

Prädiktion des intratumoralen Immunmilieus im Mammakarzinom durch periphere CXCR3-Chemokine in Mammakarzinom-Patientinnen

Dorine Nathalie Hamann

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

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Holger Bronger
2. Priv.-Doz. Dr. Katja Steiger

Die Dissertation wurde am 31.01.2025 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 18.06.2025 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Das Mammakarzinom	2
2.1.1 Epidemiologie	2
2.1.2 Stadien	2
2.1.3 Histopathologische Klassifikation	4
2.1.4 Molekularbiologische Klassifikation	4
2.1.5 Therapie	6
2.2 Tumorummunologie des Mammakarzinoms	8
2.3 Chemokine und ihre Rezeptoren	9
2.3.1 Übersicht	9
2.3.2 CXC-Chemokine	12
2.3.3 CXCL9, CXCL10 und ihr Rezeptor CXCR3	13
2.3.4 Das CXCR3-Chemokinsystem in Tumoren	14
2.4 Zielsetzung der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Projektplan und Studienaufbau	19
3.2 Materialien und Geräte	22
3.2.1 Chemikalien	22
3.2.2 Antikörper für die Immunhistochemie	23
3.2.3 Kits	23
3.2.4 Puffer	23
3.2.5 Verbrauchsgegenstände und Geräte	24
3.3 Versuchsmethoden	24
3.3.1 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	24
3.3.2 CXCL9- & CXCL10 ELISA	25
3.3.3 Immunhistochemie	26
3.3.4 CXCL9- und CXCL10-Immunhistochemie	26
3.4 Statistische Auswertung	27
4 Ergebnisse	29
4.1 CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumorgewebe	29
4.2 CXCL9- und CXCL10-Expression im Serum	34

4.2.1	Korrelation der Chemokin-Expression in Serum und Tumorgewebe	37
4.3	Assoziation zwischen Chemokinen und klinikopathologischen Faktoren	39
4.3.1	Chemokinexpression im Tumor und klinikopathologische Faktoren	39
4.3.2	Chemokinexpression im Serum und klinikopathologische Faktoren	43
4.4	Assoziationen zwischen Chemokinen und molekularbiologischen Faktoren	47
4.4.1	Chemokinexpression im Tumor und molekularbiologische Faktoren....	47
4.4.2	Chemokinexpression im Serum und molekularbiologische Faktoren ...	48
4.5	Einfluss der CXCR3-Chemokine auf die Prognose.....	50
4.5.1	Prognostischer Einfluss der intratumoralen Chemokine.....	50
4.5.2	Prognostischer Einfluss der peripheren Chemokine.....	53
4.5.2.1	Bedeutung der Chemokine nach Nodalstatus	59
4.5.2.2	Bedeutung der Chemokine nach histologischem Subtyp	62
4.5.3	Prognostischer Einfluss der intratumoralen & peripheren Chemokine..	67
5	Diskussion	69
5.1	Systemische Chemokine unabhängig von intratumoralen Chemokinen.....	70
5.2	Intratumorale Chemokine ohne prognostische Relevanz.....	72
5.3	Höheres Serum-CXCL10 im primär metastasierten Mammakarzinom.....	75
5.4	Periphere Chemokine als prognostische Marker im Mammakarzinom.....	78
5.5	Einsatz des CXCL9 und CXCL10 im Serum als Biomarker	81
6	Literaturverzeichnis.....	83
7	Danksagung.....	95

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
<i>BRCA1/2</i>	<i>Breast Cancer 1/2-Gene</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	CC-Motiv-Chemokinligand
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CTLs	Zytotoxische T-Lymphozyten
CXCL	CXC-Motiv-Chemokinligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DCIS	Duktales Carcinoma <i>in situ</i>
DFS	<i>Disease-free survival</i> : Krankheitsfreies Überleben
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Östrogenrezeptor
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i> : und andere
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2 bzw. HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIFs	Hypoxie-induzierbare Faktoren
HR	Hormonrezeptor
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> : Meerrettich-Peroxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin-6
int.	interna
IP-10	<i>interferon gamma-induced protein 10</i>
kDa	kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
LCIS	Lobuläres Carcinoma <i>in situ</i>
M. pectoralis minor	Musculus pectoralis minor
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIG	<i>monokine induced by interferon-gamma</i>
NK	Natürliche Killerzelle(n)
OS	<i>Overall survival</i> : Gesamtüberleben

PARP-Inhibitoren	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> : Phosphatgepufferte Salzlösung
PFS	<i>Progression-free survival</i> : Progressionsfreies Überleben
PR	Progesteronrezeptor
TH1-Zelle	Typ1-T-Helferzelle
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
T-DM1	Trastuzumab-Emtansin
TNF- α	Tumornekrosefaktor - α
TNM	Tumor Lymphknoten Metastasen (Klassifikationssystem maligner Tumoren)
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF-A	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor A
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histopathologisches Staging des Mammakarzinoms mittels pTNM-Klassifikation.....	3
Tabelle 2: Immunhistochemische Subtypen des Mammakarzinoms.	5
Tabelle 3: Adjuvante Systemtherapie des Mammakarzinoms nach Tumorsubtyp.....	7
Tabelle 4: Nomenklatur der humanen Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	10
Tabelle 5: Übersicht über das Patientinnenkollektiv.	20
Tabelle 6: Genutzte Chemikalien.	22
Tabelle 7: Für die Immunhistochemie genutzte Primärantikörper.....	23
Tabelle 8: Kommerziell erhältliche Kits.	23
Tabelle 9: Verwendete Puffer.....	23
Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsgegenstände und Geräte.....	24
Tabelle 11: CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumorgewebe.	31
Tabelle 12: CXCL9- und CXCL10-Serumkonzentration im Patientinnenkollektiv.	36
Tabelle 13: Assoziationen zwischen intratumoraler Chemokinkonzentration und klinikopathologischen Faktoren im nicht metastasierten Patientinnenkollektiv.....	39
Tabelle 14: Assoziationen zwischen intratumoraler Chemokinkonzentration und klinikopathologischen Faktoren im primär metastasierten Patientinnenkollektiv. .	41
Tabelle 15: Assoziationen zwischen peripherer Chemokinkonzentration und klinikopathologischen Faktoren im nicht metastasierten Patientinnenkollektiv.....	44
Tabelle 16: Assoziationen zwischen peripherer Chemokinkonzentration und klinikopathologischen Faktoren im metastasierten Patientinnenkollektiv.	46
Tabelle 17: Assoziationen zwischen Chemokinkonzentration im Tumor und molekularbiologischen Faktoren.....	47
Tabelle 18: Assoziationen zwischen Chemokinkonzentration im Serum und molekularbiologischen Faktoren.....	48
Tabelle 19: Univariate Cox-Regressionsanalyse des M0-Kollektivs.	55
Tabelle 20: Multivariate Cox-Regressionsanalyse des M0-Kollektivs.....	56
Tabelle 21: Univariate Cox-Regressionsanalyse des M1-Kollektivs.	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tertiärstruktur eines CXC-Chemokins.	9
Abbildung 2: Schematische Übersicht der antitumoralen Aktivität verschiedener Chemokine.....	15
Abbildung 3: Rolle von CXCL9 und CXCL10 in soliden Tumoren.	16
Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung der CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumorgewebe.	30
Abbildung 5: CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumorgewebe in Gesamtkollektiv und Subgruppen.	32
Abbildung 6: Korrelation von CXCL9 und CXCL10 im Tumor.....	33
Abbildung 7: Absolute und relative CXCL9- und CXCL10-Serumkonzentrationen in Gesamtkollektiv und Subgruppen.....	35
Abbildung 8: Korrelation von CXCL9 und CXCL10 im Serum.	37
Abbildung 9: Korrelation der CXCL9- und CXCL10-Expression in Serum und Tumorgewebe.....	38
Abbildung 10: Korrelation zwischen Chemokinexpression im Tumor und TILs sowie zwischen CXCL9 und histologischem Grad im nicht metastasierten Kollektiv.	40
Abbildung 11: Korrelation zwischen Chemokinexpression im Tumor und TILs im primär metastasierten Kollektiv.	42
Abbildung 11: Korrelation zwischen CXCL9- und CXCL10-Expression in Serum und tumorinfiltrierenden Lymphozyten im nicht metastasierten Kollektiv.	43
Abbildung 12: Korrelation zwischen CXCL9- und CXCL10-Expression in Serum und tumorinfiltrierenden Lymphozyten im metastasierten Kollektiv.	45
Abbildung 13: Prognostische Signifikanz des intratumoralen CXCL9 und CXCL10 im nicht metastasierten Kollektiv.....	52
Abbildung 15: Prognostische Bedeutung des peripheren CXCL9 und CXCL10 im nicht metastasierten Kollektiv.	54
Abbildung 16: Prognostische Signifikanz des peripheren CXCL9 und CXCL10 im primär metastasierten Kollektiv.	58
Abbildung 17: Prognostische Signifikanz von CXCL9 im Serum im nicht metastasierten Kollektiv, abhängig vom Nodalstatus.....	60
Abbildung 18: Prognostische Signifikanz von CXCL10 im Serum im nicht metastasierten Kollektiv, abhängig vom Nodalstatus.....	61
Abbildung 19: Prognostische Signifikanz von CXCL9 und CXCL10 im Serum im Hormonrezeptor-positiven, nicht metastasierten Kollektiv.	63

Abbildung 20: Prognostische Signifikanz von CXCL9 und CXCL10 im Serum im HER2-positiven, nicht metastasierten Kollektiv.	64
Abbildung 21: Prognostische Signifikanz von CXCL9 und CXCL10 im Serum im Triple-negativen, nicht metastasierten Kollektiv.....	66
Abbildung 22: Prognostische Signifikanz des intratumoralen und peripheren CXCL9 und CXCL10 im nicht metastasierten Kollektiv.	68

1 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Moderne Therapiekonzepte, welche Einfluss auf das Immunsystems nehmen, gewinnen zunehmend an Bedeutung. Eine wichtige Voraussetzung für deren Erfolg spielen dabei Chemokine, endogene, chemotaktische Botenstoffe, die vor allem die Leukozytenmigration in physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen steuern. Von besonderem Interesse sind im Mammakarzinom vor allem die CXCR3-Chemokine CXCL9 und CXCL10. Sie sind einerseits für die Rekrutierung von tumorsuppressiven Immunzellen in die Tumormikroumgebung zuständig. Andererseits können Tumorzellen den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren, damit an Orte mit erhöhter Chemokinkonzentration migrieren und die Invasivität und Metastasierung von Tumoren auf diese Art fördern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression beider Chemokine im Tumorgewebe sowie im Serum von Brustkrebspatientinnen mit klinikopathologischen Faktoren sowie der Prognose zu korrelieren.

Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen intratumoraler und peripherer Chemokinkonzentration. Zudem fanden sich im Serum primär metastasierter Brustkrebspatientinnen höhere CXCL10-Konzentrationen als bei nicht metastasierten Patientinnen. Auch zeigte sich das krankheitsfreie Überleben nicht metastasierter Patientinnen mit hohem Serum-CXCL9 verringert. Es stellte sich kein Einfluss der intratumoralen oder systemischen Chemokinkonzentration auf das Gesamtüberleben heraus, unabhängig vom Metastasierungsstatus.

Diese Beobachtungen waren unabhängig von etablierten prognostischen Faktoren wie dem tumorbiologischen Subtyp, dem histologischen Grad oder dem Proliferationsindex. Die Ergebnisse legen eine tumorsupportive Rolle hoher systemischer Konzentrationen der CXCR3-Liganden im Mammakarzinom nahe. Somit könnten CXCL9 und CXCL10 zukünftig als potentielle Serummarker für eine schlechtere Prognose diskutiert werden.

2 Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Jährlich werden deutschlandweit rund 70.000 Neudiagnosen gestellt (Robert Koch-Institut, 2021) und weltweit 2,4 Millionen neue Fälle gemeldet (Fitzmaurice et al., 2017). Dies entspricht in Deutschland fast einem Drittel der jährlich neu auftretenden malignen Neoplasien bei Frauen. Die weite Verbreitung spiegelt sich ebenfalls im Lebenszeitrisiko wider: Derzeit erkrankt eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (Robert Koch-Institut, 2021; Siegel et al., 2020). Bei der Diagnosestellung sind die Patientinnen im Durchschnitt 64 Jahre alt (Robert Koch-Institut, 2021).

Es fällt zudem auf, dass die Inzidenz des Mammakarzinoms zunimmt. Erkrankten 1980 weltweit noch 641.000 Frauen pro Jahr, waren es drei Jahrzehnte später mit 1.643.000 Frauen schon mehr als doppelt so viele (Forouzanfar et al., 2011).

Mit 17,7% aller Krebspatientinnen ist das Mammakarzinom für den größten Anteil der krebsbedingten Todesfälle bei Frauen verantwortlich (Robert Koch-Institut, 2021). Im Gegensatz zum Inzidenzanstieg zeigte sich in den letzten Jahrzehnten durch weiterentwickelte Therapiekonzepte und neue Screeningmethoden ein Rückgang der Mortalität (Siegel et al., 2020).

Als Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms kann in erster Linie steigendes Alter sowie eine familiäre Prädisposition genannt werden. Reproduktionsfaktoren wie eine frühe Menarche, eine späte Menopause sowie wenig, keine oder eine späte erste Schwangerschaft erhöhen das Risiko ebenfalls. Zusätzlich zu einem langen hormonell aktiven Zeitraum kann der Einsatz von Östrogenen, vor allem postmenopausal, brustkrebsfördernd wirken. Hinzu kommen einige Lifestylefaktoren, die einen möglichen Angriffspunkt für eine Prävention darstellen. So können hoher Alkoholkonsum und fettreiche Ernährung zur Erhöhung des Brustkrebsrisikos beitragen, ebenso wie ein hoher BMI bzw. Adipositas (Reeves et al., 2007; Sun et al., 2017).

2.1.2 Stadien

Das Mammakarzinom wird analog zu anderen malignen Tumoren anhand der TNM-Klassifikation in verschiedene Stadien eingeteilt. Dabei werden die Ausdehnung des Primärtumors (T), die Ausprägung regionaler Lymphknotenmetastasen (N) sowie das Vorliegen von Fernmetastasen (M) beurteilt (Tabelle 1). Für die Charakterisierung der

Lymphknoten spielt vor allem deren Lokalisation eine Rolle. Kontralateral befallene axilläre Lymphknoten werden hierbei als Fernmetastasen gewertet (Gaspar et al., 2017). Hämatogene Fernmetastasen betreffen am häufigsten Knochen, Lunge und Leber (Y. T. Lee, 1983).

Die Einstufung erfolgt zunächst klinisch sowie mittels Bildgebung in ein cTNM-Stadium und nach operativer Resektion in ein histopathologisches pTNM-Stadium (Brierley et al., 2017).

Tabelle 1: Histopathologisches Staging des Mammakarzinoms mittels pTNM-Klassifikation.
Modifiziert nach (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021)

pTNM-Stadium	Tumorausbreitung
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Nachweis für Primärtumor
pTis	Carcinoma <i>in situ</i>
pT1	Tumorgröße ≤ 2 cm
pT2	Tumorgröße > 2 cm und ≤ 5 cm
pT3	Tumorgröße > 5 cm
pT4	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Haut und/oder Brustwand
pNX	Lymphknotenstatus kann nicht beurteilt werden (bspw. nach Resektion)
pN0	Kein regionärer Lymphknotenbefall
pN1	Mikrometastasen, Befall 1-3 ipsilateraler Lymphknoten
pN2	Befall 4-9 ipsilateraler axillärer Lymphknoten oder klinisch erkennbarer Lymphknoten entlang der A. mammaria int. ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Befall ≥ 10 ipsilateraler axillärer oder Befall infraklavikulärer Lymphknoten; Befall klinisch erkennbarer Lymphknoten entlang der A. mammaria int. mit Befall min. eines axillären Lymphknotens oder Befall > 3 axillärer Lymphknoten sowie Sentinel-Lymphknoten entlang der A. mammaria int., aber nicht klinisch erkennbar; Befall ipsilateraler supraklavikulärer Lymphknoten
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen mikroskopisch bestätigt

Die TNM-Klassifikation kann zusätzlich um die peritumorale Invasion von Lymphgefäßen (L) sowie Venen (V) erweitert werden (Mohammed et al., 2011). Mit dem Präfix y wird das Stadium nach neoadjuvanter Systemtherapie bezeichnet (Brierley et al., 2017).

Anhand der TNM-Klassifikation werden vier Stadien nach der *union internationale contre le cancer (UICC)* unterschieden. Diese Stadien lassen sich in lokal begrenzte, lokal fortgeschrittene sowie metastasierte Karzinome zusammenfassen (Wörmann et al., 2018).

2.1.3 Histopathologische Klassifikation

Grundsätzlich werden maligne Neoplasien der Brust in invasive Karzinome und Vorläuferläsionen unterteilt. Anhand ihres Ursprungsgewebes werden die invasiven Mammakarzinome nach *World Health Organisation (WHO)* in solche ohne und mit speziellem Typ unterschieden. Erstere Kategorie wurde früher auch als invasiv-duktales Karzinom bezeichnet, entspringt dem Milchgangsepithel und macht mit 75% den größten Anteil der Mammakarzinome aus. Die zweithäufigste Form ist das invasiv-lobuläre Karzinom, welches zu den speziellen Typen gehört und sich aus dem Gewebe der Milchdrüsenläppchen entwickelt. Seltene Brustkrebsformen umfassen u.a. das kribiforme sowie das inflammatorische Mammakarzinom (Böcker, 2013; Sinn et al., 2013). Analog werden die Vorläuferläsionen in der Brust in duktales Carcinomata *in situ* (DCIS) sowie lobuläre Carcinomata *in situ* (LCIS) eingeteilt. Diese Tumore durchbrechen die Basalmembran nicht und werden somit als nicht-invasiv eingestuft. Das DCIS gilt darüber hinaus als obligate Präkanzerose (Sinn und Kreipe, 2013).

Zudem wird der Tumor histologisch auf seine Zelldifferenzierung hin geprüft. Für das Grading des Mammakarzinoms hat sich das nach Elston und Ellis modifizierte Bloom-Richardson-System etabliert, welches den Tumor in Bezug auf Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate untersucht. Durch ein Punktesystem wird der Tumor in drei Kategorien eingeteilt, welche eine starke Korrelation mit der Prognose aufweisen (Elston et al., 1991).

2.1.4 Molekularbiologische Klassifikation

Das Mammakarzinom ist eine äußerst heterogene Tumorentität. Auf Basis verschiedener tumorbiologischer und immunhistochemischer Ausprägungsmerkmale lassen sich einzelne Subtypen unterscheiden. Diese sind in Tabelle 2 dargestellt.

Bei dieser Einteilung ist vor allem die Erhebung des Hormonrezeptorstatus von besonderer Bedeutung, welche bei allen Mammakarzinompatientinnen regulär

durchgeführt wird. Bis zu drei Viertel der Tumore sind Hormonrezeptor (HR)-positiv und exprimieren somit Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren. Bei einem immunhistochemischen Nachweis von min. 1% positiver Tumorzellkerne gilt ein Tumor als hormonsensitiv (Hammond et al., 2010). HR-positive Tumore werden anhand des *human epidermal growth factor receptor* (HER) 2- und Ki-67-Status zusätzlich in Luminal A und Luminal B eingeteilt und haben gegenüber den anderen Subtypen eine bessere Prognose (Sotiriou et al., 2003).

HER2-positive Tumoren finden sich in 15% bis 30% der Mammakarzinome (Rüschoff et al., 2017; Slamon et al., 1989; Wolff et al., 2013). Der Wachstumsfaktorrezeptor HER2 fungiert als Protoonkogen. Dessen Überexpression führt in der Regel zu einer ungünstigen Prognose, bietet jedoch einen Angriffspunkt für eine gezielte Antikörpertherapie (Slamon et al., 1989; Untch et al., 2006). Die HER2-Expression wird mittels Immunhistochemie (IHC) bestimmt und kann bei unklarem Ergebnis um eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erweitert werden (Wolff et al., 2013). Tumoren mit niedriger HER2-Expression in der IHC und negativer FISH werden neuerdings als HER2-low Tumore bezeichnet (Shirman et al., 2023). Eine fehlende HER2-Überexpression wird als HER2-negativ gewertet.

Alle weiteren Mammakarzinome werden der Triple-negativen Gruppe zugeordnet, die keinen der drei genannten Rezeptoren exprimiert und auch seltene histologische Sonderformen umfasst (Goldhirsch et al., 2011). Der Triple-negative Subtyp ist im Vergleich mit den anderen Subtypen mit der prinzipiell schlechtesten Prognose vergesellschaftet (Liedtke et al., 2008).

Eine starke Ausprägung des Proteins Ki-67 geht ebenfalls mit einer schlechteren Prognose einher (Thor et al., 1999). Ki-67 lässt sich sowohl im Zellkern sich teilender Zellen als auch vermehrt in malignen Neoplasien nachweisen und wird entsprechend in verschiedenen Tumorentitäten als Marker für die Proliferationsrate genutzt (Gerdes et al., 1983).

Tabelle 2: Immunhistochemische Subtypen des Mammakarzinoms.

HR = Hormonrezeptor, ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor. Modifiziert nach (Goldhirsch et al., 2011)

Tumorsubtyp	ER und/oder PR	HER2	Ki67
Luminal A	positiv	negativ	niedrig
Luminal B	positiv	positiv/negativ	hoch
HER2-positiv	negativ	positiv	jeder Wert
Triple-negativ	negativ	negativ	jeder Wert

2.1.5 Therapie

Die Behandlung des Mammakarzinoms wird durch multimodale Therapiekonzepte beschrieben und ist abhängig vom Stadium sowie der individuellen Tumorklassifikation. Sie besteht aus verschiedenen Therapiemodalitäten, wobei bei nicht-metastasierten Mammakarzinomen die operative Resektion meist die kurative Basis bildet. Zusätzlich wird bei klinisch unauffälligen regionären Lymphknoten eine Sentinel-Lymphonodektomie durchgeführt, um den axillären Lymphknotenstatus zu untersuchen und im positiven Fall eine Axilladisektion vornehmen zu können (McDonald et al., 2016). Inzwischen werden meist brusterhaltende Verfahren angewandt, welche in Kombination mit einer Bestrahlung vergleichbare Überlebensraten wie nach einer Mastektomie bieten. Zu der Operation kommen je nach Tumorsubtyp adjuvante Maßnahmen, welche in Tabelle 3 aufgelistet sind (Harbeck et al., 2019; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Für die Behandlung HR-positiver Karzinome stehen Wirkstoffe wie der selektive Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen zur Verfügung, welcher die Mortalität dieser Tumoruntergruppe vor allem in Kombination mit einer Chemotherapie signifikant senken kann (Harbeck et al., 2019).

Bei HER2-positiven Tumoren bietet der gegen HER2 gerichtete monoklonale Antikörper Trastuzumab eine zusätzliche Therapiemöglichkeit (Harbeck et al., 2019). Neuere Arzneistoffe umfassen Lapatinib und Pertuzumab (Pondé et al., 2018). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren Chemoimmunkonjugate wie Trastuzumab-Emtansin (T-DM1) entwickelt, welche HER2-spezifische Antikörper mit Zytostatika kombinieren, um die Therapieeffektivität zu steigern (Ferraro et al., 2021).

Eine Chemotherapie erfolgt in der Regel neben den in Tabelle 3 genannten Indikationen ebenfalls bei jungen Patientinnen sowie bei schlecht differenziertem Tumorgewebe. Als Zytostatika werden standardmäßig Kombinationen aus Anthrazyklinen und Taxanen eingesetzt. Bei Triple-negativen Karzinomen können zusätzlich Platinderivate Anwendung finden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Eine neoadjuvante Systemtherapie wird unter anderem bei einer Tumorgröße von über 5 cm, lokal fortgeschrittenen und inflammatorischen Mammakarzinomen durchgeführt (McDonald et al., 2016).

Metastasierte Mammakarzinome werden als nicht heilbar angesehen und entsprechend palliativ therapiert. Zum Einsatz kommen in erster Linie systemische Therapien, welche in bestimmten Fällen durch eine Radiotherapie oder eine Operation ergänzt werden können (Harbeck et al., 2019).

Tabelle 3: Adjuvante Systemtherapie des Mammakarzinoms nach Tumorsubtyp.

Modifiziert nach (Harbeck et al., 2019)

Subtyp	Adjuvante Systemtherapie
Luminal A	Endokrine +/- Chemotherapie
Luminal B	Endokrine +/- Chemotherapie +/- Antikörpertherapie
HER2-positiv	Chemo- + Antikörpertherapie
Triple-negativ	Chemotherapie

Hervorzuheben ist, dass viele eingesetzte Wirkstoffe neben ihrem pharmakologischen Wirkmechanismus auch Einfluss auf das Immunsystem nehmen und so ihre Wirkung ausüben oder verstärken. Als Beispiel sei die Wirkstoffgruppe der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren wie Olaparib genannt. Diese werden als Chemotherapeutika beim metastasierten Mammakarzinom mit BRCA1- oder BRCA2-Mutationen eingesetzt und verlieren bei Immundefizienz ihre Wirksamkeit. Dies legt nahe, dass ihr Therapieeffekt abhängig von einem intakten Immunsystem ist (L. Ding et al., 2018; Shen et al., 2019).

2.2 Tumorimmunologie des Mammakarzinoms

Zusätzlich zu bekannten und etablierten Systemtherapien wie Chemotherapien wurden Behandlungskonzepte onkologischer Erkrankungen in den letzten Jahren intensiv weiterentwickelt. Insbesondere Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen konnten bisher bereits von innovativen Therapiekonzepten in der Immuntherapie (gemeint: Immuncheckpointblockade) profitieren (Khalil et al., 2016).

Chen und Mellman beschreiben in ihrem „Krebs-Immunitäts-Zyklus“ die endogene Aktivierung des Immunsystems gegen Tumorzellen, die prinzipiell zu einer wirksamen Bekämpfung und Eliminierung dieser führen kann. Durch den Zelltod von Tumorzellen werden Tumorantigene freigesetzt, welche von T-Zellen erkannt werden und zu einer spezifischen T-Zell-Antwort führen. Zytotoxische T-Zellen (CTLs) migrieren und infiltrieren den Tumor, wo sie durch die Sekretion porenbildender Proteine und Einschleusung von Granzymen die Apoptose der Tumorzellen erwirken (Chen et al., 2013; Zander et al., 2020).

Von Tumorzellen entwickelte negative Feedback-Mechanismen greifen jedoch in diesen Prozess ein und verhindern eine effektive Immunbekämpfung. Der Ansatz der meisten Immuntherapien zielt entsprechend darauf ab, die Schritte der immunologischen Reaktion zu reaktivieren (Pio et al., 2019). Bestimmte Therapiemechanismen fördern beispielsweise die Migration tumorsuppressiver T-Zellen in den Tumor. Diese T-Zellen werden als Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) bezeichnet, die in den Tumor einwandern und zu denen zusätzlich auch B-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK) gezählt werden (Teixeira et al., 2016). TILs gehören mit verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen sowie löslichen Faktoren wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren zur Tumormikroumgebung auch des Mammakarzinoms (TME). Die Zusammensetzung des TME spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Progression des Mammakarzinoms und bietet darüber hinaus einen Angriffspunkt für verschiedene therapeutische Ansätze (Soysal et al., 2015).

