungen sind die

Entwicklung eines Fatigue-Syndroms, Entzündungen der Haut und Schmerzen in der Brust sowie eine langfristige Fibrosierung. Bezüglich des Fatigue-Syndroms zeigte sich eine Teilbrustbestrahlung überlegen gegenüber der konventionellen und hypofraktionierten Ganzbrustbestrahlung (Taunk et al. 2011), zudem war die Teilbrustbestrahlung bei gleichbleibender Rezidivrate mit geringerer Hauttoxizität vergesellschaftet (Meattini et al. 2015). Auch eine einmalige, intraoperative Teilbrustbestrahlung zeigte sich bei risikoadaptierter Auswahl der in Frage kommenden Patientinnen als ebenbürtig im Vergleich mit der konventionellen externen Bestrahlung der ganzen Brust (Vaidya et al. 2014; Coles et al. 2017) bzw. nicht unterlegen bezüglich des Überlebens, allerdings mit einer etwas höheren Lokalrezidivrate (Veronesi et al. 2013). Zusätzlich traten bei intraoperativer Teilbrustbestrahlung geringere Nebenwirkungen auf (Coles et al. 2017).

Neben der adjuvanten Radiotherapie kann eine Bestrahlung auch bei Auftreten von nicht operablen Rezidiven oder bei Rezidiven ohne vorherige Bestrahlung sinnvoll sein. Zudem eignet sich die Strahlentherapie gut zur Behandlung von Skelettmetastasen, die Schmerzen, Bewegungs- und Stabilitätseinschränkungen und im Fall von Wirbelsäulenmetastasen eine neurologische Symptomatik hervorrufen können (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

1.1.5.3. Chemotherapie

Bei einer Chemotherapie werden verschiedene Zytostatika, häufig in Kombination, systemisch verabreicht, um primäre Mammakarzinome, Rezidive und Metastasen kurativ oder palliativ zu behandeln. Die Therapie kann dabei abhängig von der individuellen Situation neoadjuvant, adjuvant oder auch ohne Kombination mit einer Operation durchgeführt werden.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Substanzen, die leitliniengemäß als Monotherapie oder untereinander kombiniert bei Brustkrebs eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Tabelle 2: Übersicht über Zytostatika, die bei Brustkrebs eingesetzt werden.

Substanzklasse	Beispielsubstanzen	Einsatz
Alkylanzien	Cyclophosphamid	Fernmetastasen
Anthrachinone	Mitoxantron	Fernmetastasen
Anthrazykline	Epirubicin, (liposomales) Doxorubicin	Primärtumor, Fernmetastasen
Halichondrin-B-Analoga	Eribulin	Fernmetastasen
Antimetabolite	5-Floururacil	Fernmetastasen
Platinkomplexe	Cisplatin, Carboplatin	Fernmetastasen,
Taxane	Docetaxel, Paclitaxel	Primärtumor, Fernmetastasen
Vinca-Alkaloide	Vinorelbin	Fernmetastasen

Die Substanzen können adjuvant oder neoadjuvant sowie beim rezidierten und metastasierten Karzinom eingesetzt werden. Bei der Therapie des lokal begrenzten Primärtumors sollte immer ein Anthrazyklin und ein Taxan im Regime enthalten sein. Häufig wird diese Kombination noch durch 5-Floururacil oder ein Platinderivat ergänzt. Indiziert ist eine adjuvante Chemotherapie bei Luminal B Tumoren mit einem hohen Rezidivrisiko, HER-2⁺ Karzinomen und TNBC. Die Chemotherapie von inoperablen metastasierten Mammakarzinomen kann sowohl mit kurativem als auch palliativem Ziel erfolgen und muss individuell auf den Allgemeinzustand und die Prognose der Patientin abgestimmt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Neoadjuvante Chemotherapien sind geeignet, um vor der Operation eine Reduktion des Tumors zu erreichen (Asselain et al. 2018) und dadurch eine chirurgische Therapie von inoperablen Tumoren oder eine BET zu ermöglichen. Außerdem werden sie bei lokal fortgeschrittenem und inflammatorischem Mammakarzinom eingesetzt. Wie in der adjuvanten Situation, sollte auch bei einer neoadjuvanten Chemotherapie ein Anthrazyklin und ein Taxan, evtl. kombiniert mit weiteren Substanzen, verwendet werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

1.1.5.4. Endokrine Therapie

Mammakarzinome, die ER⁺ und/oder PR⁺ sind, können durch Entzug dieser Hormone therapiert werden, wobei verschiedene Wirkstoffe zur Anwendung kommen. Tamoxifen und Fulvestrant wirken beispielsweise durch Blockade der Östrogenrezeptoren. Hierbei führt Tamoxifen durch Modifikation einer der beiden funktionellen Untereinheiten des ER zu einer veränderten Transkription (Nathan und Schmid 2017) und wird eher zur Rezidivprophylaxe eingesetzt (Visvanathan et al. 2009). Fulvestrant hemmt dagegen beide Untereinheiten, sodass keine Transkription mehr stattfinden kann und reduziert zudem die Anzahl an ER. Therapeutisch wird Fulvestrant bei fortgeschrittenem und metastasiertem Brustkrebs verwendet (Nathan und Schmid 2017). Die Aromataseinhibitoren Anastrozol, Letrozol und Exemestan werden vor allem bei postmenopausalen Frauen eingesetzt und verhindern die Umwandlung von Östrogenvorstufen zu Östrogen, indem die dafür notwendige Aromatase gehemmt wird. Nach der Menopause wird die Östrogenkonzentration dadurch deutlich reduziert und die Rezidivrate vermindert (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) 2015). Als dritte Medikamentenklasse kommen GnRH-Analoga in Frage, die über eine negative Rückkopplung eine verminderte GnRH-Freisetzung im Hypothalamus und konsekutiv eine Hemmung der ovariellen Hormonproduktion bewirken. Jüngere Frauen vor der Menopause können von einer Ovarialsuppression durch GnRH-Analoga profitieren, gegebenenfalls in Kombination mit Tamoxifen oder Aromataseinhibitoren (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Generell wird eine adjuvante Hormontherapie normalerweise für fünf Jahre durchgeführt, bei hohem Rezidivrisiko kann diese Zeit auch auf zehn Jahre ausgedehnt werden. Dabei werden prämenopausale Patientinnen meist mit Tamoxifen, postmenopausale Frauen dagegen eher mit Aromatasehemmern behandelt. Auch bei prämenopausalen Frauen kann jedoch unter Ovarialsuppression ein Aromatasehemmer eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Auch in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms spielt die endokrine Therapie eine wichtige Rolle. Dadurch wird nicht unbedingt eine Remission erreicht, allerdings kann der Krankheitsprogress reduziert werden bei vertretbaren Nebenwirkungen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

1.1.5.5. Antikörpertherapie bei HER-2⁺ Mammakarzinomen

Karzinome, die die Rezeptortyrosinkinase HER-2 überexprimieren, reagieren stärker auf EGF und neigen in der Folge zu einer schnelleren Proliferation und Metastasierung (Schneider und Yarden 2016; Ross et al. 2009). Durch die zielgerichtete Blockade von HER-2 mittels des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab kann das tumorfreie Überleben ebenso wie das Gesamtüberleben deutlich verbessert werden (Perez et al. 2011; Slamon et al. 2001; Slamon et al. 2011). Trastuzumab wird bei Patientinnen mit HER-2⁺ Karzinomen in der neoadjuvanten und adjuvanten Situation eingesetzt, kann aber auch bei HER-2⁺ Rezidiven und Metastasen das (tumorfreie) Überleben verbessern. Zur adjuvanten Therapie wird es in Kombination mit einer Chemotherapie für die Dauer eines Jahres gegeben (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

Pertuzumab, ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen HER-2, verhindert die für die Funktion erforderliche Dimerisierung von HER-2 (Adams et al. 2006). Die Angriffspunkte und damit die Wirkmechanismen von Trastuzumab und Pertuzumab unterscheiden sich, sodass eine verstärkte Wirkung auf Tumorzellen durch die Kombination beider Antikörper erzielt werden konnte (Scheuer et al. 2009; Nahta et al. 2004). Bei Patientinnen mit HER-2⁺ metastasiertem Mammakarzinom konnte die Überlegenheit der Kombinationstherapie aus Trastuzumab, Docetaxel und Pertuzumab gegenüber Trastuzumab, Docetaxel und einem Placebo bezüglich des Gesamtüberlebens gezeigt werden (Swain et al. 2015; Swain et al. 2020). Bei metastasiertem HER-2⁺ Mammakarzinom besteht die Therapie der ersten Wahl daher aus einer Kombination von Pertuzumab, Trastuzumab und einem Taxan (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

1.1.5.6. Immuntherapie und zielgerichtete Therapie

Ein wichtiges Thema der aktuellen Forschung ist die Entwicklung von Immuntherapien und weiteren zielgerichteten Therapien neben den HER-2-Antikörpern. Der Zellzyklus und damit die Proliferation von Zellen wird durch eine präzise abgestimmte Interaktion aus Cyclinen und cyklinabhängigen Kinasen (CDK) moduliert und gesteuert. Insbesondere in ER⁺ Mammakarzinomen wird Cyclin D überexprimiert, was mit einer erhöhten Mortalität

assoziiert ist (Ahlin et al. 2017). Der aktivierte Komplex aus Cyclin D und CDK4/6 führt in der G1-Phase zur Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins, wodurch sich eine Konformationsänderung ergibt und der an das unphosphorylierte Retinoblastom-Protein gebundene Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und aktiviert wird. In der späten G1-Phase bildet sich ein Komplex aus Cyclin E und CDK2, der schließlich zu einer Hyperphosphorylierung des Retinoblastom-Proteins und damit zu einer gesteigerten Aktivität von E2F führt. Dadurch findet eine vermehrte Transkription von für die S-Phase wichtigen Genen und damit letztlich der Übergang in die S-Phase statt. Durch die Überexpression von Cyclin D und die daraus resultierende dauerhafte Aktivität des Cyclin D/CDK4/6-Komplexes wird der Retinoblastom-Protein-abhängige Kontrollpunkt außer Kraft gesetzt und der Übergang in die S-Phase beschleunigt (VanArsdale et al. 2015). Davon ausgehend wurden CDK-Inhibitoren entwickelt, die durch Inhibition von CDK4/6 den Zellzyklus stoppen und damit die Proliferation hemmen. Einer dieser inzwischen zugelassenen Wirkstoffe ist Palbociclib, für den bei HR⁺ metastasiertem Mammakarzinom in Kombination mit Letrozol bzw. Fulvestrant ein längeres progressionsfreies Überleben gezeigt werden konnte als bei einer Monotherapie mit Letrozol bzw. Fulvestrant (Finn et al. 2016; Turner et al. 2018; Cristofanilli et al. 2016; Rugo et al. 2020; Loibl et al. 2017). Ähnliche Ergebnisse zeigten die MONALEESA- und MONARCH-Studien für die CDK4/6-Inhibitoren Ribociclib bzw. Abemaciclib, jeweils kombiniert mit antihormoneller Therapie (Yardley 2019; Goetz et al. 2017; Sledge et al. 2017). Die Phase-3-Studie PENELOPE-B der Technischen Universität München, die den Nutzen von Palbociclib zusätzlich zur adjuvanten Hormontherapie im frühen, nicht metastasierten Krankheitsstadium untersuchte, konnte jedoch keine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens zeigen (German Breast Group 2020).

In präklinischen Studien wurde außerdem eine erhöhte Radiosensitivität von Tumorzellen unter Einfluss von Palbociclib und anderen CDK4/6-Inhibitoren nachgewiesen (Hagen et al. 2013; Whittaker et al. 2017). Bei Patientinnen, die eine Strahlentherapie und parallel eine Therapie mit den CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib, Ribociclib oder Abemaciclib erhalten haben, zeigten sich jedoch verstärkt Nebenwirkungen der Bestrahlung (Bosacki et al. 2020). Hier besteht noch weiterer Forschungsbedarf, um zu zeigen, ob und wie die verstärkte Radiosensitivität bei vertretbaren Nebenwirkungen therapeutisch genutzt werden kann.

Als Zielstruktur kommt auch die an DNA-Reparaturvorgängen beteiligte Polyadenosin-diphosphatbosepolymerase (PARP) in Frage. Während in Zellen ohne Mutation in den Genen BRCA1/2 auch bei PARP-Inhibition DNA-Doppelstrangbrüche durch homologe Rekombination repariert werden können, ist dies in Zellen mit einer BRCA-Mutation, die auf die Funktion der PARP angewiesen sind, nicht möglich. Daher kann deren Replikation durch PARP-Inhibition selektiv gehemmt werden (Farmer et al. 2005; Bryant et al. 2005; Rose et al. 2020). Der PARP-Inhibitor Olaparib wurde in einer Phase-1-Studie an Patientinnen mit fortgeschrittenem TNBC getestet, wobei sich eine dosisabhängige Wirksamkeit von 22 % - 41 % bei geringer Toxizität zeigte (Tutt et al. 2010). Verglichen mit der Standardtherapie konnte die Überlegenheit einer Monotherapie mit Olaparib bezüglich des progressionsfreien Überlebens bei Patientinnen mit einer BRCA-Mutation und metastasiertem Her-2⁻ Mammakarzinom dargestellt werden (Robson et al. 2017). Beim Vergleich des Gesamtüberlebens konnte kein Unterschied zwischen einer Therapie mit Olaparib und einer Chemotherapie festgestellt werden, allerdings zeigte sich ein verbessertes Gesamtüberleben bei Patientinnen unter Olaparib-Therapie gegenüber Patientinnen, die noch keine Chemotherapie erhalten hatten (Robson et al. 2019). Neben Olaparib stellt auch der PARP-Inhibitor Talazoparib einen vielversprechender Therapieansatz dar: Für eine Monotherapie mit Talazoparib konnte ebenfalls ein verbessertes progressionsfreies Überleben gegenüber der Standardtherapie bei fortgeschrittenem bzw. metastasiertem Mammakarzinom nachgewiesen werden (Litton et al. 2018).

Ein anderer Ansatz besteht im Einsatz von Antikörpern gegen das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (TDL4), programmed cell death Protein 1 (PD1) und den entsprechenden Liganden (PDL1), die insbesondere bei TNBC vielversprechend erscheinen. In diesen Karzinomen befinden sich besonders viele Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) (Hu et al. 2017; Disis und Stanton 2018), was mit der vermehrten Expression von PDL1 assoziiert ist (Wimberly et al. 2015). Der monoklonale Antikörper Pembrolizumab blockiert die Bindung von PD1 an PDL1 und wird bei verschiedenen Krebsentitäten bereits eingesetzt. Bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde seine Verträglichkeit bereits getestet (Nanda et al. 2016). Eine Studie zur Wirksamkeit beim metastasierten TNBC konnte sowohl bei vorbehandelten Patientinnen als auch als Erstlinientherapie eine längerfristige antineoplastische Wirkung von Pembrolizumab über ca. 10 Monate nachweisen, wobei die objektive Ansprechrate beim Einsatz als Erstlinienmedikament mit 21,4 % deutlich besser war als in der vorbehandelten Gruppe (5,7 % bei PDL1⁺ Patientinnen) (Adams et al. 2019a; Adams

et al. 2019b). Da das Ansprechen auf die Therapie auch von der Anzahl Tumor-infiltrierender Lymphozyten abhängig ist, könnte eine medikamentöse Induktion dieser Lymphozyten möglicherweise die Prognose verbessern (Disis und Stanton 2018).

Neben den genannten Beispielen wird aktuell an diversen anderen Substanzen geforscht. Deren Zielstrukturen sind beispielsweise der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, der JAK/STAT-Signalweg, der IGF-1-Rezeptor und Histondeacetylasen (HDAC) (Hosford und Miller 2014). Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft weitere Zielstrukturen untersucht werden und die zielgerichteten Therapien einen hohen Stellenwert in der Behandlung von Krebs im Allgemeinen und Mammakarzinomen im Speziellen einnehmen werden.

1.1.5.7. Nachsorge

Ziel der Nachsorgeuntersuchungen ist es, einerseits Rezidive oder Metastasen möglichst frühzeitig zu detektieren, andererseits die Patientin bei längerfristigen adjuvanten Therapien zu begleiten und mögliche Nebenwirkungen oder Unverträglichkeiten zu erkennen und angemessen zu behandeln. Zur Nachsorge nach therapiertem Mammakarzinom gehört daher die regelmäßige Anamnese, körperliche Untersuchung und Sonographie, nach brusterhaltend operierten Karzinomen darüber hinaus eine jährliche Mammographie der betroffenen Brust und der Gegenseite. Insgesamt sollte die Nachsorge über mindestens zehn Jahre durchgeführt werden, wobei die Abstände zwischen den Untersuchungen in den ersten drei Jahren drei Monate betragen, anschließend sechs Monate und fünf Jahre nach abgeschlossener Therapie sollte nur noch eine jährliche Nachsorge stattfinden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020).

1.2. Hitzeschockproteine

Bei den Hitzeschockproteinen handelt es sich um stark konservierte Proteinfamilien, die sowohl bei Eukaryonten als auch Prokaryonten vorkommen (Craig 1985). Ihre Erstbeschreibung beruht auf der Beobachtung, dass Speicheldrüsenzellen von *Drosophila melanogaster* auf erhöhte Temperaturen mit Auflockerungen ihrer Chromosomenstrukturen reagierten (Ritossa 1962). Dadurch wird die Transkription von sogenannten Hitzeschockproteinen (Hsp) gesteigert, die die Zelle vor Hitze, aber auch anderen Stressfaktoren schützen sollen (Tissières et al. 1974).

Heute sind viele Hsp-Familien bekannt, darunter DNAJ (Hsp40), HSPA (Hsp70), HSPC (Hsp90), HSPH (Hsp110), HSPD (Hsp60), HSPE (Hsp10), HSPB (small Hsp) und CCT (TRiC) (Kampinga et al. 2009). Durch zellulären Stress, beispielsweise in Form von UV-Strahlung, Hitze, Hypoxie, Infektionen, Entzündungen oder andere schädliche Umwelteinflüsse wird die Expression dieser Proteine gesteigert (Lindquist und Craig 1988). Ihre Funktionen sind vielfältig, wobei intrazellulär die Prävention der Aggregation falsch gefalteter oder ungefalteter Proteine, sowie die ATP-abhängige Unterstützung bei der korrekten Proteinfaltung im Vordergrund steht. Zudem wirken beispielsweise Hsp70 und Hsp90 antiapoptotisch. Extrazelluläre Hitzeschockproteine bewirken dagegen über verschiedene Rezeptoren und Signalwege eine Immunmodulation (Joly et al. 2010; Calderwood 2018). Im Folgenden wird die Hsp70-Familie genauer beschrieben.

1.2.1. Hitzeschockprotein 70

Zur Hsp70-Familie werden 13 strukturell sehr ähnliche Proteine gezählt, von denen einige konstitutiv exprimiert werden und andere durch Stress induzierbar sind (Tabelle 3). Am bekanntesten sind die durch Stress induzierbaren HspA1A (Hsp70-1) und HspA1B (Hsp70-2) sowie das konstitutiv exprimierte HspA8 (Hsc70).

Tabelle 3: verschiedene Mitglieder der Hsp70-Familie, ihre Lokalisation und Induzierbarkeit durch zellulären Stress, modifiziert nach (Radons 2016).

Protein	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	ER, 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	ER, extrazellulär, Mikrosomen	Nein
HspA14	Zytosol, Zellmembran	Ja

Unter physiologischen Bedingungen besteht die Funktion von intrazellulärem Hsp70 in erster Linie darin, als molekulare Chaperone die Proteinfaltung zu unterstützen. Konkret spielen sie eine wichtige Rolle bei Faltung und Transport neu synthetisierter Proteine, aber auch bei der Reparatur fehlgefalteter Proteine. Diese werden durch einen Komplex aus Hsp70 und Hsp40 erkannt, unter ATP-Verbrauch entfaltet und vor der Aggregation mit anderen Proteinen geschützt, bis sie sich spontan erneut falten. Dieser Prozess wird solange wiederholt, bis das Protein seine funktionsfähige Struktur angenommen hat (Radons 2016). Auch der Komplex aus Hsp70 und Hsp110 kann fehlgefaltete Proteine bei der neuen korrekten Faltung unterstützen sowie bereits vorliegende Proteinaggregate auflösen (Mattoo et al. 2013).

Neben seiner wichtigen Funktion im Zusammenhang mit der Proteinfaltung reguliert Hsp70 auf vielfältige Weise apoptotische Vorgänge in der Zelle. Beispielsweise wird über eine Hemmung der Aktivierung von Bax und die damit verbundene Stabilisierung der Mitochondrien eine Freisetzung proapoptotischer Faktoren verhindert (Yang et al. 2012). Weiterhin interagiert Hsp70 mit Apaf-1, Caspase 3 und anderen intrazellulären Faktoren, sodass über verschiedenste Signalwege die Apoptose unterdrückt wird (Radons 2016). Zudem stimuliert Hsp70 im Zellkern DNA-Reparaturmechanismen, indem es an PARP-1 bindet und diese aktiviert (Kotoglou et al. 2009). All diese Funktionen unterstützen Zellen dabei, unter Stressbedingungen ihre Homöostase wiederherzustellen und eine Apoptose zu vermeiden.

Allerdings ist Hsp70 nicht nur in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert, sondern liegt auch extrazellulär vor, insbesondere im Rahmen von inflammatorischen Prozessen oder in der Umgebung von Tumoren. Dort interagiert es mit verschiedenen Immunzellen, wie beispielsweise NK-Zellen (Multhoff et al. 1999) und antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (Milani et al. 2002). Darüber hinaus fördert es die Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin (IL) 1 α und IL-8, wodurch entzündliche Vorgänge wiederum verstärkt werden (Hulina et al. 2017).

1.2.2. Hsp70 im Zusammenhang mit Krebs

Bei verschiedenen Krebsentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass Hsp70 vermehrt exprimiert wird und die Tumorzellen dadurch vor Apoptose schützt und sich fördernd auf Proliferation und Migration auswirkt. Dabei steigt nicht nur die Konzentration an intrazellulärem Hsp70, sondern es wird auch über bisher nicht vollständig geklärte Mechanismen in die Membran eingebaut und aktiv in Form von Exosomen freigesetzt (Vega et al. 2008). Zudem wird es aus nekrotischen Zellen passiv in freier Form sezerniert. Im Zusammenhang mit der Proliferation und Migration von Tumorzellen nimmt das Hsp70 in unterschiedlichen Kompartimenten verschiedene Funktionen ein, von denen einige tumorfördernd und andere tumorhemmend wirken. In der folgenden Abbildung 8 sind diese zusammenfassend dargestellt.

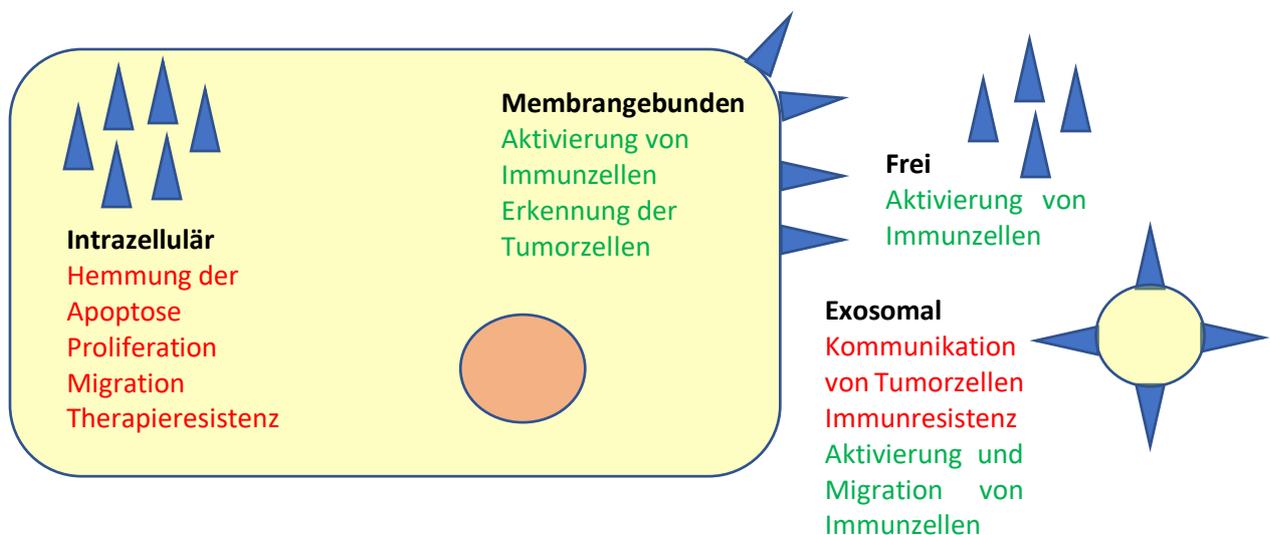


Abbildung 8: Typische Lokalisationen von Hsp70 und entsprechende Funktionen in und um Tumorzellen, modifiziert nach (Shevtsov et al. 2018). Tumorfördernde Funktionen sind rot, tumorhemmende Funktionen grün dargestellt.

Da insbesondere das intrazelluläre Hsp70 Tumorzellen einen Überlebensvorteil bietet, wird es in malignen Zellen stark exprimiert und liegt dauerhaft in einer hohen Konzentration vor. Dadurch werden ein schneller Metabolismus und eine entsprechend hohe Proliferationsrate ermöglicht. Zudem führen die in malignen Zellen zahlreichen DNA-Mutationen zur verstärkten Bildung falsch gefalteter Proteine und Veränderungen in verschiedenen Signalwegen, wodurch der intrazelluläre Stress ansteigt. Darüber hinaus kommt es zunehmend zu äußeren Stressfaktoren wie Hypoxie im Zentrum schnell wachsender Tumore oder dem Einfluss zytostatischer Substanzen. Als Reaktion darauf wird über den Transkriptionsfaktor Hitzeschockfaktor 1 (HSF-1) konsekutiv die Transkription von Hsp70 weiter verstärkt (Powers et al. 2010). Dementsprechend kann in Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten eine erhöhte Hsp70-Konzentration gegenüber gesunden Zellen nachgewiesen werden, wobei eine hohe Hsp70-Konzentration mit fortgeschrittenen und höhergradigen Tumoren, Lymphknotenmetastasen und ungünstiger Prognose vergesellschaftet ist (Murphy 2013). Auch im Zusammenhang mit Brustkrebs konnte dies festgestellt werden: eine starke intrazelluläre Hsp70-Expression war beispielsweise mit kürzerem tumorfreiem Überleben (Ciocca et al. 1993), Lymphknotenmetastasen und schlechter Differenzierung (Lazaris et al. 1997) assoziiert.

Ebenso konnte auf der Membran von Tumorzellen im Gegensatz zu korrespondierenden gesunden Zellen Hsp70 nachgewiesen werden (Multhoff et al. 1995). Der Transport mittels Lipidvesikeln und die Interaktion mit lipid rafts in der Membran erscheint wahrscheinlich (Vega et al. 2008; Gehrmann et al. 2008), die oberflächliche Bindung findet vermutlich über Phospholipidanker statt (Mahalka et al. 2014). Die Funktion des membrangebundenen Hsp70 besteht vornehmlich in der Interaktion der Zellen untereinander, aber auch mit Immunzellen. Als Zielstruktur für Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) steigert membrangebundenes Hsp70 deren Zytolyse-Aktivität und führt zu einer vermehrten Freisetzung von Interferon γ (IFN- γ) und dem proapoptotischen Granzym B (Multhoff et al. 1999). Allerdings bietet das membrangebundene Hsp70 auch einen Überlebensvorteil für die Tumorzelle, beispielsweise in Form einer Resistenz gegen ionisierende Strahlen (Murakami et al. 2015). Eine hohe Dichte an membrangebundenem Hsp70 ist assoziiert mit einem aggressiveren Tumorwachstum und Metastasierung ebenso wie mit erhöhter Therapieresistenz (Shevtsov et al. 2020).

Hsp70 kommt jedoch nicht nur im direkten Zusammenhang mit der Zelle vor, sondern wird von verschiedenen Zelltypen, darunter unterschiedliche Immunzellen und auch Tumorzellen, in Form von Exosomen (exHsp70) aktiv sezerniert. Im Zusammenhang mit Tumoren konnte eine Assoziation zwischen der lebenden Tumormasse und dem freigesetzten exHsp70 gezeigt werden (Gunther et al. 2015; Ostheimer et al. 2017), freies Hsp70 stammt dagegen hauptsächlich von nekrotischen Zellen und ist insbesondere bei starkem Zellzerfall erhöht. Beispielsweise konnte bei Patienten mit Brustkrebs (Gunaldi et al. 2015a), kolorektalem Karzinom (Gunaldi et al. 2015b; Jubran et al. 2017), hepatozellulärem Karzinom und Lungenkrebs (Ren et al. 2017) und vielen anderen Tumorentitäten eine vermehrte aktive und passive Hsp70-Sekretion nachgewiesen werden.

Für die Interaktion mit dem Immunsystem spielt freies und exHsp70 eine wichtige Rolle: Hsp70-haltige Exosomen, die Tumorzellen entstammen, führen zu einer Aktivierung von NK-Zellen und induzieren deren Migration zu Tumorzellen, die Hsp70 auf ihrer Membran exprimieren (Gastpar et al. 2004).