Eine hohe Anzahl an TILs geht im Mammakarzinom mit einer verbesserten Prognose einher. Neben der direkten Tumorzellelimination erhöht ein ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat das Ansprechen auf adjuvante sowie neoadjuvante Therapiekonzepte (Denkert, Loibl, et al., 2018; Denkert et al., 2010; Loi et al., 2013; Mahmoud et al., 2011).

Die Rekrutierung von T-Zellen in den Tumor wird maßgeblich durch die Chemokine CXC-Motiv-Chemokinligand (CXCL) 9 und CXCL10 initiiert (Chen und Mellman, 2013), welche zusätzlich auch tumorsuppressive Natürliche Killerzellen in den Tumor locken (Wendel et al., 2008).

2.3 Chemokine und ihre Rezeptoren

2.3.1 Übersicht

Chemokine sind chemotaktisch aktive Zytokine, die eine Gruppe von 47 verschiedenen Molekülen umfassen und hauptsächlich die Chemotaxis von Immunzellen steuern. Sie zeichnen sich durch eine molekulare Größe von ca. 8-14 kDa aus und bestehen aus 70-125 Aminosäuren (Le et al., 2004; Zlotnik et al., 2000). Chemokine spielen eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen wie der Embryogenese, Angiogenese, Hämatopoese und Leukozytenmigration (Allen et al., 2007).

Die Chemokine der verschiedenen Subgruppen ähneln sich in ihrer Aminosäuresequenz und weisen eine charakteristische Tertiärstruktur auf. Bis auf eine Ausnahme enthalten sie vier Cysteinreste. Diese bilden untereinander zwei Disulfidbrücken aus, welche drei antiparallele β -Faltblätter stabilisieren. An das flexible aminoterminele Ende schließen sich eine starre N-Schleife und meist eine 3₁₀-Helix an. Dieser Bereich ist für die Rezeptorbindung und -aktivierung zuständig. Angrenzend an das flexible carboxyterminale Segment folgt eine α -Helix (Bronger et al., 2019). In Abbildung 1 ist die Tertiärstruktur eines Chemokins beispielhaft abgebildet.

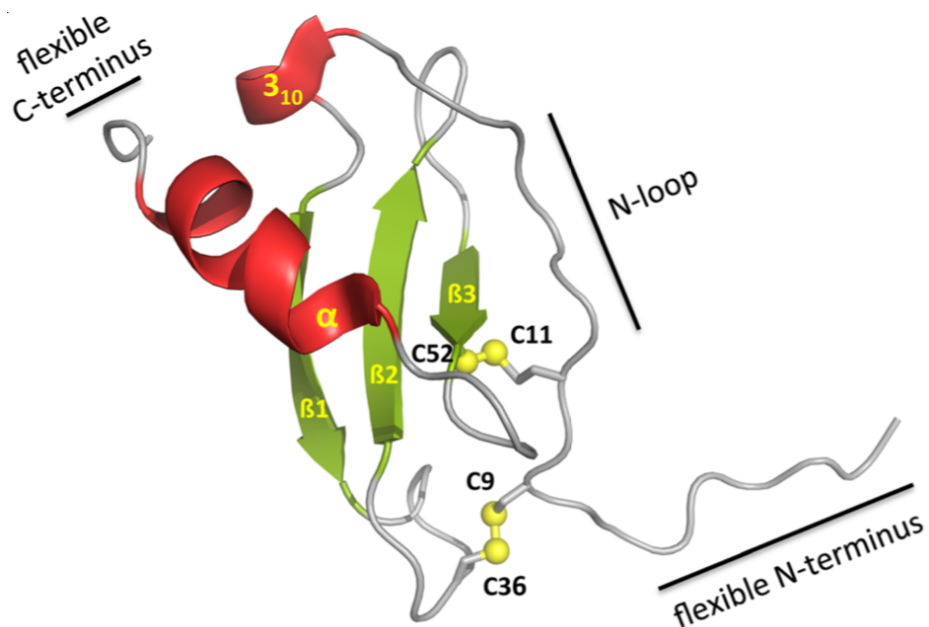


Abbildung 1: Tertiärstruktur eines CXC-Chemokins.

Beispielhaft ist CXCL11 dargestellt. Die zentralen, antiparallelen β -Faltblätter (grün) werden durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert (gelbe Kugeln). An das aminoterminele Ende schließen sich die N-Schleife und eine 3₁₀-Helix (rot) an. Angrenzend an das carboxyterminale Ende findet sich eine α -Helix (rot). Nach (Bronger et al., 2019)

Die Einteilung in vier Subgruppen erfolgt nach Anzahl und Position der Cysteinreste im aminoterminalen Proteinbereich. Eine Übersicht über die Nomenklatur des Chemokinsystems gibt Tabelle 4.

In der CXC- oder auch α -Untergruppe sind die ersten beiden Cysteinreste durch eine Aminosäure getrennt, während sie in der CC- oder β -Gruppe benachbart sind. Letztere bildet die größte Untergruppe und wirkt chemotaktisch auf viele Subtypen der Leukozyten, wie z.B. auf Monozyten, T-Zellen, Natürliche Killerzellen und Mastzellen (Zlotnik und Yoshie, 2000). Charakteristisch für die XC- bzw. γ -Subgruppe ist, dass am N-Terminus das erste und letzte Cystein fehlen (Kelner et al., 1994). Die CX3C- oder auch δ -Gruppe umfasst nur ein Molekül, das membrangebunden oder löslich vorkommende Fraktalkin, bei dem sich zwischen den ersten beiden Cysteinresten drei Aminosäuren befinden (Bazan et al., 1997).

Tabelle 4: Nomenklatur der humanen Chemokine und Chemokinrezeptoren.

Die ausschließlich murin vorkommenden Chemokine CXCL15, CCL6, CCL9/CCL10 und CCL12 sind nicht mit aufgeführt. Modifiziert nach (Struyf et al., 2003; Zlotnik et al., 2012)

Gruppe	Systematischer Name	Weitere Namen	Rezeptor
CXC-Familie	CXCL1	GRO α , MGSA	CXCR2
	CXCL2	GRO β	CXCR2
	CXCL3	GRO γ	CXCR2
	CXCL4	PF-4	CXCR3-B
	CXCL4L1	PF-4V1	CXCR3-B
	CXCL5	ENA-78	CXCR2
	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
	CXCL7	PBP, NAP-2	CXCR1, CXCR2
	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
	CXCL9	MIG	CXCR3
	CXCL10	IP-10	CXCR3
	CXCL11	I-TAC	CXCR3, CXCR7
	CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4, CXCR7
	CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR5, CXCR3
	CXCL14	BRAK, Bolekine	unbekannt
	CXCL16	SR-PSOX	CXCR6
	CXCL17	DMC	unbekannt
CC-Familie	CCL1	I-309	CCR8
	CCL2	MCP-1	CCR2
	CCL3	MIP-1 α , LD78 α	CCR1, CCR5
	CCL4	MIP-1 β	CCR5
	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5

	CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
	CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR5
	CCL11	Eotaxin	CCR3, CCR5
	CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
	CCL14	HCC-1	CCR1, CCR3, CCR5
	CCL15	HCC-2, Leukotactin-1	CCR1, CCR3
	CCL16	LEC, HCC-4	CCR1, CCR2, CCR5, CCR8, H4
	CCL17	TARC	CCR4
	CCL18	DC-CK1, PARC	PITPNM3
	CCL19	MIP-3 β , ELC	CCR7
	CCL20	MIP-3 α , LARC	CCR6
	CCL21	6Ckine, SLC	CCR6
	CCL22	MDC	CCR4
	CCL23	MPIF-1, CK β 8	CCR1, FPRL-1
	CCL24	MPIF-2, Eotaxin-2	CCR3, CCR5
	CCL25	TECK	CCR9
	CCL26	Eotaxin-3	CCR3, CX3CR1
	CCL27	CTACK, ILC	CCR10
	CCL28	MEC	CCR10, CCR3
XC-Familie	XCL1	Lymphotactin, SCM-1 α , ATAC	XCR1
	XCL2	SCM-1 β	XCR1
CX3C-Familie	CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1

Neben der strukturellen Einteilung können Chemokine auch funktionell in homöostatische und inflammatorische Untergruppen eingeordnet werden. Erstere finden sich konstitutiv in bestimmten Zellen und Geweben und sichern die für das Immunsystem essentielle Zellmigration, wie z.B. das Durchwandern sekundärer lymphatischer Organe während der Reifung von B- und T-Zellen. Zusätzlich spielen sie eine essentielle Rolle in der Kardio- und Angiogenese sowie der Entwicklung des Zentralnervensystems. Inflammatorische Chemokine hingegen werden temporär als Reaktion auf bestimmte Verletzungs- oder Entzündungsreize von zirkulierenden Leukozyten sezerniert. Ziel der induzierbaren Chemokine ist es, Immunzellen an den Ort der Verletzung bzw. Inflammation zu locken. Die Übergänge sind teils fließend, je nach biologischer Situation können Chemokine auch beide Funktionen ausüben (Allen et al., 2007; Vandercappellen et al., 2008).

Chemokine entfalten ihre Wirkung maßgeblich durch die Bindung an ihren passenden Oberflächenrezeptor. Der Hauptanteil dieser besteht aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Bindet ein Ligand daran, verändert der Rezeptor seine Konformation und wird aktiviert. Infolgedessen werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst wie z.B. die Stimulation von Tyrosinkinasen oder Phospholipasen (Fernandez et al., 2002). Es kommt zur Migration der Zielzellen, welche einem Konzentrationsgradienten folgend in das Gewebe mit der höchsten Chemokinkonzentration einwandern (Luster, 1998; Struyf et al., 2003; Vandercappellen et al., 2008).

Die Rezeptoren werden analog ihrer Liganden in vier Gruppen eingeteilt: CXC-, CC-, XC- und CX3C-Rezeptoren, wobei zwischen Rezeptor und Ligand meist keine Exklusivität besteht (s. Tabelle 4). Zusätzlich existieren atypische Rezeptoren, von denen aktuell sieben verschiedene bekannt sind. Diese weichen von der typischen Struktur ab, agieren nicht über G-Proteine und vermitteln keine Chemotaxis (Bachelier et al., 2014; Zlotnik und Yoshie, 2012).

Unabhängig der Bindung an Rezeptoren können die basischen Chemokine mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen (GAG) der Glykokalix und Extrazellulärmatrix interagieren, um einen Konzentrationsgradienten aufzubauen und aufrechtzuerhalten (Thompson et al., 2017). Die Chemokine werden dadurch an der Oberfläche von Endothelzellen gebunden und zirkulierenden Lymphozyten präsentiert (Van Raemdonck et al., 2015). Dieser Mechanismus ist essentiell für das Auslösen einer Zellmigration. Durch Affinität für bestimmte Chemokine sowie fluktuierender Expression der GAG kann die Immunantwort angepasst und reguliert werden (Mortier et al., 2012).

2.3.2 CXC-Chemokine

Die CXC-Chemokine bilden die zweitgrößte Untergruppe der Chemokine. Aktuell sind 17 verschiedene Proteine bekannt, wobei eines davon, CXCL15, ausschließlich murin vorkommt (Bachelier et al., 2014).

Die CXC-Familie kann ferner in eine ELR-positive und eine ELR-negative Gruppe differenziert werden. Das ELR-Motiv beschreibt ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Leucin und Arginin, welches sich vor der CXC-Domäne befindet (Strieter et al., 1995). Dabei fördern ELR-positive CXC-Chemokine die Angiogenese, indem sie Endothelzellen und Neutrophile rekrutieren, die wiederum den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (VEGF-A) produzieren und speichern können (Addison et al., 2000; Scapini et al., 2004). ELR-negative CXC-Chemokine hemmen diese angiogenetische Aktivität und wirken so angiostatisch. Eine Ausnahme bildet CXCL12, welches kein ELR-Motiv ausbildet, jedoch trotzdem angiogenetisch wirkt (Strieter et al., 1995).

Mit Ausnahme von CXCL12 und CXCL13 werden die CXC-Chemokine den inflammatorischen Chemokinen zugeordnet (Vandercappellen et al., 2008).

Einigen CXC-Chemokinen wird eine tumorsupportive Wirkung zugeschrieben. Unter anderem können sie das Tumorstadium und die Metastasierung begünstigen, indem sie die tumorgerichtete Migration von tumorfördernden Immunzellen wie myeloiden Suppressorzellen und regulatorischen T-Zellen induzieren (Nagarsheth et al., 2017). Tumorsupprimierende CXC-Chemokine können wiederum den Tumor bekämpfende Immunzellen wie TH1-Helferzellen, CD8-positive T-Zellen und Natürliche Killerzellen in das Tumormilieu locken und so zu einer Tumorrepression beitragen (Nagarsheth et al., 2017).

2.3.3 CXCL9, CXCL10 und ihr Rezeptor CXCR3

Die Chemokine CXCL9 und CXCL10 gehören zu den inflammatorischen Chemokinen und werden entsprechend als Antwort auf bestimmte Entzündungsreize sezerniert. Sie vermitteln die Chemotaxis verschiedener Leukozytenpopulationen hin zu inflammatorischen Bereichen. Dazu gehören vor allem Natürliche Killerzellen und aktivierte T-Lymphozyten. Darüber hinaus bilden sie kein ELR-Motiv aus und wirken somit angiostatisch (Nagarsheth et al., 2017; Zlotnik und Yoshie, 2012).

CXCL9 und CXCL10 zeichnen sich durch eine hohe strukturelle Homologie aus (Muller et al., 2010). Beide Chemokine binden an den G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptor CXCR3, welcher zudem CXCL11 als zusätzlichen Liganden aufweist. Dabei besitzt CXCL11 die höchste Rezeptoraffinität, gefolgt von CXCL10 und schließlich CXCL9 (Meyer et al., 2001).

CXCR3 findet sich vor allem auf aktivierten T-Zellen, Natürlichen Killerzellen, Makrophagen, Endothel- und dendritischen Zellen (Garcia-Lopez et al., 2001; Loetscher et al., 1996; Loetscher et al., 1998). Durch alternatives Splicing entstehen verschiedene Isoformen. CXCR3-A, die Hauptform, findet sich zum Beispiel in der Plazenta, während auf mikrovaskulärem Endothel ausschließlich CXCR3-B exprimiert wird. Zudem lassen sich beide Varianten in Herz, Niere, Leber und Skelettmuskulatur nachweisen. Die Rezeptorformen unterscheiden sich zudem in der Funktion: Die Bindung an CXCR3-A vermittelt proliferative, migratorische und antiapoptotische Effekte (Lasagni et al., 2003; Y. Li et al., 2015). Die Interaktion mit CXCR3-B führt hingegen zu Wachstumshemmung, Apoptose und Angiostase. Ferner ermöglicht CXCR3-B zusätzlich die Bindung von CXCL4 und seiner Variante CXCL4L1 (Lasagni et al., 2003). Die Funktion der Splicevariante CXCR3-alt ist nicht abschließend geklärt, sie scheint jedoch trotz

struktureller Abweichungen die chemotaktische Funktion von CXCL11 zu vermitteln (Ehlert et al., 2004).

Eine Stimulation mit dem immunmodulatorischen Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) führt in zahlreichen Zellen zur Synthese und anschließender Sezernierung beider Chemokine. Dazu gehören neben TH1-Zellen, Keratinozyten, Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten auch Tumorzellen (Luster et al., 1987; Park et al., 2002; Rossi et al., 2000). CXCL10 kann zusätzlich durch IFN- α , IFN- β und Tumornekrosefaktor (TNF)- α induziert werden, wohingegen CXCL9 nur auf TNF- α anspricht, wenn es synergistisch mit IFN- γ wirkt (Farber, 1990; Ohmori et al., 1997; Ohmori et al., 1993; Vanguri et al., 1990). Durch endogene Stoffe wie Prostaglandin E2 kann die Sekretion beider Chemokine inhibiert werden (Bronger et al., 2012).

CXCL9 und CXCL10 sind durch übersteigerte Immunaktivierung mit der Pathogenese verschiedenster Krankheitsbilder assoziiert, zu denen beispielsweise die proliferative Glomerulonephritis, die rheumatoide Arthritis sowie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen gehören (Ostvik et al., 2013; Patel et al., 2001; Romagnani et al., 1999; Uguccioni et al., 1999).

2.3.4 Das CXCR3-Chemokinsystem in Tumoren

In Tumorerkrankungen spielen CXCL9 und CXCL10 eine wichtige, jedoch divergente Rolle. Das CXCR3-System wird in der Literatur häufig als „zweischneidiges Schwert“ bezeichnet: Werden die beiden Liganden in der Tumormikroumgebung exprimiert, führt dies zu einer Steigerung der protektiven Immuninfiltration mit Tumorregression. Wird der CXCR3-Rezeptor jedoch von Tumorzellen selbst exprimiert, werden Tumorwachstum und Metastasierung gefördert (Billottet et al., 2013; Cerny et al., 2015).

Der antitumorale Effekt der CXCR3-Chemokine entsteht vor allem durch die Rekrutierung tumorsuppressiver Lymphozyten. Wie Abbildung 2 zeigt, sind CXCL9 und CXCL10 für die Rekrutierung und Migration tumorinfiltrierender Lymphozyten wie TH1-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen aus dem peripheren Blut in das Tumorgebiet zuständig. Dies wird durch die Expression des CXCR3-Rezeptors auf den entsprechen Zellen ermöglicht (Nagarsheth et al., 2017; Wendel et al., 2008).

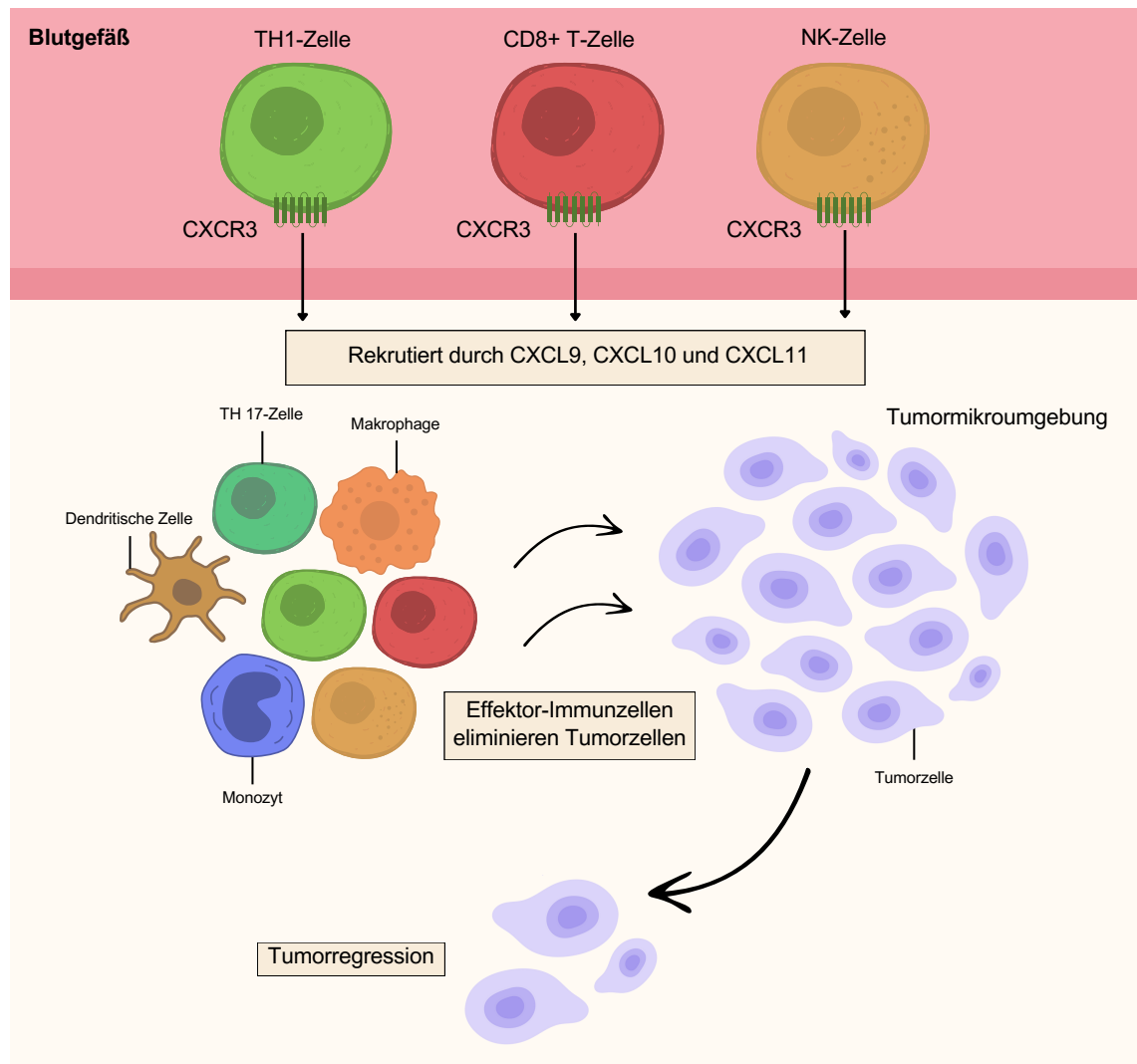


Abbildung 2: Schematische Übersicht der antitumoralen Aktivität verschiedener Chemokine.

Immunzellen, welche verschiedene Chemokinrezeptoren exprimieren, werden durch Chemokine rekrutiert und wandern aus dem Blut in den Tumor ein. Dort eliminieren sie Tumorzellen und führen zu einer Tumorregression. Modifiziert nach (Nagarsheth et al., 2017)

Beobachtungen im Plasmozytom, Lymphom, Melanom und Ovarialkarzinom konnten demonstrieren, dass CXCL9 und CXCL10 durch die Rekrutierung von TILs zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums und einem verlängerten Überleben führen (Bronger et al., 2016; Luster et al., 1993; Wendel et al., 2008).

Auch im Mammakarzinom konnte die protektive Wirkung von CXCL9 und CXCL10 durch eine verstärkte Immunzellinfiltration sowohl im Mausmodell als auch in vivo bestätigt werden. Dieser Effekt wurde durch eine Immundefizienz aufgehoben (Denkert et al., 2010; Luster und Leder, 1993; Walser et al., 2007).

Analog dazu zeigten Denkert et al. und Specht et al., dass eine hohe Expression von CXCL9-mRNA im Brustkrebsgewebe mit einem besseren Ansprechen auf eine Chemotherapie und somit einer besseren Prognose einhergeht (Denkert et al., 2010;

Specht et al., 2009). Wie eine Studie im Kolonkarzinom-Modell herausfand, wird CXCL9 im intratumoralen Milieu benötigt, um ein Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren zu ermöglichen, welche auch im Mammakarzinom eingesetzt werden (Chow et al., 2019).

Hinzu kommt, dass CXCL9 und CXCL10 durch die Hemmung von VEGF die Neovaskularisation des Tumors verhindern und so ein Tumorwachstum eindämmen können (Angiolillo et al., 1995; Aronica et al., 2009; Bronger, 2019; Nagarsheth et al., 2017).

Tumorigene Eigenschaften durch CXCL9 und CXCL10 können jedoch entstehen, wenn ihr Rezeptor CXCR3 von Tumorzellen exprimiert wird. Eine hohe CXCR3-Ligandenexpression an Orten unabhängig des Tumors kann zur Migration der Tumorzellen entlang eines Konzentrationsgradienten führen, wodurch Invasivität und Metastasierung gefördert werden (Billottet et al., 2013; X. Ma et al., 2009). Die Chemokine können so direkte Wirkungen auf die Tumorzellen selbst ausüben. Abbildung 3 stellt diesen Mechanismus schematisch dar.

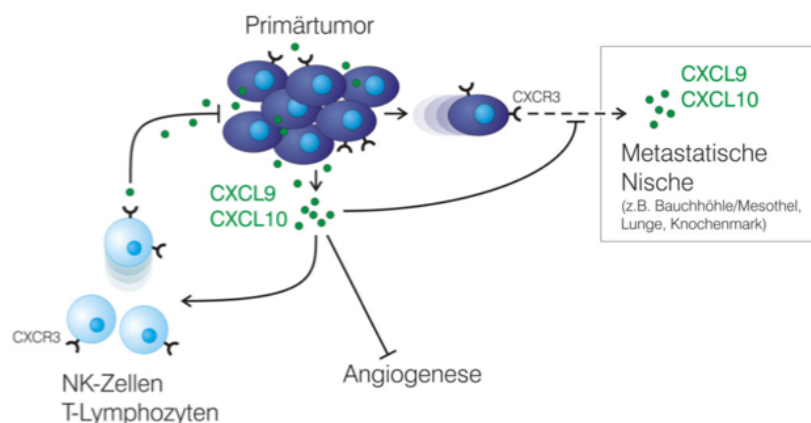


Abbildung 3: Rolle von CXCL9 und CXCL10 in soliden Tumoren.

Das CXCR3-Chemokinsystem übt einerseits durch die Rekrutierung von Natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten sowie durch die Hemmung der Tumorangiogenese einen tumorsupprimierenden Effekt aus. Andererseits können Tumorzellen den CXCR3-Rezeptor zur Ausbildung metastatischer Nischen nutzen. Mit freundlicher Genehmigung von H. Bronger.

Im Ovarialkarzinom, Osteosarkom, Melanom und Kolonkarzinom trägt CXCR3 entscheidend zur Ausbildung von Metastasen und so zu einer ungünstigeren Prognose bei (Kawada et al., 2007; Kawada et al., 2004; Pradelli et al., 2009; Windmuller et al., 2017).

Auch im Mausmodell des Mammakarzinoms zeigte sich die Metastasierung abhängig von CXCR3: Ein Antagonismus führte zu reduzierter pulmonaler Metastasierung, ohne

das lokale Tumorwachstum in der Brust zu beeinträchtigen (Walser et al., 2006). Ma et al. bestätigten diese Beobachtung durch das Silencing des *CXCR3*-Gens. Beide Forschungsgruppen konnten bei diesen Effekten eine Abhängigkeit von Natürlichen Killerzellen nachweisen (X. Ma et al., 2009; Walser et al., 2006).

Des Weiteren ist die Expression von *CXCR3* im Mammakarzinom mit einer schlechten Prognose korreliert. Vor allem in Patientinnen ohne Lymphknotenbefall trägt eine hohe Expression zu einem kürzeren krankheitsfreien Intervall und einer reduzierten Überlebenszeit bei (Bronger et al., 2017; X. Ma et al., 2009). Zudem ist eine starke *CXCR3*-Ausprägung mit einer großen Tumorausdehnung sowie einer höheren Anzahl an Lymphknotenmetastasen vergesellschaftet (X. Ma et al., 2009).