Darüber hinaus ermöglicht Hsp70 eine Kreuzpräsentation von intrazellulär gebundenen Tumorantigenen gegenüber CD8⁺ T-Lymphozyten. Nachdem der Komplex aus Hsp70 und dem Antigen freigesetzt wurde, kann er von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wie dendritischen Zellen und Makrophagen endozytiert werden. Dies führt zur Aktivierung der APZ, Prozessierung und Präsentation des Tumorantigens über ihren MHC I-Rezeptor. Die Folgen sind eine Induktion der CD8⁺ T-Lymphozyten-abhängigen Immunantwort (Arnold-Schild et al. 1999) und die Reifung von dendritischen Zellen (Lehner et al. 2004).

Des Weiteren interagiert extrazelluläres Hsp70 mit lipid raft-Mikrodomänen auf der Membran von Makrophagen und steigert deren Phagozytoseaktivität deutlich, wobei exHsp70 einen sehr viel größeren Einfluss hat als freies Hsp70 (Wang et al. 2006; Vega et al. 2008). Die Präsentation der phagozytierten Antigene über MHC II und die anschließende Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten wurde unter Einfluss von Hsp70 ebenfalls deutlich effizienter (Wang et al. 2006).

Auch an die Membran von Monozyten kann Hsp70 binden, was zur Aktivierung von NFκB und zur Freisetzung von TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12, Chemokinen und NO führt (Lehner et al. 2004; Asea et al. 2000). Dabei spielt für die Sekretion von TNFα, IL-1β und IL-6 vor allem ein CD14-

abhängiger Signalweg eine Rolle, wobei TNF α zusätzlich CD14-unabhängig freigesetzt werden kann (Asea et al. 2000).

Zusammengefasst beeinflusst die Funktion des freien Hsp70 als Damage Associated Molecular Pattern (DAMP) die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, interagiert mit verschiedenen Rezeptoren und moduliert so die Immunantwort, was sich sowohl hemmend als auch fördernd auf maligne Prozesse auswirken kann (Hulina et al. 2017; Klee et al. 2017).

1.3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Brustkrebs ist eine häufige Erkrankung und trotz guter Prognose in frühen Stadien nach wie vor die zweithäufigste Todesursache infolge von Krebs bei Frauen. Eine verbesserte Therapie, die an das individuelle Risiko einer jeden Patientin angepasst ist, würde sich nicht nur auf die Mortalität, sondern auch das tumorfreie Überleben positiv auswirken. Darüber hinaus könnte die immer mit Nebenwirkungen verbundene und psychisch und physisch belastende Therapie der Erkrankung reduziert werden, wenn der Tumor nur ein sehr geringes Progressions- und Rezidivrisiko aufweist. Die betroffenen Patientinnen mit geringem Risiko würden dann von einer verbesserten Lebensqualität und geringeren Nebenwirkungen bei gleichem Überleben profitieren.

Dazu ist jedoch ein prognostischer Marker notwendig, der eine bessere Vorhersage bezüglich des Rezidiv- und Metastasierungsrisikos liefern kann als momentan etablierte klinische und pathologische Parameter. Ideal wäre dabei ein Marker, der nicht invasiv, wiederholt und mit geringem Aufwand bestimmt werden kann und schon möglichst frühzeitig eine aussagekräftige Prognose liefert. Es ist bereits bekannt, dass bei Brustkrebspatientinnen sowohl das Hsp70 im Tumor als auch exHsp70 in einer erhöhten Konzentration vorliegt. Allerdings spielt insbesondere freies Hsp70 als DAMP eine wichtige Rolle im Immunsystem, wobei es über komplexe Mechanismen sowohl vor malignen Prozessen schützen als auch diese fördern kann. Die Beobachtung der immunologischen Aktivitäten im Therapieverlauf könnte daher Aufschluss darüber geben, ob die protektiven oder die tumorfördernden Effekte im Vordergrund stehen und somit zur individuellen Prognose genutzt werden. Davon ausgehend könnte eine Anpassung der Therapie vorgenommen werden, um sowohl eine Übertherapie zu vermeiden als auch einem erhöhten Risiko mit einer entsprechenden Behandlung zu begegnen und so das tumorfreie Überleben und die Mortalität zu verbessern.

Um die stattfindenden Immunprozesse im Therapieverlauf von Brustkrebspatientinnen individuell quantifizieren zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das freie Hsp70 im Serum von 40 Patientinnen zu sechs verschiedenen Zeitpunkten gemessen und die Werte mit dem Outcome mindestens drei Jahre nach dem Therapieende korreliert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Materialien zur Blutentnahme und -verarbeitung

Tabelle 4: Materialien zur Blutentnahme und -verarbeitung.

Material	Hersteller
Safety-Multifly®-Kanüle inkl. Multiadapter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® Plasma Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.2. Reagenzien

Tabelle 5: Reagenzien zur Durchführung des ELISAs.

Lösung	Hersteller
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Steriles Wasser	Herstellung im eigenen Labor
Tween 20 Detergent (Tween 20)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Alkopharm 80 (Ethanol)	Brüggemann Alcohol, Heilbronn, Deutschland

2.1.3. ELISA-Kit und Kitlösungen

Verwendet wurde das Kit Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA von R&D Systems aus Minneapolis, MN, USA.

Tabelle 6: Zusammensetzung der für den ELISA verwendeten Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
Diluent 1	1 % BSA in PBS
Diluent 4	1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100 in PBS
Standard	Lösung in 500 µl Diluent 4
Streptavidin-HRP	Gebrauchsfertig
Substratlösung	Substrate Reagent Pack; 1:1 Mischung aus Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)
Stopplösung	2N H ₂ SO ₄ : 5,6 ml H ₂ SO ₄ in 100 ml steriles Wasser
Waschpuffer	250 µl Tween 20 in 500 ml PBS (c=0,05 %)

2.1.4. Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für den ELISA, deren Ursprung und Verdünnung.

Antikörper	Ursprung	Herstellung	Hersteller
Capture-Antikörper	Maus	Lösung in 200 µl PBS (c = 360 µg/ml)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Detection-Antikörper	Kaninchen	Lösung in 1 ml Diluent 1 (c = 3,6 µg/ml)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

2.1.5. Technische Geräte

Tabelle 8: Verwendete technische Geräte für die Durchführung des ELISA.

Gerät	Hersteller
Inkubator	Selutec Teco 20,
Absorbance Microplate Reader	ELx800, BioTek, Winooski, VT, USA

2.1.6. Weitere Materialien

Tabelle 9: Weitere verwendete Materialien.

Material	Hersteller
Costar 96-well EIA/RIA plate 3590	Corning Inc., Corning, NY, USA
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetman Classic 1-10 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetman Classic 10-100 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetman Classic 20-200 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetman Classic 100-1000 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Diamond D10 Tips 10 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Diamond D200 Tips 200 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Diamond D1000 Tips 1000 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
epT.I.P.S. Standard/Bulk 2-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Standard/Bulk 20-300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Stripettor™ Ultra	Corning Inc., Corning, NY, USA
Cellstar Serological Pipette 5 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Serological Pipette 12 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Serological Pipette 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
SafeSeal Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Reagent Reservoir 50 ml	VWR International LLC, Radnor, PA, USA
SealPlate Klebefolie	Excel Scientific Inc., Victorville, CA, USA
Latex Powder-Free Examination Gloves Microtouch Coated	Ansell, Richmond, Australien

2.2. Methoden

2.2.1. Blutentnahme und Verarbeitung der Blutproben

Den Patientinnen wurde zwischen 2012 und 2014 insgesamt zu sechs Zeitpunkten Blut aus einer oberflächlichen Vene, meist in der Ellenbeuge, abgenommen. Dazu wurde zunächst ein Stauschlauch am Oberarm angelegt, anschließend die Entnahmestelle nach Herstellerangaben mit einem Hautdesinfektionsmittel desinfiziert und schließlich unter Stauung Blut in einer EDTA-Monovette sowie in einer Serum-Monovette abgenommen. Mit dem EDTA-Blut wurde routinemäßig ein Differenzialblutbild durch das Labor des Klinikums rechts der Isar erstellt. Nach Abschluss der Gerinnung wurden die Serumproben zentrifugiert, das Serum abpipettiert und in Aliquots von 150 µl aufgeteilt. Die Aliquots wurden anschließend bei -80° C gelagert. Die Blutentnahme und weitere Verarbeitung wurden durch Sage, E. durchgeführt.

2.2.2. Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA

Der Human/Mouse/Rat Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC ELISA von R&D Systems funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs. Bei dieser Technik wird zunächst ein Capture-Antikörper an den Boden einer Platte gebunden. Im weiteren Verlauf bindet daran das zu messende Antigen, das wiederum einen Detection-Antikörper bindet. Das Antigen liegt somit zwischen den beiden Antikörpern. Der Detection-Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert, durch dessen Reaktion die Konzentration des Antigens quantifizierbar wird.

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte und Reaktionen, die für den beschriebenen ELISA notwendig sind, dargestellt.

1. Am Vortag vor der Durchführung des ELISAs wurde der Capture-Antikörper in 200 µl PBS gelöst, die Konzentration betrug somit 360 µg/ml. Um eine ausreichende Lösung zu gewährleisten, wurde der Behälter mit dem Antikörper bei Raumtemperatur für 15 Minuten stehen gelassen, anschließend umgedreht und für weitere 10 Minuten stehen gelassen.
2. Der gelöste Capture-Antikörper wurde mit PBS auf eine Konzentration von 2µg/ml verdünnt. Direkt nach der Verdünnung wurde jede Vertiefung einer COSTAR 3590

ELISA-Platte mit 100 µl der Antikörperlösung befüllt. Die Platte wurde mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen und in einem verschlossenen Plastikbehälter über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

3. Vorbereitet wurden zudem drei weitere Reagenzien. Für die Herstellung des Waschpuffers mit einer Konzentration von 0,05 % Tween in PBS wurden 250 µl Tween 20 in 500 ml PBS gelöst. Außerdem wurde eine 1 % Lösung von BSA in PBS, im Folgenden Diluent 1 genannt, vorbereitet und über Nacht bei 4° C kontinuierlich geschwenkt. 0,5 % Triton, 1 mM EDTA in PBS, im Folgenden als Diluent 4 bezeichnet, wurde aus 250 µl Triton X-100, 100 µl EDTA und 50 ml PBS hergestellt und gemeinsam mit Diluent 1 bei 4° C gekühlt und bei ständiger Durchmischung über Nacht aufbewahrt.
4. Am nächsten Tag wurde zunächst die Lösung mit dem Capture-Antikörper durch mehrmaliges Klopfen der ELISA-Platte auf saubere Tücher entfernt. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 250 µl Waschpuffer befüllt, durch Ausklopfen wieder entleert und dieser Vorgang zwei weitere Male durchgeführt. Insgesamt wurde so jede Vertiefung dreimal gewaschen.
5. Nach Entfernung des Waschpuffers folgte der Blockvorgang. Hierzu wurden in jede Vertiefung 250 µl Diluent 1, aufgewärmt auf Raumtemperatur, aufgetragen. Die Platte wurde erneut mit einer Klebefolie verschlossen und anschließend bei 26° C in einer geschlossenen und lichtundurchlässigen Plastikbox für zwei Stunden inkubiert.
6. Währenddessen wurden die zu messenden Serumproben auf Eis langsam aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl einer jeden Probe im Verhältnis 1:5 mit Diluent 4 verdünnt. Durch vorsichtiges Wenden wurde eine gute Durchmischung gewährleistet. Bis zum Ende der Inkubationszeit wurden die vorbereiteten Proben bei 4° C im Kühlschrank gelagert.
7. Zusätzlich wurden acht Lösungen mit definierten Hsp70-Konzentrationen hergestellt, um daraus eine Standardkurve ableiten zu können. Zunächst wurde der Standard mit einer Konzentration von 170 ng/ml durch Zugabe von 500 µl Diluent 4 gelöst. Vor der Weiterverarbeitung wurde das Gefäß nun zwischen 15 und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 50 µl der Standardlösung mit 800 µl Diluent 4 in Gefäß 1 gut vermischt. Anschließend wurden 400 µl der Lösung aus Gefäß 1 mit 400 µl Diluent 4 in Gefäß 2 vermischt. Aus Gefäß 2 wurden wieder 400 µl

entnommen und in Gefäß 3 mit 400 µl Diluent 4 vermischt. Diese Verdünnungsreihe setzte sich fort bis zu Gefäß 7. In Gefäß 8 wurden nur 400 µl Diluent 4 gefüllt. Auch die Gefäße mit der Verdünnungsreihe wurden für die verbleibende Zeit bis zum Ende der Inkubationszeit bei 4° C aufbewahrt. Zwischen dem Lösen des Standards und dem Auftragen auf die Platte lagen jedoch nicht mehr als 60 Minuten. Die Verdünnungsreihe und die entsprechenden Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Verdünnungsreihe für den Standard.

Gefäß	Inhalt	Konzentration
1	50 µl Standard und 800 µl Diluent 4	10 ng/ml
2	400 µl Diluent 4 und 400 µl aus Gefäß 1 mit 10 ng/ml	5 ng/ml
3	400 µl Diluent 4 und 400 µl aus Gefäß 2 mit 5 ng/ml	2,5 ng/ml
4	400 µl Diluent 4 und 400 µl aus Gefäß 3 mit 2,5 ng/ml	1,25 ng/ml
5	400 µl Diluent 4 und 400 µl aus Gefäß 4 mit 1,25 ng/ml	0,625 ng/ml
6	400 µl Diluent 4 und 400 µl aus Gefäß 5 mit 0,625 ng/ml	0,312 ng/ml
7	400 µl Diluent 4 und 400 µl aus Gefäß 6 mit 0,312 ng/ml	0,156 ng/ml
8	400 µl Diluent 4	0 ng/ml

8. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Vertiefungen der Platte auf sauberen Papiertüchern entleert und dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen (siehe 4.).
9. Die Vertiefungen der Platte wurden anschließend jeweils mit 100 µl der verdünnten Proben beimpft. Jede Probe wurde dabei in zwei benachbarte Vertiefungen gefüllt und somit zweimal gemessen. Auch für die Standardreihe wurden jeweils 100 µl in benachbarte Vertiefungen pipettiert. Die Platte wurde wieder abgedeckt und bei 26°C in einer verschlossenen, lichtundurchlässigen Plastikbox für weitere zwei Stunden inkubiert.
10. Während der Inkubation wurde der Detection-Antikörper in einer Konzentration von 3,6 µg/ml in Diluent 1 aufgelöst. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde der aufgelöste Antikörper auf 100 ng/ml in Diluent 1 verdünnt.
11. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Vertiefungen der Platte auf sauberen Papiertüchern entleert und dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen (siehe 4.).

12. Pro Vertiefung wurden 100 µl der Lösung mit dem Detection-Antikörper aufgetragen. Anschließend wurde die Platte wieder abgedeckt und in einer verschlossenen, lichtundurchlässigen Plastikbox bei 26° C erneut für zwei Stunden inkubiert.
13. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Vertiefungen der Platte auf sauberen Papiertüchern entleert und dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen (siehe 4.).
14. 60 µl Streptavidin-HRP wurden unmittelbar vor Gebrauch mit 12 ml Diluent 1 verdünnt und jede Vertiefung mit 100 µl dieser Lösung befüllt. Es wurde darauf geachtet, die Platte und die Lösung keiner direkten Lichteinstrahlung auszusetzen. Danach wurde die Platte wieder mit einer Klebefolie abgedeckt und in einer verschlossenen, lichtundurchlässigen Plastikbox bei 26° C für 20 Minuten inkubiert.
15. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Vertiefungen der Platte auf sauberen Papiertüchern entleert und dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen (siehe 4.).
16. Aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidine im Verhältnis 1:1 wurde die Substratlösung hergestellt. In jede Vertiefung wurden 100 µl gegeben, wobei auch hier darauf geachtet wurde, dass die Platte oder die Substratlösung keiner direkten Lichteinstrahlung ausgesetzt werden. Nach dem Abdecken wurde die Platte in einer verschlossenen, lichtundurchlässigen Plastikbox wieder für 20 Minuten bei 26° C inkubiert.
17. Nach Ende der Inkubationszeit wurden ohne weiteren Waschvorgang 50 µl der Stopplösung (2N H₂SO₄) in jede Vertiefung appliziert.
18. Unmittelbar im Anschluss wurde die optische Dichte jeder Vertiefung mittels eines Absorbance Microplate Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm und 570 nm gemessen. Aus der Differenz der beiden Werte wurde die Hsp70-Konzentration der jeweiligen Vertiefung ermittelt.

In Abbildung 9 sind alle Arbeitsschritte noch einmal als Übersicht dargestellt.

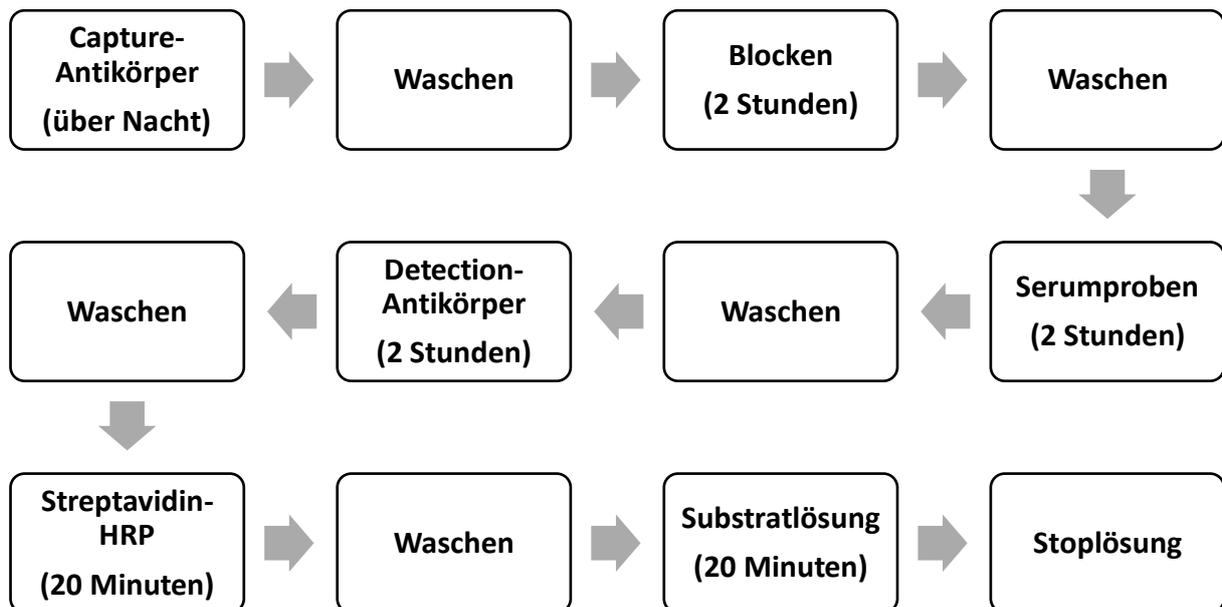


Abbildung 9: Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte des ELISAs. Eigene Darstellung.

2.2.3. Ermittlung des Outcomes der Patientinnen

Um den eventuellen prognostischen Wert von freiem Hsp70 im Serum zu untersuchen, wurde die Gesundheit der Patientinnen mindestens vier Jahre nach Ende der Bestrahlung und drei Jahre nach der letzten Blutentnahme untersucht. Die Daten der Patientinnen, die regelmäßig zur Nachsorge im Klinikum rechts der Isar erschienen sind, waren im Archiv der Abteilung für Strahlentherapie hinterlegt. Bei den Patientinnen, die stattdessen zur Nachsorge bei ihrem Gynäkologen waren, wurde der gesundheitliche Status telefonisch erfragt. Die durchgeführten Untersuchungen beinhalteten eine Mammographie, eine Sonographie der Brust und eine klinische Untersuchung. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen durch das Klinikum rechts der Isar oder niedergelassene Gynäkologen.

Für die weiteren Berechnungen wurden die Werte aller Patientinnen verwendet, deren Outcome ermittelt werden konnte (n = 35).

2.2.4. Statistische Auswertung

Jede Serumprobe wurde viermal gemessen. Der Mittelwert aus allen vier gemessenen Hsp70-Konzentrationen wurde anschließend für die weiteren Berechnungen verwendet. Dabei betrug die Standardabweichung der jeweils vier Messungen untereinander höchstens 25,05 %, bis auf drei Proben lag sie deutlich unter 20 % und in vielen Fällen sogar unter 10 %.

Um zu überprüfen, ob klinische Parameter einen Einfluss auf die Hsp70-Konzentration im Serum haben, wurden die Patientinnen anhand dieser Parameter in entsprechende Gruppen eingeteilt und ihre Hsp70-Werte miteinander verglichen. Bei dem Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Berechnung der statistischen Signifikanz verwendet, da die Werte nicht normalverteilt waren. Bei einem Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurde stattdessen der Kruskal-Wallis-Test verwendet, der ebenfalls bei nicht normalverteilten Daten eingesetzt wird. Wenn der so errechnete p-Wert unter 0,05 lag, wurde der Unterschied als signifikant betrachtet. Bei den statistischen Auswertungen und insbesondere der Auswahl der Signifikanztests wurde die Arbeit durch das Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie unterstützt.

Für die weitere Datenverarbeitung wurden die Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 25 sowie Microsoft Excel 2016 verwendet. Tabellen und Diagramme wurden überwiegend mit Microsoft Excel 2016 erstellt und bearbeitet, für die Berechnung von Mittelwerten und die Anwendung von Signifikanztests wurde dagegen vor allem IBM SPSS Statistics 25 genutzt.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

Alle in die Studie eingeschlossenen Personen (n = 40) waren weiblich und an unilateralem Mammakarzinom erkrankt. Ausschlusskriterien waren Fernmetastasen, Zweitkarzinome, eine neoadjuvante Chemotherapie, frühere Strahlentherapie sowie eine Mastektomie anstelle einer Brust-erhaltenden Therapie. Im Folgenden werden die Patientinnen mit bekanntem Outcome (n = 35), die in die weiteren Berechnungen einbezogen wurden, genauer beschrieben.

Die jüngste Patientin erkrankte in einem Alter von 43 Jahren an Brustkrebs, die älteste war bei Diagnosestellung 83 Jahre alt. Im Median betrug das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung 57 Jahre. Die jüngste und die älteste Patientin sind in der folgenden Abbildung 10 durch die Enden der Antennen dargestellt. Das Perzentil P25 beträgt 51,5 Jahre und ist durch das untere Ende der Box gekennzeichnet. Das obere Ende der Box gibt das Perzentil P75 von 66,5 Jahren an und die Linie innerhalb der Box zeigt den Median mit 57 Jahren (Abbildung 10).

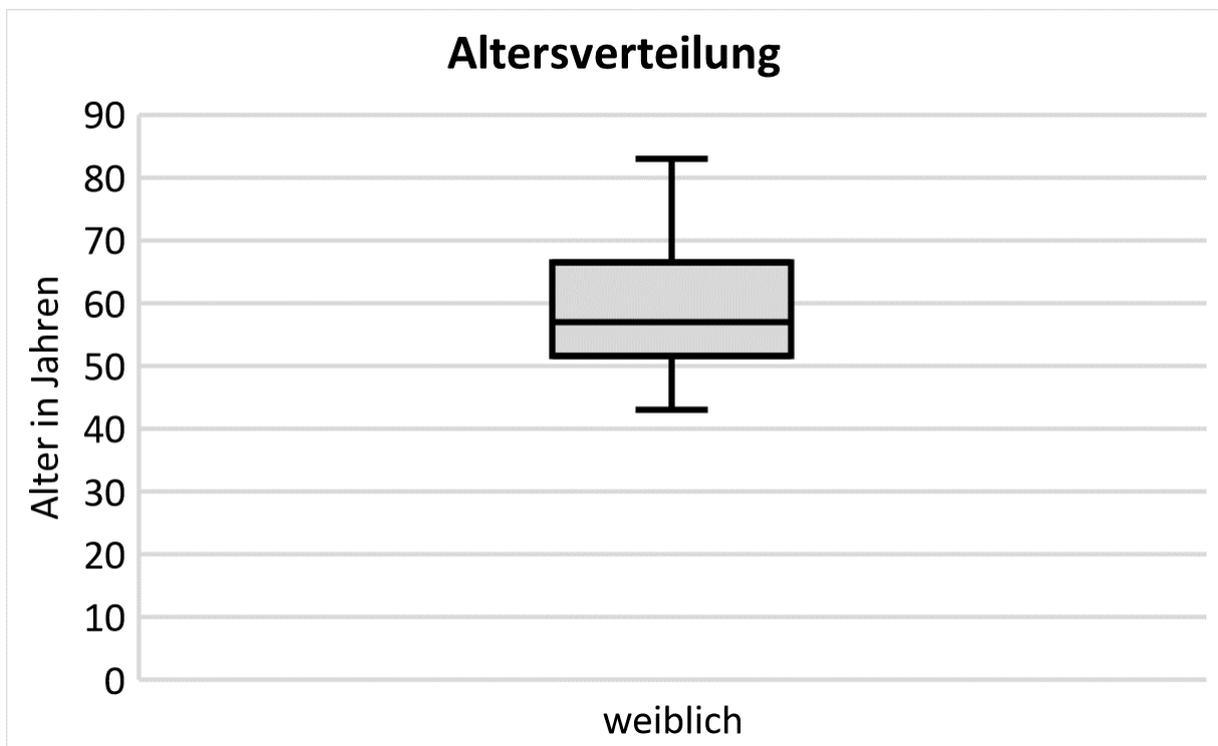


Abbildung 10: Altersverteilung der Studienteilnehmerinnen. Eigene Darstellung.

Die Größe des Tumors lag jeweils zwischen 0,2 cm und 2,2 cm, im Median bei 1,1 cm. Die Verteilung kann Abbildung 11 entnommen werden. Die Ausdehnung des kleinsten und des größten Tumors werden durch die Enden der Antennen angezeigt, die Box umfasst den Bereich zwischen dem Perzentil P25 und P75 und der Median wird durch die horizontale Linie innerhalb der Box dargestellt.

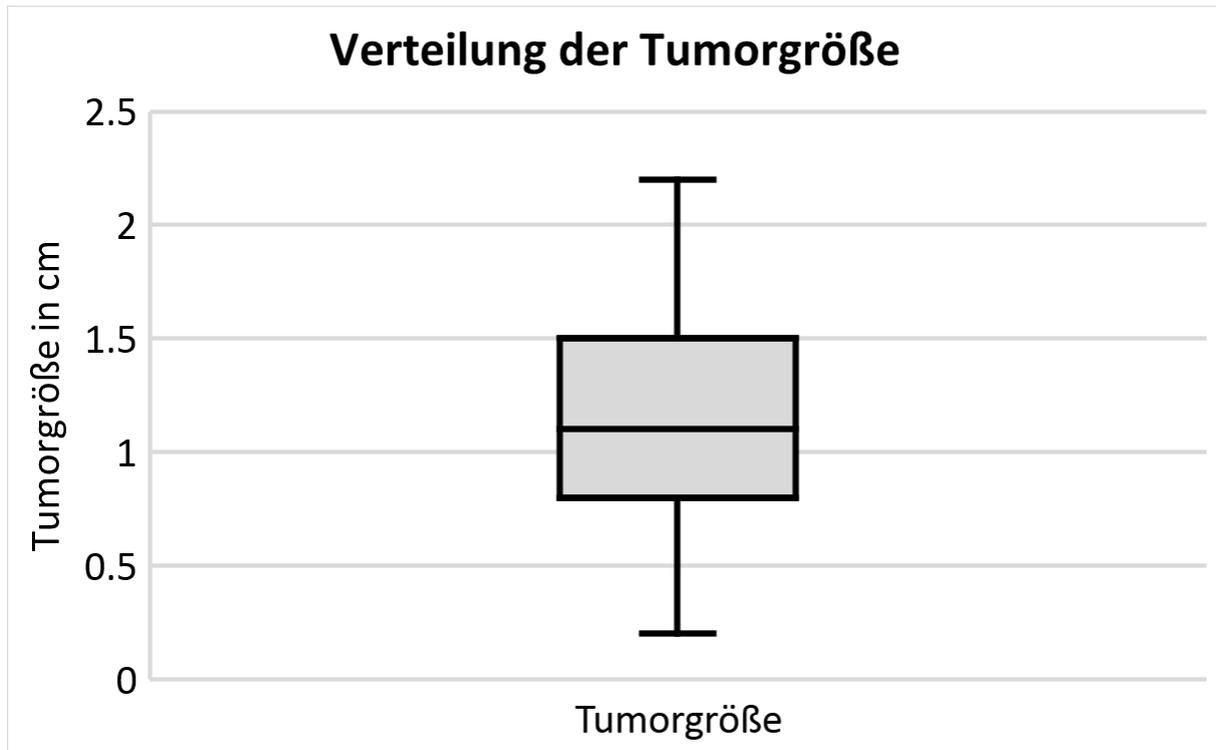


Abbildung 11: Verteilung der Tumorgroesse der Studienteilnehmerinnen. Eigene Darstellung.

Bei 30 Patientinnen wurde das Karzinom anhand des TNM-Stagings als T1 eingestuft, fünf Tumoren wurden im Stadium T2 diagnostiziert. Fernmetastasen führten zum Ausschluss aus der Studie, weshalb alle Patientinnen als M0 eingestuft wurden. Außerdem fanden sich bei 30 Patientinnen auch keine Lymphknotenmetastasen, sodass diese als Stadium N0 klassifiziert wurden. Die übrigen fünf Patientinnen wurden dem Stadium N1 zugeordnet. Bezüglich des Gradings wurden die Tumore bei sieben Patientinnen als Grade 1, bei 26 als Grade 2 und bei zwei Frauen als Grade 3 eingestuft. Bei einer Patientin fanden sich Merkmale eines Grade 1 und eines Grade 2 Tumors. Für die weiteren Berechnungen wurde diese Patientin in die Gruppe mit Grade 2 aufgenommen.

Die folgende Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Tumoreigenschaften der einzelnen Patientinnen.

Tabelle 11: Charakteristika des Tumors bei den einzelnen Studienteilnehmerinnen.

Patientin	Größe des Tumors (cm)	T	N	M	Grading
1	0.4	1a	1mi	0	1
2	1.2	1c	0	0	1
3	1	1b	0	0	2
4	2.2	2	0	0	2
5	1.4	1c	1a	0	2
6	1	1b	1	0	2
7	1.7	1c	0	0	2
8	2.1	2	0	0	2
9	0.3	1c	0	0	2
10	1.1	1c	0	0	1
11	1.5	1c	1a	0	1
12	0.25	1a	0	0	3
13	0.7	1b	0	0	1
14	1.3	1c	0	0	2
15	1.4	1c	0	0	2
16	2.1	2	0	0	2
17	0.6	1b	0	0	1
18	1.7	1c	0	0	2
19	1.5	1c	0	0	2
20	1.6	1c	0	0	2
21	0.8	1b	0	0	2
22	0.7	1b	0	0	1+2
23	0.8	1b	0	0	2
24	0.7	1b	0	0	1
25	1.5	2	0	0	2
26	0.2	1a	0	0	2
27	1.2	1c	0	0	2
28	0.9	1b	0	0	2
29	1.6	1c	0	0	3
30	0.8	1b	0	0	2

31	1	1b	1a	0	2
32	1	1b	0	0	2
33	1.6	1c	0	0	2
34	1.5	2	0	0	2
35	1	1b	0	0	2

Chirurgisch wurden alle Patientinnen mit einer brusterhaltenden Therapie und einer Strahlentherapie im Anschluss behandelt. Neben der Bestrahlung der gesamten Brust erhielten 35 der Patientinnen eine Boost-Bestrahlung, eine Dosissteigerung in dem Bereich, in dem der Tumor lokalisiert war, um das Risiko für Lokalrezidive zu minimieren. Die Dosis des Boosts betrug dabei im Median 10 Gy, die Gesamtdosis der Strahlentherapie inklusive Boost 60 Gy. Da die Mammakarzinome aller Patientinnen als Östrogen- und Progesteronrezeptorpositiv eingestuft wurden, wurde bei zwölf Frauen eine Hormontherapie vor Beginn der Strahlentherapie begonnen und bei 22 Patientinnen danach. Eine Patientin verweigerte diese Therapie. Zusätzlich wurden acht Patientinnen einer adjuvanten Chemotherapie unterzogen.

Das Outcome der Patientinnen wurde mindestens drei, in den meisten Fällen vier oder fünf Jahre nach Ende der Strahlentherapie untersucht. Innerhalb der ersten zwei Jahre entwickelte eine Patientin Fernmetastasen und eine weitere einen zweiten Tumor der kontralateralen Brust. Eine Patientin erkrankte nach zwei Jahren an einem Endometriumkarzinom. Die übrigen 32 Frauen blieben mindestens drei Jahre nach Ende der Bestrahlung tumorfrei, 18 davon sogar fünf Jahre (Abbildung 12).

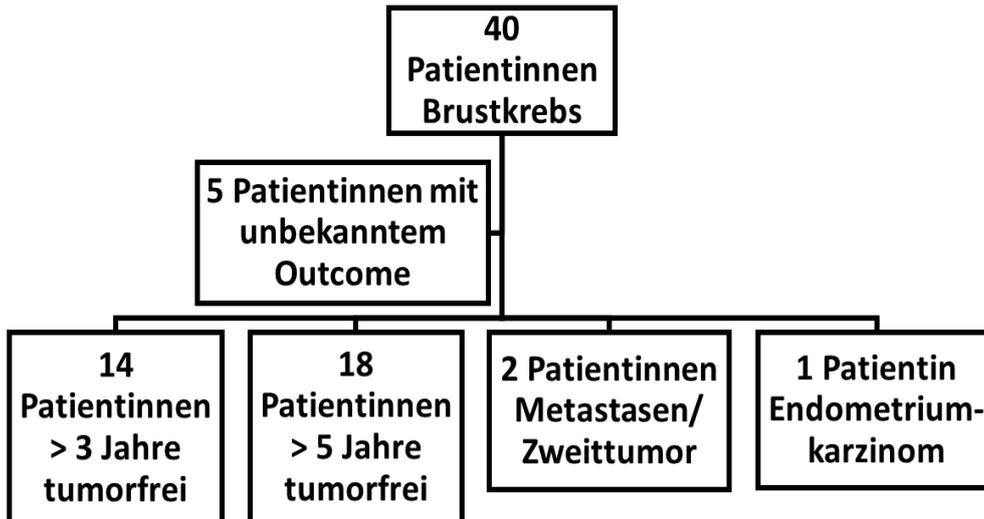


Abbildung 12: Outcome der Patientinnen: 32 Frauen blieben mindestens drei Jahre tumorfrei, zwei erlitten ein Mammakarzinom der kontralateralen Brust oder Metastasen und eine Patientin entwickelte ein Endometriumkarzinom. Bei fünf Patientinnen ist das Outcome unbekannt. Eigene Darstellung.

Die Verteilung aller oben beschriebenen Charakteristika in Prozent sowie in absoluten Zahlen ist in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 12: Altersverteilung, Therapie und Charakteristika des Tumors der 35 in die Auswertung einbezogenen Patientinnen.

Alter (Jahre)	N	%
40-49	8	23
50-59	11	32
60-69	11	31
>70	5	14
Chemotherapie		
Ja	8	23
Nein	27	77
Hormontherapie		
Beginn vor Strahlentherapie	12	34
Beginn nach Strahlentherapie	22	63
Keine	1	3
Tumorgröße (cm)		
<1	12	34
1-2	20	57
>2	3	9

pTNM	N	%
T1 (a-c)	30	86
T2	5	14
N0	30	86
N1	5	14
M0	35	100
G1	7	20
G2	26	74
G3	2	6
Hormonrezeptorstatus		
Östrogenrezeptor ⁺	35	100
Progesteronrezeptor ⁺	35	100
Gesamtdosis (Gy)		
40	3	9
60	27	77
66	5	14
Dosis des Boosts (Gy)		
10	25	72
16	5	14
Klinisches Outcome		
krankheitsfrei >3 Jahre	14	40
krankheitsfrei >5 Jahre	18	52
Endometriumkarzinom	1	2
Metastasen/Zweittumor der kontralateralen Brust	2	6

Um das freie Hsp70 im Serum während des Therapieverlaufs zu bestimmen, wurde den Patientinnen zu sechs verschiedenen definierten Zeitpunkten Blut abgenommen: Die erste Blutentnahme fand nach der Operation, aber noch vor Beginn der Strahlentherapie (RT) statt. Nach der Hälfte der Bestrahlung, nach 30 Gy folgte die zweite Blutentnahme, die dritte direkt nach Ende der Strahlentherapie. Anschließend wurden drei weitere Blutproben sechs Wochen, sechs Monate und ein Jahr nach der Bestrahlung im Rahmen der Nachsorgetermine abgenommen. Die folgende Abbildung 13 verdeutlicht die zeitlichen Zusammenhänge.

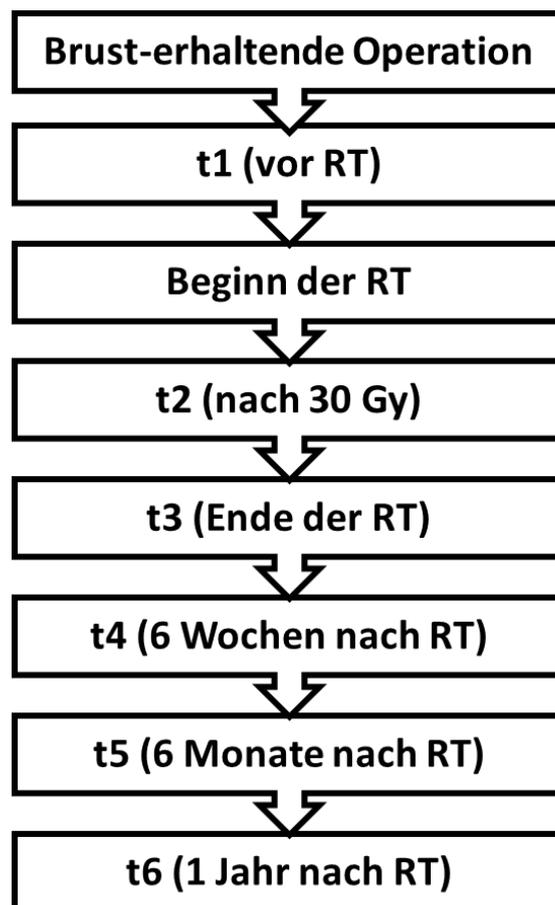
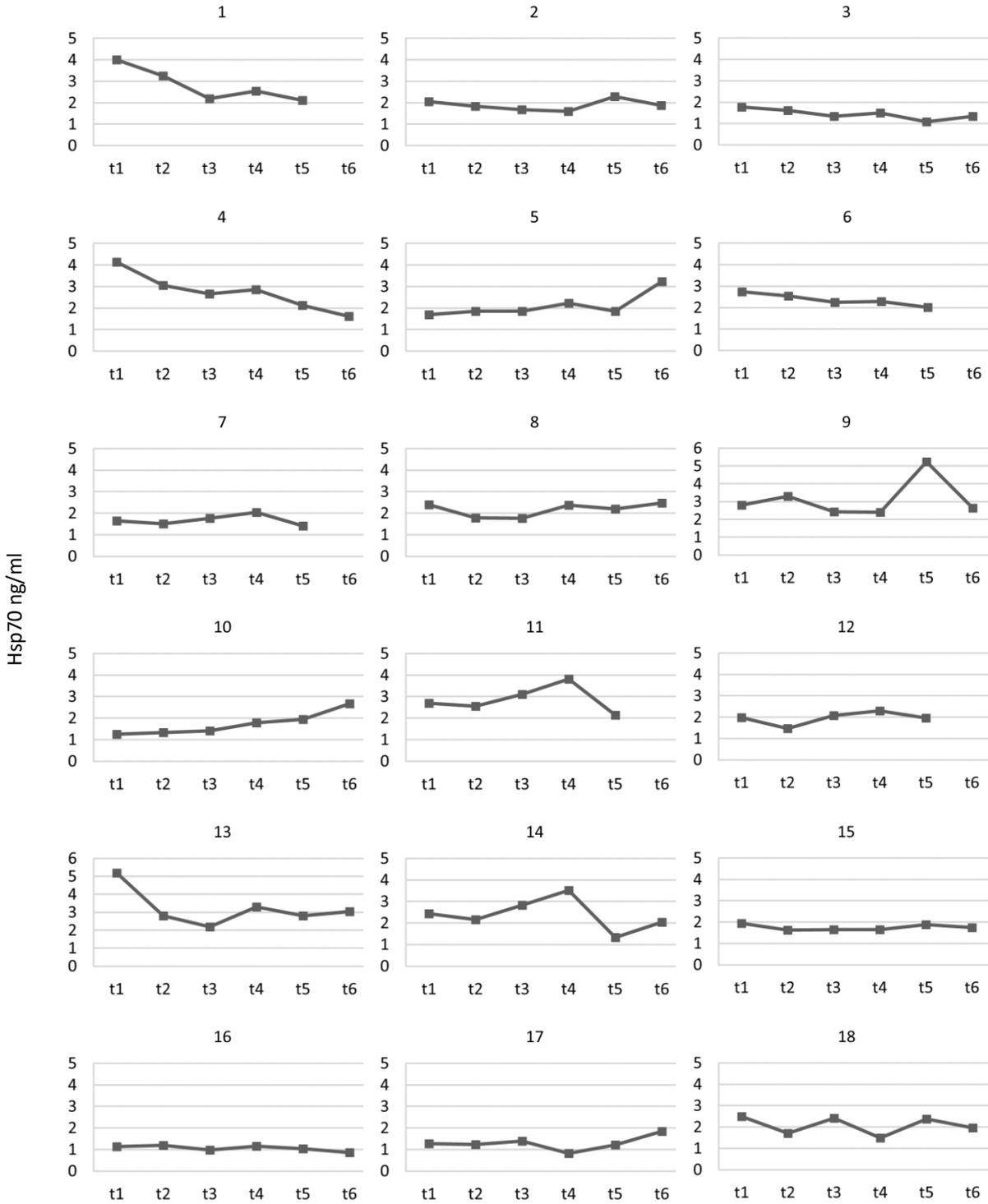


Abbildung 13: Zeitverlauf von Therapie und Blutentnahmen. Eigene Darstellung.

3.2. Hsp70 im Therapieverlauf

Die Blutentnahmen zu den sechs verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Therapie dienten dazu, die Veränderung der Hsp70-Konzentration im Serum während der Behandlung zu quantifizieren. Nachfolgend sind die Einzelverläufe aller Patientinnen mit bekanntem Outcome (n = 35) dargestellt (Abbildung 14). Im Normalfall wurden die Einzelwerte aller sechs Zeitpunkte ermittelt. In manchen Fällen, wenn die Patientin nicht zum letzten Follow-Up und

zur Blutentnahme nach einem Jahr erschienen ist, konnte das freie Hsp70 im Serum nur bis einschließlich t5 (6 Monate nach Ende der Bestrahlung) bestimmt werden. In diesen Fällen fehlt der letzte Wert im Diagramm. Der Verlauf der Patientin 33 kann nicht beurteilt werden, da von dieser Patientin nur zu t1 bis t3 Serumproben vorlagen und daher nur die ersten drei Hsp70-Werte bestimmt werden konnten. Wie der weitere Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration in ihrem Fall war, lässt sich aus diesen drei Werten nicht ableiten.



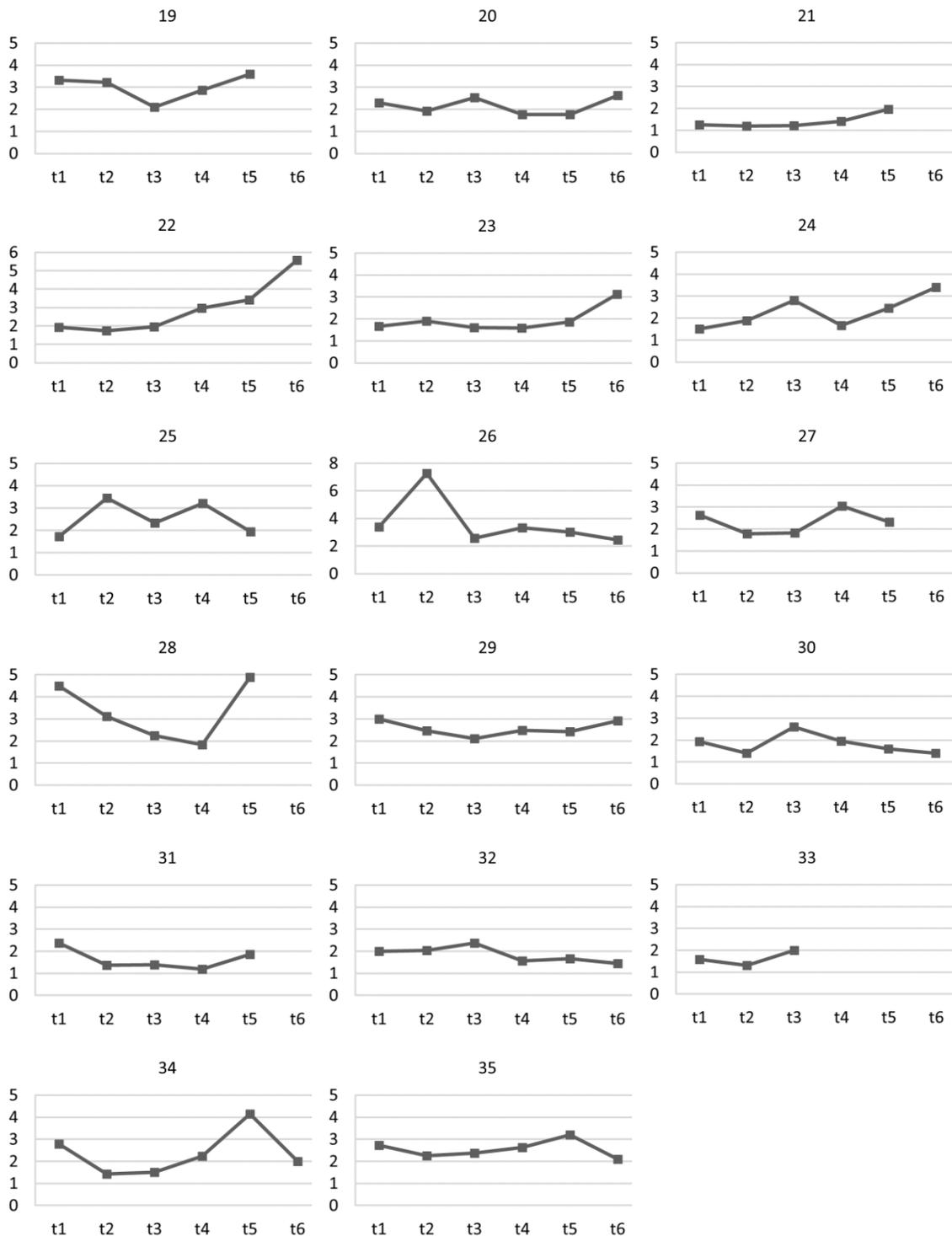


Abbildung 14: Einzelne Hsp70-Verläufe aller Patientinnen mit bekanntem Outcome (n=35). Eigene Darstellung.

Der Vergleich der einzelnen Patientinnen untereinander zeigt hier sehr heterogene Hsp70-Verläufe. In vielen Fällen lassen sich keine großen Veränderungen des freien Hsp70 im Serum über den kompletten Therapieverlauf hinweg erkennen und die Kurven bleiben hinsichtlich der Hsp70-Konzentration relativ konstant. Dies trifft insbesondere auf die Patientinnen 2, 7, 8, 12, 15, 16, 20, 29 zu. Deren Hsp70-Verläufe sind abgesehen von geringen Schwankungen

auf einem gleichbleibenden Niveau ohne deutliche Peaks (Spitzen) und ohne einen klar erkennbaren Anstieg oder Abfall.

Zudem unterscheiden sich bei den Patientinnen 9, 18, 19, 25, 27, 28, 34 und 35 die Hsp70-Konzentrationen bei t1 und t5 bzw. t6 wenig voneinander. Die Kurven dieser Patientinnen zeigen jedoch einen ungleichmäßigen Verlauf mit Peaks und Anstiegen oder Abfällen. Meist liegt die Hsp70-Serumkonzentration bei t4 oder t5 noch einmal auf einem ähnlich hohen oder höheren Niveau als bei t1. Zwischen den ersten Werten und diesem Peak zeigt sich ein U-förmiger Verlauf mit niedrigeren Hsp70-Konzentrationen. Der letzte Wert bei t6 liegt dann meist wieder auf einem niedrigeren Niveau. Bei Patientin 19 und 28 kann dieser letzte Wert nicht beurteilt werden.

Die Kurven der Patientinnen 1, 3, 4, 6 und 32 zeigen keine Peaks, hier ist jedoch eine Tendenz hin zu niedrigeren Hsp70-Werten gegen Ende der Therapie zu erkennen. Einige weitere Patientinnen zeigen ebenfalls insgesamt eher fallende Hsp70-Werte über den Verlauf der Therapie, allerdings kann hier zusätzlich ein Anstieg des Proteins nach Ende der der Bestrahlung festgestellt werden. Dazu zählen die Patientinnen 11 und 13. Ein ähnlicher Verlauf ist bei den Patientinnen 30 und 31 zu beobachten, wobei der Zwischenanstieg hier schon nach 30 Gy bei t3 stattfindet. Zudem zeigt sich bei Patientin 26 insgesamt eine fallende Kurve, allerdings ist hier der Wert bei t2 deutlich höher als zu den übrigen Zeitpunkten.

Bei vielen Frauen fällt die Konzentration des Hsp70 im Serum jedoch über den Verlauf der Zeit nicht ab, sondern steigt an. Insbesondere bei den Patientinnen 5, 10, 17, 21-23 zeigt sich ein relativ geradliniger Verlauf ohne Peaks mit steigender Tendenz. Ein grundsätzlicher Anstieg der Hsp70-Serumkonzentration, der allerdings durch einen Abfall bei t4 bzw. t5 unterbrochen ist und sich anschließend fortsetzt, kann in den Kurven der Patientinnen 14 und 24 beobachtet werden.

Insgesamt ist jedoch nicht nur der Verlauf der Hsp70-Konzentration im Serum individuell sehr unterschiedlich, sondern insbesondere auch die absoluten Werte. Betrachtet man beispielsweise die Patientinnen 15 und 16, so fällt auf, dass beide Kurven zwar einen sehr ähnlichen, gleichbleibenden Verlauf nehmen, die absolute Hsp70-Konzentration bei Patientin 15 jedoch um ca. 1 ng/ml über der von Patientin 16 liegt. Die folgende Abbildung 15 zeigt die Verteilung der Hsp70-Konzentrationen unter allen Patientinnen (n = 35) zu den sechs unterschiedlichen Zeitpunkten der Blutentnahme.

Die Linien in der Mitte der Boxen stellen dabei den Median der jeweils 35 Einzelwerte dar, die Box selbst den Interquartilsabstand. Das Ende der Antennen nach oben und unten zeigt jeweils den höchsten und den niedrigsten zu diesem Zeitpunkt gemessenen Einzelwert ohne sogenannte „Ausreißer“ an. Diese Ausreißer, deren Wert deutlich über den anderen liegt, sind durch die Punkte auf Höhe der jeweiligen Hsp70-Konzentration dargestellt.

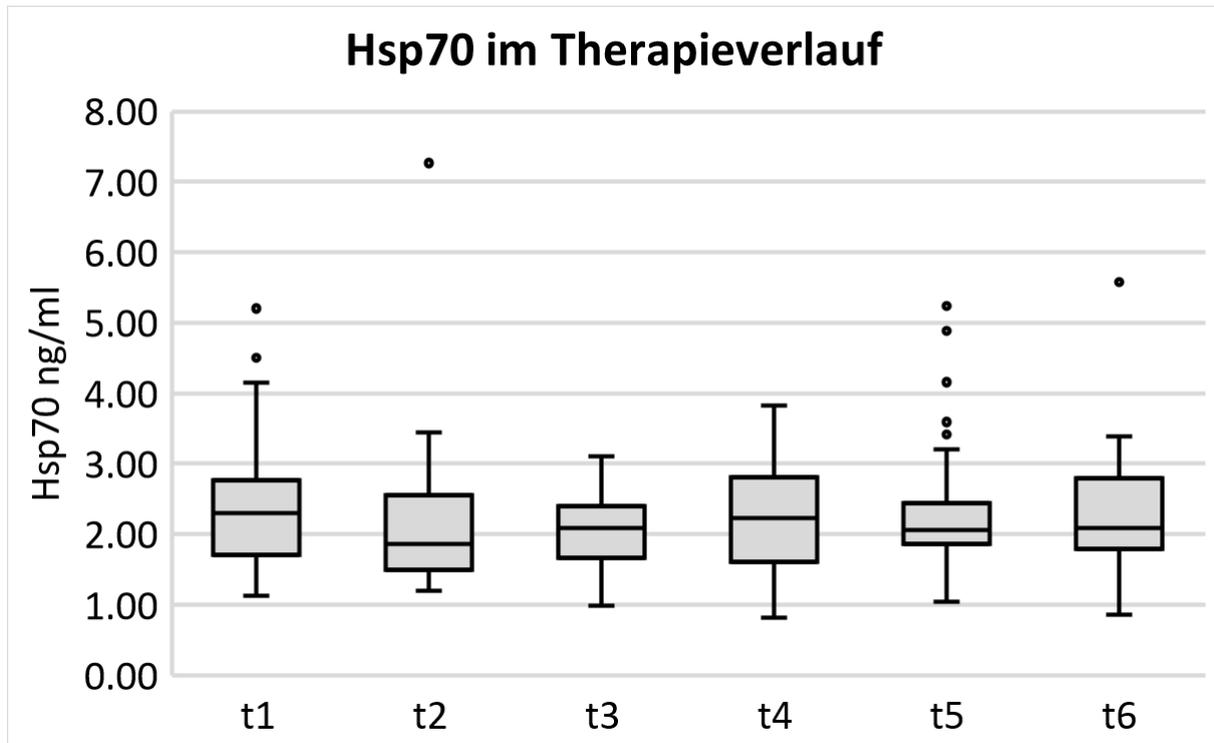


Abbildung 15: Verteilung der Hsp70-Serumkonzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Eigene Darstellung.

Hier zeigt sich, dass zwar die meisten Werte zu einem Zeitpunkt auf einem ähnlichen Niveau liegen, allerdings finden sich bei t1, t2, t5 und t6 auch Patientinnen, die eine deutlich höhere Hsp70-Konzentration im Serum aufweisen. Insbesondere bei t5 lässt sich dem Diagramm entnehmen, dass die Streuung der meisten Werte eher klein ist, weil die 25 %-Perzentile und die 75 %-Perzentile einen engen Bereich einschließen. Zu diesem Zeitpunkt gibt es jedoch auch fünf Werte, die deutlich nach oben abweichen.

Die absolute Hsp70-Konzentration im Serum liegt bei den meisten Patientinnen um 2,0 ng/ml, wobei der Median zwischen t1 und t2 abfällt, anschließend ansteigt bis t4 und danach wieder leicht rückläufig ist. Betrachtet man den hier dargestellten Median aus allen Patientinnen, sind die Unterschiede jedoch nur gering. Erst die Untersuchung der Verläufe einzelner

Patientinnen zeigt, wie individuell unterschiedlich sich das freie Hsp70 im Serum im Therapieverlauf verhält.

3.3. Assoziationen zwischen Hsp70 und klinikopathologischen Parametern

3.3.1. Alter der Patientinnen

Da das Alter der Patientinnen wie oben beschrieben große Unterschiede aufwies, wurde überprüft, ob daraus ein Einfluss auf das freie Hsp70 im Serum entsteht. Dazu wurden die Patientinnen in vier Altersgruppen (bezogen auf den Zeitpunkt der Diagnose) aufgeteilt. Die erste Gruppe umfasste acht Patientinnen in einem Alter zwischen 40 und 49 Jahren bei Diagnosestellung. In der zweiten Gruppe wurden elf Patientinnen zwischen 50 und 59 Jahren zusammengefasst. Die elf Patientinnen der dritten Gruppe waren 60 bis 69 Jahre alt und die vierte Gruppe bestand aus fünf Patientinnen ab einem Alter von 70 Jahren. In jeder Gruppe wurde der Mittelwert aus den Einzelwerten einer jeden Patientin gebildet. Um weiterhin den Verlauf der Serumkonzentration des freien Hsp70 untersuchen zu können, wurde der Mittelwert dabei für jeden der sechs Zeitpunkte getrennt ermittelt. Mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests für drei oder mehr unabhängige Stichproben wurde berechnet, ob es jeweils zum gleichen Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Mittelwerten der vier Gruppen gibt. In keinem Fall zeigte sich dabei ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ (Tabelle 13).

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach Altersgruppen.

Alter	N	t1	t2	t3	t4	t5	t6
40-49	8	2.11 _{+0.78}	2.47 _{+2.05}	1.97 _{+0.64}	1.77 _{+0.78}	2.40 _{+1.31}	2.33 _{+0.67}
50-59	11	2.56 _{+0.99}	2.11 _{+0.71}	2.17 _{+0.51}	2.55 _{+0.74}	2.33 _{+1.03}	2.07 _{+0.03}
60-69	11	2.42 _{+0.76}	2.09 _{+0.58}	2.09 _{+0.40}	2.15 _{+0.57}	2.26 _{+0.67}	2.48 _{+1.25}

> 70 5 2.51±1.62 2.14±0.95 1.77±0.54 2.43±0.88 2.36±1.18 2.29±1.09

p-Wert 0.776 0.883 0.646 0.179 0.993 0.991

Kruskal-Wallis-test

3.3.2. Charakteristika des Tumors

Bereits vor der ersten Blutentnahme war der Tumor bei allen Patientinnen R0 reseziert worden, sie waren also definitionsgemäß tumorfrei. Die folgende Untersuchung sollte zeigen, ob und wie lange Charakteristika des Mammakarzinoms wie Größe, TNM-Staging oder Grade auch nach der Operation noch einen Einfluss auf den Konzentrationsverlauf des freien Hsp70 im Serum nehmen.

Zuerst wurde die Tumorgröße betrachtet. Dazu wurden drei Gruppen gebildet, die erste mit einer Tumorgröße < 1 cm (n = 12). Die Tumorgröße in der zweiten Gruppe lag zwischen 1 cm und 2 cm (n = 20) und in der dritten Gruppe (n = 3) wurden Patientinnen mit einem Tumor > 2 cm zusammengefasst. In Abbildung 16 ist der Hsp70-Verlauf der drei Gruppen dargestellt.