CXCL9 und *CXCL10* sind somit für die Immunmodulation in Tumorerkrankungen von großer Bedeutung. Sie können durch parakrine Aktivität tumorsuppressive Wirkungen erzielen, indem sie tumorinfiltrierende Lymphozyten in die Tumormikroumgebung locken. Andererseits können sie autokrin direkt auf Tumorzellen wirken und für eine Zunahme der Invasivität, Proliferation und Metastasierung sorgen (Bikfalvi et al., 2020).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Chemokinen wird in der Entstehung, Metastasierung sowie der endogenen Bekämpfung von Tumorerkrankungen eine bedeutende Rolle zugesprochen. Besonders CXCR3-Liganden im Tumor sorgen für eine Infiltration von tumor-suppressiven T-Zellen. Durch die Expression von CXCR3 auf Tumorzellen können diese jedoch an Orte mit hoher Chemokinkonzentration migrieren, was zu Invasivität und Metastasierung des Tumors beitragen kann.

Bisher existieren vor allem Arbeiten zur Expression der Chemokine im Brustkrebsgewebe selbst und der damit einhergehenden Assoziationen mit klinischen Parametern und Auswirkungen auf die Prognose. Es ist bisher unzureichend untersucht, inwiefern sich diese Erkenntnisse auch auf die Chemokinkonzentration im peripheren Blut übertragen lassen.

Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden vorrangig darin, die jeweiligen CXCL9- und CXCL10-Werte im Blut von 278 therapienaiven Mammakarzinom-Patientinnen mit klinischen Parametern und histomorphologischen Daten zu korrelieren. Dabei wird vor allem der Fragestellung nachgegangen, ob Abweichungen in der Chemokinkonzentration zwischen den einzelnen Tumorstadien und den tumorbiologischen Subtypen bestehen.

Darüber hinaus wird der Zusammenhang zwischen Serumkonzentration der CXCR3-Liganden und ihrer Expression im Tumorgewebe untersucht.

Zudem wird der Krankheitsverlauf abhängig von der CXCL9- bzw. CXCL10-Konzentration im Serum untersucht und damit auch die Frage adressiert, ob die systemische Chemokinkonzentration als prognostisch relevanter peripherer Marker beim Mammakarzinom fungieren kann.

3 Material und Methoden

3.1 Projektplan und Studienaufbau

Diese Promotionsarbeit ist Teil der Studie „Expression, Funktion und klinische Bedeutung der Chemokine CXCL9 und CXCL10 sowie ihres Rezeptors CXCR3 beim Mammakarzinom des Menschen“ der Frauenklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

Den Studienteilnehmerinnen wurde bei der Vorstellung in einer der Brustkrebssprechstunden des Interdisziplinären Brustzentrums am Klinikum rechts der Isar jeweils zwei Serum- und ein EDTA-Röhrchen Blut abgenommen. Die Seren wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gelagert und anschließend zehn Minuten lang bei 10.000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und in Kryotanks mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Zur Verarbeitung und Messung wurden die Proben aufgetaut und die Konzentrationen von CXCL9 und CXCL10 per *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) aus dem Probandinnenserum bestimmt. Zum Messzeitpunkt handelte es sich um präoperative und therapienaive Patientinnen.

Der Zeitraum der Patientinnen-Rekrutierung erstreckte sich von Dezember 2011 bis April 2019. Während der Anbindung an das Interdisziplinäre Brustzentrum des Klinikums rechts der Isar wurden mit Einverständnis klinische und histomorphologische Daten der Patientinnen erhoben und dokumentiert. Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Klinikum rechts der Isar bewilligt und nach den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

In die Studie wurden 278 Patientinnen im Alter zwischen 22 und 91 Jahren eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren andere Karzinomerkkrankungen, Autoimmunerkrankungen, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, chronische Virushepatitiden, HIV-Infektionen, Kollagenosen, rheumatoide Arthritiden, sowie systemische Kortison- oder Heparintherapien. Eine Beschreibung der klinischen Merkmale des Patientinnenkollektivs findet sich in Tabelle 5.

Lokoregional begrenzte, nicht metastasierte Mammakarzinome unterscheiden sich erheblich von metastasierten Mammakarzinomen und werden daher als gänzlich unterschiedliche Krankheitsentitäten betrachtet. Deswegen wurde für die meisten Fragestellungen eine Unterteilung der Patientinnen in das M0- (nicht metastasierte) und das M1- (primär metastasierte) Kollektiv vorgenommen. Dabei umfasste das M1-Kollektiv nur Patientinnen mit primär metastasiertem Mammakarzinom, nicht solche, die erst im Krankheitsverlauf Fernmetastasen entwickelten.

Nicht für alle Patientinnen waren Angaben zu jedem Merkmal verfügbar. Es wurde zunächst das Gesamtkollektiv betrachtet (inklusive benigner Befunde und *in situ*-Karzinome) und dieses anschließend in nicht metastasierte (M0) sowie primär metastasierte Karzinome (M1) aufgeteilt.

Insgesamt fanden sich in dem betrachteten Kollektiv 15 Patientinnen mit einem benignen Mammabefund, zwei Patientinnen mit einem *in situ*-Karzinom, 237 Patientinnen mit nicht-metastasiertem Brustkrebs (davon 170 Patientinnen mit nodal-negativem und 52 Patientinnen mit nodal-positivem Brustkrebs) sowie 22 Patientinnen mit primär metastasiertem Brustkrebs. Nicht für alle Patientinnen waren Daten zum Nodalstatus verfügbar. Für jeweils eine Patientin fehlten Angaben zur Dignität bzw. zum Metastasierungsstatus.

Unter den 15 benignen Mammabefunden lagen vier Fibroadenome, zwei benigne Phylloides tumore, eine Mammazyste und eine komplex-serosierende Läsion ohne invasives Tumorwachstum vor. Eine Patientin wurde mit Mollusca contagiosa (Dellwarzen) diagnostiziert. Zu den weiteren Patientinnen mit benignem Befund lagen außer dem fehlenden Malignitätsnachweis keine weiteren Details vor.

Für das Grading wurden die TMAs und Tumorbiopsien nach Elston und Ellis in die drei histologischen Stadien G1 (gut differenziert, geringer Malignitätsgrad), G2 (mäßig differenziert, mäßiger Malignitätsgrad) und G3 (schlecht differenziert, hoher Malignitätsgrad) eingeteilt (Elston und Ellis, 1991).

Bei der Betrachtung des Hormonrezeptorstatus galten Tumore mit $\geq 1\%$ positiven Tumorzellen als Hormonrezeptor-positiv (Nofech-Mozes et al., 2012).

Tabelle 5: Übersicht über das Patientinnenkollektiv.

Dargestellt sind sozioanamnestische, klinikopathologische und tumorbiologische Daten und Verlaufparameter für das Patientinnenkollektiv. Für das Alter, die Anzahl an Schwangerschaften, die Anzahl an TILs und den Ki-67-Status standen nicht für alle Patientinnen Daten zur Verfügung. Die Parameter Lokalrezidiv, Axillarezidiv, Fernmetastasen und verstorben beziehen sich auf das Auftreten im Verlauf der Studie.

* = Prozentangaben beschreiben den Anteil an den malignen Befunden ohne DCIS (n = 260).

	Gesamtkollektiv (n = 278)		M0-Kollektiv (n = 237)		M1-Kollektiv (n = 22)	
	n	Median (Spannweite)	n	Median (Spannweite)	n	Median (Spannweite)
Alter	267	58 (22-91)	237	58 (22-91)	22	61 (34-84)
Schwangerschaften	147	2 (1-7)	133	2 (1-7)	11	2 (1-4)
TILs (%)	53	10 (0-40)	44	5 (0-40)	8	5 (0-30)
Ki-67 (%)	61	15 (1-70)	55	15 (1-70)	4	27,5 (20-35)
	n	%	n	%	n	%
Menopausenstatus						
prämenopausal	93	33,5	84	35,4	4	18,2
perimenopausal	12	4,3	11	4,6	1	4,5
postmenopausal	164	59	141	59,5	17	77,3
unbekannt	9	3,2	1	0,4		
Malignität						
benigne	15	5,4				
maligne	262	94,2				
unbekannt	1	0,4				
pT-Stadium*						
pT0-pT1	151	54,3	144	60,8	3	13,6
pT2-pT4	76	27,3	67	28,3	8	36,4
unbekannt	51	18,3	26	11	11	50
pN-Stadium*						
pN0	170	61,2	163	68,8	4	18,2
pN1	52	18,7	44	18,6	6	27,3
unbekannt	56	20,1	30	12,7	12	54,5
M-Status*						
M0	237	91,1				
M1	22	8,5				
unbekannt	1	0,4				
Histologischer Grad*						
G1	30	10,8	29	12,2	1	4,5
G2	147	52,9	137	57,8	7	31,8
G3	68	24,5	55	23,2	11	50
unbekannt	33	11,9	16	6,8	3	13,6
Tumorsubtyp*						
HR+	191	68,7	173	73	15	68,2
HER+	36	12,9	31	13,1	4	18,2
TNBC	30	10,8	28	11,8	1	4,5
unbekannt	8	2,9	5	2,1	2	9,1
Lokalrezidiv*						
nein	214	77	193	81,4	16	72,7
ja	10	3,6	9	3,8	1	4,5
unbekannt	54	19,4	35	14,8	5	22,7
Axilläres Rezidiv*						
nein	181	65,1	162	68,4	13	59,1
ja	4	1,4	3	1,3	1	4,5
unbekannt	92	33,1	72	30,4	8	36,4
Fernmetastasen*						
nein	175	62,9	168	70,9		
ja	48	17,3	29	12,2		
unbekannt	55	19,8	40	16,9		
Verstorben*						
nein	251	90,3	228	96,2	18	81,8
ja	11	4	7	3	4	18,2
unbekannt	16	5,8	2	0,8		

3.2 Materialien und Geräte

3.2.1 Chemikalien

Tabelle 6: Genutzte Chemikalien.

Chemikalie	Firma	Methode
<i>Antibody Diluent</i>	Agilent Dako, Santa Clara, USA	IHC
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MN, USA	ELISA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	ELISA
<i>Dulbecco's Balanced Salt Solution</i> (DPBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	IHC
Ethanol	Institut für Pathologie, Technische Universität München, Deutschland	IHC
Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	IHC
Isopropanol	Institut für Pathologie, Technische Universität München, Deutschland	IHC
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MN, USA	ELISA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MN, USA	ELISA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	IHC, ELISA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland	ELISA
Peroxidase Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	ELISA
Pertex Eindeckmittel	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland	IHC
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	IHC
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	ELISA
Trizma®-Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MN, USA	IHC
Tween®-20	Merck, Darmstadt, Deutschland	ELISA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland	IHC
Xylol	Institut für Pathologie, Technische Universität München, Deutschland	IHC
Zitronensäuremonohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MN, USA	IHC

3.2.2 Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 7: Für die Immunhistochemie genutzte Primärantikörper.

Antikörper	Wirtsspezies	Klonalität	Katalognummer	Firma
Anti-CXCL9	Maus	Monoklonal	MAB392	R&D Systems, Minneapolis, USA Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
Anti-CXCL10	Maus	Monoklonal	sc-101500	

3.2.3 Kits

Tabelle 8: Kommerziell erhältliche Kits.

Kit	Katalognummer	Firma	Methode
Human CXCL9/MIG DuoSet	DY 392	R&D Systems, Minneapolis, USA	ELISA
Human CXCL10/IP-10 DuoSet	DY 266	R&D Systems, Minneapolis, USA	ELISA
DAB Substrate High Contrast Kit	DAB5000PLUS	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland	IHC
ZytoChem Plus (HRP) Broad Spectrum Bulk Kit	ZYT-HRP125	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland	IHC

3.2.4 Puffer

Tabelle 9: Verwendete Puffer.

Puffer	Herstellung	Methode
Citratpuffer	- 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat - ad 700 ml aqua dest. - pH auf 6,0 einstellen	IHC
PBS 10x	- 80 g NaCl, 2 g KCl, 2,4 g KH ₂ PO ₄ , 14,4 g Na ₂ HPO ₄ - ad 800 ml aqua dest. - mit NaOH auf pH 7,4 einstellen	ELISA
PBST 1x	- 100 ml PBS (10x), 500 µl Tween20 - ad 1000 ml aqua dest.	ELISA
TBS 10x	- 60,5 g Trizma-Base - ad 700 ml aqua dest. - mit HCl pH auf 7,5 einstellen - 90g NaCl dazugeben - ad 1000 ml aqua dest.	IHC
TBST 1x	- 100 ml PBS (10x), 1 ml Tween20 - ad 1000 ml aqua dest.	IHC

3.2.5 Verbrauchsgegenstände und Geräte

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsgegenstände und Geräte.

Verbrauchsgegenstand/Gerät	Hersteller
96-well-Platten für ELISA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Falcon Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Multipipette Multipette plus	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Multiskan FC ELISA Reader	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
pH-Meter Lab 850	Schott, Mainz, Deutschland
Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Germany
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Combitips plus	Eppendorf SE, Hamburg, Germany
Purelab classic Laborwasser	Elga GmbH, Wein, Österreich
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sartorius basic Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sartorius BP 1200 Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland

3.3 Versuchsmethoden

3.3.1 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) nutzt das immunologische Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung. Ein Enzym wird, an Antikörper gekoppelt, als Marker eingesetzt und erlaubt über einen Substratumsatz eine Aussage über die Menge an gebundenem und somit in der Probe vorhandenem Antigen (Gan et al., 2013). Als Enzym wird die Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*; HRP) genutzt (Luttmann, 2014). Das hinzugefügte chromogene Substrat generiert über eine Reaktion mit dem Enzym einen Farbumschlag, der anschließend photometrisch gemessen werden kann und quantitative oder qualitative Ergebnisse liefert (Gan und Patel, 2013). Je nach ELISA-Technik wird entweder der Antikörper oder das Antigen an eine feste Phase, meist eine 96-well-Platte, gebunden. Durch Waschen der Platte kann so freies von gebundenem Antigen differenziert und getrennt werden. Zudem werden unbesetzte

Proteinbindestellen geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden (Luttmann, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Hierbei wird ein Capture-Antikörper, welcher spezifisch für das zu messende Antigen ist, an die feste Phase gebunden. Nach Inkubation mit der zu untersuchenden Probe wird ein spezifischer Detektionsantikörper und anschließend ein enzymgebundener Sekundärantikörper aufgetragen. Durch Hinzufügen von Substrat wird eine Farbreaktion erzielt, welche nachfolgend photometrisch gemessen werden kann (Gan und Patel, 2013).

3.3.2 CXCL9- & CXCL10 ELISA

Die hCXCL9- sowie hCXCL10-ELISAs wurden gemäß den Vorgaben von R&D Systems durchgeführt. Das folgende Versuchsprotokoll bezieht sich auf jeweils eine 96-well-Platte. Alle Vorgänge und Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wurde pro well 100 µl der Capture-Antikörper-Verdünnung (CXCL9: 6 µg/ml, CXCL10: 2 µg/ml) aufgetragen und über Nacht mit einer Klebefolie verschlossen inkubiert. Danach wurden die freien Proteinbindungsstellen mit 200 µl Blocking-Lösung (1% BSA in PBS) für eine Stunde geblockt.

Für den Standard wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe von 2.000 pg/ml – 31,25 pg/ml (CXCL9) bzw. 4.000 pg/ml - 62,5 pg/ml (CXCL10) in 1% BSA/PBS angefertigt. Nach der Inkubation der Blocking-Lösung wurden die Standards in Duplikaten und die Proben in Triplikaten aufgetragen. Neben den Proben wurde immer der Blank-Wert sowie ein interner Kalibrator mitgemessen. Es wurde jeweils 100 µl pro well appliziert. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie verschlossen und für zwei Stunden inkubiert. Nachfolgend wurde die Platte mit je 100 µl der Detektionsantikörper-Verdünnung (CXCL9: 200 ng/ml, CXCL10: 12,5 ng/ml) über zwei Stunden inkubiert.

Die Platte wurde danach mit 100 µl des Streptavidin-HRP-Konjugats in einer 1:40-Verdünnung mit 1% BSA/PBS über 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte die 20-minütige Inkubation mit je 100 µl des Peroxidase-Substrats, erneut im Dunkeln. Es wurde schließlich pro well 50 µl Stopplösung (1 M Schwefelsäure) hinzugegeben, um die enzymatische Reaktion zu beenden. Die Platte wurde abschließend in den ELISA plate reader gegeben, zehn Sekunden geschüttelt und die Absorption photometrisch bei 450 nm gemessen.

Zwischen jedem Arbeitsschritt wurde die Platte drei Mal mit PBS gewaschen und ausgeklopft.

Die Serumkonzentrationen für CXCL9 und CXCL10 wurden in absoluten Werten (pg/ml) dargestellt. Zusätzlich wurden sie auf einen Standard normalisiert und in relativer Konzentration angegeben, um Variationen zwischen den Assays auszugleichen. Hierfür wurde eine hochproteinangereicherte, komplexe biologische Probe mit bekannter Chemokinkonzentration genutzt. Bei dieser Probe handelte es sich um eine intraoperativ entnommene Aszitesprobe einer Ovarialkarzinompatientin. Aufgrund übermäßiger Verfügbarkeit wurde diese als interner Kalibrator verwendet und die CXCL9- und CXCL10-Konzentrationen entsprechend als ein Vielfaches dargestellt.

3.3.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, welches ähnlich wie der ELISA auf einer spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung basiert. Hierbei ist es möglich, bestimmte Proteine und vor allem ihre Lokalisation im Gewebe darzustellen.

Nach Fixierung und Einbettung in Paraffin werden Gewebeschnitte erzeugt, die mikroskopisch oder digital beurteilt werden können. Neben dem primären, spezifischen Antikörper wird ein mit einem Enzym (HRP) gekoppelter Sekundärantikörper aufgetragen, um durch eine anschließende Reaktion mit einem Substrat das gebundene Antigen sichtbar zu machen. Als Gegenfärbung erfolgt das Auftragen von Hämalaun, welches basophile Strukturen wie Zellkerne bläulich anfärbt (Luttmann, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden Tissue Microarrays (TMAs) sowie Full Phase Schnitte verwendet. TMAs erlauben es, bis zu 1.000 verschiedene Gewebeproben auf einmal zu untersuchen (Ramos-Vara et al., 2014). Dafür werden auf den Gewebeschnitten Areale markiert, die anschließend als Zylinder ausgestanzt und in Paraffinblöcke eingesetzt werden (Kuefer et al., 2004).

3.3.4 CXCL9- und CXCL10-Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde gemäß den Vorgaben von R&D Systems (CXCL9) bzw. Santa Cruz Biotechnology (CXCL10) an Formalin-fixierten Gewebeproben durchgeführt. Zunächst wurden die Gewebeschnitte erwärmt und anschließend entparaffiniert. Hierzu wurden die Schnitte einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen, beginnend mit zwei Mal Xylol à zehn Minuten, dann zweimal 100%-igem Isopropanol, einmal 96%-igem Ethanol, und einmal 70%-igem Ethanol für jeweils 5 Minuten. Der letzte Waschschritt erfolgte in TBST für fünf Minuten. Die Schnitte wurden anschließend zur Revision der Quervernetzung vier Minuten lang im Schnellkochtopf in Citratpuffer (s. Tabelle 9) erhitzt.

Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurde das Gewebe in der Küvette für 20 Minuten mit 3%-igem Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur inkubiert.

Um endogenes Avidin-Biotin zu blockieren, wurde für die CXCL10-Färbung vor der Inkubation mit dem Primärantikörper ein Avidin-Biotin-Block aufgetragen.

Nach Inkubation mit 5%-igem Ziegen Serum wurde der primäre Antikörper 1:25 (CXCL9) bzw. 1:200 (CXCL10) mit dem Antibody Diluent gemischt und pro Schnitt 120 µl auf das Gewebe gegeben. Die Schnitte wurden nachfolgend über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer inkubiert.

Nach einem Pufferwechsel wurde jeweils 120 µl Sekundärantikörper aus dem LSAB-Kit (Tabelle 8) hinzugegeben und 20 Minuten in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Pufferwechsel erfolgte das Auftragen von jeweils 120 µl Streptavidin-Peroxidase mit 20-minütiger Inkubation in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur.

Daraufhin wurde das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) 1:20 im zugehörigen Puffer verdünnt, jeweils 120 µl aufgetragen und für acht Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert.

Zur Gegenfärbung wurden die Gewebeschnitte für ca. 60 Sekunden in eine Küvette mit Hämalun getaucht und anschließend fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Das Gewebe wurde dann in destilliertes Wasser übertragen.

Zur Dehydrierung wurde das Präparat einer aufsteigenden Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge zur oben beschriebenen Vorgehensweise unterzogen. Schließlich wurde das Gewebe zur Konservierung mit Pertex eingedeckelt.

Zwischen jedem Arbeitsschritt erfolgte ein Waschschrift mit TBST.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics für Mac, Version 28.0.1.1.

Die Proteinfärbung der Immunhistochemie wurde zum einen semiquantitativ ausgewertet und zum anderen mit der Software Aperio ImageScope quantitativ analysiert. Anschließend wurde die Chemokinexpression mit der Software Aperio ImageScope in die Pixelintensitäten 0 bis 255 eingeteilt. Hierbei stellt 0 keinerlei Färbung, d.h. weiß, und 255 eine komplette Färbung, d.h. schwarz, dar.

Assoziationen zwischen klinischen, histopathologischen und serologischen Parametern wurden mittels einer Korrelation nach Spearman berechnet und für Unterschiede

zwischen verschiedenen Gruppen der Mann-Whitney-U (Mann et al., 1947) bzw. bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test (Kruskal et al., 1952) durchgeführt. Aussagen über das Krankheitsfreie Überleben (DFS), Progressionsfreie Überleben (PFS) sowie das Gesamtüberleben (OS) wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven (Kaplan et al., 1958) dargestellt und signifikante Unterschiede mithilfe des Log-Rank-Tests bestimmt. Als Startpunkt wurde jeweils das Diagnosedatum verwendet. Das Intervall zwischen diesem und dem Auftreten eines Lokalrezidivs, Fernmetastasen oder dem Versterben wurde für nicht metastasierte Tumore als Krankheitsfreies Überleben definiert. Für primär metastasierte Tumore wurde das Progressionsfreie Überleben genutzt. Als Gesamtüberleben wurde der Zeitraum zwischen dem Diagnosedatum und dem Versterben gewertet. Trat keines dieser Ereignisse auf, wurde jeweils das Datum der letzten Nachbeobachtung genutzt. Als Signifikanzniveau galt stets $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumorgewebe

Um die lokale Expression der CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 im Mammakarzinom zu bestimmen, wurde bei der diagnostischen Biopsie gewonnenes Tumorgewebe immunhistochemisch untersucht. Die Expression von CXCL9 und CXCL10 wurde zunächst semiquantitativ in die Kategorien keine (0), niedrige (1+), moderate (2+) und hohe (3+) Chemokinexpression eingeteilt (siehe Abbildung 4). Von den 278 in die Studie eingeschlossenen Patientinnen lagen lediglich für einen Teil immunhistochemische Proben vor. Entsprechend wurde bei 46 Patientinnen die CXCL9-Expression und bei 43 Patientinnen die CXCL10-Expression im Tumor semiquantitativ gemessen.

Die Chemokinexpression wurde anschließend anhand ihrer Pixelintensität ermittelt. Hierfür wurden mehr Patientinnenproben als für die semiquantitative Messung untersucht. Für CXCL9 lagen 52 und für CXCL10 50 Patientinnenproben vor, davon jeweils eine Patientin mit DCIS.

Angefärbt werden dabei Tumorzellen, jedoch nicht das Stroma. Die Färbung ist dabei nicht im Zellkern, sondern im Zytoplasma lokalisiert.

Die ermittelte Verteilung der Chemokinexpression im Tumorgewebe ist in Tabelle 11 dargestellt.

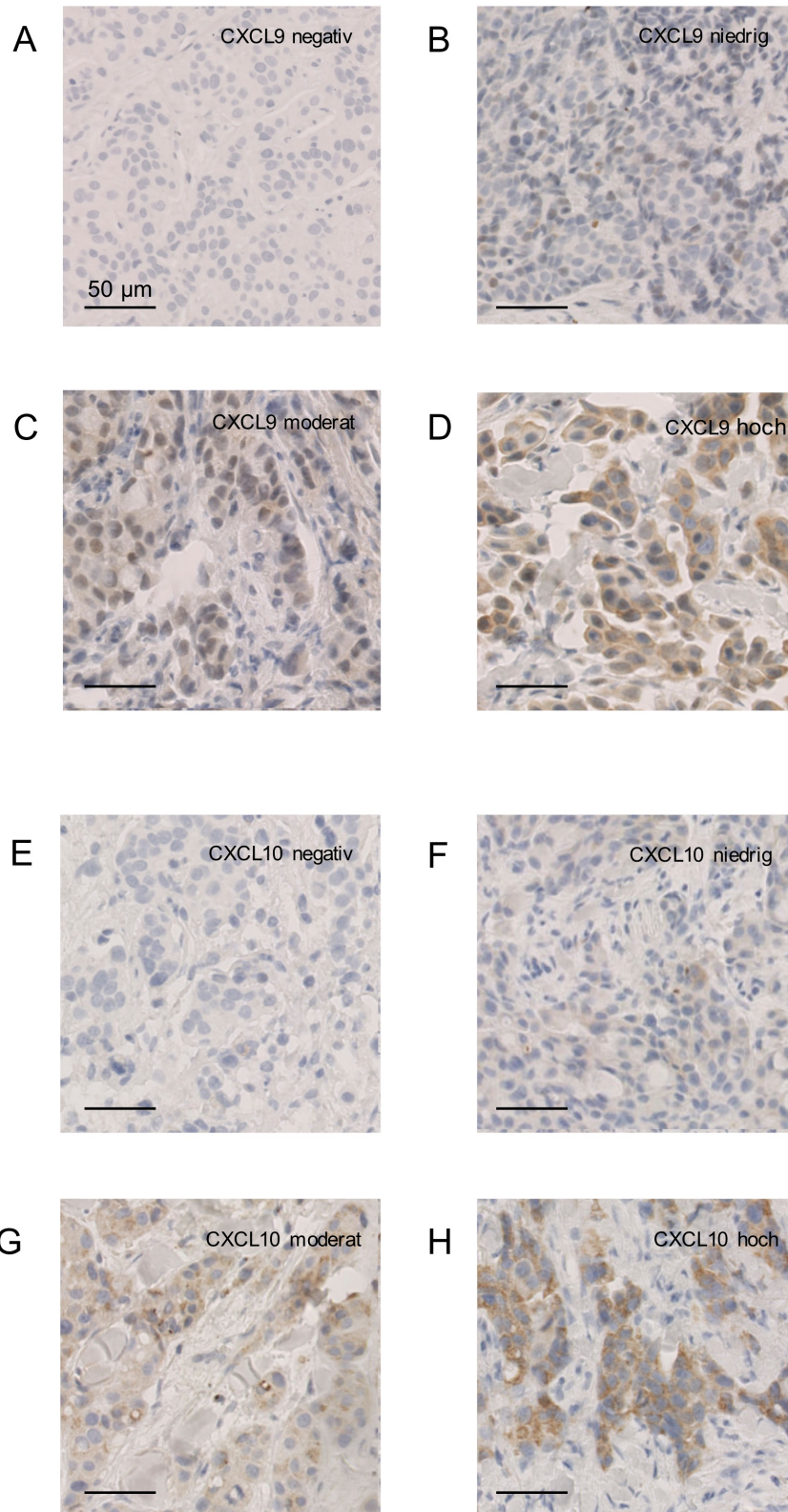


Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung der CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumorgewebe.