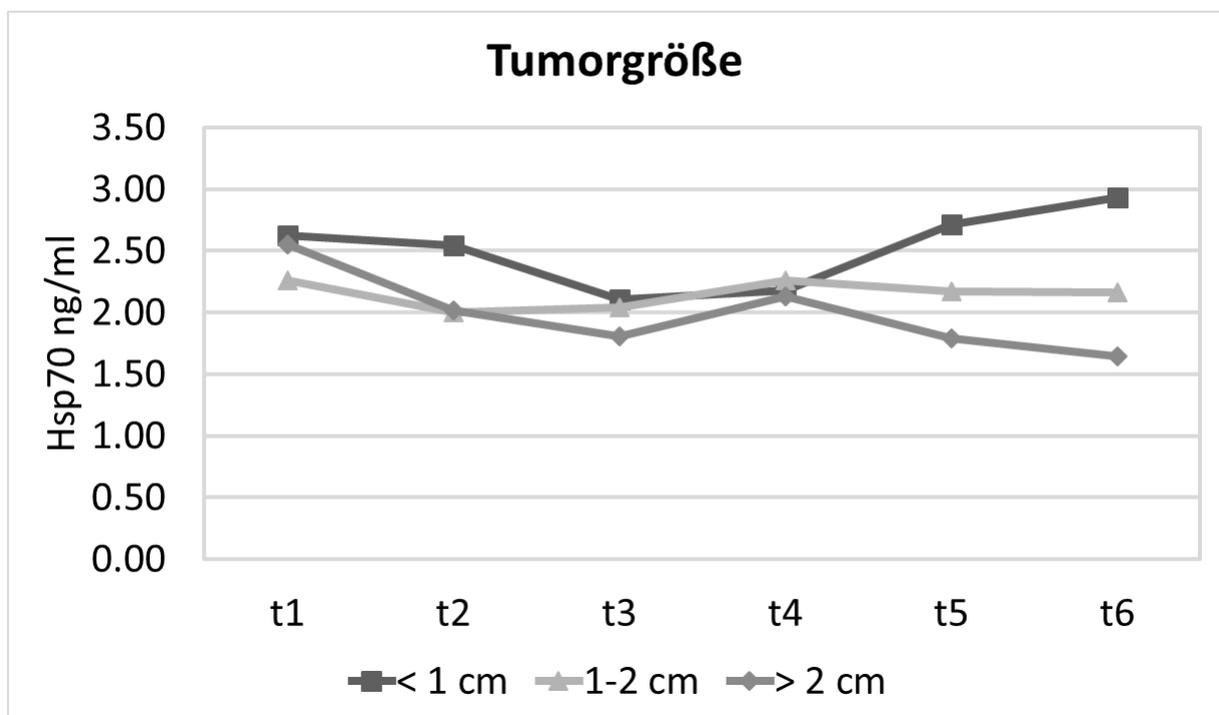


Abbildung 16: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentrationen bei Patientinnen mit präoperativ unterschiedlich großen Tumoren. Eigene Darstellung.

Während der Verlauf besonders bei Tumorgößen zwischen 1 cm und 2 cm über den gesamten Zeitraum relativ gleichmäßig ist, sind die Veränderungen bei der Gruppe mit einem Tumor > 2 cm deutlicher. Zu bedenken ist hierbei allerdings die geringe Patientenzahl (n = 3) in dieser Gruppe, wodurch kleine Veränderungen größere Auswirkungen haben können. In diesen beiden Gruppen fällt die Hsp70-Konzentration initial leicht ab, ab t2 bzw. t3 kommt es zu einem leichten Anstieg und ab t4 kommt es zu einem geringen Abfall des freien Hsp70 im Serum. Der Verlauf in der Gruppe mit kleinen Tumoren < 1 cm unterscheidet sich jedoch von dem der anderen Patientinnen. Hier ist am Anfang ebenfalls ein Abfall bis t3 zu beobachten, danach allerdings ein kontinuierlicher Anstieg, der auch ein Jahr nach Ende der Bestrahlung noch anhält. Ein Jahr nach Ende der Bestrahlung (t6) zeigten sich in der Gruppe mit den kleinsten Tumoren < 1 cm die höchsten und in der Gruppe mit den größten Tumoren > 2 cm die niedrigsten Hsp70-Werte. Der Kruskal-Wallis-Test ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Tabelle 14).

Neben der Tumorgöße ist vor allem das Staging eine relevante Untersuchung, die über die weitere Therapie und Prognose entscheidet. In das sehr verbreitete TNM-Staging fließen Informationen über Größe und Ausbreitung des Primärtumors, der Befall von regionären Lymphknoten und eventuelle Fernmetastasen ein. Da Fernmetastasen einen der Ausschlussgründe für die Studienteilnahme darstellten, sind alle Patientinnen als M0 eingestuft worden. Es gab jedoch Unterschiede bezüglich des Primärtumors und der Lymphknotenmetastasen.

Der Vergleich der Hsp70-Konzentration im Serum der Patientinnen im Stadium T1 (n = 30) mit Patientinnen im Stadium T2 (n = 5) zeigte kaum Unterschiede über den kompletten Therapieverlauf hinweg (Abbildung 17). Ein Jahr nach Ende der Bestrahlung zeigte sich mit 2,50 ng/ml ein etwas höherer Wert bei den Patientinnen im Stadium T1 gegenüber den anderen im Stadium T2 mit einem Wert von 1,74 ng/ml. Allerdings ist die Stichprobe im Stadium T2 mit fünf Patientinnen sehr klein, sodass der Unterschied nicht signifikant ist.

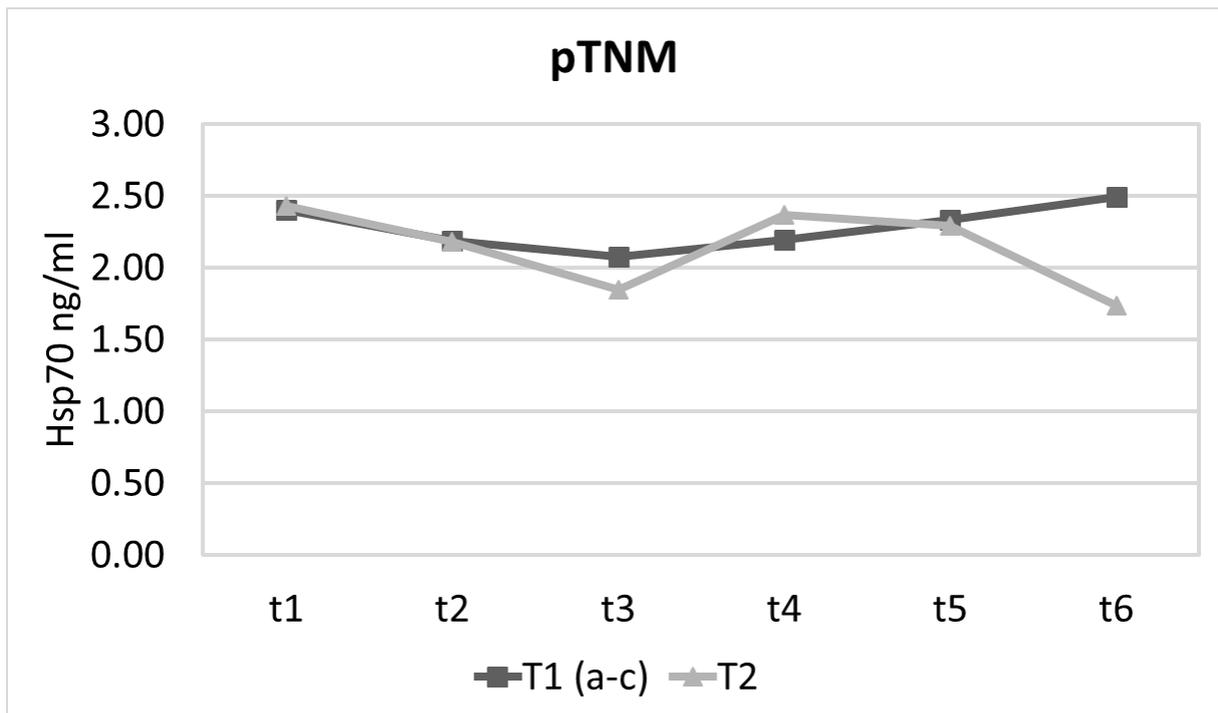


Abbildung 17: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit als T1 und T2 eingestuften Tumoren. Eigene Darstellung.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch beim Vergleich der Patientinnen anhand ihres Lymphknotenstatus (Abbildung 18). Bis t5 liegen die Mittelwerte der Gruppen im Stadium N0 (n = 30) und im Stadium N1 (n = 5) sehr nah aneinander. Der letzte Hsp70-Wert ein Jahr nach Ende der Bestrahlung liegt mit 3,23 ng/ml bei der Gruppe mit Lymphknotenmetastasen über dem Wert von 2,32 ng/ml der anderen Patientinnen. Auffällig ist, dass hier die Patientinnen mit der schlechteren Prognose bei t6 den höheren Wert haben, bei Betrachtung der Tumorausdehnung jedoch die mit der besseren Prognose. Aufgrund der auch hier sehr geringen Anzahl von Patientinnen im Stadium N1 ist der Unterschied jedoch ebenfalls nicht signifikant. Die genauen Werte und die Ergebnisse des Signifikanztests sind aus Tabelle 14 ersichtlich.

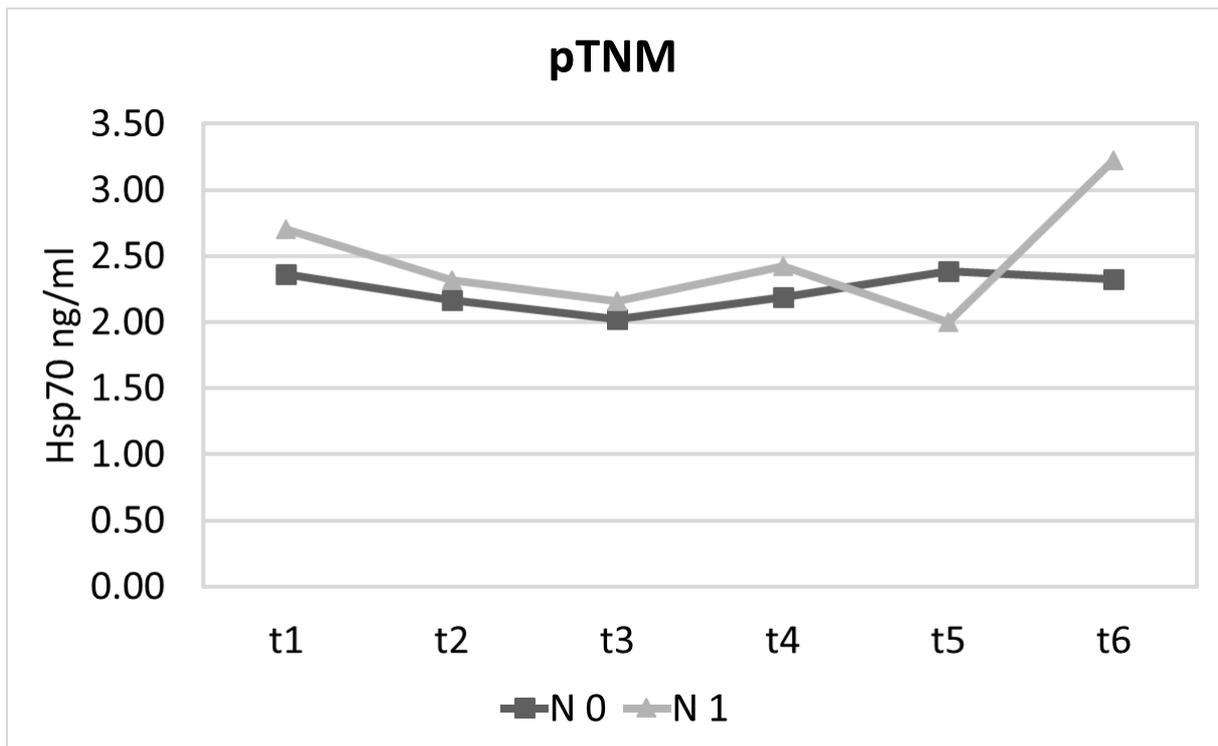


Abbildung 18: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit (N1) und ohne befallene Lymphknoten (N0). Eigene Darstellung.

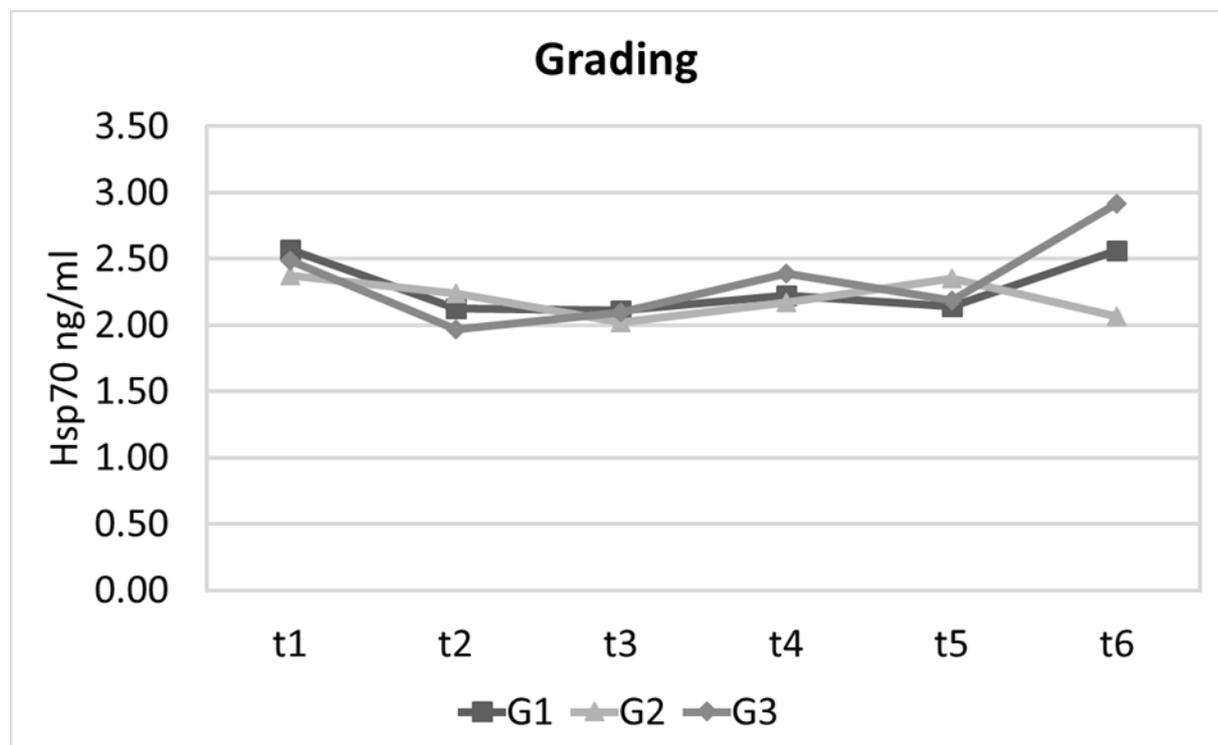


Abbildung 19: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit Grade 1-3 Tumoren. Eigene Darstellung.

Neben Tumorgöße und Staging wurde auch das Grading der Tumore berücksichtigt (Abbildung 19). Anhand der Differenzierung und der Ähnlichkeit mit dem Ursprungsgewebe

werden Tumore nach der Operation durch die Pathologie in verschiedene Grade eingeteilt. G1 steht dabei für ein gut differenziertes Gewebe, das noch relativ stark mit dem Ursprungsgewebe übereinstimmt. G2 ist weniger gut und G3 nur schlecht differenziert.

Das Grading beeinflusst auch die weitere Therapie und Prognose. Von den untersuchten Patientinnen hatten sieben einen G1 Tumor, bei 26 wurde der Tumor als G2 klassifiziert und bei 2 Patientinnen als G3.

Der Verlauf bei den Patientinnen mit G1 und G3 Tumoren zeigt einen Abfall zwischen t1 und t2, anschließend einen Anstieg bis t4 und nach einem niedrigeren Wert ein halbes Jahr nach der Bestrahlung (t5) einen erneuten Anstieg bis t6. In der Gruppe mit G2 Tumoren scheint der Verlauf verzögert zu sein. Hier steigt die Hsp70-Konzentration nach einem initialen Abfall erst ab t3 wieder an, der Anstieg bleibt jedoch bis t5. Der letzte Wert ein Jahr nach Ende der Bestrahlung (t6) ist wieder niedriger, der Anstieg in den anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt fehlt. Insgesamt lagen die Hsp70-Werte der drei Gruppen jedoch stets sehr eng beieinander und es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.

In der folgenden Tabelle 14 sind die Mittelwerte der Hsp70-Konzentration und die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Gruppen bezüglich Tumorgröße, pTNM-Stagings und Grading aufgeführt. Auch die p-Werte können der Tabelle entnommen werden.

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach Tumorgröße, TNM-Staging und Grading.

Tumorgröße (cm)	N	t1	t2	t3	t4	t5	t6
<1	12	2.62 _{+1.35}	2.55 _{+1.69}	2.11 _{+0.50}	2.18 _{+0.78}	2.71 _{+1.26}	2.94 _{+1.26}
1-2	20	2.26 _{+0.55}	2.00 _{+0.60}	2.04 _{+0.49}	2.26 _{+0.75}	2.17 _{+0.76}	2.16 _{+0.58}
>2	3	2.56 _{+1.51}	2.02 _{+0.96}	1.80 _{+0.84}	2.13 _{+0.88}	1.79 _{+0.65}	1.65 _{+0.80}
p-Wert		0.990	0.833	0.809	0.976	0.379	0.132
Kruskal-Wallis-test							

pTNM

T1 (a-c)	30	2.40 \pm 0.95	2.19 \pm 1.15	2.07 \pm 0.49	2.19 \pm 0.75	2.33 \pm 0.97	2.50 \pm 0.99
-----------------	----	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

T2	5	2.43 \pm 1.15	2.18 \pm 1.01	1.85 \pm 0.66	2.37 \pm 0.78	2.29 \pm 1.14	1.74 \pm 0.68
-----------	---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

p-Wert		1.00	0.982	0.536	0.671	0.962	0.162
---------------	--	------	-------	-------	-------	-------	-------

Mann-Whitney-U-test

N0	30	2.36 \pm 0.98	2.17 \pm 1.18	2.02 \pm 0.50	2.18 \pm 0.73	2.39 \pm 1.05	2.32 \pm 0.98
-----------	----	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

N1	5	2.70 \pm 0.84	2.32 \pm 0.73	2.16 \pm 0.63	2.42 \pm 0.94	2.00 \pm 0.13	3.23
-----------	---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------

p-Wert		0.369	0.395	0.732	0.671	0.539	0.261
---------------	--	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Mann-Whitney-U-test**Grading**

G1	7	2.57 \pm 1.52	2.13 \pm 0.76	2.11 \pm 0.67	2.22 \pm 1.06	2.14 \pm 0.49	2.56 \pm 0.70
-----------	---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

G2	26	2.38 \pm 0.83	2.24 \pm 1.26	2.02 \pm 0.50	2.17 \pm 0.70	2.35 \pm 1.12	2.07 \pm 0.66
-----------	----	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

G3	2	2.48 \pm 0.72	1.96 \pm 0.71	2.10 \pm 0.03	2.39 \pm 0.12	2.19 \pm 0.33	2.91
-----------	---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------

p-Wert		0.849	0.985	0.993	0.781	0.776	0.239
---------------	--	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Kruskal-Wallis-test**3.3.3. Einfluss der Chemotherapie**

Eine Chemotherapie geht im Allgemeinen mit ausgeprägten Nebenwirkungen einher und hat auch einen Einfluss auf das Immunsystem. Deshalb wurde untersucht, ob sich daraus konsekutiv Veränderungen der Konzentration des freien Hsp70 im Serum ergeben. Dazu wurden zwei Gruppen gebildet, von denen eine (n = 8) zusätzlich zu Operation und Bestrahlung mit einer Chemotherapie behandelt wurde. Die andere Gruppe (n = 27) erhielt

diese Therapie nicht. Zu jedem der sechs Zeitpunkte wurde in beiden Gruppen der Mittelwert aus den Einzelwerten einer jeden Patientin errechnet. Für die Berechnung des Unterschieds zwischen den beiden Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen, da es sich nur um zwei unabhängige Stichproben handelt.

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach erhaltener Chemotherapie.

Chemo- therapie	N	t1	t2	t3	t4	t5	t6
Nein	27	2.52 \pm 1.01	2.31 \pm 1.18	2.12 \pm 0.44	2.20 \pm 0.66	2.36 \pm 1.00	2.45 \pm 0.95
Ja	8	2.02 \pm 0.67	1.78 \pm 0.81	1.79 \pm 0.69	2.30 \pm 1.08	2.21 \pm 0.95	1.44 \pm 0.81
p-Wert Mann-Whitney-U-test		0.236	0.061	0.113	0.934	0.771	0.198

Wie in Tabelle 15 erkennbar, zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientinnen mit Chemotherapie und denen, die diese Therapie nicht erhalten hatten. Nach 30 Gy (t2) ist jedoch der Hsp70-Wert der Gruppe ohne Chemotherapie geringfügig höher als der der anderen Gruppe, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant. In Abbildung 20 sind die Hsp70-Werte beider Gruppen über den Therapieverlauf hinweg ersichtlich.

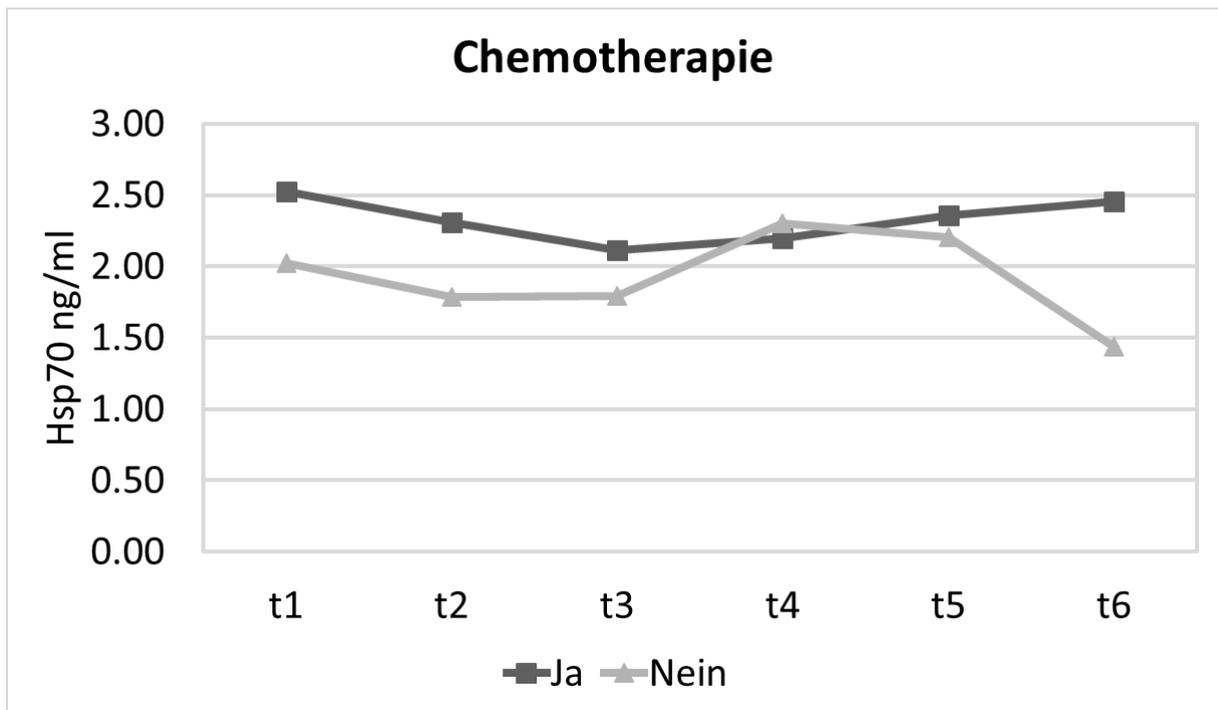


Abbildung 20: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit und ohne Behandlung durch eine Chemotherapie. Eigene Darstellung.

Auffällig ist, dass die Hsp70-Werte der Patientinnen ohne Chemotherapie über nahezu den kompletten Verlauf etwas niedriger sind als in der Gruppe, die eine Chemotherapie erhalten hatte. Nur sechs Wochen nach Ende der Bestrahlung (t4), übersteigt der Hsp70-Wert der Gruppe ohne Chemotherapie geringfügig den der anderen Patientinnen. Sechs Monate nach der Strahlentherapie (t5) ist die Hsp70-Konzentration wieder etwas niedriger, der Unterschied ist dabei jedoch sehr gering. Insgesamt fällt die Hsp70-Konzentration in der Gruppe ohne Chemotherapie ab t4 deutlich ab, wohingegen sie in der anderen Gruppe nach einem anfänglichen Abfall bereits ab t3 wieder ansteigt. Dennoch sind die Unterschiede zu keiner Zeit statistisch signifikant.

3.3.4. Einfluss der Strahlendosis

Die Therapie der Patientinnen unterschied sich nicht nur in der Gabe von Chemotherapeutika, sondern auch bezüglich der Strahlendosis, der die Brust nach der Operation ausgesetzt wurde. Die meisten Patientinnen erhielten eine Gesamtdosis von 60 Gy (n = 27), drei Patientinnen wurden mit nur 40 Gy bestrahlt und bei fünf Patientinnen betrug die Gesamtdosis 66 Gy. In der Gesamtdosis enthalten ist der Boost, eine selektive Bestrahlung der Region, wo der Tumor vor der Operation lokalisiert war. Bis auf fünf Patientinnen wurden alle Frauen mit einem

solchen Boost bestrahlt, in den meisten Fällen mit einer Gesamtdosis von 10 Gy (n = 25), die übrigen fünf Patientinnen erhielten einen Boost von 16 Gy. Die entsprechenden Verläufe der Hsp70-Serumkonzentration können Abbildung 21 entnommen werden.

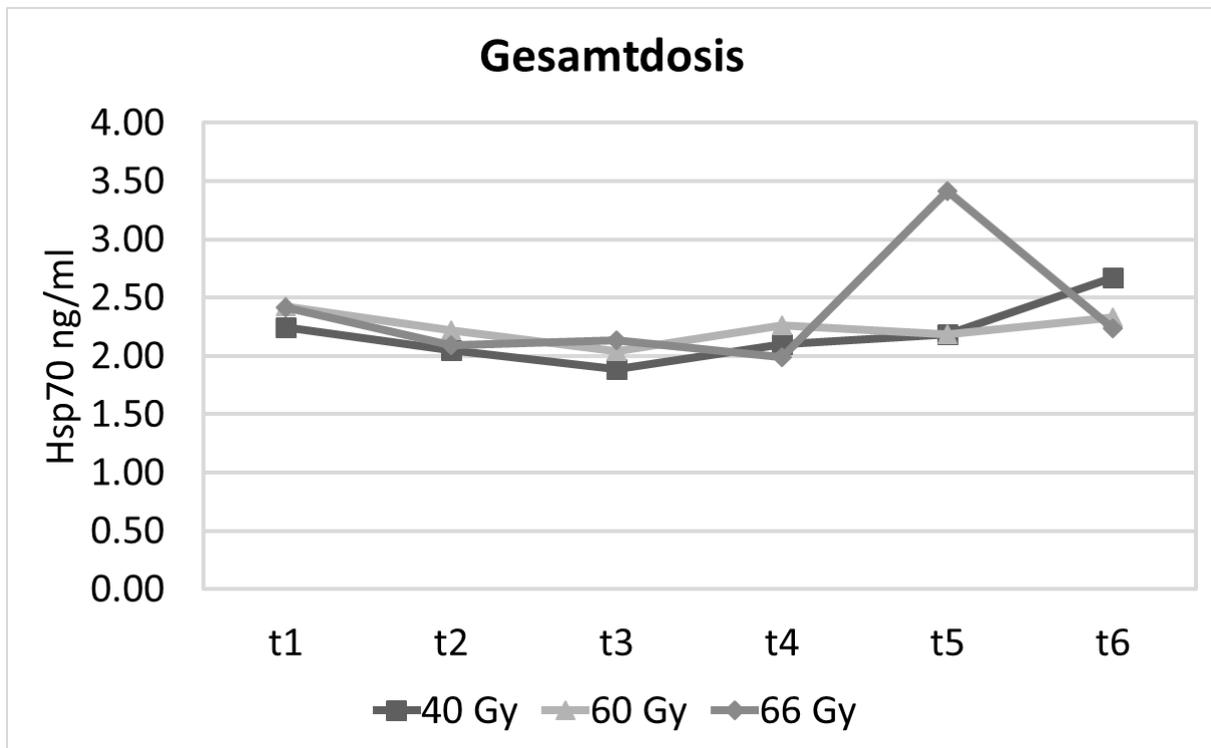


Abbildung 21: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen, die mit unterschiedlichen Strahlendosen bestrahlt wurden. Eigene Darstellung.

In diesem Diagramm ist deutlich erkennbar, dass der Hsp70-Verlauf in allen drei Gruppen nahezu identisch ist. Die einzige Ausnahme bildet hier ein höherer Wert zum Zeitpunkt t5. Dieser Mittelwert kommt durch eine höhere Hsp70-Konzentration im Serum von nur zwei der fünf Patientinnen zustande. Bei den anderen Patientinnen in dieser Gruppe ist der Wert zum Zeitpunkt t5 nicht wesentlich höher als zu den anderen Zeitpunkten, daher ist der Unterschied hier nicht statistisch signifikant. Zur letzten Blutentnahme (t6) erreicht der Mittelwert auch dieser Gruppe wieder ein ähnliches Niveau wie in den beiden anderen Gruppen.

Ein Vergleich der verschiedenen Strahlendosen, die im Rahmen des Boosts appliziert wurden, zeigt ein sehr ähnliches Bild. Die Patientinnen mit einem Boost in einer Dosis von 16 Gy sind identisch mit denen, die 66 Gy als Gesamtdosis erhielten. Daher sind auch hier die Hsp70-Konzentrationen der beiden Gruppen bis auf einen höheren Wert (t5) der Gruppe, die mit einem Boost von 16 Gy bestrahlt wurde, wieder sehr ähnlich in ihrem Verlauf.

In der folgenden Tabelle 16 sind die genauen Hsp70-Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Gesamtdosis und der Dosis des Boosts sowie die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Signifikanztests dargestellt.

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach erhaltener Gesamtdosis und Dosis einer eventuellen Teilbrustbestrahlung in Form eines Boosts.

Gesamtdosis (Gy)	N	t1	t2	t3	t4	t5	t6
40	3	2.24 _{+0.67}	2.05 _{+0.36}	1.88 _{+0.22}	2.10 _{+0.45}	2.19 _{+0.29}	2.67 _{+0.71}
60	27	2.42 _{+0.95}	2.22 _{+1.21}	2.04 _{+0.55}	2.27 _{+0.82}	2.18 _{+0.77}	2.33 _{+1.07}
66	5	2.41 _{+1.30}	2.10 _{+1.02}	2.13 _{+0.47}	1.99 _{+0.28}	3.42 _{+1.91}	2.24 _{+0.72}
p-Wert		0.947	0.838	0.719	0.921	0.629	0.597
Kruskal-Wallis-test							
Gesamtdosis							
Boost (Gy)							
0	5	3.20 _{+1.80}	2.31 _{+0.47}	2.14 _{+0.26}	2.72 _{+0.55}	2.62 _{+0.69}	2.79 _{+0.61}
10	25	2.30 _{+0.80}	2.20 _{+1.25}	2.02 _{+0.56}	2.21 _{+0.82}	2.12 _{+0.76}	2.30 _{+1.13}
16	5	2.41 _{+1.30}	2.10 _{+1.02}	2.13 _{+0.47}	1.99 _{+0.28}	3.42 _{+1.91}	2.24 _{+0.72}
p-Wert		0.638	0.598	0.853	0.480	0.429	0.351
Kruskal-Wallis-test							

3.4. Assoziation zwischen Hsp70 und dem klinischen Outcome

Diese Arbeit hat die Erforschung von freiem Hsp70 im Serum als potenziellem Biomarker für das klinische Outcome von Brustkrebspatientinnen zum Ziel. Daher wurde mehrere Jahre nach

Ende der Bestrahlung der Gesundheitsstatus der Patientinnen überprüft. In 18 Fällen konnte das Outcome fünf Jahre nach Ende der Bestrahlung bestimmt werden, in weiteren 15 Fällen nach vier Jahren und bei zwei Patientinnen lagen zwischen der Bestrahlung und der Untersuchung des Outcomes drei Jahre.

Bei fünf Patientinnen war die Ermittlung des Outcomes leider nicht möglich, sodass deren Hsp70-Werte nicht in die Berechnungen einbezogen wurden. Insgesamt blieben 32 der 35 Patientinnen nach der Behandlung bis zur aktuellsten Nachsorgeuntersuchung tumorfrei. Eine Patientin entwickelte innerhalb von zwei Jahren ein Mammakarzinom der kontralateralen Brust, bei einer weiteren Patientin bildeten sich im gleichen Zeitraum Fernmetastasen. Eine dritte Patientin erkrankte innerhalb von zwei Jahren an einem Endometriumkarzinom, erlitt jedoch keinen Rückfall des Mammakarzinoms. In Abbildung 22 wurden die langfristig tumorfreien Patientinnen gemeinsam mit der Patientin, die das Endometriumkarzinom entwickelt hatte, zu einer Gruppe (n = 33) zusammengefasst. Diese Patientin wurde mit einer Hormontherapie behandelt, die das Risiko für Endometriumkarzinome erhöht. Daher ist davon auszugehen, dass dieser Krebs nicht direkt mit dem Brustkrebs in Verbindung steht. Zudem unterschieden sich die Hsp70-Werte der Patientin nicht von denen der anderen Frauen ohne Rezidiv oder Metastasen.

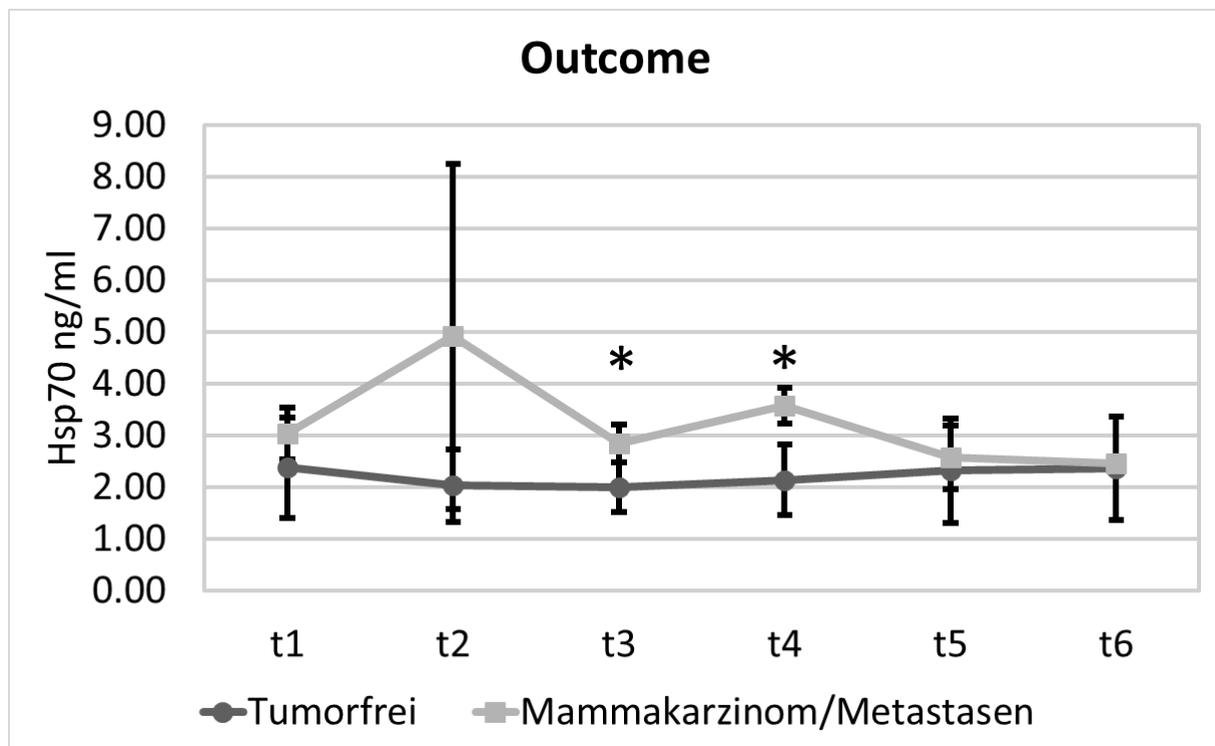


Abbildung 22: Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration bei Patientinnen mit unterschiedlichem Outcome. Eigene Darstellung.

Über den gesamten Therapieverlauf ist der Mittelwert der Hsp70-Konzentration der Gruppe mit ungünstigem Outcome höher als im Kollektiv der tumorfreien Patientinnen. Erst ein Jahr nach Ende der Bestrahlung gleichen sich die Werte an (t6). Insbesondere nach 30 Gy (t2) fällt ein hoher Peak in der Gruppe der Patientinnen mit einem Rückfall des Mammakarzinoms oder Metastasen auf. Sechs Wochen nach der Bestrahlung (t4) zeigt sich ein erneuter Anstieg in dieser Gruppe, zu diesem Zeitpunkt mit deutlich geringerer Standardabweichung als bei t2.

Mit zwei Patientinnen ist die Gruppe derer, die einen Rückfall des Mammakarzinoms bzw. Metastasen entwickelt haben, sehr klein. Dennoch zeigt der Vergleich mit den Patientinnen, die keinen Rückfall erlitten haben, direkt nach Ende der Strahlentherapie (t3) und auch noch sechs Wochen später (t4) einen statistisch signifikanten Unterschied im Hsp70-Serumspiegel ($p_{t3} = 0,03$ und $p_{t4} = 0,007$). In diesem Zeitraum ist das freie Hsp70 im Serum der Patientinnen mit ungünstigem Outcome deutlich höher konzentriert als bei den Patientinnen, die tumorfrei blieben. Eine der beiden Frauen hatte auch nach 30 Gy (t2) schon einen ausgesprochen hohen Wert, bei der anderen schien die Hsp70-Serumkonzentration jedoch erst etwas später anzusteigen. In Verbindung mit der geringen Stichprobengröße ist die Standardabweichung bei t2 daher vergleichsweise hoch und der Unterschied zu den tumorfreien Patientinnen nicht statistisch signifikant ($p_{t2} = 0,08$). Alle Werte und die p-Werte können Tabelle 17 entnommen werden.

Tabelle 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hsp70-Konzentration, eingeteilt nach dem Outcome der Patientinnen.

Outcome	N	t1	t2	t3	t4	t5	t6
Tumorfrei	33	2.37±0.97	2.02±0.70	1.99±0.48	2.13±0.68	2.31±1.00	2.36±0.99
Mamma- karzinom/ Metastasen	2	3.04±0.50	4.91±3.34	2.84±0.37	3.58±0.35	2.58±0.62	2.45
p-value (Mann-Whitney-U-Test)		0.215	0.084	0.030	0.007	0.392	0.957

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt auf, wie sich die Konzentration des im Serum gelösten Hsp70 im Verlauf der Strahlentherapie verändert. Davon ausgehend soll die Frage beantwortet werden, ob der individuelle Verlauf von Hsp70 im Serum als prognostischer Marker für das Outcome bei lokal begrenztem Brustkrebs in Frage kommt. Dazu wurden 40 Brustkrebspatientinnen in die Studie aufgenommen, davon konnte bei 35 Patientinnen der Gesundheitszustand mindestens drei Jahre nach Ende der Strahlentherapie untersucht werden. Von diesen erlitt eine Frau innerhalb von zwei Jahren ein erneutes Mammakarzinom der kontralateralen Brust. Bei einer weiteren Patientin entwickelten sich im gleichen Zeitraum Metastasen des Mammakarzinoms. Der Vergleich dieser beiden Patientinnen mit den 33 übrigen Frauen, die tumorfrei geblieben waren, zeigt direkt nach Ende der Strahlentherapie und auch sechs Wochen später noch signifikant erhöhte Hsp70-Konzentrationen im Serum der Patientinnen mit ungünstigem Outcome.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Unterschied der Hsp70-Serumkonzentration durch einen Störfaktor zustande kommt, wurden innerhalb des Patientenkollektivs die Hsp70-Werte in unterschiedlichen Gruppen verglichen. Insbesondere wurde dabei das Alter als möglicher Störfaktor betrachtet, aber auch Charakteristika des Tumors wie Größe, Staging und Grading sowie der mögliche Einfluss einer zusätzlichen Chemotherapie oder unterschiedlicher Strahlendosen.

Die Betrachtung der unterschiedlichen Altersgruppen der Patientinnen ergab keine signifikanten Unterschiede. Daraus lässt sich schließen, dass in diesem Kollektiv das Alter keinen Einfluss auf die Konzentration des freien Hsp70 im Serum nimmt und der Unterschied zwischen den Patientinnen mit unterschiedlichem Outcome nicht durch das Alter bestimmt wird. Zwar nimmt im Alter die Konzentration des freien Hsp70 im Serum ab (Njemini et al. 2011), allerdings betrug das Alter im untersuchten Patientenkollektiv im Mittel 58,9 Jahre und lag damit deutlich unter dem mittleren Alter von 83,3 Jahren im Patientenkollektiv von Njemini et al. Das Alter scheint sich in diesem Bereich noch nicht auf das freie Hsp70 im Serum auszuwirken. Bei noch etwas jüngeren Frauen im Alter von 41,5 Jahren im Mittel konnte gezeigt werden, dass das Alter in diesem gesunden Kollektiv keinen Einfluss auf die Hsp70 Konzentration im Serum hat (Knape 2017).

Neben dem Alter wurden auch verschiedene Charakteristika des Tumors und deren Einfluss auf das freie Hsp70 im Serum untersucht. Sowohl bei Brustkrebs als auch bei anderen Tumorentitäten konnte bereits ein Zusammenhang zwischen hohen Hsp70-Konzentrationen und dem Staging, Grading und der Prognose festgestellt werden (Ciocca und Calderwood 2005; Calderwood et al. 2006). Die präoperative Größe des Tumors scheint im beobachteten Patientenkollektiv dagegen keinen Einfluss auf den Verlauf der Hsp70-Serumkonzentration zu nehmen. Zu keinem Zeitpunkt wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem freien Hsp70 im Serum von Patientinnen mit unterschiedlich großen Tumoren festgestellt. Bei einigen Tumorentitäten ist jedoch eine positive Korrelation zwischen der Tumorgöße und der Hsp70-Konzentration bekannt. Beispielsweise wurde ein solcher Zusammenhang beim Nicht-Kleinzelligen Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom der Lunge gezeigt (Gunther et al. 2015), ebenso im Mausmodell bei Kopf-Hals-Tumoren und Pankreaskarzinomen (Bayer et al. 2014). Auch das TNM-Staging, in das neben der Größe und Ausdehnung des Tumors auch Lymphknotenstatus und das Vorhandensein von Fernmetastasen einfließen, wurde untersucht. Da Fernmetastasen als Ausschlussgrund für die Studie galten und folglich alle Patientinnen M0 klassifiziert wurden, konnte dieser Aspekt nicht betrachtet werden. Der Vergleich von Patientinnen im Stadium T1 und T2 zeigt einen höheren Hsp70-Wert der T1-Patientinnen ein Jahr nach Ende der Bestrahlung (t6). Auch hier war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Dabei ist zu bedenken, dass bereits vor der ersten Blutentnahme die R0 Resektion des Mammakarzinoms stattgefunden hatte und die Patientinnen daher über den gesamten Zeitraum der Blutentnahmen hinweg definitionsgemäß tumorfrei waren. Daher ist davon auszugehen, dass sich das im Serum gelöste Hsp70 nach Resektion des Tumors und Abheilung der Operationswunde bereits vor der ersten Blutentnahme wieder normalisiert hat.

Auch der Vergleich der Hsp70-Werte zwischen Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen und Patientinnen, die als N1 eingestuft wurden, zeigte keine signifikanten Unterschiede. Allerdings lagen die mittleren Hsp70-Werte in der Gruppe mit Lymphknotenmetastasen bis auf t5 kontinuierlich minimal über den Werten der anderen Gruppe, der größte Unterschied zeigt sich bei t6. Da nur eine einzige der fünf N1-klassifizierten Patientinnen ein Jahr nach Ende der Bestrahlung (t6) zur Blutentnahme zur Verfügung stand, ist dieser letzte Wert allerdings wenig aussagekräftig. Möglicherweise gibt es jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenstatus und dem freien Hsp70 im Serum insbesondere kurz nach der Operation. Für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das

im Tumor exprimierte Hsp70 positiv mit Lymphknotenmetastasen korreliert (Noguchi et al. 2002), dagegen scheint etwa bei kolorektalen Karzinomen kein solcher Zusammenhang zu bestehen (Bauer et al. 2012). Da die Stichprobe mit fünf Patientinnen im Stadium N1 aber ausgesprochen klein ist und zudem nur die Konzentration des freien Hsp70 im Serum gemessen wurde, nicht aber die Expression des Proteins im Tumor selbst, kann daraus nicht auf eine Korrelation zwischen der Hsp70-Konzentration und dem Lymphknotenstatus bei Brustkrebspatientinnen geschlossen werden. Hierfür sind weitere Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv und der Bestimmung des im Tumor exprimierten Hsp70 notwendig.

In Bezug auf die Fragestellung, ob das freie Hsp70 im Serum als prognostischer Marker für das Outcome bei Brustkrebs fungieren kann, ist neben dem möglichen Einfluss der zuvor beschriebenen Parameter auch eine Veränderung der Hsp70-Konzentration in Folge der Therapie auszuschließen. Bisherige Forschungen zeigen, dass zellulärer Stress in vielerlei Hinsicht zu einer gesteigerten intrazellulären Hsp70-Produktion und dem Einbau des Proteins in die Plasmamembran führt. Ausgehend davon können Zellen membrangebundenes Hsp70 in Form von Vesikeln aktiv freisetzen (Vega et al. 2008; Gastpar et al. 2005). Insbesondere freies, nicht an Membranen gebundenes Hsp70 kann zudem passiv durch Zelllyse im Rahmen von Nekrose (Basu et al. 2000) in den Extrazellulärraum gelangen. Im Rahmen von aggressiven Radiochemotherapien vor Stammzelltransplantationen konnte jedoch gezeigt werden, dass kein Zusammenhang zwischen der Therapie und dem Anstieg von freiem Hsp70 besteht (Mirza et al. 2016). Da Hsp70 vor allem in Tumorzellen in einer hohen Konzentration vorkommt (Radons 2016), wird vorrangig bei der Nekrose dieser Zellen viel Hsp70 freigesetzt. Nachdem die Patientinnen aber vor Bestimmung der Hsp70-Werte operiert wurden und sowohl während der Bestrahlung als auch während der adjuvanten Chemotherapie tumorfrei waren, kam es nicht zur Lyse von Tumorzellen. Da normal ausdifferenzierte Zellen deutlich weniger Hsp70 produzieren und bei Nekrose freisetzen, ist kein Unterschied zu erkennen zwischen den Patientinnen mit und ohne adjuvante Chemotherapie. Auch die Dosis der Strahlentherapie scheint bei tumorfreien Patientinnen die Hsp70-Konzentration im Serum nicht zu beeinflussen.

Da somit die vorgenannten Parameter als Störfaktoren ausgeschlossen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass weder das Alter der Patientinnen noch die Charakteristika des

Tumors oder die Therapieunterschiede die Ursache für die höheren Hsp70-Werte bei schlechtem Outcome sind. In Anbetracht der Tatsache, dass die Patientinnen nach R0 Resektion tumorfrei waren, stammt das mithilfe des ELISAs quantifizierte extrazelluläre Hsp70 mit größter Wahrscheinlichkeit nicht von Tumorzellen, sondern ist möglicherweise im Rahmen einer chronischen Entzündung, die nach Ende der Bestrahlung für mindestens sechs Wochen anhält, in seiner Konzentration erhöht. Hsp70 gehört zur Gruppe der sogenannten Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs), die normalerweise im Zytosol im Inneren der Zelle lokalisiert sind. Im Rahmen entzündlicher Prozesse und konsekutiver Zellschädigung werden diese DAMPs jedoch ins extrazelluläre Milieu freigesetzt (Scaffidi et al. 2002) und interagieren dort auf vielfältige Art und Weise mit dem Immunsystem (Pandolfi et al. 2016; Kaczmarek et al. 2013). Es liegt nahe, dass die Prozesse, die zur vermehrten Freisetzung von Hsp70 geführt haben, auch eine gesteigerte Sekretion weiterer DAMPs zur Folge haben.

Eine wichtige Rolle spielt beispielsweise das High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1), das aktiv und passiv in den Extrazellulärraum freigesetzt werden kann. Dort kann das Molekül, ebenso wie Hsp70 und andere DAMPs, beispielsweise durch Interaktion mit den Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2, 4 und 9 zu einer Stimulation des angeborenen Immunsystems führen (Tsung et al. 2014). Normalerweise ist HMGB1, bei dem es sich um ein chromatingebundenes Nicht-Histon-Protein handelt, im Zellkern lokalisiert und fungiert als Transkriptionsfaktor, indem es durch seine hohe DNA-Affinität Konformationsänderungen induziert (Klune et al. 2008). Diese Funktion wird durch die Molekülstruktur des Proteins ermöglicht, die aus zwei verschiedenen, jeweils aus ca. 80 Aminosäuren bestehenden Boxen besteht (Weir et al. 1993). Sobald HMGB1 jedoch in den Extrazellulärraum freigesetzt wird, ändert sich seine Funktion. Insbesondere mithilfe der B-Box wirkt es dann proinflammatorisch (Klune et al. 2008). Im Rahmen der Therapie von Brustkrebs spielt HMGB1 eine weitere wichtige Rolle: Es moduliert die Bindung von Hormontherapeutika an den Östrogenrezeptor. Die HMGB1-Konzentration könnte somit einen Einfluss auf das Ansprechen der Hormontherapie nehmen (Flohr et al. 2001). Konkret wird durch intrazelluläres HMGB1 die Bindung des Östrogenrezeptors an die DNA gefördert (Kang et al. 2013), was zu einer verstärkten Restwirkung des verbleibenden Östrogens bzw. der nicht blockierten Östrogenrezeptoren auf das hormonabhängige Tumorstadium führen kann. Beide Patientinnen, die später erneut an Brustkrebs erkrankten bzw. Metastasen entwickelten, wurden mit einer Hormontherapie behandelt. Möglicherweise ist das ungünstige Outcome zumindest teilweise darin begründet, dass diese Hormontherapie

angesichts der chronischen Entzündung bei diesen Patientinnen und der konsekutiv erhöhten Konzentration an HMGB1 ihre Wirkung nicht optimal entfalten konnte. Dabei muss jedoch zwischen intrazellulärem und extrazellulärem HMGB1 unterschieden werden: Ein starker Anstieg des extrazellulären HMGB1 als Reaktion auf eine neoadjuvante Chemotherapie stellte sich in einer kleineren Studie als möglicher prognostischer Marker für ein verbessertes Gesamtüberleben dar (Exner et al. 2016).

Auch Hsp70 erfüllt seine Funktionen normalerweise intrazellulär. Als molekulares Chaperon unterstützt es die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine und kann fehlgefaltete Proteine wieder in einen ungefalteten Zustand versetzen, sodass eine erneute, korrekte Faltung ermöglicht wird. Zudem wirkt es antiapoptotisch (Radons 2016). Auch im Zusammenhang mit der Strahlentherapie beispielsweise bei Brustkrebs spielt Hsp70 eine wichtige Rolle, indem es dazu beiträgt, die durch die Bestrahlung und die konsekutiv entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzierten zellulären Schäden zu reparieren. Infolge der Bestrahlung steigt daher auch die Konzentration an Hsp70 im Zellinneren (Multhoff et al. 2015). Anhand von Kopf-Hals-Tumorzellen konnte eine Korrelation zwischen hoher Hsp70-Konzentration und besserem Überleben der Zellen nach Bestrahlung und sogar eine gesteigerte Proliferation nach Bestrahlung mit geringen Dosen gezeigt werden (Muschter et al. 2018). Wenn es aktiv oder passiv von gestressten oder nekrotischen Zellen freigesetzt wird, erfüllt extrazelluläres Hsp70 dagegen in erster Linie immunmodulatorische Funktionen. Besonders wichtig dabei sind die Interaktion mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Multhoff et al. 1999; Gastpar et al. 2004) und die Aktivierung von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (Milani et al. 2002). Tumorantigene werden intrazellulär an Hsp70 gebunden und nach Freisetzung des Proteins und Aktivierung der dendritischen Zelle über deren MHC I-Rezeptor den CD8⁺ T-Lymphozyten präsentiert (Arnold-Schild et al. 1999). Auch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise IL-1 α , IL-1 β , IL6 und IL-8 wird getriggert, so dass Hsp70 nicht nur vermehrt freigesetzt wird im Rahmen entzündlicher Prozesse, sondern diese wiederum auch selbst aufrechterhalten und sogar verstärken kann (Hulina et al. 2017; Asea et al. 2000). Insgesamt kann ein inflammatorisches Milieu daher sowohl die Ursache einer erhöhten extrazellulären Konzentration von Hsp70 und anderen DAMPs sein als auch deren Folge.

Anhand der für mindestens sechs Wochen nach Ende der Bestrahlung anhaltenden erhöhten Hsp70-Konzentration im Serum der beiden Patientinnen mit ungünstigem Outcome kann angenommen werden, dass sich bei ihnen eine chronische Entzündung entwickelt hat. Kurzfristig kann die erhöhte Konzentration an DAMPs, die damit verbundene erhöhte Aktivität des Immunsystems und die Unterstützung von Reparaturmechanismen protektiv wirken und vor Zellentartung und Tumor schützen (Pandolfi et al. 2016; Hernandez et al. 2016).

Besteht ein solches proinflammatorisches Mikromilieu allerdings im Sinne einer chronischen Entzündung über einen längeren Zeitraum, kehrt sich dessen schützende Wirkung ins Gegenteil um und fördert über verschiedene Mechanismen das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren, insbesondere auch bei Brustkrebs (Jiang und Shapiro 2014). Das Modell von Klee et al. 2017 geht dabei wie in Abbildung 23 dargestellt von zwei Grenzkonzentrationen aus: eine erhöhte, aber nicht exzessiv erhöhte Konzentration an DAMPs schützt durch eine verstärkte Immunaktivität vor Entstehung und Fortschreiten maligner Erkrankungen. Bei Überschreiten einer zweiten Konzentrationsgrenze, also bei unkontrollierter Freisetzung und Aktivität von DAMPs im Rahmen einer chronischen Entzündung, überwiegen die negativen Effekte der Inflammation und das Risiko für Rezidive und Metastasen steigt an (Klee et al. 2017).

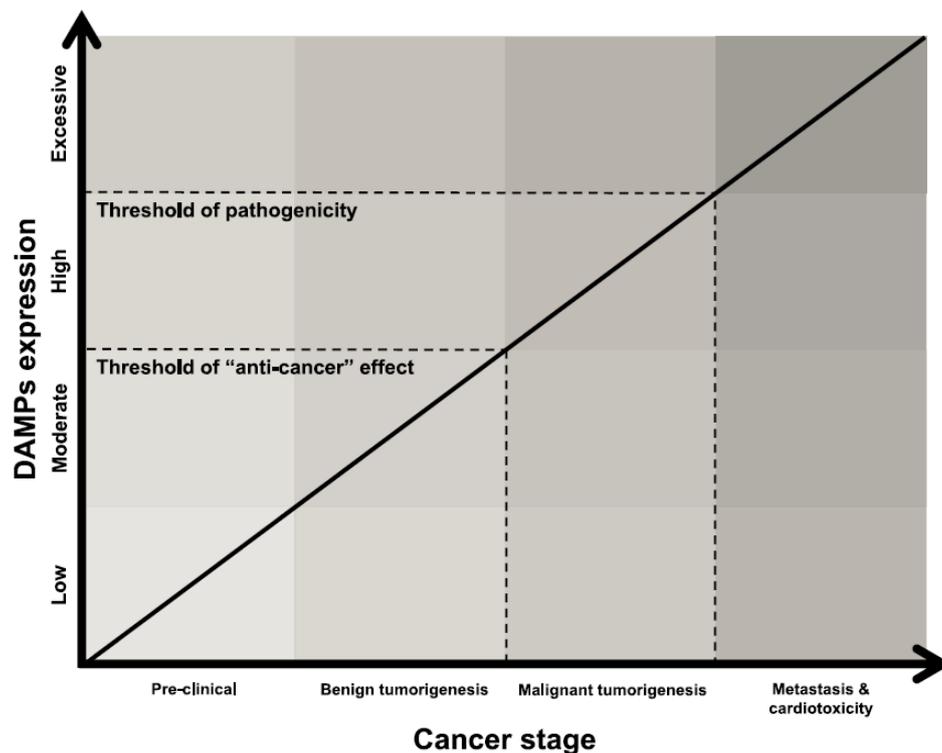


Abbildung 23: Grenzkonzentrationen an DAMPs mit protektiver bzw. tumorfördernder Wirkung (Klee et al. 2017).

Bei der Tumorentstehung im Zusammenhang mit chronischen Entzündungen spielen verschiedene Zytokine eine Rolle. Besonders hervorzuheben sind dabei $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-10 und $\text{TGF}\beta$ (Landskron et al. 2014). Auch verschiedene Transkriptionsfaktoren werden im entzündlichen Milieu verstärkt gebildet und tragen zur Tumorentstehung bei. Dazu gehören beispielsweise NF κ B (Karin und Greten 2005) und STAT3 (Yu et al. 2007), die wiederum durch IL-6 aktiviert werden können (Ghosh und Ashcraft 2013). Bei Östrogenrezeptor-positiven Tumoren besteht eine positive Korrelation zwischen IL-6 und dem TNM-Staging (Madeddu et al. 2014), was für die tumorfördernden Eigenschaften des Zytokins spricht. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 β in rezidierten Mammakarzinomen in besonders hoher Konzentration vorhanden sind, verglichen mit Carcinomata in situ und nicht rezidierten Tumoren (Soria et al. 2011). Der Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ konnte zudem eine epithelial-mesenchymale Transition in den Krebszellen auslösen (Soria et al. 2011), die einen obligaten Schritt auf dem Weg zur Migration und Metastasierung darstellt.