Die repräsentativen Färbebeispiele zeigen für CXCL9 keine (0, **A**), niedrige (1+, **B**), moderate (2+, **C**) bzw. hohe (3+, **D**) Expression im Tumorgewebe, sowie für CXCL10 keine (0, **E**), niedrige (1+, **F**), moderate (2+, **G**) bzw. hohe (3+, **H**) Expression. CXCL9 bzw. CXCL10 ist braun angefärbt. Die Balkenlänge beträgt 50 µm.

Tabelle 11: CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumorgewebe.

M0 = nicht metastasiertes Kollektiv, M1 = primär metastasiertes Kollektiv. *Cut-Off anhand des Medians.

	Gesamtkollektiv		M0		M1	
	CXCL9	CXCL10	CXCL9	CXCL10	CXCL9	CXCL10
Semiquantitative Expression						
	n = 46 (%)	n = 43 (%)	n = 40 (%)	n = 38 (%)	n = 6 (%)	n = 5 (%)
keine	16 (35)	25 (58)	14 (35)	23 (60,5)	2 (33)	2 (40)
niedrig	8 (17)	7 (16)	7 (17,5)	6 (16)	1 (16,5)	1 (20)
moderat	13 (28)	4 (10)	11 (27,5)	4 (10,5)	2 (33)	0
hoch	9 (20)	7 (16)	8 (20)	5 (13)	1 (16,5)	2 (40)
Expression in Pixelintensität						
	n = 52	n = 50	n = 43	n = 41	n = 8	n = 8
Mittelwert	80,77	58,71	80,8	56,52	77,65	63,17
Std.-Abweichung	21,92	19,35	22,18	17,68	21,45	19,07
Minimum	46,61	39,53	46,61	39,53	56,87	41,45
Maximum	139,39	126,05	139,39	126,05	120,83	101,77
1. Quartil	62,41	45,86	61,95	44,84	59	52,43
Median	79,72	53,23	79,64	52,64	73,68	54,76
3. Quartil	92,43	62,37	92,53	58,8	89,62	74,47
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
CXCL9/10 niedrig*	26 (50)	25 (50)	22 (51)	22 (54)	4 (50)	3 (37,5)
CXCL9/10 hoch*	26 (50)	25 (50)	21 (49)	19 (46)	4 (50)	5 (62,5)

In Abbildung 5 ist die Verteilung der Chemokinexpression im Brustkrebsgewebe im Gesamtkollektiv sowie den einzelnen Subgruppen (DCIS, M0, M1) dargestellt.

Hierbei stellte sich die CXCL9-Konzentration über die verschiedenen Gruppen nicht unterschiedlich dar ($p = 0,443$). Für CXCL10 konnte ebenfalls keine unterschiedliche Verteilung der intratumoralen Konzentration festgestellt werden ($p = 0,423$).

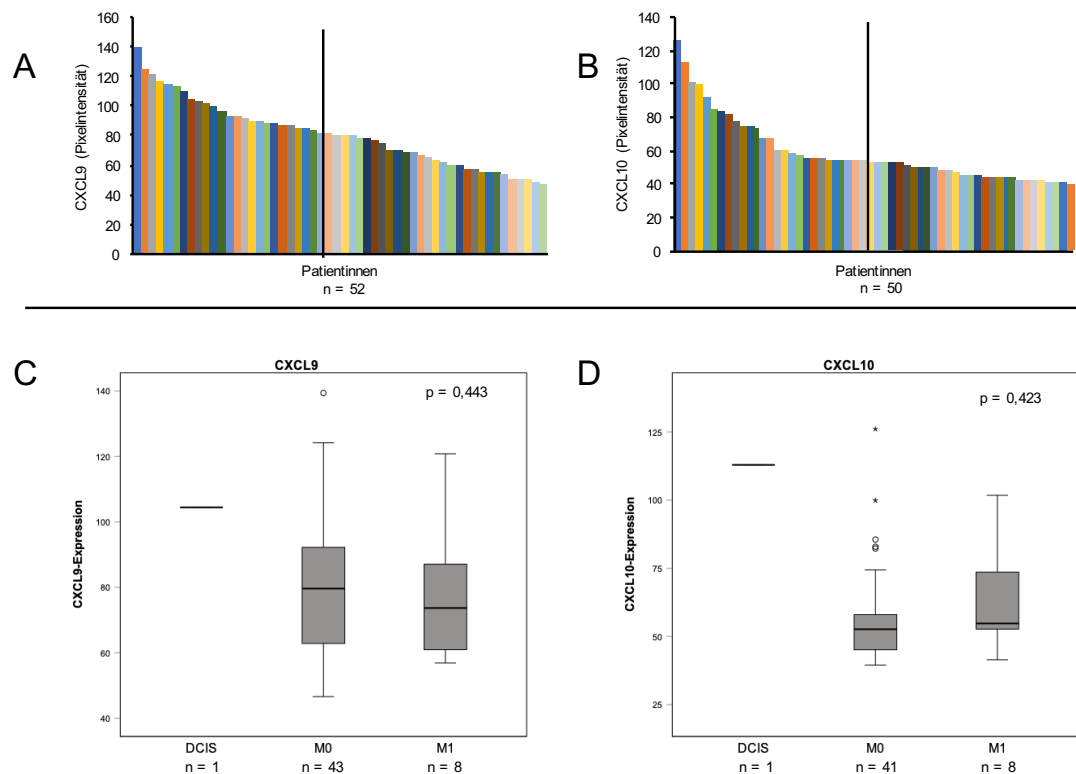


Abbildung 5: CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumorgewebe in Gesamtkollektiv und Subgruppen.

Es ist die CXCL9- (A) bzw. CXCL10- (B) Expression in Pixelintensität im Tumorgewebe im Gesamtkollektiv sowie der Median dargestellt. C bzw. D zeigen das Tumor-CXCL9 bzw. -CXCL10 in Pixelintensität in den verschiedenen Patientinnenkollektiven DCIS, M0 und M1. DCIS = duktales Carcinoma *in situ*, M0 = nicht metastasiertes Kollektiv, M1 = primär metastasiertes Kollektiv. Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet.

Zwischen CXCL9 und CXCL10 im Tumorgewebe fand sich im M0-Kollektiv keine Korrelation ($r = -0,065$, $p = 0,70$, Abbildung 6A). Im M1-Kollektiv zeigte sich eine mittelstarke Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,464$. Es fiel jedoch eine fehlende Signifikanz auf ($p = 0,294$, Abbildung 6B), wahrscheinlich auf die niedrige Fallzahl von $n = 7$ zurückzuführen.

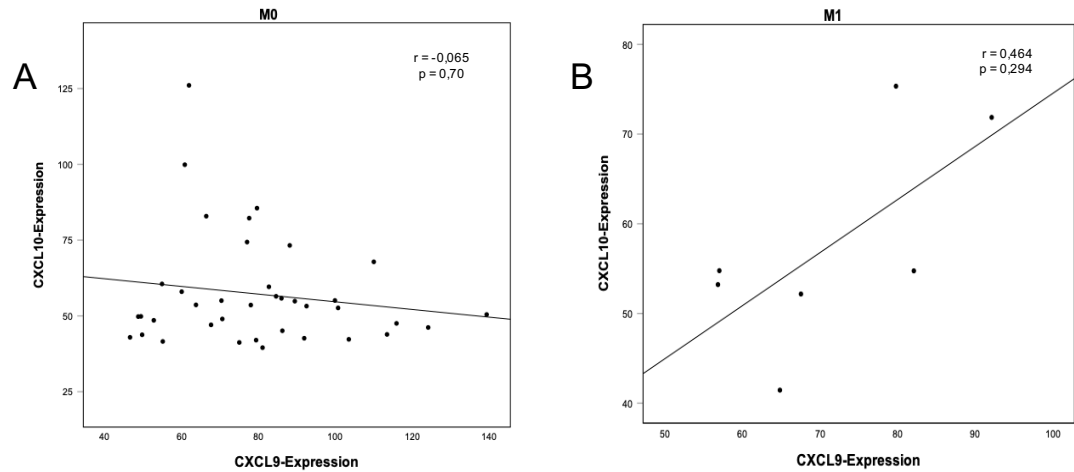


Abbildung 6: Korrelation von CXCL9 und CXCL10 im Tumor.

In **A** ist die Verteilung der CXCL9- und CXCL10-Expression im Tumor (in Pixelintensität) im M0-Kollektiv ($n = 38$) und in **B** im M1-Kollektiv ($n = 7$) dargestellt. Assoziationen wurden mittels Spearman-Korrelation berechnet.

4.2 CXCL9- und CXCL10-Expression im Serum

Um die Chemokinkonzentration im Serum von Mammakarzinompatientinnen zu untersuchen, wurden CXCL9 und CXCL10 mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 7 ist die absolute sowie die auf eine Aszitesprobe normalisierte Chemokinkonzentration im Gesamtkollektiv dargestellt. Für eine Patientin fehlte die CXCL9-Konzentration und für eine andere Patientin die CXCL10-Konzentration, entsprechend standen für beide Untersuchungen 271 Daten zur Verfügung.

Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, wurden die absoluten Chemokinkonzentrationen anhand einer Aszitesprobe normalisiert, um Variationen zwischen den an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Assays auszugleichen.

Die Chemokinkonzentration im Serum wurde zunächst über die verschiedenen Befundgruppen (benigne Mammabefunde, *in situ*-Karzinome, nicht metastasierte Karzinome und primär metastasierte Karzinome) betrachtet und mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen.

Hierbei stellte sich die CXCL9-Konzentration über die verschiedenen Gruppen nicht unterschiedlich dar ($p = 0,361$). Auch der Vergleich zwischen Patientinnen mit benignen und malignen Befunden ergab keine unterschiedliche CXCL9-Konzentration ($p = 0,422$). Für CXCL10 konnte ebenfalls keine unterschiedliche Verteilung der Serumkonzentration festgestellt werden ($p = 0,155$). Im paarweisen Vergleich zeigte sich jedoch, dass zwischen dem M0- und M1-Kollektiv ein signifikanter Unterschied in der CXCL10-Konzentration besteht (Median 0,096 vs. 0,121, $p = 0,025$). Dieser wies hingegen nach der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen lediglich noch eine angepasste Signifikanz von $p = 0,155$ auf. Im Vergleich zwischen Patientinnen mit benignen und malignen Befunden konnte keine Assoziation mit dem Malignitätsgrad gefunden werden ($p = 0,286$).

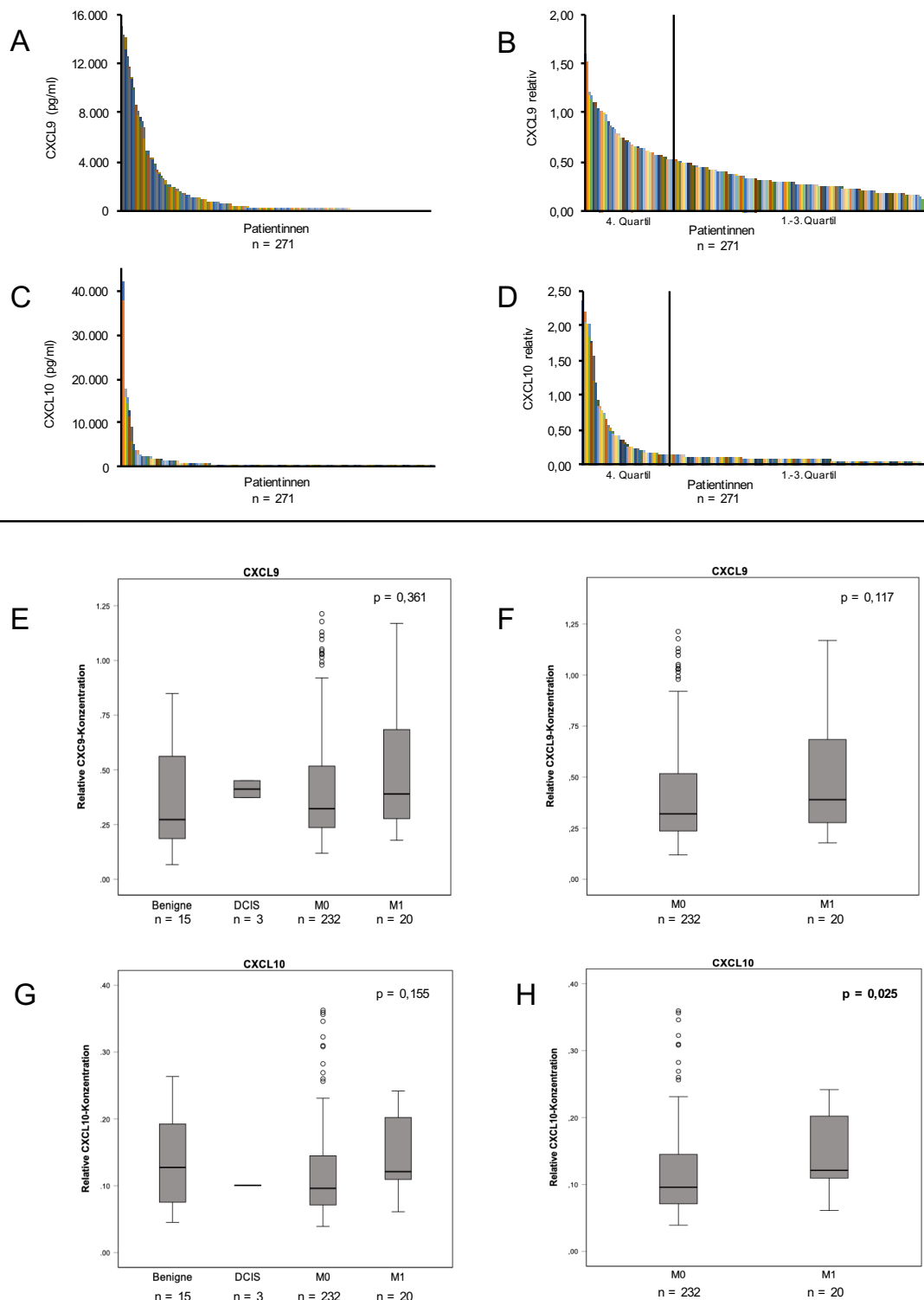


Abbildung 7: Absolute und relative CXCL9- und CXCL10-Serumkonzentrationen in Gesamtkollektiv und Subgruppen.

In **A** bzw. **C** ist die absolute CXCL9- bzw. CXCL10-Serumkonzentration in pg/ml dargestellt, in **B** bzw. **D** findet sich die relative, normalisierte CXCL9- bzw. CXCL10-Serumkonzentration mit Cut-Off am 3. Quartil. **E** bzw. **G** zeigen das Serum-CXCL9 bzw. -CXCL10 in den verschiedenen Kollektiven, in **F** bzw. **H** aufgeteilt nach M0 und M1. Extremwerte, welche den dreifachen Interquartilsabstand überschritten, sind nicht dargestellt. DCIS = duktales Carcinoma *in situ*, M0 = nicht metastasiertes Kollektiv, M1 = primär metastasiertes Kollektiv. Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet.

Eine Übersicht über die Konzentrationen von CXCL9 und CXCL10 findet sich in Tabelle 12. Der Median der CXCL9-Werte lag bei 0,324 (Spannweite 0,070 – 1,610), der Median von CXCL10 bei 0,099 (Spannweite 0,040 – 2,370).

Die Chemokinkonzentrationen wurden anschließend in die Kategorien niedrig bzw. hoch eingeteilt. Da die Mehrzahl der Proben wenig bis gar kein Chemokin enthielten (s. Abbildung 7), galten Werte innerhalb des 1. – 3. Quartils als niedrig und Werte im 4. Quartil als hoch. Relative CXCL9-Konzentrationen bis 0,532 wurden entsprechend als niedrig eingestuft, solche darüber als hoch. Als niedrig wurden relative CXCL10-Konzentrationen bis 0,153 klassifiziert und als hoch Werte darüber.

Tabelle 12: CXCL9- und CXCL10-Serumkonzentration im Patientinnenkollektiv.

M0 = nicht metastasiertes Kollektiv, M1 = primär metastasiertes Kollektiv. *Cut-Off anhand der 75. Perzentile; CXCL9 niedrig: < 0,532, CXCL9 hoch: $\geq$ 0,532; CXCL10 niedrig: < 0,153, CXCL10 hoch: $\geq$ 0,153.

	Gesamtkollektiv (n = 272)		M0 (n = 236)		M1 (n = 20)	
	CXCL9	CXCL10	CXCL9	CXCL10	CXCL9	CXCL10
Mittelwert	0,419	0,215	0,415	0,215	0,491	0,260
Std.-Abweichung	0,260	0,370	0,260	0,382	0,275	0,361
Minimum	0,070	0,040	0,120	0,040	0,180	0,060
Maximum	1,610	2,370	1,610	2,370	1,170	1,580
1. Quartil	0,239	0,072	0,235	0,071	0,274	0,109
Median	0,324	0,099	0,323	0,096	0,390	0,121
3. Quartil	0,532	0,153	0,518	0,146	0,700	0,214
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
CXCL9/10 niedrig*	203 (75)	203 (75)	178 (76)	179 (76)	13 (65)	13 (65)
CXCL9/10 hoch*	68 (25)	68 (25)	57 (24)	56 (24)	7 (35)	7 (35)

Die Spearman-Korrelation zwischen CXCL9 und CXCL10 zeigte einen moderaten Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration beider Chemokine (Abbildung 8), sowohl in nicht metastasierten Patientinnen ($r = 0,590$, $p < 0,001$), als auch in primär metastasierten Patientinnen ($r = 0,532$, $p = 0,016$).

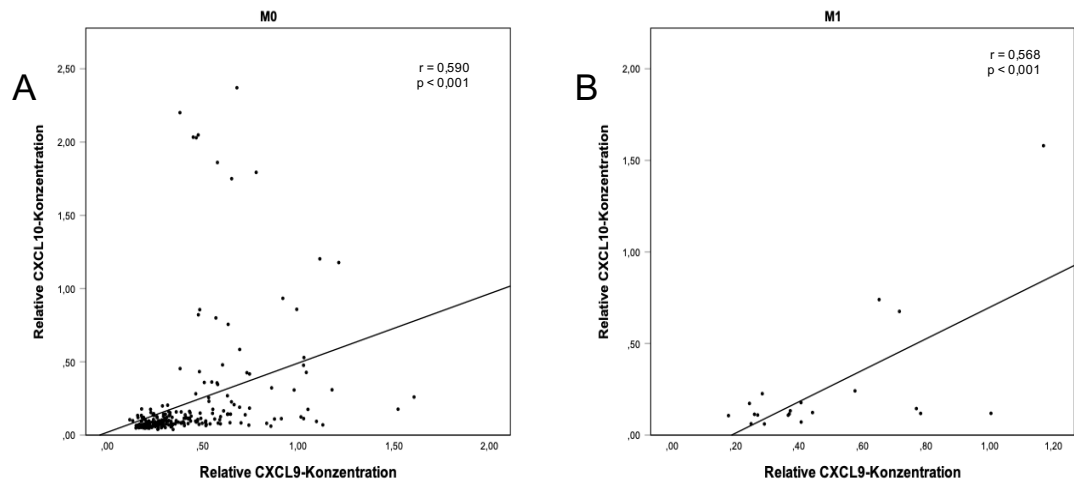


Abbildung 8: Korrelation von CXCL9 und CXCL10 im Serum.

In **A** ist die Verteilung der relativen CXCL9- und CXCL10-Konzentration im M0-Kollektiv (n = 236) und in **B** im M1-Kollektiv (n = 20) dargestellt. Assoziationen wurden mittels Spearman-Korrelation berechnet.

4.2.1 Korrelation der CXCL9- und CXCL10-Expression in Serum und Tumorgewebe

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen intratumoraler und systemischer Konzentration der CXCR3-Chemokine besteht. Dazu wurde die per ELISA gemessene Serumkonzentration mit der immunhistochemisch erhobenen Expression korreliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

Es fand sich kein Zusammenhang zwischen CXCL9 im Serum und im Tumor ($r = 0,162$, $p = 0,318$). Auch im M1-Kollektiv zeigte sich keine Assoziation zwischen Werten im Serum und Tumor ($r = -0,088$, $p = 0,868$). Die CXCL10-Konzentration in Serum und Tumorgewebe korrelierten ebenfalls nicht miteinander, weder im M0-Kollektiv ($r = -0,022$, $p = 0,894$) noch im M1-Kollektiv ($r = 0,316$, $p = 0,604$).

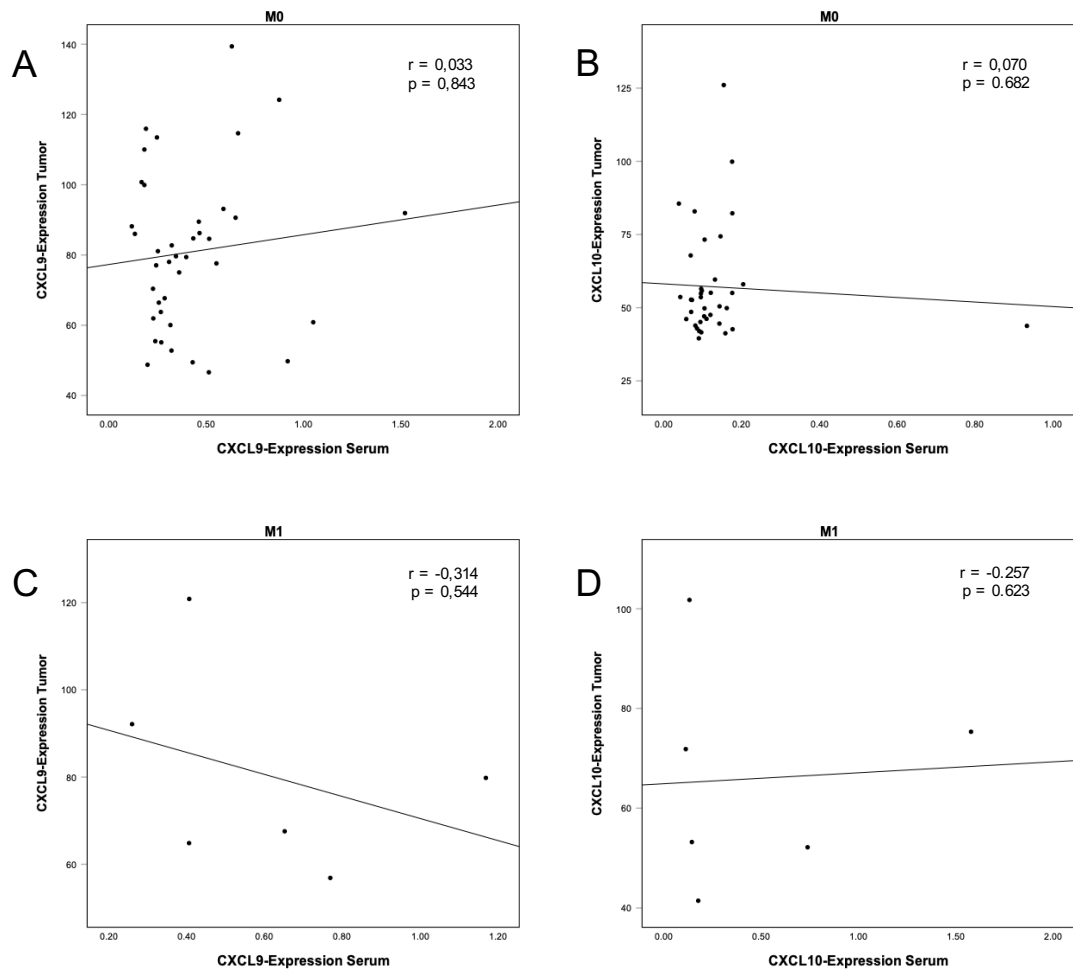


Abbildung 9: Korrelation der CXCL9- und CXCL10-Expression in Serum und Tumorgewebe.

Dargestellt ist die Korrelation zwischen Chemokinkonzentration in Serum und Tumorgewebe (in Pixelintensität) im M0-Kollektiv für CXCL9 (**A**) und CXCL10 (**B**), sowie im M1-Kollektiv für CXCL9 (**C**) und CXCL10 (**D**). Assoziationen wurden per Spearman-Korrelation berechnet.

4.3 Assoziation zwischen Chemokinexpression und klinikopathologischen Faktoren

4.3.1 Assoziationen zwischen Chemokinexpression im Tumor und klinikopathologischen Faktoren

Tabelle 13: Assoziationen zwischen intratumoraler Chemokinkonzentration und klinikopathologischen Faktoren im nicht metastasierten Patientinnenkollektiv.

Berechnung mittels Mann-Whitney-U- bzw. Kruskal-Wallis-Test. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

		CXCL9			CXCL10	
Variable	n (%)	Median	p-Wert	n (%)	Median	p-Wert
Alter						
< 60 J.	22 (51)	83,74	0,645	23 (46)	52,64	0,860
≥ 60 J.	21 (49)	67,69		18 (44)	51,30	
Menopause						
prämenopausal	14 (32,5)	83,74	0,317	14 (34)	51,55	0,316
perimenopausal	2 (4,5)	72,24		2 (5)	68,25	
postmenopausal	27 (63)	77,06		25 (61)	49,85	
Grading						
G1	6 (14)	95,68	0,030	5 (12,5)	44,56	0,692
G2	29 (69)	77,61		27 (67,5)	50,46	
G3	7 (17)	79,64		8 (2)	54,14	
Tumorgröße						
< 2 mm	19 (53)	79,64	1,000	15 (47)	49,00	0,156
≥ 2 mm	17 (47)	77,61		17 (53)	55,04	
Nodalstatus						
pN0	26 (76)	80,37	0,686	24 (77)	52,69	0,339
pN+	8 (24)	76,05		7 (23)	55,81	
Sentinel-LK						
pN0 (sn)	21 (81)	82,74	1,000	19 (29)	52,74	0,317
pN1 (sn)	5 (19)	75,04		5 (21)	73,26	
Lymphgefäßinvasion						
L0	34 (94)	80,37	0,467	32 (97)	52,99	0,975
L1	2 (6)	66,27		1 (3)	74,37	
Veneninvasion						
V0	35 (97)	79,64	1,000			-
V1	1 (2)	55,47				

Im nicht metastasierten Patientinnenkollektiv wurde zunächst die Assoziation zwischen der Chemokinverteilung im Tumor und klinikopathologischen Faktoren untersucht

(Tabelle 13). Hierbei fiel auf, dass die CXCL9-Korrelation in den verschiedenen histologischen Gradinggruppen signifikant verschieden war ($p = 0,030$, Abbildung 10C). Ein niedriger Grad wies höheres intratumorales CXCL9 auf. Im paarweisen Vergleich fand sich jedoch keine statistische Signifikanz mehr. Weitere Korrelationen zwischen der Chemokinexpression und anderen klinikopathologischen Faktoren ergaben sich nicht, insbesondere zwischen der CXCL9- & CXCL10-Konzentration und der Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs, Abbildung 10).

Die CD3-positiven TILs wurden im Stroma des intraoperativ resezierten Tumorgewebes bestimmt. Es erfolgte eine Einteilung nach Anteil des Immuninfiltrates an der Gesamtzellpopulation.

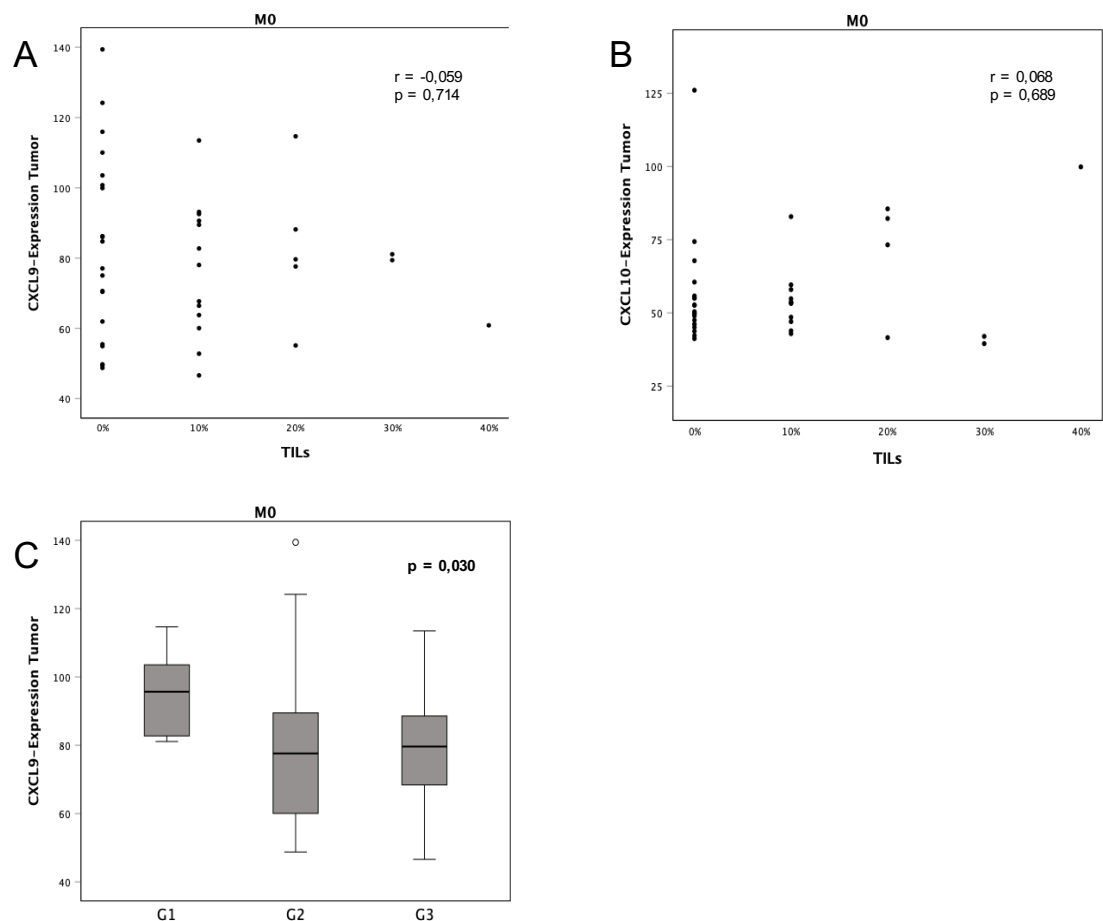


Abbildung 10: Korrelation zwischen Chemokinexpression im Tumor und TILs sowie zwischen CXCL9 und histologischem Grad im nicht metastasierten Kollektiv.

Dargestellt ist die Korrelation zwischen Chemokinexpression im Tumor in Pixelintensität und tumorinfiltrierenden Lymphozyten (Anteil an der Gesamtzellpopulation) im nicht metastasierten Patientinnenkollektiv für CXCL9 (A) und CXCL10 (B) sowie die Korrelation zwischen CXCL9 und histologischem Grad (C). Korrelationen wurden per Spearman-Korrelation berechnet. TILs = tumorinfiltrierende Lymphozyten

Anschließend wurde der Zusammenhang zwischen klinikopathologischen Faktoren und Chemokinkonzentration im Tumor im primär metastasierten Kollektiv untersucht. Es zeigten sich keinerlei Korrelationen (Tabelle 14). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Fallzahlen sehr gering waren.

Tabelle 14: Assoziationen zwischen intratumoraler Chemokinkonzentration und klinikopathologischen Faktoren im primär metastasierten Patientinnenkollektiv.

Berechnung mittels Mann-Whitney-U- bzw. Kruskal-Wallis-Test. * = Berechnung nicht möglicher aufgrund zu geringer Fallzahlen.

		CXCL9			CXCL10	
Variable	n (%)	Median	p-Wert	n (%)	Median	p-Wert
Alter						
< 60 J.	3 (37,5)	67,56	1,000	3 (37,5)	54,77	1,000
≥ 60 J.	5 (62,5)	82,10		5 (62,5)	54,75	
Menopause						
prämenopausal	2 (25)	73,68	1,000	2 (25)	63,76	1,000
perimenopausal	0	-		0	-	
postmenopausal	6 (75)	73,48		6 (75)	54,76	
Grading						
G1	1 (14)	12,08	0,388	0	-	0,429
G2	2 (29)	73,48		2 (29)	48,10	
G3	4 (57)	62,31		5 (71)	54,77	
Tumorgröße						
< 2 mm	0	-	-*	0	-	-*
≥ 2 mm	3 (100)	92,13		2 (100)	63,32	
Nodalstatus						
pN0	1 (33,3)	12,08	0,333	0	-	-*
pN+	2 (66,7)	74,59		2 (100)	63,32	
Sentinel-LK						
pN0 (sn)	2 (66,7)	10,15	1,000	1 (50)	54,75	1,000
pN1 (sn)	1 (33,3)	92,13		1 (50)	71,86	
Lymphgefäßinvasion						
L0	1 (33,3)	12,08	0,221	0	-	-*
L1	2 (66,7)	74,59		2 (100)	63,32	
Veneninvasion						
V0	3 (100)	92,13	-*	2 (100)	63,32	-*
V1	0			0	-	

Im primär metastasierten Kollektiv fiel eine starke Korrelation zwischen intratumoraler CXCL10-Expression und TILs auf ($r = 0,896$, $p = 0,006$, Abbildung 11). Es ist jedoch zu beachten, dass die untersuchte Subgruppe sehr klein war ($n = 7$) und die Aussagekraft somit stark eingeschränkt ist.

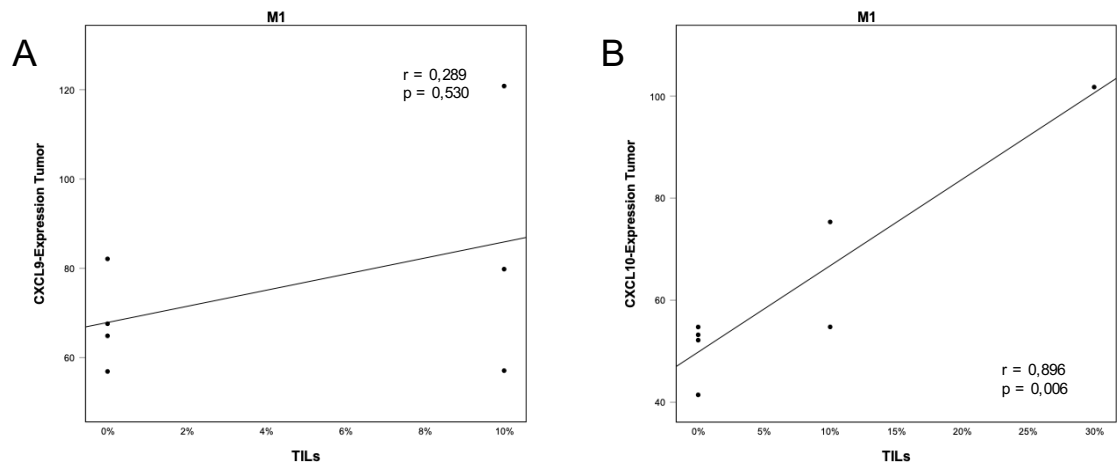


Abbildung 11: Korrelation zwischen Chemokinexpression im Tumor und TILs im primär metastasierten Kollektiv.

Dargestellt ist die Korrelation zwischen Chemokinkonzentration im Tumor und tumorinfiltrierenden Lymphozyten für CXCL9 (**A**) und CXCL10 (**B**). Korrelationen wurden per Spearman-Korrelation berechnet. TILs = tumorinfiltrierende Lymphozyten.

4.3.2 Assoziationen zwischen Chemokinexpression im Serum und klinikopathologischen Faktoren

Im nicht metastasierten Patientinnenkollektiv wurde zunächst die Assoziation zwischen der Chemokinkonzentration im Serum und klinikopathologischen Faktoren untersucht (Tabelle 15). Jüngere Patientinnen unter 60 Jahren wiesen eine geringere CXCL9-Serumkonzentration auf als ältere Patientinnen (Median 0,294 gegenüber 0,341, $p = 0,031$). In der Spearman-Korrelation zwischen Alter und Serum-CXCL9 zeigte sich keine Assoziation ($r = 0,139$, $p = 0,034$). Zwischen der CXCL9- bzw. CXCL10-Serumkonzentration und dem Menopausenstatus, dem histologischen Grad, der Tumorgroße, dem Nodalstatus, dem Sentinel-Lymphknotenstatus sowie der Lymphgefäß- und Veneninvasion fand sich ebenfalls keinerlei Assoziation.

Anschließend wurde eine Spearman-Korrelation durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen systemischer Chemokinkonzentration und Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) zu untersuchen. CXCL9-Werte und TILs korrelierten nicht miteinander ($r = 0,231$, $p = 0,146$), CXCL10-Werte und TILs ebenfalls nicht ($r = -0,135$, $p = 0,399$, Abbildung 12).

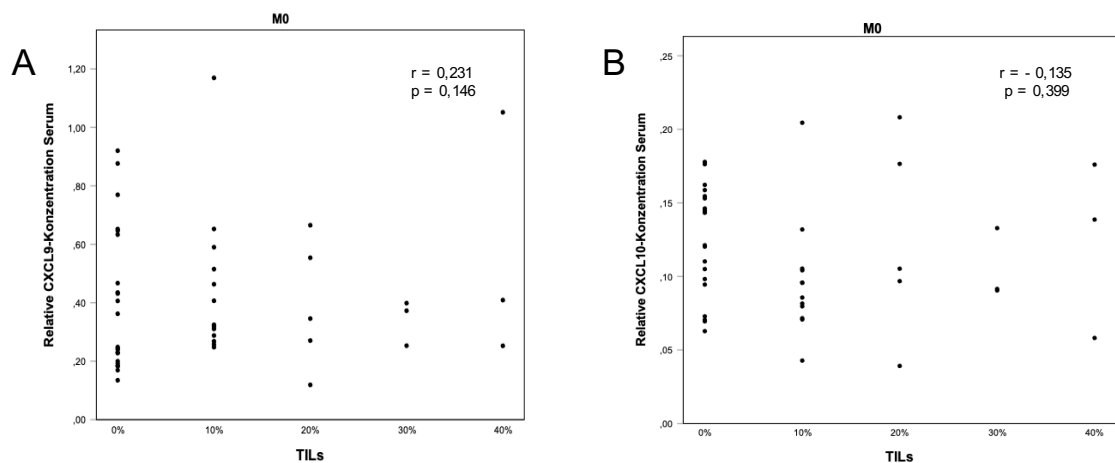


Abbildung 12: Korrelation zwischen CXCL9- und CXCL10-Expression in Serum und tumorinfiltrierenden Lymphozyten im nicht metastasierten Kollektiv.

Dargestellt ist die Korrelation zwischen Chemokinkonzentration in Serum und tumorinfiltrierende Lymphozyten im nicht metastasierten Patientinnenkollektiv für CXCL9 (A) und CXCL10 (B). Extremwerte, welche den dreifachen Interquartilsabstand überschritten, sind nicht dargestellt. Korrelationen wurden per Spearman-Korrelation berechnet. TILs = tumorinfiltrierende Lymphozyten.

Tabelle 15: Assoziationen zwischen peripherer Chemokinkonzentration und klinikopathologischen Faktoren im nicht metastasierten Patientinnenkollektiv.

Berechnung mittels Mann-Whitney-U- bzw. Kruskal-Wallis-Test. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

		CXCL9			CXCL10	
Variable	n (%)	Median	p-Wert	n (%)	Median	p-Wert
Alter						
< 60 J.	126 (54)	0,294	0,031	126 (54)	0,094	0,208
≥ 60 J.	109 (46)	0,341		109 (46)	0,098	
Menopause						
prämenopausal	84 (36)	0,315	0,102	84 (36)	0,090	0,125
perimenopausal	10 (4)	0,264		10 (4)	0,087	
postmenopausal	140 (60)	0,335		140 (60)	0,100	
Grading						
G1	26 (12)	0,317	0,308	27 (12)	0,109	0,467
G2	138 (63)	0,305		137 (63)	0,095	
G3	54 (25)	0,360		54 (25)	0,097	
Tumorgröße						
< 2 mm	142 (68)	0,333	0,125	142 (68)	0,096	0,969
≥ 2 mm	67 (32)	0,292		67 (32)	0,097	
Nodalstatus						
pN0	154 (77)	0,321	0,889	154 (77)	0,095	0,921
pN+	46 (23)	0,337		46 (23)	0,098	
Sentinel-LK						
pN0 (sn)	141 (84)	0,294	0,854	141 (84)	0,096	0,791
pN1 (sn)	27 (16)	0,337		27 (16)	0,102	
Lymphgefäßinvasion						
L0	112 (85)	0,352	0,166	113 (86)	0,097	0,588
L1	20 (15)	0,285		19 (14)	0,126	
Veneninvasion						
V0	124 (98)	0,347	0,144	125 (98)	0,098	0,777
V1	3 (2)	0,240		3 (2)	0,134	

Das Vorliegen einer Assoziation zwischen den klinikopathologischen Faktoren und der Serum-Chemokinkonzentration wurde anschließend im primär metastasierten Patientinnenkollektiv untersucht (Tabelle 16).

Im paarweisen Vergleich der CXCL10-Konzentration bei prämenopausalen und perimenopausalen Patientinnen zeigte sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied (Median 0,491 vs. 0,062, $p = 0,064$), welcher nach der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen jedoch keinerlei Signifikanz mehr aufwies (angepasstes $p = 0,192$). Für CXCL9-Werte und Menopausenstatus fand sich keinerlei Zusammenhang.

Für die Beziehung zwischen CXCL9- bzw. CXCL10-Serumkonzentration und dem histologischen Grad, der Tumorgroße, dem Nodalstatus, dem Sentinel-Lymphknotenstatus sowie der Lymphgefäßinvasion ergab sich kein signifikanter Zusammenhang. Die Assoziation zwischen Chemokinkonzentration und Veneninvasion konnte aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht gemessen werden.

Zwischen der systemischen CXCL9-Konzentration und tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) fand sich keine Korrelation ($r = -0,309$, $p = 0,552$). Eine fehlende Korrelation ließ sich ebenfalls für das Serum-CXCL10 und die TILs beobachten ($r = -0,370$, $p = 0,470$, Abbildung 13).

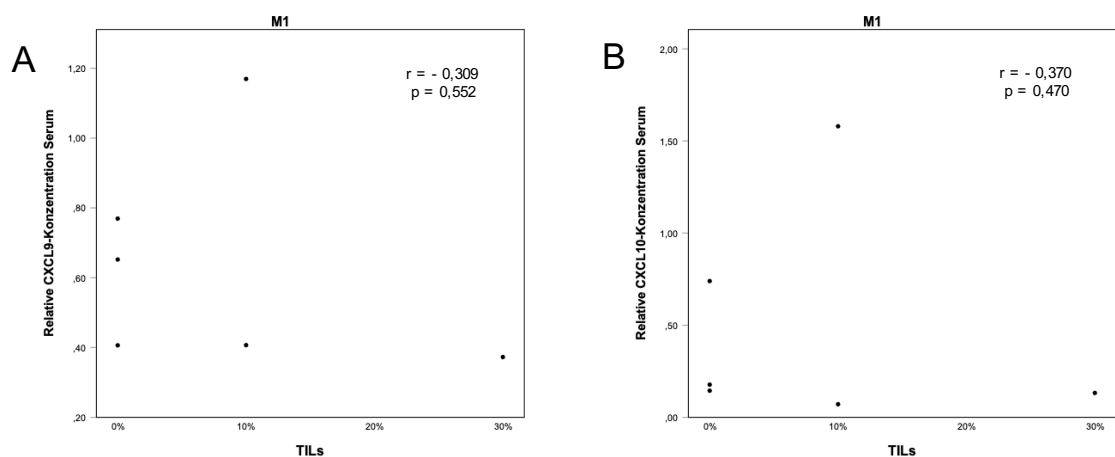


Abbildung 13: Korrelation zwischen CXCL9- und CXCL10-Expression in Serum und tumorinfiltrierenden Lymphozyten im metastasierten Kollektiv.

Dargestellt ist die Korrelation zwischen Chemokinkonzentration in Serum und tumorinfiltrierende Lymphozyten im metastasierten Patientinnenkollektiv für CXCL9 (A) und CXCL10 (B). Extremwerte, welche den dreifachen Interquartilsabstand überschritten, sind nicht dargestellt. Korrelationen wurden per Spearman-Korrelation berechnet. TILs = tumorinfiltrierende Lymphozyten.

Tabelle 16: Assoziationen zwischen peripherer Chemokinkonzentration und klinikopathologischen Faktoren im metastasierten Patientinnenkollektiv.

Berechnung mittels Mann-Whitney-U- bzw. Kruskal-Wallis-Test.

		CXCL9			CXCL10	
Variable	n (%)	Median	p-Wert	n (%)	Median	p-Wert
Alter						
< 60 J.	9 (45)	0,443	0,882	9 (45)	0,145	0,710
≥ 60 J.	11 (55)	0,373		11 (55)	0,119	
Menopause						
prämenopausal	4 (20)	0,614	0,214	4 (20)	0,491	0,153
perimenopausal	1 (5)	0,250		1 (5)	0,062	
postmenopausal	15 (75)	0,373		15 (75)	0,119	
Grading						
G1	1 (6)	0,407	0,995	1 (6)	0,072	0,385
G2	6 (35)	0,425		6 (35)	0,121	
G3	10 (59)	0,513		10 (59)	0,139	
Tumorgröße						
pT < 2	3 (30)	0,291	1,000	3 (30)	0,107	0,517
pT ≥ 2	7 (70)	0,285		7 (70)	0,116	
Nodalstatus						
pN0	4 (44)	0,349	0,286	4 (44)	0,091	0,286
pN+	5 (56)	0,260		5 (56)	0,173	
Sentinel-LK						
pN0 (sn)	4 (67)	0,288	0,133	4 (67)	0,091	0,533
pN1 (sn)	2 (33)	0,252		2 (33)	0,144	
Lymphgefäßinvasion						
pL0	2 (40)	0,388	0,800	2 (40)	0,094	0,400
pL1	3 (60)	0,260		3 (60)	0,173	
Veneninvasion						
V0	5 (100)	0,370	-	5 (100)	0,116	-
V1	0			0	0,186	

4.4 Assoziationen zwischen Chemokinexpression und molekularbiologischen Faktoren

4.4.1 Assoziationen zwischen Chemokinexpression im Tumor und molekularbiologischen Faktoren

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen Chemokinexpression im Tumor und dem Rezeptorsubtyp untersucht (Tabelle 17). Hierbei fiel auf, dass nicht metastasierte, HER2-positive Tumore eine signifikant höhere intratumorale CXCL10-Konzentration aufwiesen als Hormonrezeptor-positive oder Triple-negative Tumore. Diese Beobachtung ließ sich für CXCL9 oder das primär metastasierte Kollektiv nicht bestätigen.

Für die Untersuchung des Ki-67-Status lag eine ungenügende Fallzahl vor.

Tabelle 17: Assoziationen zwischen Chemokinkonzentration im Tumor und molekularbiologischen Faktoren.

Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. HR = Hormonrezeptor, HER2 = HER2-Rezeptor, TNBC = Triple-negativ.

Nicht metastasiertes Kollektiv						
Variable	n (%)	CXCL9		CXCL10		
		Median	p-Wert	n (%)	Median	p-Wert
Subtyp						
HR+	34 (79)	81,91	0,578	33 (81)	49,78	0,033
HER2+	6 (14)	78,63		5 (12)	82,25	
TNBC	3 (7)	79,41		3 (7)	55,04	
Primär metastasiertes Kollektiv						
Variable	n (%)	CXCL9		CXCL10		
		Median	p-Wert	n (%)	Median	p-Wert
Subtyp						
HR+	5 (71)	64,85	0,143	5 (71)	53,22	1,000
HER2+	2 (29)	80,95		2 (29)	65,05	
TNBC	0			0		

4.4.2 Assoziationen zwischen Chemokinexpression im Serum und molekularbiologischen Faktoren

Anschließend wurde die Assoziation der CXCL9- und CXCL10-Serumkonzentration mit verschiedenen molekularbiologischen Faktoren untersucht. Hierzu wurden der tumorbiologische Subtyp sowie der Ki-67-Status in die Berechnungen eingeschlossen (Tabelle 18).

Eine gängige Differenzierung von Mammakarzinomen erfolgt in die Kategorien Ki-67 niedrig bzw. Ki-67 hoch, wobei der Grenzwert nicht einheitlich definiert ist. Die Cut-Off-Werte für die Einteilung reichen von 14% bis 29% (Gnant et al., 2015; Goldhirsch et al., 2011). Für diese Arbeit wurde ein Grenzwert von 14% gewählt. Somit wurden Tumore mit einer Ki-67-Ausprägung von $\geq 14\%$ als Ki-67 hoch definiert.

Tabelle 18: Assoziationen zwischen Chemokinkonzentration im Serum und molekularbiologischen Faktoren.

Berechnung mittels Mann-Whitney-U- bzw. Kruskal-Wallis-Test. HR = Hormonrezeptor, HER2 = HER2-Rezeptor, TNBC = Triple-negativ.

Nicht metastasiertes Kollektiv						
Variable	n (%)	CXCL9		n (%)	CXCL10	
		Median	p-Wert		Median	p-Wert
Subtyp						
HR+	170 (74)	0,31	0,253	170 (74)	0,096	0,324
HER2+	31 (14)	0,335		31 (14)	0,081	
TNBC	29 (13)	0,31		29 (13)	0,101	
Ki-67						
niedrig	24 (48)	0,277	0,669	23 (47)	0,089	0,968
hoch	26 (52)	0,322		26 (53)	0,096	
Primär metastasiertes Kollektiv						
Variable	n (%)	CXCL9		n (%)	CXCL10	
		Median	p-Wert		Median	p-Wert
Subtyp						
HR+	14 (78)	0,407	0,792	14 (78)	0,121	0,434
HER2+	3 (17)	0,577		3 (17)	0,242	
TNBC	1 (5)	0,37		1 (5)	0,116	

Es fand sich für keine der molekularbiologischen Faktoren ein Zusammenhang mit den CXCL9- oder CXCL10-Serumwerten. Insbesondere stellte sich die Chemokinkonzentration in den verschiedenen tumorbiologischen Subtypen nicht unterschiedlich dar. Die Serumwerte zeigten sich unabhängig vom Hormonrezeptorstatus, sowohl für CXCL9 (Median HR+ 0,310 vs. HR- 0,352, $p = 0,539$) als auch für CXCL10 (Median HR+ 0,096 vs. HR- 0,094, $p = 0,816$). Eine ähnliche Beobachtung ließ sich im primär metastasierten Kollektiv machen. Es zeigte sich kein Zusammenhang mit den verschiedenen Subtypen ($p = 0,792$ für CXCL9; $p = 0,434$ für CXCL10).

Auch die Rangkorrelation nach Spearman wies keinen Zusammenhang zwischen Ki-67-Prozentsatz und CXCL9- bzw. CXCL10-Konzentration auf. Ki-67 konnte aufgrund zu geringer Fallzahlen im primär metastasierten Kollektiv nicht untersucht werden.

4.5 Prognostischer Wert von CXCR3-Chemokinen bei Mammakarzinom-Patientinnen

Die prognostische Bedeutung der CXCR3-Liganden wurde zunächst anhand ihrer Expression im Tumorgewebe sowie anhand der Konzentration im Serum untersucht. Als Endpunkte wurden das Gesamtüberleben (*Overall Survival*, OS) sowie das krankheitsfreie Überleben (*Disease-free survival*, DFS, im M0-Kollektiv) oder progressionsfreie Überleben (*Progression-free survival*, im M1-Kollektiv) definiert. Hierbei wurde das Studienkollektiv in Patientinnen mit nicht metastasiertem und primär metastasiertem Mammakarzinom unterteilt. Es wurden Kaplan-Meier-Schätzungen durchgeführt und die Signifikanz mittels log-rank-Test berechnet.

Zudem wurde der Einfluss der Chemokinkonzentration auf das krankheitsfreie, progressionsfreie und Gesamtüberleben mittels univariater und multivariater Cox-Regressionsanalyse evaluiert. Dafür wurden die etablierten prognostischen Faktoren Alter, Tumorgroße, Lymphknotenstatus und histologischer Grad untersucht.

4.5.1 Prognostischer Einfluss der intratumoralen CXCR3-Chemokine

Der mediane Nachbeobachtungszeitraum belief sich für das krankheitsfreie Überleben auf 40 Monate (95% Konfidenzintervall (KI): 0,1 – 88,5 Monate), und für das Gesamtüberleben auf 47,38 Monate (95% KI: 0,3 – 87,7 Monate). Mediane krankheitsfreie, progressionsfreie oder Überlebenszeiten konnten mangels ausreichender Ereignisse bzw. Daten nicht bestimmt werden.

Für die Analyse des nicht metastasierten Kollektivs wurden 40 Patientinnen (*Disease-free survival*) bzw. 42 Patientinnen (*Overall Survival*) untersucht (Abbildung 14).

Eine hohe CXCL9-Serumkonzentration war im M0-Kollektiv im Zeitraum von ca. 6 Jahren mit einem besseren krankheitsfreien Überleben assoziiert, nach diesem Zeitpunkt kam es jedoch zu einer Umkehr dieser Beobachtung. Dies war nicht statistisch signifikant ($p = 0,535$). Hohes intratumorales CXCL10 war wiederum negativ mit der Dauer des krankheitsfreien Überlebens korreliert ($p = 0,078$).