Im Zusammenhang mit Brustkrebs ist zudem die durch ein langfristig bestehendes inflammatorisches Milieu ausgelöste endokrine Resistenz zu bedenken, wodurch die Wirksamkeit einer antihormonellen Therapie abnimmt und in der Folge die Prognose verschlechtert wird. Über verschiedenste Mechanismen kommt es dabei zu einer abnehmenden Östrogenabhängigkeit der Tumorzellen (Murray et al. 2015; AlFakeeh und Brezden-Masley 2018). Im Vergleich zu gesundem Brustgewebe konnten in Mammakarzinomen verschiedene Zytokine in einer deutlich erhöhten Konzentration festgestellt werden, wobei insbesondere IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β and $\text{TNF}\alpha$ außerdem in Östrogenrezeptor-negativen Tumoren stärker exprimiert wurden. Dies scheint allerdings eher das Resultat einer negativen Regulierung dieser Zytokine durch den Östrogen- und Progesteronrezeptor zu sein als die Ursache der Rezeptornegativität (Chavey et al. 2007). Vor allem IL-10 wirkt jedoch sehr komplex und über unterschiedliche Mechanismen sowohl fördernd als auch hemmend auf das Tumorstadium (Sheikhpour et al. 2018). Wie sich die Östrogenabhängigkeit der Patientinnen unserer Studie nach der Erstdiagnose weiterentwickelt hat, ist leider nicht bekannt. Es ist jedoch gut möglich, dass die Rezidiventstehung bei zwei Patientinnen auch mit einer Abnahme des Rezeptors und verminderter Wirkung der antihormonellen Therapie verbunden ist.

Im Rahmen chronischer Entzündungen verändert sich das Mikromilieu aber nicht nur durch die erwähnten Zytokine, sondern es entstehen zudem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffradikale. Unter normalen Umständen können diese durch antioxidative Schutzmechanismen eliminiert werden. Wenn jedoch mehr ROS entstehen, als abgebaut werden können, kommt es zu oxidativem Stress der Zellen. In der Folge entstehen Schäden der DNA und anderer Zellbestandteile, was das Risiko einer malignen Entartung deutlich erhöht (Wu et al. 2014). Allerdings muss dabei zwischen kurzfristigen und langfristigen Expositionen unterschieden werden. Während verschiedene Krebstherapien, insbesondere Chemotherapie und Strahlentherapie, die Exposition mit ROS kurzfristig stark erhöhen, um die Tumorzellen zu schädigen, ist die Exposition im Rahmen einer chronischen Entzündung deutlich langfristiger und meist niedriger. In vitro führte eine kurzzeitige Exposition mit ROS zu einem Rückgang von Brustkrebszellen, wohingegen das Zellwachstum zunahm, wenn die Zellen über einen längeren Zeitraum ROS ausgesetzt waren (Mahalingaiah und Singh 2014). Darüber hinaus führte die längerfristige Exposition mit ROS bei der gleichen Zelllinie auch zur Resistenzentwicklung gegenüber Doxorubicin (Cen et al. 2016). Eine der Patientinnen in unserer Studie, die zwei Jahre nach Ende der Strahlentherapie erneut an einem Mammakarzinom erkrankte, wurde mit einer Chemotherapie behandelt. Sie erhielt kein Doxorubicin, sondern den sehr ähnlichen Wirkstoff Epirubicin in Kombination mit Cyclophosphamid und Paclitaxel. Da die Chemotherapie vor Beginn der Strahlentherapie abgeschlossen war, ist jedoch in ihrem Fall nicht von einem Wirkverlust im Rahmen der chronischen Entzündung und konsekutiv erhöhten ROS-Exposition auszugehen.

Die Aktivierung des Immunsystems durch die kontrollierte Freisetzung von DAMPs, nicht im Rahmen einer chronischen Entzündung mit exzessiver Sekretion, trägt dagegen zu einer verbesserten Erkennung und Elimination von Tumorzellen und Mikrometastasen bei. Antigenpräsentierende dendritische Zellen spielen dabei eine besonders wichtige Rolle, indem sie Tumorantigene gegenüber T-Zellen präsentieren. Durch verschiedene DAMPs werden die dendritischen Zellen stimuliert (Fang et al. 2014), beispielsweise wirkt Hsp70 als Chemokin und fördert darüber hinaus die Reifung der dendritischen Zellen ebenso wie HMGB1 über die Bindung an den Rezeptor TLR4 (Nace et al. 2012). Die Bedeutung dieses Rezeptors konnte sowohl im Mausmodell als auch anhand von Brustkrebspatientinnen gezeigt werden. Wenn TLR4 fehlte oder vermindert exprimiert wurde, führte dies zu einem reduzierten Ansprechen auf die Chemotherapie und zu früherem Auftreten von Rezidiven

(Apetoh et al. 2007). Der Einsatz von dendritischen Zellen nach Transfektion mit Hsp70-mRNA bei Hsp70-exprimierenden hepatozellulären Karzinomen im Rahmen einer Phase I/II-Studie zeigte ein verbessertes Gesamtüberleben gegenüber der Kontrollgruppe bei guter Verträglichkeit (Matsui et al. 2020). Inwiefern sich dieses Ergebnis bei anderen Tumorentitäten und in größeren Studien bestätigen lässt, bleibt abzuwarten.

Aktuell widmet sich die Forschung sehr stark der Immunantwort auf maligne Erkrankungen und davon ausgehend möglichen Immuntherapien. Mit dem Ziel einer Modifikation des entzündlichen Mikromilieus hin zu einer möglichst effektiven Immunantwort (Nakamura und Smyth 2017), wurden auch im Zusammenhang mit Brustkrebs verschiedene Ansätze mit bisher mäßigem Erfolg versucht. Beispielsweise wurde eine Therapie mit Anti-TNF α -Antikörpern zwar gut vertragen, brachte jedoch keinen nennenswerten Therapieerfolg (Madhusudan et al. 2004). Auch Impfungen gegen Antigene von Tumorzellen könnten in der Zukunft eine wichtige Rolle spielen (Akram et al. 2017), insbesondere gegen HER-2, Mucin 1 und Tumor-assoziierte Kohlenhydratantigene (Makhoul et al. 2018). Bereits jetzt sind zielgerichtete Therapien gegen zelluläre Strukturen, wie beispielsweise PARP-Inhibitoren, CDK4/6-Inhibitoren oder PDL1-Inhibitoren wichtiger Gegenstand der Forschung.

Dabei ist jedoch zu bedenken, dass das lokale Mikromilieu im Bereich des Tumors einen sehr großen Einfluss auf die Aktivität des Immunsystems und damit auch auf die Wirkung einer eventuellen Immuntherapie hat. Insofern wäre es sinnvoll, vor der Entscheidung für oder gegen eine solche Behandlung, einen Überblick über dieses Mikromilieu zu erhalten. Da im Rahmen chronischer Entzündungen vermehrt DAMPs freigesetzt werden, könnte deren Quantifizierung möglicherweise genutzt werden, um die Erfolgsaussichten einer Immuntherapie einzuschätzen. Wenn der Tumor noch nicht reseziert wurde, könnte beispielsweise die Bestimmung des exosomalen Hsp70 im peripheren Blut, das aktiv von Tumorzellen sezerniert wird (Breuninger und Erl 2014), in die Entscheidungsfindung einbezogen werden. Auch hinsichtlich einer adjuvanten Immuntherapie kann eine solche Untersuchung sinnvoll sein. Da jede Therapie Nebenwirkungen auslösen kann, ist die Prognose neben der erwarteten Wirksamkeit ein wichtiger Faktor, der in die Entscheidung einbezogen werden muss.

Der Verlauf des freien Hsp70 im Serum von Patientinnen, die später ein Wiederauftreten des Brustkrebses bzw. die Entwicklung von Metastasen erlitten, unterscheidet sich in unserer

Studie signifikant von dem Hsp70-Verlauf der tumorfrei gebliebenen Patientinnen. Direkt nach Ende der Bestrahlung und sechs Wochen später ist der Wert der Patientinnen mit ungünstigem Outcome höher. Das lässt den Schluss zu, dass das freie Hsp70 im Serum von Brustkrebspatientinnen im Therapieverlauf eventuell als prognostischer Marker genutzt werden kann. Obwohl die Methode der Hsp70-Bestimmung mittels ELISA sich in dieser Studie als geeignet erwies, Patientinnen mit unterschiedlichem Outcome voneinander zu unterscheiden, sind einige Einschränkungen bei der Bewertung des Ergebnisses zu beachten.

Problematisch ist dabei vor allem die geringe Anzahl an Patientinnen. Von ursprünglich 40 in die Studie aufgenommenen Patientinnen konnte nur bei 35 der Gesundheitsstatus mindestens drei Jahre nach Ende der Bestrahlung erfasst werden. Von diesen 35 Frauen erlitten zwei Metastasen bzw. ein erneutes Auftreten eines Mammakarzinoms der kontralateralen Brust. Zwar war der Unterschied zwischen diesen und den tumorfreien Patientinnen statistisch signifikant, jedoch ist zu bedenken, dass die Stichprobe in der Rezidivgruppe sehr klein ist. Diese geringe Stichprobe wirft außerdem das Problem auf, dass die Bestimmung eines Cut-off-Wertes, ab dem das Risiko für ein ungünstiges Outcome deutlich erhöht ist, nicht sinnvoll umsetzbar ist. Dazu wären weitere Untersuchungen mit einer wesentlich größeren Stichprobe notwendig.

Zudem ist, wie in Kapitel 3.2. beschrieben, das Niveau der Hsp70-Konzentration zwischen den Patientinnen sehr unterschiedlich. Daher ist die Betrachtung der Konzentration von freiem Hsp70 im Serum als Einzelwert als sehr schwierig zu bewerten. Erst der Hsp70-Verlauf über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg zeigt deutliche Unterschiede. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, beispielsweise da eine Patientin aus anderen Gründen grundsätzlich eine etwas höhere Konzentration an Hsp70 im Serum hat, muss daher mindestens ein weiterer Wert, etwa vor Beginn der Bestrahlung (in unserer Studie t1) bestimmt werden. Wichtig ist dabei, dass der Tumor bereits reseziert wurde, um den Wert nicht zu verfälschen.

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine Tumorentität, die bei früher Erkennung mit einer vergleichsweise guten Prognose einhergeht. Diese Tatsache erschwert jedoch die Etablierung von Hsp70 als möglichem prognostischem Marker. Um eine ausreichend große Stichprobe an Patientinnen mit negativem Outcome erwarten zu können, muss von Anfang an eine sehr hohe Zahl an Patientinnen in eine entsprechende Studie eingeschlossen und über

lange Zeit beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, ob die Bestimmung von freiem Hsp70 im Serum überhaupt einen möglichen prognostischen Nutzen haben kann. Da die Ergebnisse trotz kleiner Stichprobe dafürsprechen, wäre der Aufwand einer solchen größeren Studie gerechtfertigt, um die bisherigen Ergebnisse zu validieren und einen Cut-off-Wert zu bestimmen.

Neben der Untersuchung von Hsp70 als möglicher Biomarker bei Patientinnen mit brusterhaltender Tumorsektion und adjuvanter Strahlentherapie wäre insbesondere auch dessen Bestimmung bei Patientinnen ohne Bestrahlung oder bei solchen mit von vornherein schlechterer Prognose interessant. Gerade diese Patientinnen könnten stark von einem prognostisch wertvollen Biomarker profitieren, wenn dadurch früh Therapieentscheidungen getroffen werden, die das Outcome verbessern sollen. Im Gegensatz zur Bestimmung der Prognose anhand von Tumorgröße, Hormonrezeptoren oder anderen Faktoren, die immer nur eine Wahrscheinlichkeit anhand von Erfahrungswerten für die Rezidiventwicklung angeben können, wäre mittels der Bestimmung von Hsp70 oder anderer DAMPs eine individuelle Beobachtung der immunologischen Vorgänge im Körper und damit eine bessere, individuellere Vorhersage möglich. Auf dem Weg zu einer immer individualisierteren Medizin wäre dies ein wichtiger Schritt, der zu unabhängigen Therapieentscheidungen für jeden einzelnen Patienten beitragen würde.

Wenn weitere Studien den prognostischen Wert des freien Hsp70 im Serum von Brustkrebspatientinnen bestätigen, ergeben sich neben der Vorhersagbarkeit des Outcomes diverse weitere Vorteile. Momentan werden im Rahmen der Nachsorge nach Brustkrebskrankungen regelmäßig Mammographien und Sonographien zur Untersuchung der Brust eingesetzt. Wenn die Befunde nicht eindeutig sind, ergibt sich häufig zusätzlich die Indikation zur Kernspintomographie. Diese Untersuchungen sind jedoch teuer, für die Patientin vergleichsweise aufwändig und im Fall der Mammographie zudem mit einer Strahlenbelastung verbunden. Die Bestimmung von Hsp70 im Serum ist deutlich einfacher: Die venöse Blutentnahme kann ohne besondere Qualifikation durch den niedergelassenen Hausarzt oder Gynäkologen erfolgen, birgt so gut wie keine Risiken und erfordert nur einen sehr geringen zeitlichen Aufwand. Die Bestimmung der Hsp70-Konzentration mittels ELISA ist eine etablierte und im Vergleich zu anderen Untersuchungstechniken kostensparende Methode.

Wenn sich die Bestimmung des freien Hsp70 als Serummarker etabliert, würden sich daraus Auswirkungen bezüglich des weiteren Vorgehens bei den Patientinnen ergeben: Sofern eine gute Prognose zu erwarten ist, können möglicherweise die Nachsorgetermine und Untersuchungen etwas seltener angesetzt und so der zeitliche und finanzielle Aufwand, aber auch die psychische Belastung für die Patientinnen reduziert werden. Wenn hohe Hsp70-Werte dagegen ein inflammatorisches und tumorförderndes Milieu anzeigen, kann die Therapie entsprechend modifiziert und intensiviert werden, beispielsweise im Sinne einer veränderten oder zusätzlichen Chemotherapie. Zudem sollten die Nachsorgeuntersuchungen dann wesentlich engmaschiger erfolgen und im Zweifel ggf. schneller ein MRT angefertigt werden, um Rezidive und Metastasen so früh wie möglich zu erkennen und so die Prognose zu verbessern.

Auch die Therapiemöglichkeiten selbst können verbessert werden. Im Sinne einer Immuntherapie oder „targeted therapy“ könnte Hsp70 als Zielstruktur eine Rolle spielen und dadurch möglicherweise das proinflammatorische Milieu dahingehend verändert werden, dass das Immunsystem stärker zur Bekämpfung von Tumorzellen und Mikrometastasen beiträgt. Vielversprechende Ansätze in diese Richtung gibt es bereits: Beispielsweise förderte die Inhibition der Expression von Hsp70, Hsp90 und Hsp27 mittels Quercetin in vitro die Apoptose von Brustkrebszellen (Kiyga et al. 2020).

Um solche Therapien zu ermöglichen, bestehen die folgenden Schritte jedoch zunächst darin, anhand von größeren Studien und unterschiedlichen Patientenkollektiven bezüglich Therapie und Prognose die Reproduzierbarkeit der vorliegenden Ergebnisse zu zeigen, einen Cut-off-Wert mit guter Sensitivität und Spezifität zu definieren und Hsp70 im Vergleich mit anderen Biomarkern zu bewerten. Die bisherigen Ergebnisse sind vielversprechend und verdeutlichen den Sinn und die Notwendigkeit weiterer Forschung in diesem Bereich.

5. Zusammenfassung

Brustkrebs ist seit langer Zeit unverändert die häufigste maligne Erkrankung bei Frauen und dabei die zweithäufigste Todesursache als Folge von Krebs. Auch in Zukunft werden Tumorerkrankungen im Allgemeinen und Brustkrebs im Speziellen eine große Rolle sowohl in der Forschung als auch im klinischen Alltag spielen. Um die Therapie und somit neben der Mortalität auch das tumorfreie Überleben bei Krebserkrankungen zu verbessern, ist die Erfassung des individuellen Risikos und eine daran angepasste Therapie entscheidend.

Die Bestimmung des Biomarkers Hsp70 aus dem Serum nach einer venösen Blutentnahme könnte für diesen Zweck geeignet sein. Hitzeschockproteine wie beispielsweise Hsp70 sind Teil einer heterogenen Gruppe von hoch konservierten Proteinen. Als molekulares Chaperon unterstützt Hsp70 im Zytosol die Faltung neu synthetisierter Proteine, wirkt antiapoptotisch und trägt zur Reparatur zellulärer Schäden bei (Radons 2016). In Stresssituationen ebenso wie in Tumorzellen wird Hsp70 deshalb verstärkt exprimiert und zusätzlich in die Plasmamembran eingebaut. Zudem wird das Protein in membrangebundener Form, beispielsweise in Exosomen, aktiv sezerniert (Gastpar et al. 2005; Vega et al. 2008). Im Rahmen von Nekrose gelangt auch freies Hsp70 passiv in den Extrazellulärraum und wirkt dort vor allem immunmodulatorisch (Multhoff et al. 2015). Dabei fördert Hsp70 neben anderen DAMPs nicht nur entzündliche Prozesse, sondern wird in der Folge auch vermehrt freigesetzt (Hulina et al. 2017). Da das lokale Mikromilieu, insbesondere bei chronischer Entzündung, die Tumorentstehung stark beeinflusst (Jiang und Shapiro 2014), könnte die Quantifizierung dieser DAMPs und insbesondere des freien Hsp70 somit einen Hinweis auf die immunologischen Aktivitäten und das damit verbundene Risiko für die Entstehung von Rezidiven und Metastasen geben.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Serum von zwei Brustkrebspatientinnen mit ungünstigem Outcome eine signifikant höhere Hsp70-Konzentration direkt nach Ende der Bestrahlung und sechs Wochen später gemessen als im Serum von Patientinnen mit mindestens drei Jahren tumorfreiem Überleben. Wenn diese Ergebnisse in weiteren Untersuchungen bestätigt werden, könnte in Zukunft eine Blutentnahme zur Bestimmung der Hsp70-Konzentration nach der Bestrahlung helfen, das individuelle Risiko einer Brustkrebspatientin einzuschätzen. Im Gegensatz zu bisherigen Verfahren ist diese Untersuchung wenig invasiv, mit keiner Strahlenbelastung verbunden, kostengünstig und einfach durchführbar. Davon ausgehend

könnten die Weichen für weitere Behandlungen gestellt werden: bei geringem Risiko, ein Rezidiv oder Metastasen zu entwickeln, kann beispielsweise auf eine belastende Chemotherapie verzichtet oder Nachsorgetermine etwas weniger häufig angesetzt werden. Dagegen sollte bei Hochrisikopatientinnen eventuell eine weitere Therapie erwogen werden und die Nachsorgetermine höher frequentiert angesetzt werden, um Veränderungen frühzeitig zu erkennen.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist vielversprechend hinsichtlich des prognostischen Werts des freien Hsp70 im Serum. Um die Ergebnisse zu validieren und einen Cut-off-Wert mit hoher Sensitivität und Spezifität zu bestimmen, sind jedoch weitere Studien mit deutlich höheren Patientenzahlen erforderlich. Auf dem Weg zu einer individualisierten Medizin wird Hsp70 zukünftig sowohl als diagnostisches Mittel, als auch therapeutisch als Zielprotein für „targeted therapies“, sicherlich eine wichtige Rolle spielen. Diese Arbeit verdeutlicht erneut den Sinn und das Potenzial weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, Camellia W.; Allison, David E.; Flagella, Kelly; Presta, Leonard; Clarke, Janet; Dybdal, Noel; McKeever, Kathleen; Sliwkowski, Mark X. (2006): Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 55 (6), S. 717–727. DOI: 10.1007/s00262-005-0058-x.
- Adams, S.; Loi, S.; Toppmeyer, D.; Cescon, D. W.; Laurentiis, M. de; Nanda, R.; Winer, E. P.; Mukai, H.; Tamura, K.; Armstrong, A.; Liu, M. C.; Iwata, H.; Ryvo, L.; Wimberger, P.; Rugo, H. S.; Tan, A. R.; Jia, L.; Ding, Y.; Karantz, V.; Schmid, P. (2019a): Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (3), S. 405–411. DOI: 10.1093/annonc/mdy518.
- Adams, S.; Schmid, P.; Rugo, H. S.; Winer, E. P.; Loirat, D.; Awada, A.; Cescon, D. W.; Iwata, H.; Campone, M.; Nanda, R.; Hui, R.; Curigliano, G.; Toppmeyer, D.; O'Shaughnessy, J.; Loi, S.; Paluch-Shimon, S.; Tan, A. R.; Card, D.; Zhao, J.; Karantz, V.; Cortés, J. (2019b): Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (3), S. 397–404. DOI: 10.1093/annonc/mdy517.
- Ahlin, Cecilia; Lundgren, Claudia; Embretsén-Varro, Elin; Jirstrom, Karin; Blomqvist, Carl; Fjällskog, M-L (2017): High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers. In: *Breast cancer research and treatment* 164 (3), S. 667–678. DOI: 10.1007/s10549-017-4294-5.
- Akram, Muhammad; Iqbal, Mehwish; Daniyal, Muhammad; Khan, Asmat Ullah (2017): Awareness and current knowledge of breast cancer. In: *Biological research* 50 (1), S. 33. DOI: 10.1186/s40659-017-0140-9.
- AlFakkeh, A.; Brezden-Masley, C. (2018): Overcoming endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer. In: *Current oncology (Toronto, Ont.)* 25 (Suppl 1), S18-S27. DOI: 10.3747/co.25.3752.
- Allred, D. Craig (2010): Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. In: *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 2010 (41), S. 134–138. DOI: 10.1093/jncimonographs/lgq035.
- Anderson, William F.; Rosenberg, Philip S.; Prat, Aleix; Perou, Charles M.; Sherman, Mark E. (2014): How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? In: *Journal of the National Cancer Institute* 106 (8). DOI: 10.1093/jnci/dju165.
- Apetoh, Lionel; Ghiringhelli, François; Tesniere, Antoine; Obeid, Michel; Ortiz, Carla; Criollo, Alfredo; Mignot, Grégoire; Maiuri, M. Chiara; Ullrich, Evelyn; Saulnier, Patrick; Yang, Huan; Amigorena, Sebastian; Ryffel, Bernard; Barrat, Franck J.; Saftig, Paul; Levi, Francis; Lidereau, Rosette; Nogues, Catherine; Mira, Jean-Paul; Chompret, Agnès; Joulin, Virginie; Clavel-Chapelon, Françoise; Bourhis, Jean; André, Fabrice; Delaloge, Suzette; Tursz, Thomas; Kroemer, Guido; Zitvogel, Laurence (2007): Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. In: *Nature medicine* 13 (9), S. 1050–1059. DOI: 10.1038/nm1622.
- Arnold-Schild, D.; Hanau, D.; Spehner, D.; Schmid, C.; Rammensee, H. G.; La Salle, H. de; Schild, H. (1999): Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. In: *The Journal of Immunology* 162 (7), S. 3757–3760.

Asea, A.; Kraeft, S. K.; Kurt-Jones, E. A.; Stevenson, M. A.; Chen, L. B.; Finberg, R. W.; Koo, G. C.; Calderwood, S. K. (2000): HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. In: *Nature medicine* 6 (4), S. 435–442. DOI: 10.1038/74697.

Asselain, Bernard; Barlow, William; Bartlett, John; Bergh, Jonas; Bergsten-Nordström, Elizabeth; Bliss, Judith; Boccardo, Francesco; Boddington, Clare; Bogaerts, Jan; Bonadonna, Gianni; Bradley, Rosie; Brain, Etienne; Braybrooke, Jeremy; Broet, Philippe; Bryant, John; Burrett, Julie; Cameron, David; Clarke, Mike; Coates, Alan; Coleman, Robert; Coombes, Raoul Charles; Correa, Candace; Costantino, Joe; Cuzick, Jack; Danforth, David; Davidson, Nancy; Davies, Christina; Davies, Lucy; Di Leo, Angelo; Dodwell, David; Dowsett, Mitch; Duane, Fran; Evans, Vaughan; Ewertz, Marianne; Fisher, Bernard; Forbes, John; Ford, Leslie; Gazet, Jean-Claude; Gelber, Richard; Gettins, Lucy; Gianni, Luca; Gnant, Michael; Godwin, Jon; Goldhirsch, Aron; Goodwin, Pamela; Gray, Richard; Hayes, Daniel; Hill, Catherine; Ingle, James; Jagsi, Reshma; Jakesz, Raimund; James, Sam; Janni, Wolfgang; Liu, Hui; Liu, Zulian; Lohrisch, Caroline; Loibl, Sibylle; MacKinnon, Liz; Makris, Andreas; Mamounas, Eleftherios; Mannu, Gurdeep; Martín, Miguel; Mathoulin, Simone; Mauriac, Louis; McGale, Paul; McHugh, Theresa; Morris, Philip; Mukai, Hirofumi; Norton, Larry; Ohashi, Yasuo; Olivotto, Ivo; Paik, Soon; Pan, Hongchao; Peto, Richard; Piccart, Martine; Pierce, Lori; Poortmans, Philip; Powles, Trevor; Pritchard, Kathy; Ragaz, Joseph; Raina, Vinod; Ravdin, Peter; Read, Simon; Regan, Meredith; Robertson, John; Rutgers, Emiel; Scholl, Suzy; Slamon, Dennis; Sölkner, Lidija; Sparano, Joseph; Steinberg, Seth; Sutcliffe, Rosemary; Swain, Sandra; Taylor, Carolyn; Tutt, Andrew; Valagussa, Pinuccia; van de Velde, Cornelis; van der Hage, Jos; Viale, Giuseppe; Minckwitz, Gunter von; Wang, Yaochen; Wang, Zhe; Wang, Xiang; Whelan, Tim; Wilcken, Nicholas; Winer, Eric; Wolmark, Norman; Wood, William; Zambetti, Milvia; Zujewski, Jo Anne (2018): Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. In: *The Lancet Oncology* 19 (1), S. 27–39. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30777-5.

Basu, S.; Binder, R. J.; Suto, R.; Anderson, K. M.; Srivastava, P. K. (2000): Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. In: *International immunology* 12 (11), S. 1539–1546.

Bauer, Karina; Nitsche, Ulrich; Slotta-Huspenina, Julia; Drecoll, Enken; Weyhern, Claus Hann von; Rosenberg, Robert; Höfler, Heinz; Langer, Rupert (2012): High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer. In: *Cellular oncology (Dordrecht)* 35 (3), S. 197–205. DOI: 10.1007/s13402-012-0079-3.

Bayer, Christine; Liebhardt, Michael E.; Schmid, Thomas E.; Trajkovic-Arsic, Marija; Hube, Kathrin; Specht, Hanno M.; Schilling, Daniela; Gehrmann, Mathias; Stangl, Stefan; Siveke, Jens T.; Wilkens, Jan J.; Multhoff, Gabriele (2014): Validation of heat shock protein 70 as a tumor-specific biomarker for monitoring the outcome of radiation therapy in tumor mouse models. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 88 (3), S. 694–700. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2013.11.008.

Belmonte, Roser; Garin, Olatz; Segura, Marcel; Pont, Angels; Escalada, Ferran; Ferrer, Montserrat (2012): Quality-of-life impact of sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection in breast cancer patients. In: *Value in health : the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research* 15 (6), S. 907–915. DOI: 10.1016/j.jval.2012.06.003.

Bleicher, Richard J.; Ruth, Karen; Sigurdson, Elin R.; Daly, John M.; Boraas, Marcia; Anderson, Penny R.; Egleston, Brian L. (2016): Breast conservation versus mastectomy for patients with T3 primary tumors (5 cm): A review of 5685 medicare patients. In: *Cancer* 122 (1), S. 42–49. DOI: 10.1002/cncr.29726.