Zudem schienen eine hohe intratumorale CXCL9- und CXCL10-Expression zu einem längeren Gesamtüberleben zu führen, jedoch ohne eine statistische Signifikanz aufzuweisen ($p = 0,120$ bzw. $p = 0,671$).

Das längste krankheitsfreie Intervall wiesen die Patientinnen mit niedriger Expression beider Chemokine auf, das kürzeste Patientinnen mit gemischt niedriger und hoher Chemokinexpression. Für das Gesamtüberleben zeigten sich jedoch kombiniert hohe Chemokinkonzentrationen protektiv, kombiniert niedrige Konzentrationen hatten einen

negativen Effekt. Beide Beobachtungen waren jedoch nicht signifikant ($p = 0,427$ bzw. $p = 0,425$).

Für die Analyse des primär metastasierten Patientinnenkollektivs standen acht (*Disease-free survival*) bzw. sieben Patientinnen (*Overall Survival*) zur Verfügung.

Es zeigte sich keine Assoziation der intratumoralen Chemokine mit dem krankheitsfreien Intervall oder dem Gesamtüberleben. Aufgrund der geringen Fallzahl und somit eingeschränkten Aussagekraft sind diese Ergebnisse nicht graphisch dargestellt.

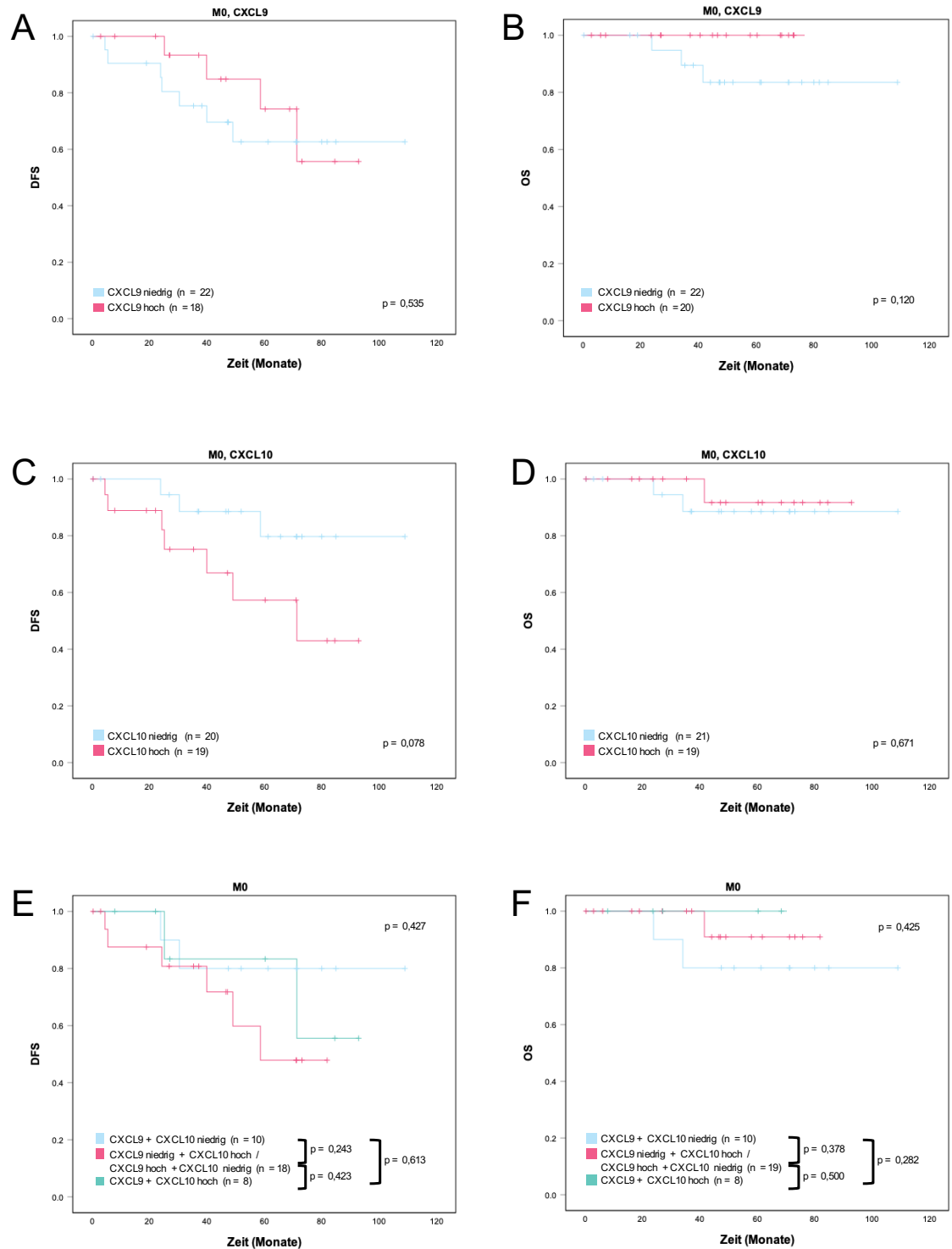


Abbildung 14: Prognostische Signifikanz des intratumoralen CXCL9 und CXCL10 im nicht metastasierten Kollektiv.

Dargestellt sind die Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben (**A**) und Gesamtüberleben (**B**) abhängig von niedriger oder hoher CXCL9-Konzentration im Tumor bzw. das krankheitsfreie Überleben (**C**) und Gesamtüberleben (**D**) abhängig von niedriger oder hoher CXCL10-Konzentration im Tumor. (**E**) zeigt das krankheitsfreie Überleben (**E**) und Gesamtüberleben (**F**) abhängig von der Konzentration beider Chemokine im Tumor. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben.

4.5.2 Prognostischer Einfluss der CXCR3-Chemokine im Serum

Die prognostische Bedeutung von CXCL9 und CXCL10 bei Mammakarzinom-Patientinnen wurde anhand der Serumkonzentration beider Chemokine untersucht.

Der mediane Nachbeobachtungszeitraum belief sich für das krankheitsfreie Überleben auf 15,2 Monate (95% Konfidenzintervall (KI): 0,3 – 79,8 Monate) und für das Gesamtüberleben auf 23,8 Monate (95% KI: 0,6 – 84,8 Monate).

Für die Analyse des nicht metastasierten Kollektivs wurden 236 Patientinnen untersucht (Abbildung 15).

Eine hohe CXCL9-Serumkonzentration war im M0-Kollektiv mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben assoziiert ($p = 0,012$). Eine derartige Beobachtung mit negativem Effekt von CXCL9 ließ sich für das Gesamtüberleben zwar andeuten, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,505$).

Für CXCL10 zeigte sich für das krankheitsfreie Überleben ein ähnlicher Trend wie bei CXCL9: Hohe Chemokinkonzentrationen gingen mit einer schlechteren Prognose einher ($p = 0,118$). Auch wiesen Patientinnen mit hohem peripheren CXCL10 ein kürzeres Gesamtüberleben auf, jedoch war der Unterschied ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,181$). Anschließend wurden die Patientinnen anhand der Chemokine im Serum in drei Gruppen eingeteilt: niedriges CXCL9 und CXCL10, hohe Konzentration beider Chemokine und niedriges CXCL9 mit hohem CXCL10 oder hohes CXCL9 mit niedrigem CXCL10.

Kombiniert hohe Konzentrationen beider Chemokine im Serum wiesen das kürzeste krankheitsfreie Intervall auf ($p = 0,047$). Im Subgruppenvergleich fiel zudem besonders ein Unterschied zwischen Patientinnen mit hohem CXCL9 sowie CXCL10 und Patientinnen mit niedriger Konzentration beider Chemokine auf ($p = 0,015$). Letztere profitierten vom längsten krankheitsfreien Intervall.

Kombiniert hohes CXCL9 und CXCL10 im Serum war zudem mit einem verkürzten Gesamtüberleben korreliert, die Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen stellten sich jedoch nicht signifikant verschieden dar ($p = 0,365$).

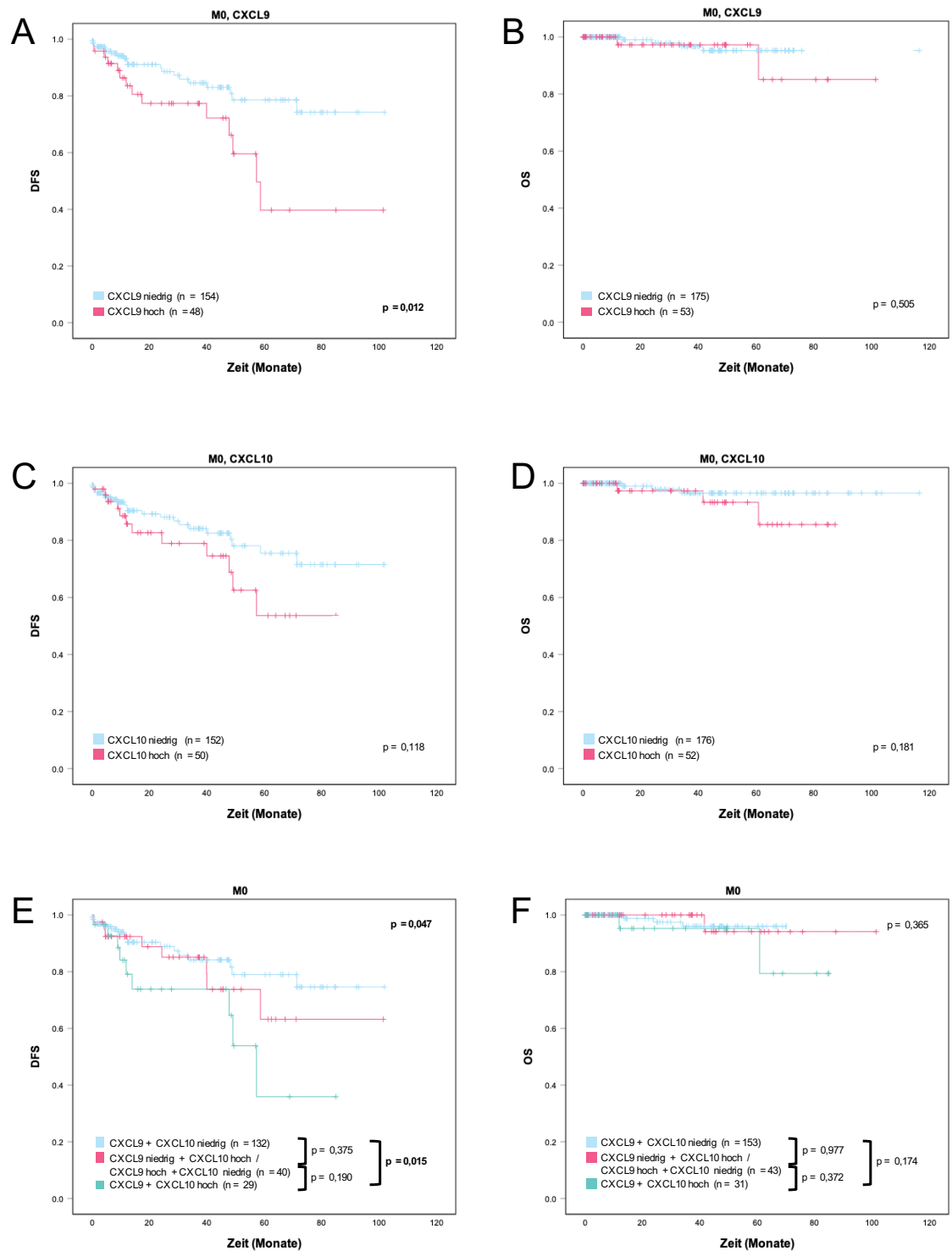


Abbildung 15: Prognostische Bedeutung des peripheren CXCL9 und CXCL10 im nicht metastasierten Kollektiv.

Dargestellt sind die Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben (**A**) und Gesamtüberleben (**B**) abhängig von niedriger oder hoher CXCL9-Konzentration im Serum bzw. das krankheitsfreie Überleben (**C**) und Gesamtüberleben (**D**) abhängig von niedriger oder hoher CXCL10-Konzentration im Serum. (**E**) zeigt das krankheitsfreie Überleben (**E**) und Gesamtüberleben (**F**) abhängig von der Konzentration beider Chemokine im Serum. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

Zur weiteren Validierung der prognostischen Wertigkeit des systemischen CXCL9 und CXCL10 wurde eine univariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt (Tabelle 19). In das Modell eingeschlossen wurden neben der Serumkonzentration beider Chemokine etablierte prognostische Faktoren für das Mammakarzinom, zu denen das Alter, die Tumorgroße, der Lymphknotenstatus und das Grading gehörten. Zudem wurde der Einfluss der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) untersucht.

Für das krankheitsfreie Überleben konnte ein prognostischer Effekt des histologischen Grads (HR = 2,38, $p = 0,016$), des Nodalstatus (HR = 2,86, $p = 0,005$) und des Serum-CXCL9 (HR 2,24, $p = 0,023$) bestätigt werden. Hohe CXCL9-Werte waren mit einem etwa zweifach erhöhten Risiko (HR = 2,24, 95%-KI = 1,12 – 4,49) für ein Lokalrezidiv, axilläres Rezidiv oder der Entwicklung von Fernmetastasen verbunden. Für CXCL10 zeigte sich ein ähnlicher negativer Effekt (HR = 1,70, 95%-KI = 0,82 – 3,50), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,153$).

Für das Gesamtüberleben fanden sich außer dem histologischen Grad als grenzwertig signifikantem Prognosefaktor (HR = 3,64, $p = 0,054$) keine prognostisch relevanten Variablen. CXCL9 und CXCL10 zeigten zwar eine negative Assoziation mit dem Gesamtüberleben (HR = 1,73 bzw. HR = 2,37), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,438$ bzw. $p = 0,200$).

Tabelle 19: Univariate Cox-Regressionsanalyse des M0-Kollektivs.

Signifikante HR und p-Werte sind fett gedruckt. In Klammern ist das 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben. DFS = *Disease-free survival*, OS = *Overall survival*, HR = *Hazard Ratio*, TILs = tumorinfiltrierende Lymphozyten.

Variable	DFS		OS	
	HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert
Alter ≥ 60 J.	0,77 (0,39 - 1,52)	0,447	1,52 (0,41 - 5,68)	0,530
Grading = 3	2,38 (1,17 – 4,84)	0,016	3,64 (0,98 - 13,57)	0,054
Tumorgroße ≥ 20 mm	1,57 (0,78 - 3,15)	0,209	1,63 (0,37 - 7,30)	0,521
pN positiv	2,86 (1,38 – 5,90)	0,005	2,35 (0,53 - 10,53)	0,263
TILs positiv	2,25 (0,58 – 8,71)	0,240	1,87 (0,17 - 20,61)	0,610
CXCL9 hoch	2,24 (1,12 - 4,49)	0,023	1,73 (0,43 - 6,96)	0,438
CXCL10 hoch	1,70 (0,82 - 3,50)	0,153	2,37 (0,64 - 8,83)	0,200

Nachfolgend wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde ein Basismodell erstellt mit den Variablen Alter, Grading, Tumorgroße sowie Nodalstatus und anschließend die Chemokinkonzentration separat mitanalysiert

(Tabelle 20). Die TILs wurden aufgrund geringer Datenanzahl aus dem Modell ausgeschlossen. Auch hierbei konnte CXCL9 als unabhängiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben identifiziert werden (HR = 2,73, 95%-KI = 1,26 – 5,88, $p = 0,011$). Hohes CXCL9 war zudem mit einem stark erhöhten Risiko für ein kürzeres Gesamtüberleben assoziiert (HR = 7,80, 95%-KI = 0,78 – 77,73, $p = 0,080$), jedoch nur mit eingeschränkter statistischer Signifikanz.

Ähnlich wie in der univariaten Analyse ließ sich auch für CXCL10 ein negativer Trend für das krankheitsfreie Überleben erkennen (HR = 1,79, 95%-KI = 0,78 – 4,11, $p = 0,168$). Der histologische Grad zeigte sich zudem ebenfalls als prognostischer Faktor mit einem fast dreifach erhöhten Risiko (HR = 2,67, $p = 0,015$).

Für das Gesamtüberleben erwiesen sich ein hohes CXCL10 als negativer prognostischer Faktor mit einem Risiko von 23,82 (95%-KI = 1,26 – 452,13) sowie ein hoher histologische Grad (HR = 10,29, 95%-KI = 1,02 – 103,44). Beide Werte weisen einen hohen HR sowie eine weite Spanne des 95%-Konfidenzintervall auf, welches vermutlich auf die wenigen eingetretenen Events (Versterben) zurückzuführen und somit nur eingeschränkt interpretierbar ist.

Tabelle 20: Multivariate Cox-Regressionsanalyse des M0-Kollektivs.

Signifikante HR und p-Werte sind fett gedruckt. In Klammern ist das 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben.

DFS = *Disease-free survival*, OS = *Overall survival*, HR = *Hazard Ratio*.

Variable	DFS		OS	
	HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert
Alter $\geq$ 60 J.	0,68 (0,30 - 1,52)	0,347	0,43 (0,04 - 4,36)	0,471
Grading = 3	2,67 (1,21 - 5,85)	0,015	10,29 (1,02 - 103,44)	0,048
Tumorgröße $\geq$ 20 mm	1,36 (0,56 - 3,29)	0,500	7,90 (0,75 - 83,19)	0,085
pN positiv	1,94 (0,81 - 4,65)	0,139	1,55 (0,20 - 12,06)	0,677
CXCL9 hoch	2,73 (1,26 - 5,88)	0,011	7,80 (0,78 - 77,73)	0,080
CXCL10 hoch	1,79 (0,78 - 4,11)	0,168	23,82 (1,26 - 452,13)	0,035

Im primär metastasierten Kollektiv zeigte sich für niedrige bzw. hohe CXCL9- und CXCL10-Serumwerte kein Unterschied in der progressionsfreien oder Gesamtüberlebenszeit. Auch die Kombination beider Chemokinkonzentrationen hatte keine prognostische Relevanz.

Eine univariate Cox-Regressionsanalyse des metastasierten Kollektivs (Tabelle 21) konnte keine signifikanten Faktoren für das progressionsfreie oder Gesamtüberleben identifizieren. Entsprechend wurde keine multivariate Analyse durchgeführt. Aufgrund

der sehr geringen Patienten- und Fallzahlen ergaben sich zum Teil sehr große Konfidenzintervalle.

Tabelle 21: Univariate Cox-Regressionsanalyse des M1-Kollektivs.

In Klammern ist das 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben. PFS = *Progression-free survival*, OS = *Overall survival*, HR = *Hazard Ratio*, TILs = tumorinfiltrierende Lymphozyten.

Variable	PFS		OS	
	HR (95%-KI)	p-Wert	HR (95%-KI)	p-Wert
Alter $\geq$ 60 J.	0,86 (0,32 - 2,31)	0,757	2,09 (0,22 - 20,20)	0,525
Grading = 3	1,07 (0,36 - 3,23)	0,898	44,46 (0,003 - 681359,83)	0,44
Tumorgröße $\geq$ 20 mm	0,82 (0,15 - 4,52)	0,815	-	-
Nodalstatus positiv	1,68 (0,30 - 9,59)	0,558	-	-
TILs positiv	0,45 (0,05 - 4,34)	0,489	55,58 (0,001 - 5456325,51)	0,493
CXCL9 hoch	2,28 (0,81 - 6,46)	0,119	0,41 (0,04 - 4,12)	0,449
CXCL10 hoch	1,70 (0,56 - 5,15)	0,351	1,16 (0,12 - 11,33)	0,902

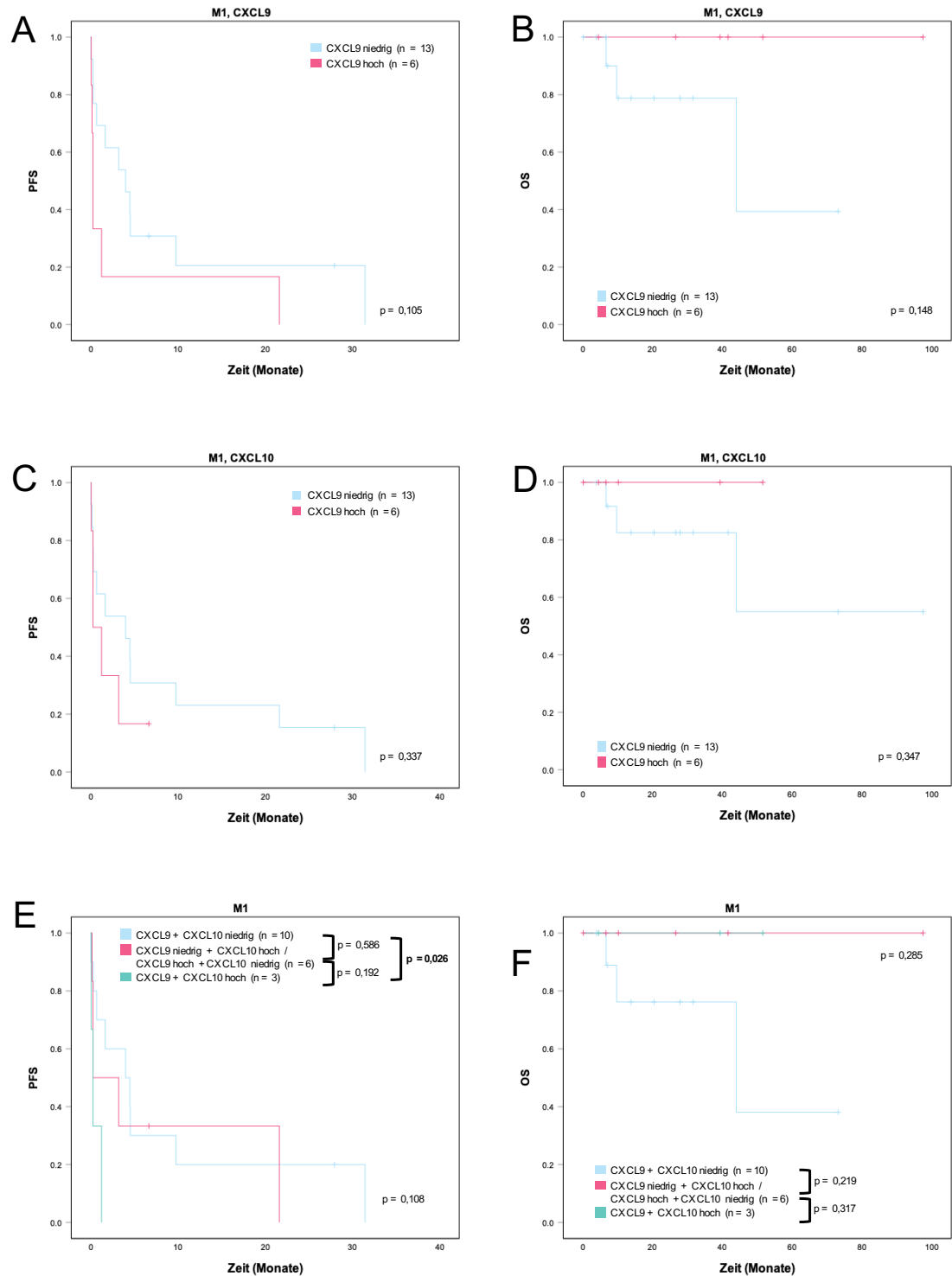


Abbildung 16: Prognostische Signifikanz des peripheren CXCL9 und CXCL10 im primär metastasierten Kollektiv.

Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) abhängig von niedriger oder hoher CXCL9-Konzentration im Serum bzw. das progressionsfreie Überleben (C) und Gesamtüberleben (D) abhängig von niedriger oder hoher CXCL10-Konzentration im Serum. (E) zeigt das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben (F) abhängig von der Konzentration beider Chemokine im Serum. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben.

4.5.2.1 Prognostische Bedeutung der CXCR3-Chemokine im Serum unter Berücksichtigung des Nodalstatus

Der prognostische Einfluss von CXCL9 und CXCL10 wurde anschließend nach Nodalstatus untersucht. Hierfür wurde das Kollektiv in die Gruppen niedrige bzw. hohe Chemokinkonzentration eingeteilt und anschließend das krankheitsfreie bzw. Gesamtüberleben abhängig vom Nodalstatus untersucht. Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven finden sich in Abbildung 17 sowie in Abbildung 18.

Für Patientinnen mit hohem CXCL9 fiel bei Vorhandensein von befallenen Lymphknoten wie zu erwarten ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben auf ($p = 0,007$). Dies ließ sich für die Gruppe mit niedrigem CXCL9 nicht beobachten. Für das Gesamtüberleben zeigten sich abhängig von niedriger bzw. hoher Chemokinexpression und befallenen Lymphknoten keine Unterschiede (Abbildung 17).

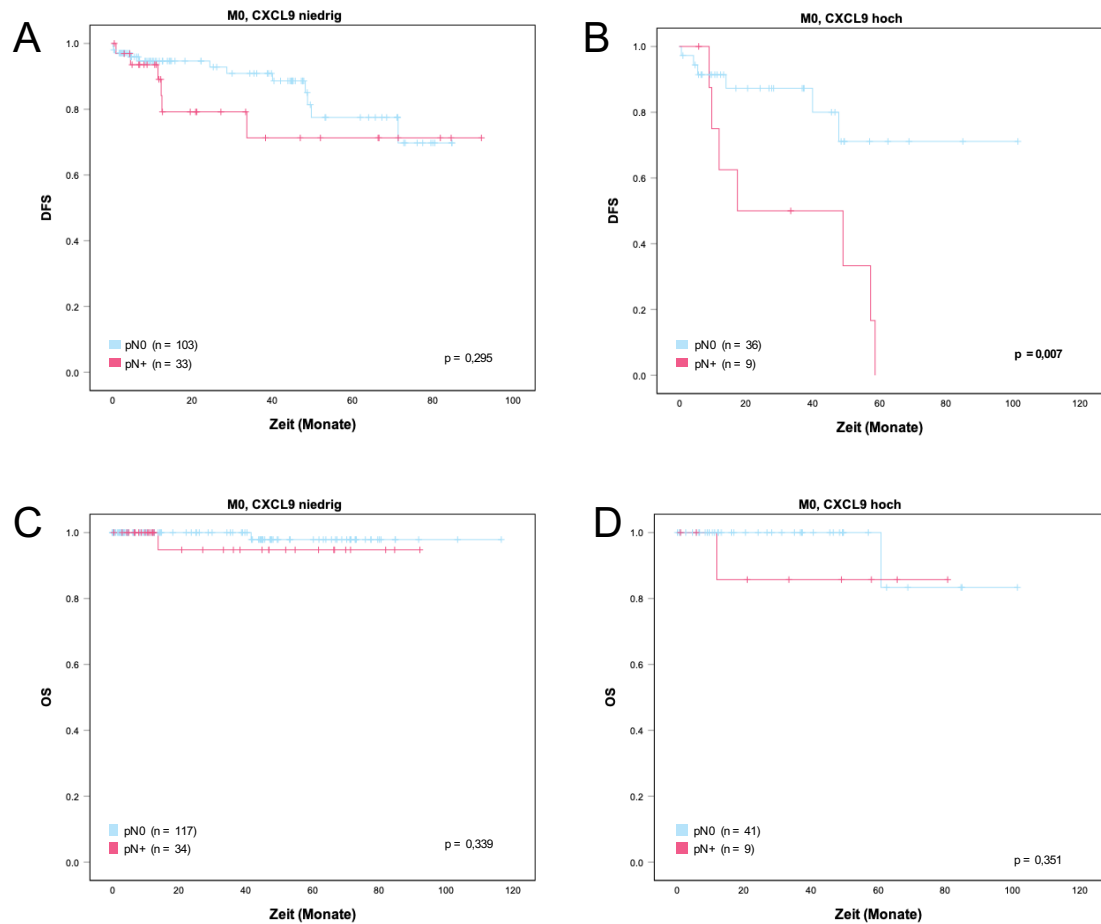


Abbildung 17: Prognostische Signifikanz von CXCL9 im Serum im nicht metastasierten Kollektiv, abhängig vom Nodalstatus.

Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben abhängig von niedriger (**A**) bzw. hoher CXCL9-Konzentration (**B**). (**C**) zeigt das Gesamtüberleben für das Kollektiv mit niedriger CXCL9-Konzentration, (**D**) für das Kollektiv mit hoher CXCL9-Konzentration. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

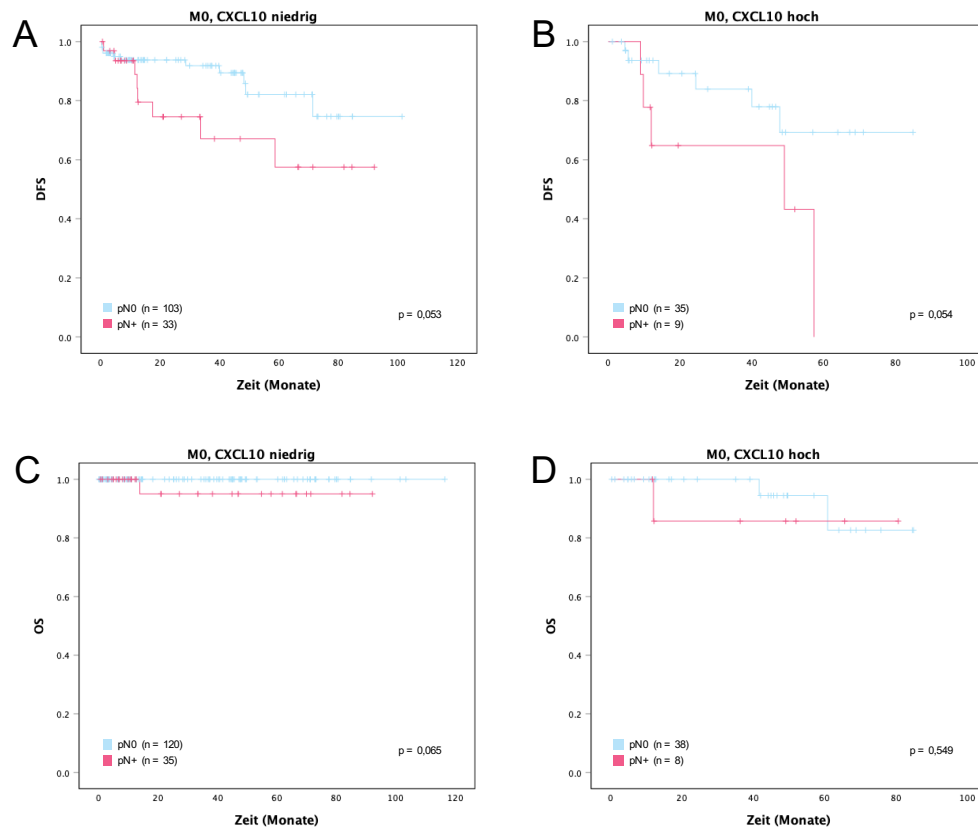


Abbildung 18: Prognostische Signifikanz von CXCL10 im Serum im nicht metastasierten Kollektiv, abhängig vom Nodalstatus.

Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben abhängig von niedriger (A) bzw. hoher CXCL10-Konzentration (B). (C) zeigt das Gesamtüberleben für das Kollektiv mit niedriger CXCL10-Konzentration, (D) für das Kollektiv mit hoher CXCL10-Konzentration. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben.

Patientinnen mit befallenen Lymphknoten wiesen unabhängig der CXCL10-Konzentration ein kürzeres krankheitsfreies Überleben auf. Die Ergebnisse zeigten einen Trend zur Signifikanz ($p = 0,053$ bzw. $p = 0,054$). Das Gesamtüberleben war im Kollektiv mit geringer CXCL10-Konzentration ebenfalls schlechter, wenn Lymphknoten befallen waren, auch wenn keine Signifikanz erreicht wurde ($p = 0,065$). Für die CXCL10-reiche Gruppe ergab sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Abbildung 18).

4.5.2.2 Prognostische Bedeutung der CXCR3-Chemokine im Serum unter Berücksichtigung des histologischen Subtyps

Der prognostische Einfluss von CXCL9 und CXCL10 wurde anschließend in Abhängigkeit des histologischen Subtyps (Hormonrezeptor-positiv, HER2-positiv oder TNBC) untersucht.

Für die Untersuchung des krankheitsfreien Überlebens standen hierfür 146 nicht-metastasierte Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiver Erkrankung zur Verfügung, für das Gesamtüberleben 165 entsprechende Patientinnen.

Es ergab sich ein bereits im Gesamtkollektiv beobachteter Trend (Abbildung 19). Eine hohe CXCL9-Serumkonzentration war mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben ($p = 0,237$) sowie einem kürzeren Gesamtüberleben ($p = 0,533$) assoziiert, jedoch ohne Signifikanz. Für CXCL10 ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens ($p = 0,920$) oder des Gesamtüberlebens ($p = 0,181$).

Die gleichzeitige Untersuchung beider Chemokine zeigte keinen Unterschied bezüglich des krankheitsfreien Intervalls ($p = 0,721$) und des Gesamtüberlebens ($p = 0,542$).

Im primär metastasierten Kollektiv fanden sich 14 Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiver Erkrankung. Es zeigte sich eine Assoziation zwischen hohem Serum-CXCL10 und einem verkürzten progressionsfreien Überleben, welche jedoch nicht statistisch signifikant war ($p = 0,065$). Durch fehlende Ereignisse konnten keine Aussagen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Serum-CXCL9 und -CXCL10 und dem Gesamtüberleben getroffen werden.

Aufgrund der geringen Fallzahl und somit eingeschränkten Aussagekraft sind diese Ergebnisse nicht graphisch dargestellt.

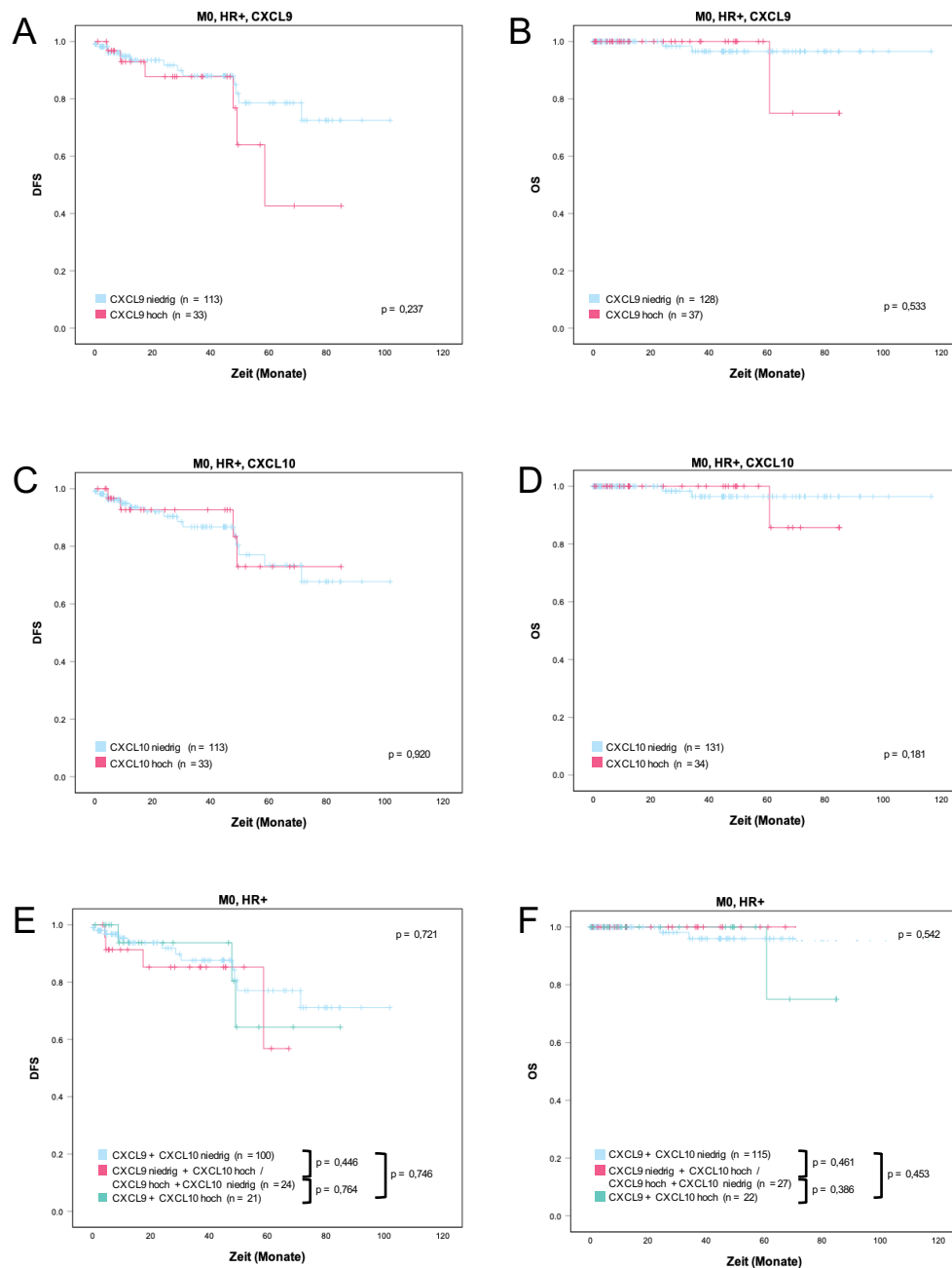


Abbildung 19: Prognostische Signifikanz von CXCL9 und CXCL10 im Serum im Hormonrezeptor-positiven, nicht metastasierten Kollektiv.

Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben (**A**) und Gesamtüberleben (**B**) abhängig von niedriger oder hoher CXCL9-Konzentration im Serum bzw. das krankheitsfreie Überleben (**C**) und Gesamtüberleben (**D**) abhängig von niedriger oder hoher CXCL10-Konzentration im Serum. (**E**) zeigt das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben (**F**) abhängig von der Konzentration beider Chemokine im Serum. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben. HR+ = Hormonrezeptor-positiv.

Anschließend wurde das Kollektiv der HER2-positiven, nicht-metastasierten Patientinnen untersucht (Abbildung 20). Hierbei handelte es sich um eine geringe Gruppengröße ($n = 27$). Es trat kein Versterben einer HER2-positiven Patientin ein, sodass ausschließlich das krankheitsfreie Überleben gemessen werden konnte.

Es ergab sich eine Assoziation mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben und hohem Serum-CXCL9 ($p = 0,052$) sowie hohem Serum-CXCL10 ($p = 0,088$), jedoch waren beide Untersuchungen statistisch nicht signifikant.

Auch hier wurden die Patientinnen anhand der Chemokine im Serum in drei Gruppen eingeteilt, analog zu den Voruntersuchungen. Kombiniert hohe Konzentrationen beider Chemokine im Serum wiesen das kürzeste krankheitsfreie Intervall auf ($p = 0,043$).

Es gab lediglich zwei Patientinnen mit primär metastasiertem, HER2-positivem Brustkrebs, sodass in diesem Kollektiv keine Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

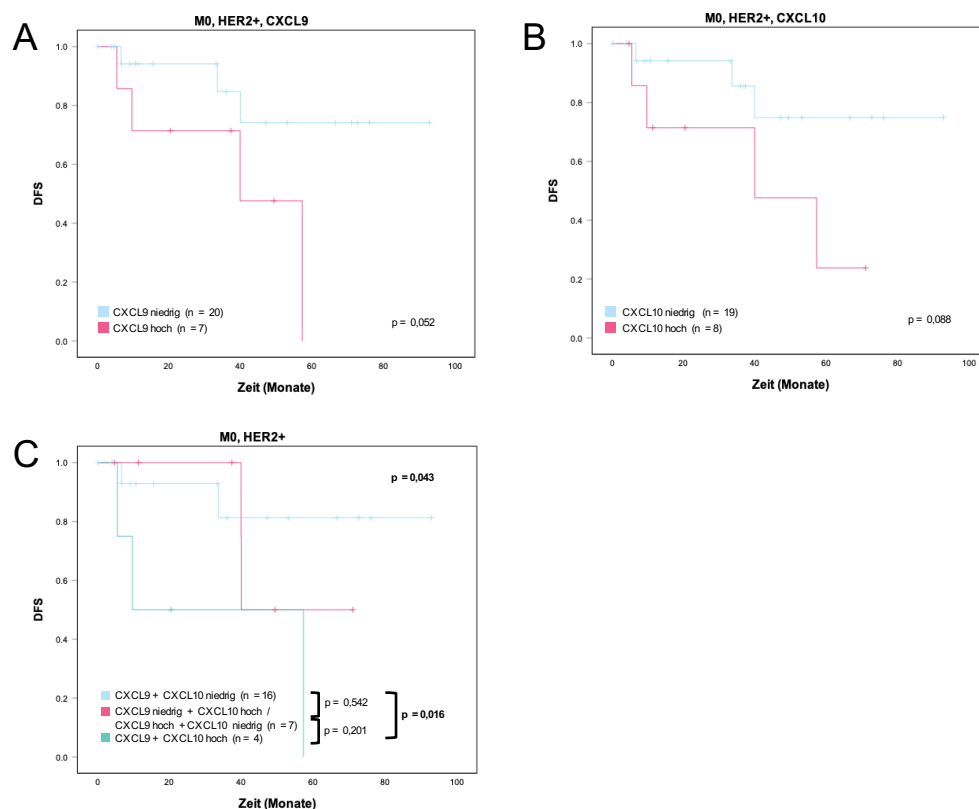


Abbildung 20: Prognostische Signifikanz von CXCL9 und CXCL10 im Serum im HER2-positiven, nicht metastasierten Kollektiv.

Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben abhängig von niedriger oder hoher CXCL9- (A) bzw. CXCL10-Konzentration (B) im Serum. (C) zeigt das krankheitsfreie Überleben abhängig von der Konzentration beider Chemokine im Serum. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben. HER2+ = HER2-positiv.

Die Gruppe der Patientinnen mit Triple-negativem Brustkrebs umfasste 28 Patientinnen (Abbildung 21). Es ist zu beachten, dass die Überlebensanalysen in einem Kollektiv mit solchen geringen Fallzahlen nur eingeschränkt zu beurteilen sind.

Hohes Serum-CXCL9 sowie -CXCL10 war auch in diesem Kollektiv mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert, jedoch waren diese Ergebnisse statistisch nicht signifikant ($p = 0,591$ für CXCL9, $p = 0,936$ für CXCL10).

Für das Gesamtüberleben ergab sich für die CXCL9-Serumkonzentration kein Unterschied. Eine hohe CXCL10-Serumkonzentration ging mit einem verkürzten Gesamtüberleben einher, jedoch ebenfalls ohne statistische Signifikanz ($p = 0,175$).

Kombiniert hohe Konzentrationen beider Chemokine im Serum wiesen das kürzeste krankheitsfreie Intervall auf ($p = 0,231$). Im Subgruppenvergleich fiel zudem besonders ein Unterschied zwischen Patientinnen mit gemischter Konzentration (niedriges CXCL9 und hohes CXCL10 oder hohes CXCL9 und niedriges CXCL10 im Serum) und Patientinnen mit hoher Konzentration beider Chemokine auf ($p = 0,046$). Letztere wiesen das kürzeste krankheitsfreie Intervall auf, jedoch belief sich die Gruppengröße lediglich auf drei Patientinnen.

Ähnliches ließ sich für das Gesamtüberleben beobachten. Auch hier wiesen die drei Patientinnen mit hohem CXCL9 und CXCL10 im Serum das kürzeste Gesamtüberleben auf. Der Unterschied war lediglich im Vergleich mit der Gruppe der gemischten Konzentration signifikant ($p = 0,046$).

Es gab im vorliegenden Kollektiv lediglich eine Patientin mit primär metastasiertem, Triple-negativem Brustkrebs, sodass keine Untersuchungen in dieser Subgruppe durchgeführt werden konnten.

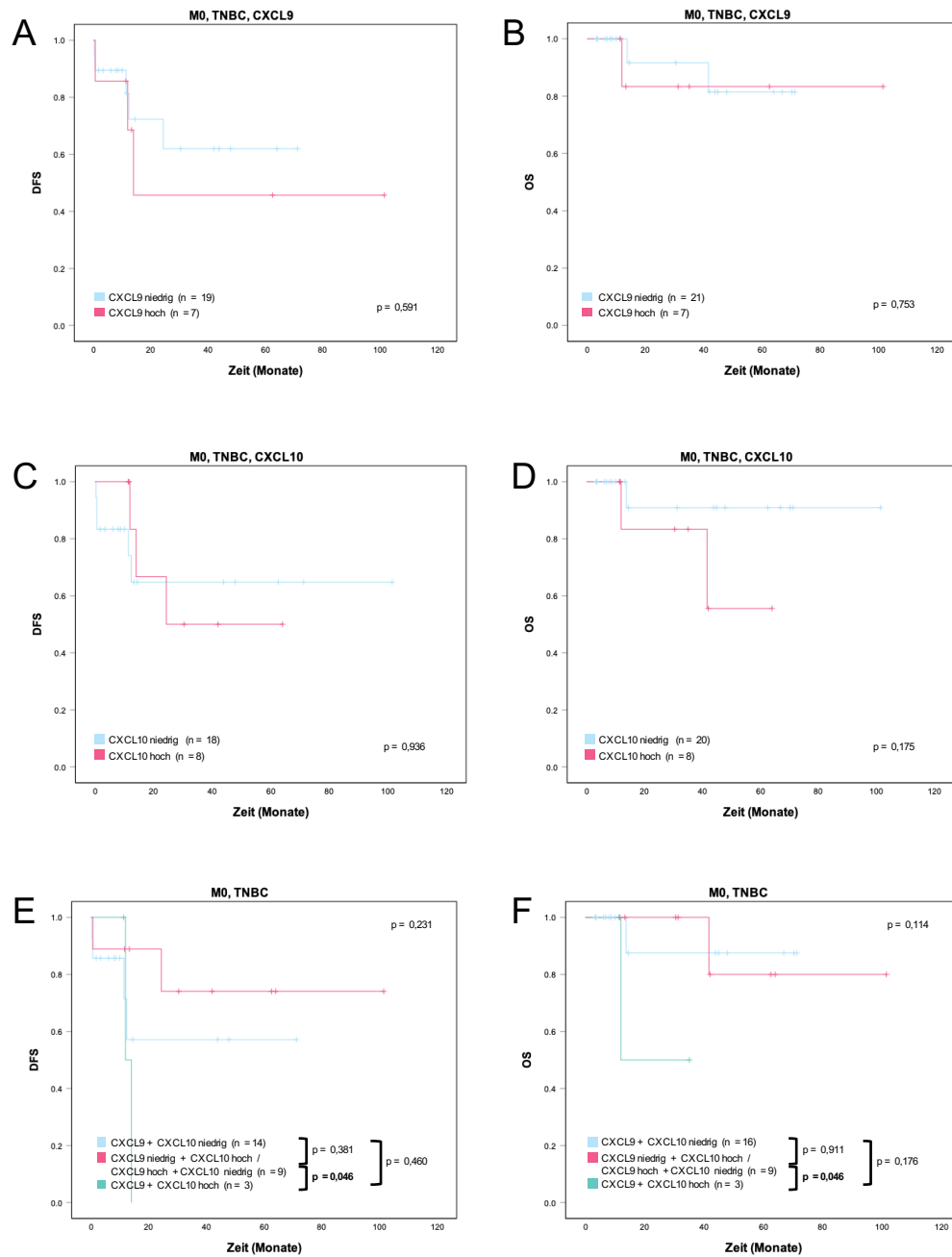


Abbildung 21: Prognostische Signifikanz von CXCL9 und CXCL10 im Serum im Triple-negativen, nicht metastasierten Kollektiv.

Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben (**A**) und Gesamtüberleben (**B**) abhängig von niedriger oder hoher CXCL9-Konzentration im Serum bzw. das krankheitsfreie Überleben (**C**) und Gesamtüberleben (**D**) abhängig von niedriger oder hoher CXCL10-Konzentration im Serum. (**E**) zeigt das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben (**F**) abhängig von der Konzentration beider Chemokine im Serum. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben. TNBC = *Triple negative breast cancer*.

4.5.3 Prognostischer Einfluss der intratumoralen und peripheren CXCR3-Chemokine

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von CXCL9 bzw. CXCL10 in Tumorgewebe und Serum kombiniert untersucht. Dazu wurde das Patientinnenkollektiv in vier Gruppen eingeteilt: Chemokinkonzentration in Tumor und Serum niedrig, Chemokinkonzentration in Tumor und Serum hoch, Konzentration im Tumorgewebe niedrig und im Serum hoch sowie Konzentration im Tumorgewebe hoch und im Serum niedrig.

Für die Analyse des nicht metastasierten Kollektivs standen hierfür 36 Patientinnen (krankheitsfreies Überleben) bzw. 37 Patientinnen (Gesamtüberleben) zur Verfügung (Abbildung 22).

Es ließ sich kein Trend für das kürzeste krankheitsfreie Intervall abhängig der CXCL9-Konzentration feststellen. Patientinnen mit niedriger CXCL9-Konzentration in Tumor und Serum zeigten das schlechteste Gesamtüberleben, jedoch keine statistische Signifikanz.

Es fiel zudem auf, dass eine hohe CXCL10-Konzentration sowohl intratumoral als auch peripher zu dem kürzesten krankheitsfreien Überleben führte. Das längste krankheitsfreie Intervall wurde von Patientinnen mit wenig Chemokin im Tumor und reichlich Chemokin im Serum erreicht. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,165$). Das Gesamtüberleben stellte sich in den verschiedenen CXCL10-Gruppen nicht signifikant unterschiedlich dar.

Insgesamt sind die Ergebnisse jedoch bei sehr niedrigen Fallzahlen als lediglich hypothesengenerierend zu werten.

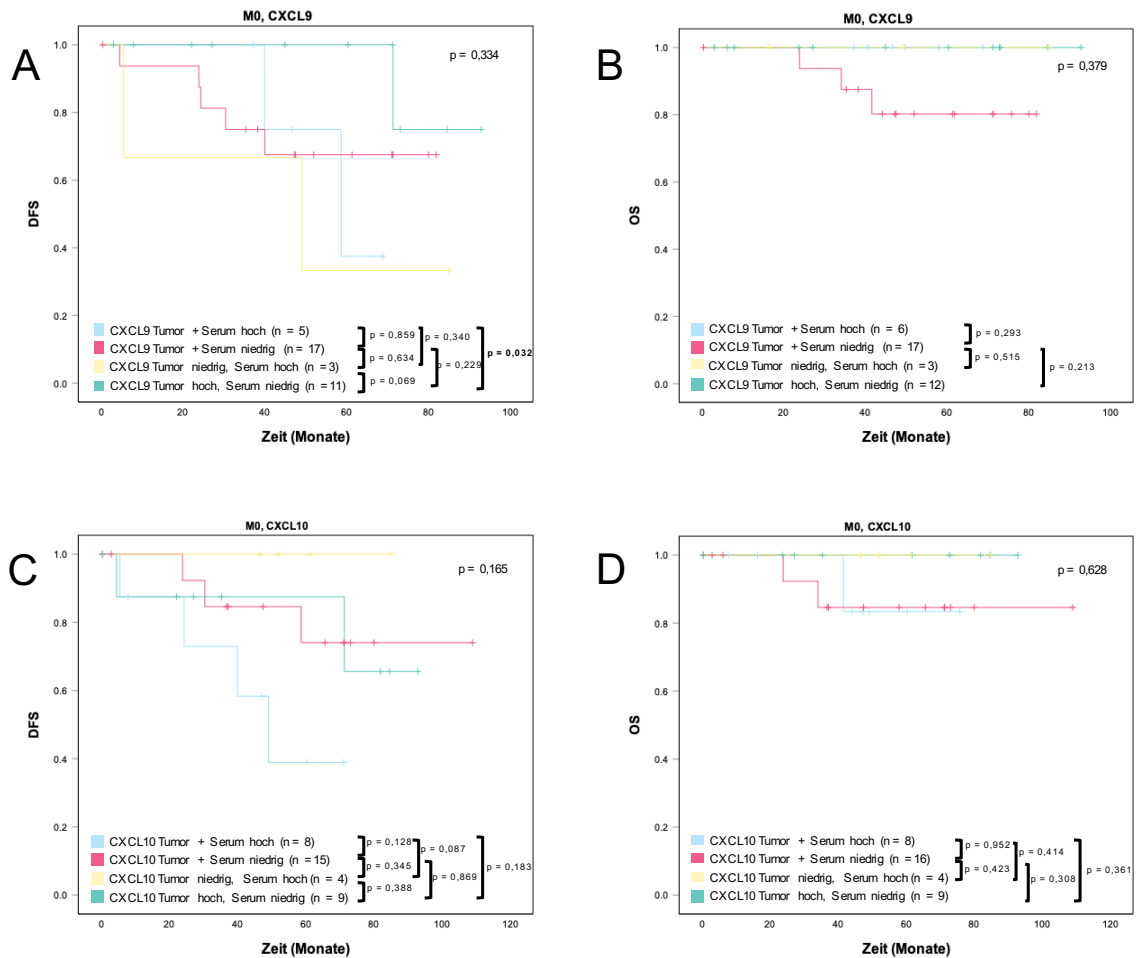


Abbildung 22: Prognostische Signifikanz des intratumoralen und peripheren CXCL9 und CXCL10 im nicht metastasierten Kollektiv.

Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben (A) und Gesamtüberleben (B) abhängig von der CXCL9-Konzentration in Tumor und Serum bzw. das krankheitsfreie Überleben (C) und Gesamtüberleben (D) abhängig von der CXCL10-Konzentration in Tumor und Serum. Die Zeit ist in Monaten skizziert. Mittels log-rank-Test ist die statistische Signifikanz (p-Wert) angegeben.