- Boniface, J. de; Frisell, J.; Bergkvist, L.; Andersson, Y. (2018): Breast-conserving surgery followed by whole-breast irradiation offers survival benefits over mastectomy without irradiation. In: *The British journal of surgery* 105 (12), S. 1607–1614. DOI: 10.1002/bjs.10889.
- Bosacki, Claire; Bouleftour, Wafa; Sotton, Sandrine; Vallard, Alexis; Daguene, Elisabeth; Ouaz, Hamza; Cojoracu, Iohel; Moslemi, Dariush; Molekzadehmoghani, Mona; Magné, Nicolas (2020): CDK 4/6 inhibitors combined with radiotherapy: A review of literature. In: *Clinical and Translational Radiation Oncology* 26, S. 79–85. DOI: 10.1016/j.ctro.2020.11.010.
- Breuninger, Stephanie; Erl, Janina (2014): Quantitative Analysis of Liposomal Heat Shock Protein 70 (Hsp70) in the Blood of Tumor Patients Using a Novel LipHsp70 ELISA. In: *J Clin Cell Immunol* 05 (05). DOI: 10.4172/2155-9899.1000264.
- Brierley, James; Gospodarowicz, Mary K.; Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.
- Bryant, Helen E.; Schultz, Niklas; Thomas, Huw D.; Parker, Kayan M.; Flower, Dan; Lopez, Elena; Kyle, Suzanne; Meuth, Mark; Curtin, Nicola J.; Helleday, Thomas (2005): Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. In: *Nature* 434 (7035), S. 913–917. DOI: 10.1038/nature03443.
- Calderwood, Stuart K. (2018): Heat shock proteins and cancer: intracellular chaperones or extracellular signalling ligands? In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 373 (1738). DOI: 10.1098/rstb.2016.0524.
- Calderwood, Stuart K.; Khaleque, Md Abdul; Sawyer, Douglas B.; Ciocca, Daniel R. (2006): Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. In: *Trends in biochemical sciences* 31 (3), S. 164–172. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.01.006.
- Catsburg, Chelsea; Miller, Anthony B.; Rohan, Thomas E. (2015): Active cigarette smoking and risk of breast cancer. In: *Int. J. Cancer* 136 (9), S. 2204–2209. DOI: 10.1002/ijc.29266.
- Cen, Juan; Zhang, Li; Liu, Fangfang; Zhang, Feng; Ji, Bian-Sheng (2016): Long-Term Alteration of Reactive Oxygen Species Led to Multidrug Resistance in MCF-7 Cells. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, S. 7053451. DOI: 10.1155/2016/7053451.
- Chavey, Carine; Bibeau, Frédéric; Gourgou-Bourgade, Sophie; Burlinon, Sandrine; Boissière, Florence; Laune, Daniel; Roques, Sylvie; Lazennec, Gwendal (2007): Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. In: *Breast cancer research : BCR* 9 (1), R15. DOI: 10.1186/bcr1648.
- Chen, Sining; Parmigiani, Giovanni (2007): Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (11), S. 1329–1333. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.1066.
- Chen, Yinghua; Olopade, Olufunmilayo I. (2008): MYC in breast tumor progression. In: *Expert review of anticancer therapy* 8 (10), S. 1689–1698. DOI: 10.1586/14737140.8.10.1689.
- Chlebowski, Rowan T. (2013): Nutrition and physical activity influence on breast cancer incidence and outcome. In: *Breast (Edinburgh, Scotland)* 22 Suppl 2, S30-7. DOI: 10.1016/j.breast.2013.07.006.
- Ciocca, D. R.; Clark, G. M.; Tandon, A. K.; Fuqua, S. A.; Welch, W. J.; McGuire, W. L. (1993): Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. In: *Journal of the National Cancer Institute* 85 (7), S. 570–574.

Ciocca, Daniel R.; Calderwood, Stuart K. (2005): Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. In: *Cell stress & chaperones* 10 (2), S. 86–103.

Coles, Charlotte E.; Griffin, Clare L.; Kirby, Anna M.; Titley, Jenny; Agrawal, Rajiv K.; Alhasso, Abdulla; Bhattacharya, Indrani S.; Brunt, Adrian M.; Ciurlionis, Laura; Chan, Charlie; Donovan, Ellen M.; Emson, Marie A.; Harnett, Adrian N.; Haviland, Joanne S.; Hopwood, Penelope; Jefford, Monica L.; Kaggwa, Ronald; Sawyer, Elinor J.; Syndikus, Isabel; Tsang, Yat M.; Wheatley, Duncan A.; Wilcox, Maggie; Yarnold, John R.; Bliss, Judith M.; Al Sarakbi, Wail; Barber, Sarah; Barnett, Gillian; Bliss, Peter; Dewar, John; Eaton, David; Ebbs, Stephen; Ellis, Ian; Evans, Philip; Harris, Emma; James, Hayley; Kirwan, Cliona; Kirk, Julie; Mayles, Helen; McIntyre, Anne; Mills, Judith; Poynter, Andrew; Provenzano, Elena; Rawlings, Christine; Sculpher, Mark; Sumo, Georges; Sydenham, Mark; Tutt, Andrew; Twyman, Nicola; Venables, Karen; Winship, Anna; Winstanley, John; Wishart, Gordon; Thompson, Alastair (2017): Partial-breast radiotherapy after breast conservation surgery for patients with early breast cancer (UK IMPORT LOW trial): 5-year results from a multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-inferiority trial. In: *The Lancet* 390 (10099), S. 1048–1060. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31145-5.

Craig, E. A. (1985): The heat shock response. In: *CRC critical reviews in biochemistry* 18 (3), S. 239–280.

Cristofanilli, Massimo; Turner, Nicholas C.; Bondarenko, Igor; Ro, Jungsil; Im, Seock-Ah; Masuda, Norikazu; Colleoni, Marco; DeMichele, Angela; Loi, Sherene; Verma, Sunil; Iwata, Hiroji; Harbeck, Nadia; Zhang, Ke; Theall, Kathy Puyana; Jiang, Yuqiu; Bartlett, Cynthia Huang; Koehler, Maria; Slamon, Dennis (2016): 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. In: *The Lancet Oncology* 17 (4), S. 425–439. DOI: 10.1016/s1470-2045(15)00613-0.

Deng, Chu-Xia (2006): BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. In: *Nucleic acids research* 34 (5), S. 1416–1426. DOI: 10.1093/nar/gkl010.

DeSantis, Carol E.; Ma, Jiemin; Goding Sauer, Ann; Newman, Lisa A.; Jemal, Ahmedin (2017): Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 67 (6), S. 439–448. DOI: 10.3322/caac.21412.

Dieci, Maria Vittoria; Orvieto, Enrico; Dominici, Massimo; Conte, PierFranco; Guarneri, Valentina (2014): Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. In: *The oncologist* 19 (8), S. 805–813. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0108.

Disis, Mary L.; Stanton, Sasha E. (2018): Immunotherapy in breast cancer: An introduction. In: *Breast (Edinburgh, Scotland)* 37, S. 196–199. DOI: 10.1016/j.breast.2017.01.013.

Dodd, Rachael H.; Forster, Alice S.; Sellars, Sarah; Patnick, Julietta; Ramirez, Amanda J.; Forbes, Lindsay J. L. (2017): Promoting early presentation of breast cancer in older women: sustained effect of an intervention to promote breast cancer awareness in routine clinical practice. In: *BMC health services research* 17 (1), S. 386. DOI: 10.1186/s12913-017-2335-8.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2015): Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. In: *The Lancet* 386 (10001), S. 1341–1352. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61074-1.

Elizalde, Patricia V.; Cordo Russo, Rosalía I.; Chervo, Maria F.; Schillaci, Roxana (2016): ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy. In: *Endocrine-Related Cancer* 23 (12), T243-T257. DOI: 10.1530/ERC-16-0360.

Elston, C. W.; Ellis, I. O. (1991): 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. In: *Histopathology* 19 (5), S. 403–410.

Engin, Atilla (2017): Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. In: *Advances in experimental medicine and biology* 960, S. 571–606. DOI: 10.1007/978-3-319-48382-5_25.

Exner, Ruth; Sachet, Monika; Arnold, Tobias; Zinn-Zinnenburg, Mercedes; Michlmayr, Anna; Dubsky, Peter; Bartsch, Rupert; Steger, Guenther; Gnant, Michael; Bergmann, Michael; Bachleitner-Hofmann, Thomas; Oehler, Rudolf (2016): Prognostic value of HMGB1 in early breast cancer patients under neoadjuvant chemotherapy. In: *Cancer medicine* 5 (9), S. 2350–2358. DOI: 10.1002/cam4.827.

Fang, Hongliang; Ang, Bing; Xu, Xinyun; Huang, Xiaohui; Wu, Yanfeng; Sun, Yanping; Wang, Wenying; Li, Nan; Cao, Xuetao; Wan, Tao (2014): TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. In: *Cellular & molecular immunology* 11 (2), S. 150–159. DOI: 10.1038/cmi.2013.59.

Farmer, Hannah; McCabe, Nuala; Lord, Christopher J.; Tutt, Andrew N. J.; Johnson, Damian A.; Richardson, Tobias B.; Santarosa, Manuela; Dillon, Krystyna J.; Hickson, Ian; Knights, Charlotte; Martin, Niall M. B.; Jackson, Stephen P.; Smith, Graeme C. M.; Ashworth, Alan (2005): Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. In: *Nature* 434 (7035), S. 917–921. DOI: 10.1038/nature03445.

Finn, Richard S.; Martin, Miguel; Rugo, Hope S.; Jones, Stephen; Im, Seock-Ah; Gelmon, Karen; Harbeck, Nadia; Lipatov, Oleg N.; Walshe, Janice M.; Moulder, Stacy; Gauthier, Eric; Lu, Dongrui R.; Randolph, Sophia; Diéras, Véronique; Slamon, Dennis J. (2016): Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. In: *New England Journal of Medicine* 375 (20), S. 1925–1936. DOI: 10.1056/NEJMoa1607303.

Flohr, A. M.; Rogalla, P.; Meiboom, M.; Borrmann, L.; Krohn, M.; Thode-Halle, B.; Bullerdiek, J. (2001): Variation of HMGB1 expression in breast cancer. In: *Anticancer research* 21 (6A), S. 3881–3885.

Galimberti, Viviana; Cole, Bernard F.; Zurrada, Stefano; Viale, Giuseppe; Luini, Alberto; Veronesi, Paolo; Baratella, Paola; Chifu, Camelia; Sargenti, Manuela; Intra, Mattia; Gentilini, Oreste; Mastropasqua, Mauro G.; Mazzarol, Giovanni; Massarut, Samuele; Garbay, Jean-Rémi; Zgajnar, Janez; Galatius, Hanne; Recalcati, Angelo; Littlejohn, David; Bamert, Monika; Colleoni, Marco; Price, Karen N.; Regan, Meredith M.; Goldhirsch, Aron; Coates, Alan S.; Gelber, Richard D.; Veronesi, Umberto (2013): Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23–01): a phase 3 randomised controlled trial. In: *The Lancet Oncology* 14 (4), S. 297–305. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70035-4.

Gastpar, Robert; Gehrman, Mathias; Bausero, Maria A.; Asea, Alexander; Gross, Catharina; Schroeder, Josef A.; Multhoff, Gabriele (2005): Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells. In: *Cancer research* 65 (12), S. 5238–5247. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3804.

Gastpar, Robert; Gross, Catharina; Rosbacher, Lydia; Ellwart, Joachim; Riegger, Julia; Multhoff, Gabriele (2004): The Cell Surface-Localized Heat Shock Protein 70 Epitope TKD Induces Migration and Cytolytic Activity Selectively in Human NK Cells. In: *The Journal of Immunology* 172 (2), S. 972–980. DOI: 10.4049/jimmunol.172.2.972.

Gehrman, Mathias; Liebisch, Gerhard; Schmitz, Gerd; Anderson, Robin; Steinem, Claudia; Maio, Antonio de; Pockley, Graham; Multhoff, Gabriele (2008): Tumor-specific Hsp70 plasma membrane

localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. In: *PloS one* 3 (4), e1925. DOI: 10.1371/journal.pone.0001925.

German Breast Group (2020): PENELOPE-B Trial of IBRANCE® (palbociclib) in Early Breast Cancer Did Not Meet Primary Endpoint. Online verfügbar unter <https://www.gbg.de/de/newsroom/meldungen/2020-10-penelopeB.php>, zuletzt geprüft am 21.12.2020.

Gershuni, Victoria; Li, Yun R.; Williams, Austin D.; So, Alycia; Steel, Laura; Carrigan, Elena; Tchou, Julia (2017): Breast cancer subtype distribution is different in normal weight, overweight, and obese women. In: *Breast cancer research and treatment* 163 (2), S. 375–381. DOI: 10.1007/s10549-017-4192-x.

Ghosh, Sagar; Ashcraft, Keith (2013): An IL-6 link between obesity and cancer. In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 5, S. 461–478.

Goetz, Matthew P.; Toi, Masakazu; Campone, Mario; Sohn, Joohyuk; Paluch-Shimon, Shani; Huober, Jens; Park, In Hae; Trédan, Olivier; Chen, Shin-Cheh; Manso, Luis; Freedman, Orit C.; Garnica Jaliffe, Georgina; Forrester, Tammy; Frenzel, Martin; Barriga, Susana; Smith, Ian C.; Bourayou, Nawel; Di Leo, Angelo (2017): MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (32), S. 3638–3646. DOI: 10.1200/JCO.2017.75.6155.

Gunaldi, Meral; Afsar, Cigdem Usul; Okuturlar, Yildiz; Gedikbasi, Asuman; Kocoglu, Hakan; Kural, Alev; Akarsu, Cevher; Gunduz, Umut; Tiken, Elif Eda (2015a): Elevated serum levels of heat shock protein 70 are associated with breast cancer. In: *The Tohoku journal of experimental medicine* 236 (2), S. 97–102. DOI: 10.1620/tjem.236.97.

Gunaldi, Meral; Kocoglu, Hakan; Okuturlar, Yildiz; Gedikbasi, Asuman; Karabulut, Mehmet; Alis, Halil; Hursitoglu, Mehmet (2015b): Heat shock protein 70 is a useful marker for predicting colorectal cancer. In: *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 20 (6), S. 1464–1470.

Gunther, Sophie; Ostheimer, Christian; Stangl, Stefan; Specht, Hanno M.; Mozes, Petra; Jesinghaus, Moritz; Vordermark, Dirk; Combs, Stephanie E.; Peltz, Friedhelm; Jung, Max P.; Multhoff, Gabriele (2015): 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. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 556. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00556.

Hagen, Katie R.; Zeng, Xiangbin; Lee, Mi-Young; Tucker Kahn, Shannon; Harrison Pitner, Mary Kathryn; Zaky, Sandra S.; Liu, Yuan; O'Regan, Ruth M.; Deng, Xingming; Saavedra, Harold I. (2013): Silencing CDK4 radiosensitizes breast cancer cells by promoting apoptosis. In: *Cell division* 8 (1), S. 10. DOI: 10.1186/1747-1028-8-10.

Haldosén, Lars-Arne; Zhao, Chunyan; Dahlman-Wright, Karin (2014): Estrogen receptor beta in breast cancer. In: *Molecular and cellular endocrinology* 382 (1), S. 665–672. DOI: 10.1016/j.mce.2013.08.005.

Hernandez, Celine; Huebener, Peter; Schwabe, Robert F. (2016): Damage-associated molecular patterns in cancer: A double-edged sword. In: *Oncogene* 35 (46), S. 5931–5941. DOI: 10.1038/onc.2016.104.

Hosford, Sarah R.; Miller, Todd W. (2014): Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways. In: *Pharmacogenomics and personalized medicine* 7, S. 203–215. DOI: 10.2147/PGPM.S52762.

- Howlander, Nadia; Altekruze, Sean F.; Li, Christopher I.; Chen, Vivien W.; Clarke, Christina A.; Ries, Lynn A. G.; Cronin, Kathleen A. (2014): US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. In: *Journal of the National Cancer Institute* 106 (5). DOI: 10.1093/jnci/dju055.
- Hu, Xichun; Huang, Wei; Fan, Minhao (2017): Emerging therapies for breast cancer. In: *Journal of hematology & oncology* 10. DOI: 10.1186/s13045-017-0466-3.
- Hulina, Andrea; Grdić Rajković, Marija; Jakšić Despot, Daniela; Jelić, Dubravko; Dojder, Ana; Čepelak, Ivana; Rumora, Lada (2017): Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. In: *Cell stress & chaperones* 23 (3), S. 373–384. DOI: 10.1007/s12192-017-0847-0.
- Jiang, Xinguo; Shapiro, David J. (2014): The immune system and inflammation in breast cancer. In: *Molecular and cellular endocrinology* 382 (1), S. 673–682. DOI: 10.1016/j.mce.2013.06.003.
- Joly, Anne-Laure; Wettstein, Guillaume; Mignot, Gregoire; Ghiringhelli, François; Garrido, Carmen (2010): Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. In: *Journal of innate immunity* 2 (3), S. 238–247. DOI: 10.1159/000296508.
- Jubran, Ritta; Kocsis, Judit; Garam, Nóra; Maláti, Éva; Gombos, Tímea; Barabás, Loránd; Gráf, László; Prohászka, Zoltán; Fishelson, Zvi (2017): Circulating mitochondrial stress 70 protein/mortalin and cytosolic Hsp70 in blood: Risk indicators in colorectal cancer. In: *International journal of cancer* 141 (11), S. 2329–2335. DOI: 10.1002/ijc.30918.
- Kaczmarek, Agnieszka; Vandenabeele, Peter; Krysko, Dmitri V. (2013): Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. In: *Immunity* 38 (2), S. 209–223. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.02.003.
- Kampinga, Harm H.; Hageman, Jurre; Vos, Michel J.; Kubota, Hiroshi; Tanguay, Robert M.; Bruford, Elspeth A.; Cheetham, Michael E.; Chen, Bin; Hightower, Lawrence E. (2009): Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. In: *Cell stress & chaperones* 14 (1), S. 105–111. DOI: 10.1007/s12192-008-0068-7.
- Kang, Rui; Zhang, Qihong; Zeh, Herbert J.; Lotze, Michael T.; Tang, Daolin (2013): HMGB1 in cancer: good, bad, or both? In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (15), S. 4046–4057. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0495.
- Karin, Michael; Greten, Florian R. (2005): NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (10), S. 749–759. DOI: 10.1038/nri1703.
- Kıyga, Ezgi; Şengelen, Aslihan; Adıgüzel, Zelal; Öney Uçar, Evren (2020): Investigation of the role of quercetin as a heat shock protein inhibitor on apoptosis in human breast cancer cells. In: *Molecular biology reports* 47 (7), S. 4957–4967. DOI: 10.1007/s11033-020-05641-x.
- Klee, Nicole S.; McCarthy, Cameron G.; Martinez-Quinones, Patricia; Webb, R. Clinton (2017): Out of the frying pan and into the fire: damage-associated molecular patterns and cardiovascular toxicity following cancer therapy. In: *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 11 (11), S. 297–317. DOI: 10.1177/1753944717729141.
- Klune, John R.; Dhupar, Rajeev; Cardinal, Jon; Billiar, Timothy R.; Tsung, Allan (2008): HMGB1: endogenous danger signaling. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 14 (7-8), S. 476–484. DOI: 10.2119/2008-00034.Klune.

Knape, Clemens (2017): Validierung von extrazellulärem Hsp70 als Tumorbiomarker. Definition des Hsp70-Schwellenwertes im Blut eines gesunden Kontrollkollektivs. Technische Universität München, München. Fakultät für Medizin.

Koo, Minjoung Monica; Wagner, Christian von; Abel, Gary A.; McPhail, Sean; Rubin, Greg P.; Lyratzopoulos, Georgios (2017): Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. In: *Cancer epidemiology* 48, S. 140–146. DOI: 10.1016/j.canep.2017.04.010.

Kotoglou, Polychronis; Kalaitzakis, Alexandros; Vezyraki, Patra; Tzavaras, Theodore; Michalis, Lampros K.; Dantzer, Françoise; Jung, Jae U.; Angelidis, Charalampos (2009): Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. In: *Cell stress & chaperones* 14 (4), S. 391–406. DOI: 10.1007/s12192-008-0093-6.

Legendijk, Mirelle; van Maaren, Marissa C.; Saadatmand, Sepideh; Strobbe, Luc J. A.; Poortmans, Philip M. P.; Koppert, Linetta B.; Tilanus-Linthorst, Madeleine M. A.; Siesling, Sabine (2018): Breast conserving therapy and mastectomy revisited: Breast cancer-specific survival and the influence of prognostic factors in 129,692 patients. In: *International journal of cancer* 142 (1), S. 165–175. DOI: 10.1002/ijc.31034.

Lahart, Ian Matthew; Metsios, George S.; Nevill, Alan Michael; Carmichael, Amtul Razzaq (2015): Physical activity, risk of death and recurrence in breast cancer survivors: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 54 (5), S. 635–654. DOI: 10.3109/0284186X.2014.998275.

Lakhani, Sunil R.; Ellis, Ian O.; Schnitt, Stuart J.; Tan, Puay Hoon; van de Vijver, Marc J. (2012): WHO classification of the breast. Lyon: IARC Press (World Health Organization Classification of Tumours).

Landskron, Glauben; La Fuente, Marjorie de; Thuwajit, Peti; Thuwajit, Chanitra; Hermoso, Marcela A. (2014): Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. In: *Journal of immunology research* 2014, S. 149185. DOI: 10.1155/2014/149185.

Lazaris, A. Ch; Chatzigianni, E. B.; Panoussopoulos, D.; Tzimas, G. N.; Davaris, P. S.; Golematis, B. Ch (1997): Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. In: *Breast cancer research and treatment* 43 (1), S. 43–51.

Lehner, T.; Wang, Y.; Whittall, T.; McGowan, E.; Kelly, C. G.; Singh, M. (2004): Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. In: *Biochemical Society transactions* 32 (Pt 4), S. 629–632. DOI: 10.1042/BST0320629.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Kurzversion 4.2 - Februar 2020, AWMF-Registernummer: 032-045OL (2020). Online verfügbar unter <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>, zuletzt geprüft am 14.12.2020.

Li, C. I.; Uribe, D. J.; Daling, J. R. (2005): Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. In: *British journal of cancer* 93 (9), S. 1046–1052. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602787.

Li, Christopher I.; Moe, Roger E.; Daling, Janet R. (2003): Risk of mortality by histologic type of breast cancer among women aged 50 to 79 years. In: *Archives of internal medicine* 163 (18), S. 2149–2153. DOI: 10.1001/archinte.163.18.2149.

Lindquist, S.; Craig, E. A. (1988): The heat-shock proteins. In: *Annual review of genetics* 22, S. 631–677. DOI: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.

Litton, Jennifer K.; Rugo, Hope S.; Ettl, Johannes; Hurvitz, Sara A.; Gonçalves, Anthony; Lee, Kyung-Hun; Fehrenbacher, Louis; Yerushalmi, Rinat; Mina, Lida A.; Martin, Miguel; Roché, Henri; Im, Young-Hyuck; Quek, Ruben G. W.; Markova, Denka; Tudor, Iulia C.; Hannah, Alison L.; Eiermann, Wolfgang; Blum, Joanne L. (2018): Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. In: *The New England journal of medicine* 379 (8), S. 753–763. DOI: 10.1056/NEJMoa1802905.

Liu, Ying; Nguyen, Nhi; Colditz, Graham A. (2015): Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. In: *Women's health (London, England)* 11 (1), S. 65–77. DOI: 10.2217/whe.14.62.

Loibl, Sibylle; Turner, Nicholas C.; Ro, Jungsil; Cristofanilli, Massimo; Iwata, Hiroji; Im, Seock-Ah; Masuda, Norikazu; Loi, Sherene; André, Fabrice; Harbeck, Nadia; Verma, Sunil; Folklerd, Elizabeth; Puyana Theall, Kathy; Hoffman, Justin; Zhang, Ke; Bartlett, Cynthia Huang; Dowsett, Mitchell (2017): Palbociclib Combined with Fulvestrant in Premenopausal Women with Advanced Breast Cancer and Prior Progression on Endocrine Therapy: PALOMA-3 Results. In: *The oncologist* 22 (9), S. 1028–1038. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0072.

Madeddu, Clelia; Gramignano, Giulia; Floris, Carlo; Murenu, Giuseppe; Sollai, Giuseppe; Macciò, Antonio (2014): Role of inflammation and oxidative stress in post-menopausal oestrogen-dependent breast cancer. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 18 (12), S. 2519–2529. DOI: 10.1111/jcmm.12413.

Madhusudan, Srinivasan; Foster, Martin; Muthuramalingam, Sethupathi R.; Braybrooke, Jeremy P.; Wilner, Susan; Kaur, Kulwinder; Han, Cheng; Hoare, Susan; Balkwill, Frances; Talbot, Denis C.; Ganesan, Trivadi S.; Harris, Adrian L. (2004): A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (19), S. 6528–6534. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0730.

Mahalingaiah, Prathap Kumar S.; Singh, Kamaleshwar P. (2014): Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. In: *PloS one* 9 (1), e87371. DOI: 10.1371/journal.pone.0087371.

Mahalka, Ajay K.; Kirkegaard, Thomas; Jukola, Laura T. I.; Jäättelä, Marja; Kinnunen, Paavo K. J. (2014): Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein. In: *Biochimica et biophysica acta* 1838 (5), S. 1344–1361. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.01.022.

Makhoul, Issam; Atiq, Mohammad; Alwbari, Ahmed; Kieber-Emmons, Thomas (2018): Breast Cancer Immunotherapy: An Update. In: *Breast cancer : basic and clinical research* 12, 1178223418774802. DOI: 10.1177/1178223418774802.

Malhotra, Gautam K.; Zhao, Xiangshan; Band, Hamid; Band, Vimla (2010): Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. In: *Cancer Biology & Therapy* 10 (10), S. 955–960. DOI: 10.4161/cbt.10.10.13879.

Maliniak, Maret L.; Patel, Alpa V.; McCullough, Marjorie L.; Campbell, Peter T.; Leach, Corinne R.; Gapstur, Susan M.; Gaudet, Mia M. (2018): Obesity, physical activity, and breast cancer survival among older breast cancer survivors in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. In: *Breast cancer research and treatment* 167 (1), S. 133–145. DOI: 10.1007/s10549-017-4470-7.

Mandelson, M. T.; Oestreicher, N.; Porter, P. L.; White, D.; Finder, C. A.; Taplin, S. H.; White, E. (2000): Breast density as a predictor of mammographic detection: comparison of interval- and screen-detected cancers. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (13), S. 1081–1087.

Matsui, Hiroto Matsui; Hazama, Shoichi; Nakajima, Masao; Xu, Ming; Matsukuma, Satoshi; Tokumitsu, Yukio; Shindo, Yoshitaro; Tomochika, Shinobu; Yoshida, Shin; Iida, Michihisa; Suzuki, Nobuaki; Takeda, Shigeru; Yoshino, Shigefumi; Ueno, Tomio; Oka, Masaaki; Nagano, Hiroaki (2020): Novel adjuvant dendritic cell therapy with transfection of heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatocellular carcinoma: a phase I/II prospective randomized controlled clinical trial. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. DOI: 10.1007/s00262-020-02737-y.

Mattoo, Rayees U. H.; Sharma, Sandeep K.; Priya, Smriti; Finka, Andrija; Goloubinoff, Pierre (2013): Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (29), S. 21399–21411. DOI: 10.1074/jbc.M113.479253.

McDonald, Elizabeth S.; Clark, Amy S.; Tchou, Julia; Zhang, Paul; Freedman, Gary M. (2016): Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 57 Suppl 1, 9S-16S. DOI: 10.2967/jnumed.115.157834.

Meattini, Icro; Saieva, Calogero; Marrazzo, Livia; Di Brina, Lucia; Pallotta, Stefania; Mangoni, Monica; Meacci, Fiammetta; Bendinelli, Benedetta; Francolini, Giulio; Desideri, Isacco; Luca Cardillo, Carla de; Scotti, Vieri; Furfaro, Ilaria Francesca; Rossi, Francesca; Greto, Daniela; Bonomo, Pierluigi; Casella, Donato; Bernini, Marco; Sanchez, Luis; Orzalesi, Lorenzo; Simoncini, Roberta; Nori, Jacopo; Bianchi, Simonetta; Livi, Lorenzo (2015): Accelerated partial breast irradiation using intensity-modulated radiotherapy technique compared to whole breast irradiation for patients aged 70 years or older: subgroup analysis from a randomized phase 3 trial. In: *Breast cancer research and treatment* 153 (3), S. 539–547. DOI: 10.1007/s10549-015-3565-2.

Milani, V.; Noessner, E.; Ghose, S.; Kuppner, M.; Ahrens, B.; Scharner, A.; Gastpar, R.; Issels, R. D. (2002): Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. In: *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 18 (6), S. 563–575. DOI: 10.1080/02656730210166140.

Mirza, Nora; Prokop, Lea; Kowalewski, Daniel; Gouttefangeas, Cécile; Faul, Christoph; Bethge, Wolfgang A.; Vogel, Wichard; Kanz, Lothar; Rammensee, Hans-Georg; Haen, Sebastian P. (2016): Soluble heat shock protein 70 members in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: *Transplant immunology* 36, S. 25–31. DOI: 10.1016/j.trim.2016.03.003.

Multhoff, G.; Botzler, C.; Wiesnet, M.; Müller, E.; Meier, T.; Wilmanns, W.; Issels, R. D. (1995): A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. In: *International journal of cancer* 61 (2), S. 272–279.

Multhoff, G.; Mizzen, L.; Winchester, C. C.; Milner, C. M.; Wenk, S.; Eissner, G.; Kampinga, H. H.; Laumbacher, B.; Johnson, J. (1999): Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. In: *Experimental hematology* 27 (11), S. 1627–1636.

Multhoff, Gabriele; Pockley, Alan G.; Schmid, Thomas E.; Schilling, Daniela (2015): The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. In: *Cancer letters* 368 (2), S. 179–184. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.02.013.

Murakami, Naoya; Kühnel, Annett; Schmid, Thomas E.; Ilicic, Katarina; Stangl, Stefan; Braun, Isabella S.; Gehrman, Mathias; Molls, Michael; Itami, Jun; Multhoff, Gabriele (2015): Role of membrane Hsp70

in radiation sensitivity of tumor cells. In: *Radiation oncology (London, England)* 10, S. 149. DOI: 10.1186/s13014-015-0461-1.

Murphy, Maureen E. (2013): The HSP70 family and cancer. In: *Carcinogenesis* 34 (6), S. 1181–1188. DOI: 10.1093/carcin/bgt111.

Murray, Jill I.; West, Nathan R.; Murphy, Leigh C.; Watson, Peter H. (2015): Intratumoural inflammation and endocrine resistance in breast cancer. In: *Endocrine-Related Cancer* 22 (1), R51-R67. DOI: 10.1530/ERC-14-0096.

Muschter, Dominique; Geyer, Fabian; Bauer, Richard; Ettl, Tobias; Schreml, Stephan; Haubner, Frank (2018): A comparison of cell survival and heat shock protein expression after radiation in normal dermal fibroblasts, microvascular endothelial cells, and different head and neck squamous carcinoma cell lines. In: *Clinical oral investigations* 22 (6), S. 2251–2262. DOI: 10.1007/s00784-017-2323-8.

Nace, Gary; Evankovich, John; Eid, Raymond; Tsung, Allan (2012): Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. In: *Journal of innate immunity* 4 (1), S. 6–15. DOI: 10.1159/000334245.

Nahta, Rita; Hung, Mien-Chie; Esteva, Francisco J. (2004): The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. In: *Cancer research* 64 (7), S. 2343–2346.

Nakamura, Kyohei; Smyth, Mark J. (2017): Targeting cancer-related inflammation in the era of immunotherapy. In: *Immunology and cell biology* 95 (4), S. 325–332. DOI: 10.1038/icb.2016.126.

Nanda, Rita; Chow, Laura Q. M.; Dees, E. Claire; Berger, Raanan; Gupta, Shilpa; Geva, Ravit; Pusztai, Lajos; Pathiraja, Kumudu; Aktan, Gursel; Cheng, Jonathan D.; Karantza, Vassiliki; Buisseret, Laurence (2016): Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (21), S. 2460–2467. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.8931.

Nathan, Mark R.; Schmid, Peter (2017): A Review of Fulvestrant in Breast Cancer. In: *Oncology and therapy* 5 (1), S. 17–29. DOI: 10.1007/s40487-017-0046-2.

Njemini, Rose; Bautmans, Ivan; Onyema, Oscar O.; van Puyvelde, Katrien; Demanet, Christian; Mets, Tony (2011): Circulating heat shock protein 70 in health, aging and disease. In: *BMC immunology* 12, S. 24. DOI: 10.1186/1471-2172-12-24.

Noguchi, Tsuyoshi; Takeno, Shinsuke; Shibata, Tomotaka; Uchida, Yuzo; Yokoyama, Shigeo; Müller, Wolfram (2002): Expression of heat shock protein 70 in grossly resected esophageal squamous cell carcinoma. In: *The Annals of thoracic surgery* 74 (1), S. 222–226.

Northridge, Mary E.; Rhoads, George G.; Wartenberg, Daniel; Koffman, Dawn (1997): The importance of histologic type on breast cancer survival. In: *Journal of Clinical Epidemiology* 50 (3), S. 283–290. DOI: 10.1016/S0895-4356(96)00366-6.

Ostheimer, Christian; Gunther, Sophie; Bache, Matthias; Vordermark, Dirk; Multhoff, Gabriele (2017): Dynamics of Heat Shock Protein 70 Serum Levels As a Predictor of Clinical Response in Non-Small-Cell Lung Cancer and Correlation with the Hypoxia-Related Marker Osteopontin. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1305. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01305.

Pandolfi, Franco; Altamura, Simona; Frosali, Simona; Conti, Pio (2016): Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair. In: *Clinical therapeutics* 38 (5), S. 1017–1028. DOI: 10.1016/j.clinthera.2016.02.028.

Passarelli, Michael N.; Newcomb, Polly A.; Hampton, John M.; Trentham-Dietz, Amy; Titus, Linda J.; Egan, Kathleen M.; Baron, John A.; Willett, Walter C. (2016): Cigarette Smoking Before and After Breast Cancer Diagnosis: Mortality From Breast Cancer and Smoking-Related Diseases. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (12), S. 1315–1322. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.9328.

Perez, Edith A.; Romond, Edward H.; Suman, Vera J.; Jeong, Jong-Hyeon; Davidson, Nancy E.; Geyer, Charles E.; Martino, Silvana; Mamounas, Eleftherios P.; Kaufman, Peter A.; Wolmark, Norman (2011): Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (25), S. 3366–3373. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.0868.

Picon-Ruiz, Manuel; Morata-Tarifa, Cynthia; Valle-Goffin, Janeiro J.; Friedman, Eitan R.; Slingerland, Joyce M. (2017): Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 67 (5), S. 378–397. DOI: 10.3322/caac.21405.

Polgár, Csaba; Fodor, János; Major, Tibor; Sulyok, Zoltán; Kásler, Miklós (2013): Breast-conserving therapy with partial or whole breast irradiation: ten-year results of the Budapest randomized trial. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 108 (2), S. 197–202. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.05.008.

Porter, P. L.; El-Bastawissi, A. Y.; Mandelson, M. T.; Lin, M. G.; Khalid, N.; Watney, E. A.; Cousens, L.; White, D.; Taplin, S.; White, E. (1999): Breast tumor characteristics as predictors of mammographic detection: comparison of interval- and screen-detected cancers. In: *Journal of the National Cancer Institute* 91 (23), S. 2020–2028.

Powers, Marissa V.; Jones, Keith; Barillari, Caterina; Westwood, Isaac; van Montfort, Rob L. M.; Workman, Paul (2010): Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (8), S. 1542–1550. DOI: 10.4161/cc.9.8.11204.

Prat, Aleix; Pineda, Estela; Adamo, Barbara; Galván, Patricia; Fernández, Aranzazu; Gaba, Lydia; Díez, Marc; Viladot, Margarita; Arance, Ana; Muñoz, Montserrat (2015): Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. In: *Breast (Edinburgh, Scotland)* 24 Suppl 2, S26-35. DOI: 10.1016/j.breast.2015.07.008.

Radons, Jürgen (2016): The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? In: *Cell stress & chaperones* 21 (3), S. 379–404. DOI: 10.1007/s12192-016-0676-6.

Rakha, Emad A.; Reis-Filho, Jorge S.; Baehner, Frederick; Dabbs, David J.; Decker, Thomas; Eusebi, Vincenzo; Fox, Stephen B.; Ichihara, Shu; Jacquemier, Jocelyne; Lakhani, Sunil R.; Palacios, José; Richardson, Andrea L.; Schnitt, Stuart J.; Schmitt, Fernando C.; Tan, Puay-Hoon; Tse, Gary M.; Badve, Sunil; Ellis, Ian O. (2010): Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. In: *Breast cancer research : BCR* 12 (4), S. 207. DOI: 10.1186/bcr2607.

Ren, Biqiong; Luo, Shudi; Xu, Fei; Zou, Guoying; Xu, Guofeng; He, Junyu; Huang, Yiran; Zhu, Haowen; Li, Yong (2017): The expression of DAMP proteins HSP70 and cancer-testis antigen SPAG9 in peripheral

blood of patients with HCC and lung cancer. In: *Cell stress & chaperones* 22 (2), S. 237–244. DOI: 10.1007/s12192-016-0758-5.

Ritossa, F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. In: *Experientia* 18 (12), S. 571–573. DOI: 10.1007/BF02172188.

Robert Koch-Institut (RKI) (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Online verfügbar unter www.krebsdaten.de/krebsbericht, zuletzt geprüft am 27.02.2019.

Robson, M. E.; Tung, N.; Conte, P.; Im, S. A.; Senkus, E.; Xu, B.; Masuda, N.; Delaloge, S.; Li, W.; Armstrong, A.; Wu, W.; Goessl, C.; Runswick, S.; Domchek, S. M. (2019): OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (4). DOI: 10.1093/annonc/mdz012.

Robson, Mark; Im, Seock-Ah; Senkus, Elzbieta; Xu, Binghe; Domchek, Susan M.; Masuda, Norikazu; Delaloge, Suzette; Li, Wei; Tung, Nadine; Armstrong, Anne; Wu, Wenting; Goessl, Carsten; Runswick, Sarah; Conte, PierFranco (2017): Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. In: *The New England journal of medicine* 377 (6), S. 523–533. DOI: 10.1056/NEJMoa1706450.

Rose, Maddison; Burgess, Joshua T.; O'Byrne, Kenneth; Richard, Derek J.; Bolderson, Emma (2020): PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 564601. DOI: 10.3389/fcell.2020.564601.

Ross, Jeffrey S.; Slodkowska, Elzbieta A.; Symmans, W. Fraser; Pusztai, Lajos; Ravdin, Peter M.; Hortobagyi, Gabriel N. (2009): The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. In: *The oncologist* 14 (4), S. 320–368. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0230.

Rugo, Hope S.; Finn, Richard S.; Gelmon, Karen; Joy, Anil A.; Harbeck, Nadia; Castellon, Aurelio; Mukai, Hirofumi; Walshe, Janice M.; Mori, Ave; Gauthier, Eric; Lu, Dongrui Ray; Bananis, Eustratios; Martin, Miguel; Diéras, Véronique (2020): Progression-free Survival Outcome Is Independent of Objective Response in Patients With Estrogen Receptor-positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-negative Advanced Breast Cancer Treated With Palbociclib Plus Letrozole Compared With Letrozole: Analysis From PALOMA-2. In: *Clinical breast cancer* 20 (2), e173-e180. DOI: 10.1016/j.clbc.2019.08.009.

Ryerson, A. Blythe; Miller, Jacqueline; Ehemann, Christie R. (2015): Reported breast symptoms in the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program. In: *Cancer causes & control : CCC* 26 (5), S. 733–740. DOI: 10.1007/s10552-015-0544-1.

Sagara, Yasuaki; Freedman, Rachel A.; Vaz-Luis, Ines; Mallory, Melissa Anne; Wong, Stephanie M.; Aydogan, Fatih; DeSantis, Stephen; Barry, William T.; Golshan, Mehra (2016): Patient Prognostic Score and Associations With Survival Improvement Offered by Radiotherapy After Breast-Conserving Surgery for Ductal Carcinoma In Situ: A Population-Based Longitudinal Cohort Study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (11), S. 1190–1196. DOI: 10.1200/JCO.2015.65.1869.

Sagara, Yasuaki; Mallory, Melissa Anne; Wong, Stephanie; Aydogan, Fatih; DeSantis, Stephen; Barry, William T.; Golshan, Mehra (2015): Survival Benefit of Breast Surgery for Low-Grade Ductal Carcinoma In Situ: A Population-Based Cohort Study. In: *JAMA surgery* 150 (8), S. 739–745. DOI: 10.1001/jamasurg.2015.0876.

Sánchez, Humberto; Paul, Maarten W.; Grosbart, Malgorzata; van Rossum-Fikkert, Sarah E.; Lebbink, Joyce H. G.; Kanaar, Roland; Houtsmuller, Adriaan B.; Wyman, Claire (2017): Architectural plasticity of human BRCA2-RAD51 complexes in DNA break repair. In: *Nucleic acids research* 45 (8), S. 4507–4518. DOI: 10.1093/nar/gkx084.

Sardanelli, Francesco; Aase, Hildegunn S.; Álvarez, Marina; Azavedo, Edward; Baarslag, Henk J.; Balleyguier, Corinne; Baltzer, Pascal A.; Beslagic, Vanesa; Bick, Ulrich; Bogdanovic-Stojanovic, Dragana; Briediene, Ruta; Brkljacic, Boris; Camps Herrero, Julia; Colin, Catherine; Cornford, Eleanor; Danes, Jan; Geer, Gérard de; Esen, Gul; Evans, Andrew; Fuchsjaeger, Michael H.; Gilbert, Fiona J.; Graf, Oswald; Hargaden, Gormlaith; Helbich, Thomas H.; Heywang-Köbrunner, Sylvia H.; Ivanov, Valentin; Jónsson, Ásbjörn; Kuhl, Christiane K.; Lisencu, Eugenia C.; Luczynska, Elzbieta; Mann, Ritse M.; Marques, Jose C.; Martincich, Laura; Mortier, Margarete; Müller-Schimpfle, Markus; Ormandi, Katalin; Panizza, Pietro; Pediconi, Federica; Pijnappel, Ruud M.; Pinker, Katja; Rissanen, Tarja; Rotaru, Natalia; Saguatti, Gianni; Sella, Tamar; Slobodníková, Jana; Talk, Maret; Taourel, Patrice; Trimboli, Rubina M.; Vejborg, Ilse; Vourtsis, Athina; Forrai, Gabor (2017): Position paper on screening for breast cancer by the European Society of Breast Imaging (EUSOBI) and 30 national breast radiology bodies from Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Israel, Lithuania, Moldova, The Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Serbia, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland and Turkey. In: *European radiology* 27 (7), S. 2737–2743. DOI: 10.1007/s00330-016-4612-z.

Scaffidi, Paola; Misteli, Tom; Bianchi, Marco E. (2002): Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. In: *Nature* 418 (6894), S. 191–195. DOI: 10.1038/nature00858.

Scheuer, Werner; Friess, Thomas; Burtscher, Helmut; Bossenmaier, Birgit; Endl, Josef; Hasmann, Max (2009): Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. In: *Cancer research* 69 (24), S. 9330–9336. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4597.

Schneider, M. R.; Yarden, Y. (2016): The EGFR-HER2 module: a stem cell approach to understanding a prime target and driver of solid tumors. In: *Oncogene* 35 (23), S. 2949–2960. DOI: 10.1038/onc.2015.372.

Sheikhpour, Elnaz; Noorbakhsh, Parisa; Foroughi, Elnaz; Farahnak, Soudabeh; Nasiri, Rezvan; Neamatzadeh, Hossein (2018): A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. In: *Reports of Biochemistry & Molecular Biology* 7 (1), S. 30–37.

Shevtsov, Maxim; Balogi, Zsolt; Khachatryan, William; Gao, Huile; Vígh, László; Multhoff, Gabriele (2020): Membrane-Associated Heat Shock Proteins in Oncology: From Basic Research to New Theranostic Targets. In: *Cells* 9 (5). DOI: 10.3390/cells9051263.

Shevtsov, Maxim; Huile, Gao; Multhoff, Gabriele (2018): Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 373 (1738). DOI: 10.1098/rstb.2016.0526.

Shield, Kevin D.; Soerjomataram, Isabelle; Rehm, Jürgen (2016): Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 40 (6), S. 1166–1181. DOI: 10.1111/acer.13071.

Singh, Deependra; Malila, Nea; Pokhrel, Arun; Anttila, Ahti (2015): Association of symptoms and breast cancer in population-based mammography screening in Finland. In: *International journal of cancer* 136 (6), E630-7. DOI: 10.1002/ijc.29170.

Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. In: *The New England journal of medicine* 344 (11), S. 783–792. DOI: 10.1056/NEJM200103153441101.

Slamon, Dennis; Eiermann, Wolfgang; Robert, Nicholas; Pienkowski, Tadeusz; Martin, Miguel; Press, Michael; Mackey, John; Glaspy, John; Chan, Arlene; Pawlicki, Marek; Pinter, Tamas; Valero, Vicente; Liu, Mei-Ching; Sauter, Guido; Minckwitz, Gunter von; Visco, Frances; Bee, Valerie; Buyse, Marc; Bendahmane, Belguendouz; Tabah-Fisch, Isabelle; Lindsay, Mary-Ann; Riva, Alessandro; Crown, John (2011): Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. In: *The New England journal of medicine* 365 (14), S. 1273–1283. DOI: 10.1056/NEJMoa0910383.

Sledge, George W.; Toi, Masakazu; Neven, Patrick; Sohn, Joohyuk; Inoue, Kenichi; Pivot, Xavier; Burdaeva, Olga; Okera, Meena; Masuda, Norikazu; Kaufman, Peter A.; Koh, Han; Grischke, Eva-Maria; Frenzel, Martin; Lin, Yong; Barriga, Susana; Smith, Ian C.; Bourayou, Nawel; Llombart-Cussac, Antonio (2017): MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2-Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (25), S. 2875–2884. DOI: 10.1200/JCO.2017.73.7585.

Soria, Gali; Ofri-Shahak, Maya; Haas, Ilana; Yaal-Hahoshen, Neora; Leider-Trejo, Leonor; Leibovich-Rivkin, Tal; Weitzenfeld, Polina; Meshel, Tsipi; Shabtai, Esther; Gutman, Mordechai; Ben-Baruch, Adit (2011): Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. In: *BMC cancer* 11, S. 130. DOI: 10.1186/1471-2407-11-130.

Statistisches Bundesamt (2019a): Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs. Online verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Sterbefaelle_KrebsInsgesamt.html#Fussnote1, zuletzt geprüft am 27.02.2019.

Statistisches Bundesamt (2019b): Gestorbene nach Todesursachen. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/GestorbeneAnzahl.html#Fussnote1>, zuletzt geprüft am 27.02.2019.

Strand, Fredrik; Azavedo, Edward; Hellgren, Roxanna; Humphreys, Keith; Eriksson, Mikael; Shepherd, John; Hall, Per; Czene, Kamila (2019): Localized mammographic density is associated with interval cancer and large breast cancer: a nested case-control study. In: *Breast cancer research : BCR* 21 (1), S. 8. DOI: 10.1186/s13058-019-1099-y.

Strnad, Vratislav; Ott, Oliver J.; Hildebrandt, Guido; Kauer-Dorner, Daniela; Knauerhase, Hellen; Major, Tibor; Lyczek, Jaroslaw; Guinot, Jose Luis; Dunst, Jürgen; Miguelez, Cristina Gutierrez; Slampa, Pavel; Allgäuer, Michael; Lössl, Kristina; Polat, Bülent; Kovács, György; Fishedick, Arnt-René; Wendt, Thomas G.; Fietkau, Rainer; Hindemith, Marion; Resch, Alexandra; Kulik, Anna; Arribas, Leo; Niehoff, Peter; Guedea, Fernando; Schlamann, Annika; Pötter, Richard; Gall, Christine; Malzer, Martina; Uter, Wolfgang; Polgár, Csaba (2016): 5-year results of accelerated partial breast irradiation using sole interstitial multicatheter brachytherapy versus whole-breast irradiation with boost after breast-conserving surgery for low-risk invasive and in-situ carcinoma of the female breast: a randomised, phase 3, non-inferiority trial. In: *The Lancet* 387 (10015), S. 229–238. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00471-7.

Sun, Yi-Sheng; Zhao, Zhao; Yang, Zhang-Nv; Xu, Fang; Lu, Hang-Jing; Zhu, Zhi-Yong; Shi, Wen; Jiang, Jianmin; Yao, Ping-Ping; Zhu, Han-Ping (2017): Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. In: *International Journal of Biological Sciences* 13 (11), S. 1387–1397. DOI: 10.7150/ijbs.21635.

Swain, Sandra M.; Baselga, José; Kim, Sung-Bae; Ro, Jungsil; Semiglazov, Vladimir; Campone, Mario; Ciruelos, Eva; Ferrero, Jean-Marc; Schneeweiss, Andreas; Heeson, Sarah; Clark, Emma; Ross, Graham; Benyunes, Mark C.; Cortés, Javier (2015): Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. In: *The New England journal of medicine* 372 (8), S. 724–734. DOI: 10.1056/NEJMoa1413513.

Swain, Sandra M.; Miles, David; Kim, Sung-Bae; Im, Young-Hyuck; Im, Seock-Ah; Semiglazov, Vladimir; Ciruelos, Eva; Schneeweiss, Andreas; Loi, Sherene; Monturus, Estefanía; Clark, Emma; Knott, Adam; Restuccia, Eleonora; Benyunes, Mark C.; Cortés, Javier (2020): Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. In: *The Lancet. Oncology* 21 (4), S. 519–530. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30863-0.

Taunk, Neil K.; Haffty, Bruce G.; Chen, Sining; Khan, Atif J.; Nelson, Carl; Pierce, Dorothy; Goyal, Sharad (2011): Comparison of radiation-induced fatigue across 3 different radiotherapeutic methods for early stage breast cancer. In: *Cancer* 117 (18), S. 4116–4124. DOI: 10.1002/cncr.26013.

Taylor, Carolyn; Correa, Candace; Duane, Frances K.; Aznar, Marianne C.; Anderson, Stewart J.; Bergh, Jonas; Dodwell, David; Ewertz, Marianne; Gray, Richard; Jagsi, Reshma; Pierce, Lori; Pritchard, Kathleen I.; Swain, Sandra; Wang, Zhe; Wang, Yaochen; Whelan, Tim; Peto, Richard; McGale, Paul (2017): Estimating the Risks of Breast Cancer Radiotherapy: Evidence From Modern Radiation Doses to the Lungs and Heart and From Previous Randomized Trials. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (15), S. 1641–1649. DOI: 10.1200/JCO.2016.72.0722.

Tissières, A.; Mitchell, H. K.; Tracy, U. M. (1974): Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. In: *Journal of molecular biology* 84 (3), S. 389–398.

Tsung, A.; Tohme, S.; Billiar, T. R. (2014): High-mobility group box-1 in sterile inflammation. In: *Journal of internal medicine* 276 (5), S. 425–443. DOI: 10.1111/joim.12276.

Turner, Nicholas C.; Slamon, Dennis J.; Ro, Jungsil; Bondarenko, Igor; Im, Seock-Ah; Masuda, Norikazu; Colleoni, Marco; DeMichele, Angela; Loi, Sherene; Verma, Sunil; Iwata, Hiroji; Harbeck, Nadia; Loibl, Sibylle; André, Fabrice; Puyana Theall, Kathy; Huang, Xin; Giorgetti, Carla; Huang Bartlett, Cynthia; Cristofanilli, Massimo (2018): Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. In: *New England Journal of Medicine* 379 (20), S. 1926–1936. DOI: 10.1056/NEJMoa1810527.

Tutt, Andrew; Robson, Mark; Garber, Judy E.; Domchek, Susan M.; Audeh, M. William; Weitzel, Jeffrey N.; Friedlander, Michael; Arun, Banu; Loman, Niklas; Schmutzler, Rita K.; Wardley, Andrew; Mitchell, Gillian; Earl, Helena; Wickens, Mark; Carmichael, James (2010): Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. In: *The Lancet* 376 (9737), S. 235–244. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60892-6.

Vaidya, Jayant S.; Wenz, Frederik; Bulsara, Max; Tobias, Jeffrey S.; Joseph, David J.; Keshtgar, Mohammed; Flyger, Henrik L.; Massarut, Samuele; Alvarado, Michael; Saunders, Christobel; Eiermann, Wolfgang; Metaxas, Marinos; Sperk, Elena; Sütterlin, Marc; Brown, Douglas; Esserman, Laura; Roncadin, Mario; Thompson, Alastair; Dewar, John A.; Holtveg, Helle M. R.; Pigorsch, Steffi; Falzon, Mary; Harris, Eleanor; Matthews, April; Brew-Graves, Chris; Potyka, Ingrid; Corica, Tammy; Williams, Norman R.; Baum, Michael (2014): Risk-adapted targeted intraoperative radiotherapy versus whole-breast radiotherapy for breast cancer: 5-year results for local control and overall survival from the

TARGIT-A randomised trial. In: *The Lancet* 383 (9917), S. 603–613. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61950-9.

van Maaren, M. C.; Munck, L. de; Jobsen, J. J.; Poortmans, P.; Bock, G. H. de; Siesling, S.; Strobbe, L. J. A. (2016): Breast-conserving therapy versus mastectomy in T1-2N2 stage breast cancer: a population-based study on 10-year overall, relative, and distant metastasis-free survival in 3071 patients. In: *Breast cancer research and treatment* 160 (3), S. 511–521. DOI: 10.1007/s10549-016-4012-8.

VanArsdale, Todd; Boshoff, Chris; Arndt, Kim T.; Abraham, Robert T. (2015): Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (13), S. 2905–2910. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0816.

Vega, V. L.; Rodriguez-Silva, M.; Frey, T.; Gehrman, M.; Diaz, J. C.; Steinem, C.; Multhoff, G.; Arispe, N.; Maio, A. de (2008): Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form that Activates Macrophages. In: *The Journal of Immunology* 180 (6), S. 4299–4307. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4299.

Veronesi, Umberto; Orecchia, Roberto; Maisonneuve, Patrick; Viale, Giuseppe; Rotmensz, Nicole; Sangalli, Claudia; Luini, Alberto; Veronesi, Paolo; Galimberti, Viviana; Zurrada, Stefano; Leonardi, Maria Cristina; Lazzari, Roberta; Cattani, Federica; Gentilini, Oreste; Intra, Mattia; Caldarella, Pietro; Ballardini, Bettina (2013): Intraoperative radiotherapy versus external radiotherapy for early breast cancer (ELIOT): a randomised controlled equivalence trial. In: *The Lancet Oncology* 14 (13), S. 1269–1277. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70497-2.

Vila, Jose; Gandini, Sara; Gentilini, Oreste (2015): Overall survival according to type of surgery in young (≤ 40 years) early breast cancer patients: A systematic meta-analysis comparing breast-conserving surgery versus mastectomy. In: *Breast (Edinburgh, Scotland)* 24 (3), S. 175–181. DOI: 10.1016/j.breast.2015.02.002.

Visvanathan, Kala; Chlebowski, Rowan T.; Hurley, Patricia; Col, Nananda F.; Ropka, Mary; Collyar, Deborah; Morrow, Monica; Runowicz, Carolyn; Pritchard, Kathleen I.; Hagerty, Karen; Arun, Banu; Garber, Judy; Vogel, Victor G.; Wade, James L.; Brown, Powel; Cuzick, Jack; Kramer, Barnett S.; Lippman, Scott M. (2009): American society of clinical oncology clinical practice guideline update on the use of pharmacologic interventions including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition for breast cancer risk reduction. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (19), S. 3235–3258. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.5179.

Walker, Sarah; Hyde, Chris; Hamilton, William (2014): Risk of breast cancer in symptomatic women in primary care: a case-control study using electronic records. In: *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners* 64 (629), e788-93. DOI: 10.3399/bjgp14X682873.

Wang, Ruibo; Kovalchin, Joseph T.; Muhlenkamp, Peggy; Chandawarkar, Rajiv Y. (2006): Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. In: *Blood* 107 (4), S. 1636–1642. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2559.

Webber, Colleen; Gospodarowicz, Mary; Sobin, Leslie H.; Wittekind, Christian; Greene, Frederick L.; Mason, Malcolm D.; Compton, Carolyn; Brierley, James; Groome, Patti A. (2014): Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. In: *International journal of cancer* 135 (2), S. 371–378.

- Webber, Colleen; Jiang, Li; Grunfeld, Eva; Groome, Patti A. (2017): Identifying predictors of delayed diagnoses in symptomatic breast cancer: a scoping review. In: *European journal of cancer care* 26 (2). DOI: 10.1111/ecc.12483.
- Weir, H. M.; Kraulis, P. J.; Hill, C. S.; Raine, A. R.; Laue, E. D.; Thomas, J. O. (1993): Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. In: *The EMBO journal* 12 (4), S. 1311–1319.
- Whittaker, Shane; Madani, Daniel; Joshi, Swapna; Chung, Sylvia A.; Johns, Terrance; Day, Bryan; Khasraw, Mustafa; McDonald, Kerrie L. (2017): Combination of palbociclib and radiotherapy for glioblastoma. In: *Cell Death Discovery* 3, 17033-. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.33.
- Wimberly, Hallie; Brown, Jason R.; Schalper, Kurt; Haack, Herbert; Silver, Matthew R.; Nixon, Christian; Bossuyt, Veerle; Pusztai, Lajos; Lannin, Donald R.; Rimm, David L. (2015): PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. In: *Cancer immunology research* 3 (4), S. 326–332. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0133.
- Wu, Yongzhong; Antony, Smitha; Meitzler, Jennifer L.; Doroshov, James H. (2014): Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. In: *Cancer letters* 345 (2), S. 164–173. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.014.
- Yang, Xiaokui; Wang, Jiandong; Zhou, Ying; Wang, Yamei; Wang, Shuyu; Zhang, Weiyuan (2012): Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. In: *Cancer letters* 321 (2), S. 137–143. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.01.030.
- Yardley, Denise A. (2019): MONALEESA clinical program: a review of ribociclib use in different clinical settings. In: *Future oncology (London, England)* 15 (23), S. 2673–2686. DOI: 10.2217/fon-2019-0130.
- Yu, Hua; Kortylewski, Marcin; Pardoll, Drew (2007): Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (1), S. 41–51. DOI: 10.1038/nri1995.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation nach Kräften unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Betreuerin Prof. Dr. G. Multhoff für ihre fachliche und emotionale Unterstützung. Sie war jederzeit für mich ansprechbar, sodass Probleme und Fragen stets innerhalb kurzer Zeit geklärt werden konnten.

Darüber hinaus möchte ich dem gesamten Team der AG Multhoff danken, das mich freundlich aufgenommen und jederzeit unterstützt hat. Bei der Durchführung der Experimente war immer jemand vor Ort, der mir bei Fragen schnell und unkompliziert helfen konnte. Danke für die gute Zusammenarbeit.

Zudem gilt mein Dank und mein großer Respekt allen Patient*innen, die in einer schwierigen Lebensphase zur Teilnahme an klinischen Studien bereit sind und dazu beitragen, Diagnostik und Therapie zu optimieren. Ich wünsche ihnen viel Gesundheit, Kraft und Durchhaltevermögen.

Meine ganze Familie, meine Freundinnen und Freunde waren jederzeit für mich da. Ich danke Euch von ganzem Herzen für Eure emotionale Unterstützung, Geduld beim Korrekturlesen und Euren ständigen Rückhalt.

Zuletzt möchte ich an meine Großmutter erinnern, die früh an Brustkrebs verstorben ist und die ich deshalb nie kennenlernen durfte. Ich wünsche mir, dass meine Arbeit dazu beiträgt, Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zu verbessern und betroffenen Familien mehr gemeinsame Zeit und Lebensqualität zu ermöglichen.