Der Einfluss von CXCL9 bzw. CXCL10 in Tumorgewebe und Serum wurde anschließend im primär metastasierten Kollektiv geprüft. Hierfür standen für das progressionsfreie Überleben sechs Patientinnen zur Verfügung, für das Gesamtüberleben lediglich fünf. Bei sehr geringer Fallzahl konnte weder ein längeres progressionsfreie Überleben noch ein Überlebensvorteil für eine der Gruppen herausgearbeitet werden. Die Ergebnisse sind nicht graphisch dargestellt.

5 Diskussion

Das Mammakarzinom ist bei Frauen der häufigste Tumor und ursächlich für die Mehrheit der krebisbedingten Todesfälle (Bray et al., 2018). In Deutschland ist jede achte Frau im Laufe ihres Lebens von der Erkrankung betroffen (Robert Koch-Institut, 2021). Umso wichtiger erscheinen effektive Behandlungsmöglichkeiten. In den letzten Jahren wurden Immuntherapien in der Onkologie weiterentwickelt und gewinnen zunehmend an Bedeutung (Esfahani et al., 2020).

Im Zuge dessen spielen das Immunsystem modulierende Stoffe, wie Chemokine, eine entscheidende Rolle. Diese können durch die Chemotaxis tumorbekämpfender Immunzellen sowie einer Angiostase tumorsupprimierende Funktionen ausüben und die Wirkung von Immuntherapien, z.B. Immuncheckpointinhibitoren, überhaupt erst ermöglichen. Andererseits können sie auch tumorfördernde Eigenschaften aufweisen, indem sie zu einer gesteigerten Invasivität, Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen führen (Mantovani et al., 2010).

Die vorliegende Arbeit adressiert die Frage, inwiefern sich die bekannten protektiven Auswirkungen der intratumoralen CXCR3-Chemokine im Mammakarzinom auf die systemische Konzentration im Serum übertragen lassen.

Die systemische Chemokinkonzentration könnte in Zukunft im Rahmen von Liquid Biopsies untersucht werden. Liquid Biopsies, also flüssige Biopsien, werden zunehmend in der Tumordiagnostik eingesetzt. Darunter wird die Entnahme von Blutproben verstanden, welche im Vergleich zu Stanz- oder Vakuumbiopsien eine geringere Invasivität aufweisen. Sollten sich protektive oder auch tumorsupportive Effekte der peripheren Chemokine auf den Krankheitsverlauf zeigen, könnte die Messung der Serumchemokine in Zukunft mit wenig diagnostischem Aufwand einen prognostischen Mehrwert bieten.

5.1 Serumexpression der CXCR3-Chemokine unabhängig von intratumoraler Expression

Die CXCR3-Chemokine CXCL9 und CXCL10 werden von verschiedenen Immun- und Tumorzellen nach Stimulation mit IFN- γ sezerniert (Ohmori et al., 1997; Ohmori et al., 1993). Moderat korrelierende Konzentrationen beider Chemokine konnten in Vorarbeiten sowohl für die intratumorale (Bronger et al., 2016) als auch für die Konzentration im Serum (M. H. Lee et al., 2022) bestätigt werden. Diese Beobachtung zeigte sich ebenfalls in der vorliegenden Arbeit mit einer signifikant moderaten Korrelation zwischen der CXCL9- und CXCL10-Expression im Serum. Im intratumoralen Gewebe fand sich jedoch keine Korrelation zwischen beiden Chemokinen. Dies könnte sich darauf zurückführen lassen, dass die CXCL10-Expression sowohl durch IFN- γ als auch durch TNF- α stimuliert wird, während CXCL9 nur auf IFN- γ oder den synergistischen Effekt mit TNF- α anspricht (Bronger et al., 2016). Das Mikromilieu in Tumoren ist generell sehr heterogen aus verschiedenen Zellentitäten sowie diversen nicht-zellulären Bestandteilen zusammengesetzt (Baghban et al., 2020), sodass ein unterschiedliches Ansprechen der Chemokinregulation sehr plausibel sein kann.

Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob zwischen der lokalen, also intratumoralen, und der systemischen Chemokinexpression ein Zusammenhang besteht. Ein solcher würde durch die periphere Konzentration Rückschlüsse auf das intratumorale Immunmilieu erlauben.

Pitteri et al. beobachteten beispielsweise im murinen HER2-positiven Mammakarzinommodell eine Modifikation des Plasmaproteoms analog zu Veränderungen im Tumormikromilieu. Mehr als die Hälfte der Proteine, welche im Plasma der Mäuse vermehrt exprimiert wurden, wurde gleichzeitig im Proteom-Profil humaner Brustkrebszelllinien nachgewiesen, hinweisend darauf, dass sich die Daten auch auf den Menschen übertragen lassen. Zu diesen Proteinen gehörten unter anderem Vertreter, die eine Rolle in Signalwegen des Immunsystems spielen, wie die Chemokine CCL2, CCL7 und CCL8 (Pitteri et al., 2011).

In unseren Ergebnissen in Patientinnen ohne Fernmetastasen zeigte sich keine Korrelation zwischen intratumoraler und serologischer Konzentration der CXCR3-Liganden. Tymoszuk et al. beobachteten erstmalig eine fehlende Korrelation zwischen CXCL10 in Tumorgewebe und Serum von 132 Brustkrebspatientinnen aller Subtypen. Jedoch wurde in der Studie nicht zwischen Patientinnen ohne und mit Fernmetastasen unterschieden (Tymoszuk et al., 2014). Auch ergab sich in einer aktuellen Studie keine Korrelation zwischen der CXCL9- und CXCL10-Konzentration im Blut von Patienten mit Nierenzellkarzinom und dem entsprechenden Tumorgewebe (M. H. Lee et al., 2022).

Jabeen et al. konnten in 159 Mammakarzinom-Patientinnen hingegen eine positive Korrelation zwischen der intratumoralen mRNA-Expression von CXCL10 und der Proteinexpression im Serum feststellen. Präoperativ untersucht wurden zwei unabhängige Kohorten mit nicht metastasiertem Mammakarzinom und sowohl HR-positiven als auch HR-negativen Probandinnen (Jabeen et al., 2019).

Im Zuge der Ergebnisse von Tymoszuk et al. und Lee et al. (M. H. Lee et al., 2022; Tymoszuk et al., 2014) kommt die Hypothese auf, dass die Chemokine im Serum vermutlich nicht dem Milieu des Primärtumors entstammen.

Unsere Beobachtung erscheint zunächst plausibel aufgrund der Tatsache, dass es sich beim Mammakarzinom nach aktuellen Erkenntnissen eher um eine lokale Neoplasie handelt, auch wenn im Verlauf die Möglichkeit einer systemischen Ausbreitung mit Ausbildung von Metastasen besteht (Punglia et al., 2007). Für diese Theorie spricht die in den letzten Jahren gesunkene Mortalität durch verbesserte Screening- und Früherkennungsmaßnahmen (Basu et al., 2018). Würde es sich ausschließlich um eine systemische Erkrankung handeln, hätte eine frühe Diagnose wenig Auswirkung auf die Prognose (Punglia et al., 2007).

Winter et al. machten in ihrer Studie im kutanen T-Zell-Lymphom eine ähnliche Beobachtung wie in der vorliegenden Arbeit, als sie erhöhte Konzentrationen der CXCR3-Liganden im Serum, einhergehend mit geringer intratumoraler Konzentration messen konnten. Ursächlich vermutet wurden Veränderungen im peripheren Metabolismus der Chemokine, welche unabhängig vom Primärtumor sind. Diese führen durch eine geringere serologische Anzahl an T-Zellen, welche Chemokin-abbauende Enzyme exprimieren, zu einer erhöhten Chemokin-Serumkonzentration (Winter et al., 2007).

5.2 Intratumorale CXCR3-Liganden im Mammakarzinom ohne prognostische Relevanz

CXCL9 und CXCL10 gehören zu den inflammatorischen Chemokinen. Neben der Differenzierung von Immunzellen initiieren sie durch einen chemotaktischen Konzentrationsgradienten vor allem die Migration verschiedener Leukozytenpopulationen. Sie werden unter anderem von TH1-Zellen und Fibroblasten, aber auch von Tumorzellen sezerniert (Tokunaga et al., 2018).

Zahlreiche Studien konnten bereits die intratumorale Proteinexpression von CXCL9 und CXCL10 in verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms herausarbeiten (Bronger et al., 2012; Datta et al., 2006; Hilborn et al., 2014; Mulligan et al., 2013).

Für beide Chemokine wurden vor allem protektive Wirkungen beobachtet. Diese ließen sich in erster Linie auf die Rekrutierung CXCR3-exprimierender tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) zurückführen (Denkert et al., 2010; Zeng et al., 2012). TIL-reiche Tumore zeigten in mehreren klinischen Studien ein verbessertes Ansprechen auf verschiedene neoadjuvante Therapien (Denkert, von Minckwitz, et al., 2018). Zudem konnte in Vorarbeiten ein intratumorales lymphozytäres Infiltrat mit einem geringeren Risiko für Fernmetastasen (Heimes et al., 2017) oder eine Krankheitsprogression (Ignatiadis et al., 2019) sowie einem verlängerten krankheitsfreien und Gesamtüberleben (Loi et al., 2013; Mahmoud et al., 2011) korreliert werden.

Ein ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat geht in soliden Tumoren wie dem Ovarialkarzinom (Bronger et al., 2016), dem Lungenkarzinom (Kawai et al., 2008) und dem kolorektalen Karzinom (Pagès et al., 2009) ebenfalls mit einer besseren Prognose einher. Oldford et al. konnten dies im Mammakarzinom bestätigen (Oldford et al., 2006). TILs können weiter differenziert werden in zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs), welche direkt eine Tumorzellelimination initiieren und T-Helferzellen, die als Typ-1-Helferzellen (TH1) zu einer Aktivierung von CTLs führen oder als Typ-2-Helferzellen (TH2) eine Stimulierung der humoralen Immunität einleiten (Gooden et al., 2011). Zudem werden regulatorische T-Lymphozyten (Treg) beschrieben, welche die tumorspezifische Immunität der anderen Subtypen hemmen können (Curiel et al., 2004). Durch CXCL9 und CXCL10 chemotaktisch angelockte TILs umfassen CTLs, TH1-Zellen und NK (Natürliche Killerzellen) (Nagarsheth et al., 2017; Wendel et al., 2008; Yang et al., 2006). Bisherige Untersuchungen konnten vor allem eine Korrelation zwischen intratumoralem CXCL10 und Anzahl der TILs sowohl im murinen (Yang et al., 2006) und humanen Mammakarzinom (Mulligan et al., 2013) als auch im Ovarialkarzinom (Bronger et al., 2016) feststellen. Jedoch bedeutet eine erhöhte intratumorale Chemokindetektion nicht zwingend eine erhöhte Immuninfiltration: In einer Untersuchung von Rainczuk et al. im

Ovarialkarzinom ergab sich eine fehlende Korrelation zwischen CXCL10 und lymphozytärem Infiltrat, welche auf das Vorliegen einer antagonistischen CXCL10-Isoform zurückgeführt wurde (Rainczuk et al., 2014).

Li et al. konnten für die mRNA-Expression beider Chemokine im Mammakarzinom einen protektiven Effekt nachweisen (Y. Li et al., 2020). Auch Ergebnisse von Razis et al. brachten eine hohe mRNA-Expression von CXCL9 mit einer verbesserten Prognose im HER2-positiven und Triple-negativen Mammakarzinom in Verbindung (Razis et al., 2020). Die Forschungsgruppe um Hilborn et al. berichtete über ein verbessertes Ansprechen auf eine Tamoxifen-Therapie und somit einer besseren Prognose bei hoher intratumoraler CXCL10-Konzentration (Hilborn et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Zusammenhang zwischen CXCL10 und TILs im primär metastasierten Kollektiv. Für die anderen Subgruppen ergab sich keine Korrelation mit den TILs. Dies könnte ursächlich dafür sein, dass die bisher beobachteten positiven Effekte intratumoraler Chemokine in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnten. Es zeigte sich keine Auswirkung der lokalen Chemokinkonzentration auf die Prognose.

Zudem könnte wie in den Arbeiten von Casrouge et al. und Rainczuk et al. eine modifizierte Proteinform der Chemokine vorliegen, welche die chemotaktische Fähigkeit einschränkt (Casrouge et al., 2011; Rainczuk et al., 2014). Dies könnte mittels einer Aminosäuresequenzierung weiter analysiert werden.

Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit ein intratumorales lymphozytäres Infiltrat mit einem erhöhten Risiko für ein kürzeres krankheitsfreies und Gesamtüberleben korreliert werden. Dies galt für Patientinnen ohne primäre Fernmetastasen, auch wenn keine Signifikanz nachweisbar war. Denkert et al. konnten bei Patientinnen mit HER2-negativen Tumoren und hohen TILs ebenfalls ein kürzeres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben messen (Denkert, von Minckwitz, et al., 2018). Dies steht in Kontrast zu den oben beschriebenen protektiven Auswirkungen intratumoraler TILs. Es ist zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit keine Differenzierung der TILs erfolgte, da eine solche mittels der verwendeten Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) in der Immunhistochemie nicht darstellbar ist. Entsprechend ist unklar, welche Lymphozyten-Subgruppen in unserem Patientinnenkollektiv dominierten. Möglicherweise handelt es sich vorwiegend um Treg, welche bei intratumoralem Vorkommen im Mammakarzinom in klinischen Studien prognostisch negative Effekte aufweisen. Bates et al. zeigten dies im nicht metastasierten Mammakarzinom anhand verkürzter Intervalle für das rezidivfreie und Gesamtüberleben für Treg-reiche Tumore (Bates et al., 2006). Analog identifizierten Seenström et al. ein ausgeprägtes Infiltrat aus Treg als unabhängigen

Risikofaktor für eine kürzere Überlebenszeit im metastasierten Mammakarzinom (Stenström et al., 2021).

5.3 Höhere periphere CXCL10-Konzentration im primär metastasierten Mammakarzinom

In der vorliegenden Arbeit wurden Assoziationen zwischen der Chemokinkonzentration und klinikopathologischen sowie molekularbiologischen Faktoren untersucht, um zu ergründen, ob CXCL9 und CXCL10 unabhängig von weiteren Faktoren exprimiert werden.

Dabei zeigte sich weder im nicht metastasierten noch im metastasierten Kollektiv eine Korrelation zwischen systemischer Chemokinexpression und Anzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs). Diese Beobachtung konnte ebenfalls durch Lee et al. in 33 Patienten mit Nierenzellkarzinom gemacht werden, bei denen sich gleichermaßen keine Korrelation zwischen der CXCL9 und CXCL10-Proteinexpression im Plasma und den TILs ergab (M. H. Lee et al., 2022). Diese Erkenntnis ist plausibel, da sich in unseren Ergebnissen zwischen intratumoraler und serologischer Chemokinkonzentration ebenfalls kein Zusammenhang zeigt.

Die Serumkonzentration beider Chemokine zeigte sich in unseren Ergebnissen zudem unabhängig vom histologischen Tumorsubtyp. Hilborn et al. konnten ebenfalls keine Assoziation zwischen histologischem Subtyp und intratumoraler CXCL10-Konzentration herstellen, wobei hier ausschließlich nodal-negative Mammakarzinom-Patientinnen untersucht wurden (Hilborn et al., 2014). Ejaeidi et al. definierten die CXCL10-Serumwerte primär metastasierter Patientinnen mit Mammakarzinom bereits als unabhängig des Hormonrezeptor (HR)-Status, während CXCL9-Werte in HR-positiven Patientinnen deutlich erhöht waren (Ejaeidi et al., 2015). Wu et al. stellten hingegen eine HR-abhängige Sekretion des serologischen CXCL10 in nicht metastasierten Patientinnen fest (Wu et al., 2020).

Im Kollektiv ohne Fernmetastasen fiel in älteren Patientinnen ein erhöhtes Serum-CXCL9 auf, verglichen mit jüngeren Patientinnen. Dies steht in Kontrast zu Ergebnissen von Ruiz-Garcia et al. sowie Narita et al., welche einen solchen Effekt für nicht-metastasierte Brustkrebspatientinnen nicht feststellen konnten (Narita et al., 2016; Ruiz-Garcia et al., 2010). Es bleibt zu beachten, dass die Forschungsgruppe die Gruppen anhand einer Grenze von 35 Jahren unterteilte, während in der vorliegenden Arbeit als Cut-Off der Median von 60 Jahren gewählt wurde. Shurin et al. korrelierten erhöhte CXCL9-Serumkonzentration mit steigendem Alter bei gesunden Probanden und Probandinnen, allerdings wurde hier nicht zwischen weiblichen und männlichen Testpersonen unterschieden. Auch wurden in der Studie mehrere nach Alter aufgeteilte Subgruppen miteinander verglichen und nicht anhand des Medians untersucht (Shurin et al., 2007). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Korrelation zeigte jedoch nur

eine sehr schwache Effektstärke, sodass der Einfluss des Alters auf die CXCL9-Werte insgesamt außer Acht gelassen werden kann.

Die Serumexpression von CXCL9 und CXCL10 zeigte sich zudem unabhängig vom Nodalstatus. Es ist seit langem bekannt, dass befallene Lymphknoten im Mammakarzinom unabhängig von der Therapie mit einer kürzeren krankheitsfreien sowie Gesamtüberlebenszeit korreliert sind (Carter et al., 1989). Hervorzuheben ist, dass der Nodalstatus in unserem Kollektiv in Patientinnen mit niedrigem Serum-CXCL9 keine besondere Relevanz hatte. Die Überlebenszeiten unterschieden sich für Patientinnen ohne und mit Lymphknotenbefall nicht signifikant.

Es fiel jedoch auf, dass die CXCL10-Konzentration im Serum primär metastasierter Patientinnen höher als im Serum nicht metastasierter Patientinnen war. Für CXCL9 konnten ebenfalls höhere Konzentrationen im metastasierten Kollektiv gefunden werden, jedoch ohne statistische Signifikanz. Eine Korrelation mit dem Alter kann hierbei ausgeschlossen werden, da sich der Median im M0- und M1-Kollektiv mit 58 bzw. 61 Jahren nicht signifikant unterscheidet.

Unsere Ergebnisse bestätigen bisherige Beobachtungen, die höheres systemisches CXCL10 in Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nachweisen konnten, verglichen mit lokal begrenzten Tumorstadien (Jafarzadeh et al., 2016) und gesunden Kontrollen (Ejaeidi et al., 2015).

Ein ähnliches Ergebnis ergaben klinische Studien im Nasopharynxkarzinom (Hsin et al., 2013), Ovarialkarzinom (Lambeck et al., 2007) sowie kolorektalen Karzinom (Toiyama et al., 2012). Auch hier war das zirkulierende CXCL10 in fortgeschrittenen Tumorstadien jeweils höher als in lokal begrenzten Stadien. Patienten mit metastasiertem Melanom wiesen ein höheres Serum-CXCL10 auf als nicht metastasierte Patienten (Nevala et al., 2009). Höheres zirkulierendes CXCL9 fand sich in Patienten mit fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, verglichen mit lokal begrenzten Stadien (Chang et al., 2013).

Im Zuge dieser Ergebnisse kommt die Frage auf, inwiefern Tumormetastasen generell das systemische Immunmilieu modulieren. Zuckerman et al. verglichen die periphere Immunsignatur von Brustkrebspatientinnen ohne und mit Lymphknotenmetastasen. Dabei fiel in den Patientinnen mit befallenen Lymphknoten eine systemische Hochregulierung inflammationsbezogener Gene wie TNF auf (Zuckerman et al., 2013). TNF- α wird neben anderen Zytokinen wie IFN- γ und Interleukin 6 (IL-6) in die Tumormikroumgebung (TME) sezerniert. Inflammatorische Zytokine können neoplastisches Wachstum begünstigen (Coussens et al., 2002). Ein Überschuss dieser Stoffe kann zudem ins Blut gelangen und so eine systemische Inflammation auslösen (Liu et al., 2015). CXCR3-Chemokine werden nach Stimulation mit TNF- α und IFN- γ von

verschiedenen Immun-, aber auch Tumorzellen exprimiert (Tsubaki et al., 2005), was ihren Nachweis im peripheren Blut erklären könnte.

Auch Salgado et al. vermuteten, dass unter anderem eine allgemeine Entzündungsreaktion in metastasierten Patientinnen zu erhöhten zirkulierenden Inflamationsmarkern führen könnte. In ihrer Studie zeigten sie, dass Brustkrebspatientinnen mit mehreren metastatischen Läsionen im Vergleich zu solchen mit nur einer betroffenen Region ein erhöhtes IL-6 im Serum aufwiesen. IL-6 ist unter anderem in zahlreiche inflammatorische Prozesse involviert (Salgado et al., 2003).

DeNardo et al. führten eine chronische Inflammation in der Tumormikroumgebung auf das Vorhandensein myeloider Suppressorzellen, konstitutiv aktiver B-Zellen, CD4-positiver TH2-Zellen sowie regulatorischer T-Zellen zurück, welche durch die Sekretion von Zytokinen ein Tumorwachstum fördert (DeNardo et al., 2007).

Zusammenfassend zeigte sich die CXCL9- und CXCL10-Serumkonzentration unabhängig von klinikopathologischen und tumorbiologischen Faktoren. Eine Ausnahme bildete der Metastasierungsstatus, hier fiel eine höhere CXCL10-Konzentration in primär metastasierten Patientinnen als in nicht metastasierten Patientinnen auf.

5.4 Periphere CXCR3-Liganden als prognostische Marker im Mammakarzinom

Die Konzentration von CXCL9 und CXCL10 im Serum von Mammakarzinom-Patientinnen wurde in der Literatur bereits mehrfach nachgewiesen. Beispielsweise konnten Ruiz-Garcia et al. CXCL9 in Patientinnen ohne Fernmetastasen unabhängig des Subtyps mittels ELISA messen (Ruiz-Garcia et al., 2010). Goldberg-Bittmann et al. beobachteten zudem die Sekretion von CXCL10 durch humane Mammakarzinomzellen *in vitro* (Goldberg-Bittman et al., 2004).

Höhere CXCL10-Serumkonzentrationen, verglichen mit gesunden Kontrollen, fanden sich zudem in Patienten mit Nierenzellkarzinom (Polimeno et al., 2013) und Gallenblasenkarzinom (Koshiol et al., 2016).

Die Serumkonzentration der CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 konnte in der vorliegenden Arbeit bereits als unabhängiger Faktor identifiziert werden. Da sich die periphere Chemokinexpression in metastasierten Patientinnen höher zeigte als in nicht metastasierten Patientinnen, wurden diese beiden Kohorten getrennt voneinander betrachtet. Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern sich die periphere Chemokinkonzentration auf die Prognose auswirkt. Dazu wurden die Serumwerte mit dem Krankheitsverlauf korreliert.

Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Hinweise auf tumorsupportive Funktionen der CXCR3-Liganden. Hohe CXCL9-Serumwerte führten in Patientinnen ohne Fernmetastasen zu einem verkürzten krankheitsfreien Überleben. Dieser Trend ließ sich auch bei Unterteilung der Patientinnen nach histologischem Subtyp beobachten. Es zeigte sich abhängig des Subtyps kein Unterschied in der Prognose, jedoch lagen je nach Subtyp sehr geringe Gruppengrößen vor, wodurch die Aussagekraft deutlich reduziert ist. Bei Einbeziehung des Nodalstatus korrelierten hohe Chemokin-Werte im nodal-positiven, nicht metastasierten Patientinnen ebenfalls mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben. Jedoch zeigte sich im nodal-positiven Kollektiv auch für ein niedriges CXCL10 ein schlechteres krankheitsfreies Überleben.

Darüber hinaus konnte das Serum-CXCL9 nicht-metastasierter Patientinnen als prognostischer Faktor für ein reduziertes krankheitsfreies Überleben identifiziert werden, unabhängig von weiteren etablierten Prognosefaktoren wie dem histologischen Grad und Nodalstatus.

CXCR3-Chemokine üben bei Expression im Tumorgewebe des Mammakarzinoms größtenteils einen protektiven Effekt aus. Diese Wirkung lässt sich zum großen Teil auf die Migration von Immunzellen an Orte mit erhöhter Chemokinkonzentration sowie die angiostatischen Effekte zurückführen (Bule et al., 2021; Mantovani et al., 2010). Es

scheint also darauf anzukommen, in welchem Kompartiment die Chemokine nachgewiesen werden. Eine hohe Chemokinexpression im peripheren Blut korrelierte in unseren Ergebnissen mit einer schlechteren Prognose. Entsprechend zeigten die Patientinnen mit hoher intratumoraler und niedriger peripherer Chemokinkonzentration die beste Prognose, auch wenn diese Beobachtungen nicht statistisch signifikant waren. Ein Erklärungsansatz für die diskrepante Wirkung der peripheren Chemokine könnte darin liegen, dass der durch CXCL9 und CXCL10 hervorgerufene Chemokingradient im Tumor bei hoher systemischer Konzentration gegebenenfalls nur noch eine eingeschränkte chemotaktische Wirkung ausübt. Jedoch könnte die erhöhte Chemokinkonzentration im Serum auch Ausdruck einer generellen Inflammation sein, welche die schlechte Prognose der Patientinnen bedingt.

Zudem weisen die CXCR3-Chemokine neben den tumorsupprimierenden Funktionen auch tumorfördernde Eigenschaften auf. Die Bindung von CXCL9 und CXCL10 an ihren G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR3 führt zu dessen Aktivierung und zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden, welches schließlich die Expression verschiedener Gene zur Folge hat. Dabei resultiert die Bindung an CXCR3-A in einer Aktivierung der Ras/ERK- sowie der PI3K/Akt-Kaskade (Bonacchi et al., 2001; B. Ma et al., 2015). Diese fördern die Invasivität, Migration, Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen durch die Induktion verschiedener Pathogenitätsfaktoren (Q. Ding et al., 2016; Ejaeidi et al., 2015).

Ejaeidi et al. fanden heraus, dass das CXCL10 im Serum metastasierter Brustkrebspatientinnen durch die Aktivierung verschiedener Signalwege Tumorzellen zu metastatischen Prozessen wie Proliferation und Migration anregt (Ejaeidi et al., 2015). Datta et al. zeigten auf, dass CXCL10 die Proliferation von Brustkrebszellen fördern kann (Datta et al., 2006). Überdies konnte bereits 1997 eine Studie in der metastasierten Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 eine durch CXCL10 ausgelöste Migration von Tumorzellen *in vitro* beobachten (Youngs et al., 1997).

Im lokoregional begrenzten Mammakarzinom konnten Jabeen et. al bereits eine negativen Effekt des systemischen CXCL10 auf das Gesamtüberleben feststellen (Jabeen et al., 2019). Auch Ergebnisse aus anderen Tumorentitäten legen eine tumorsupportive Funktion nahe. Damit im Einklang stehen klinische Beobachtungen in der Chronisch Lymphatischen Leukämie (Yan et al., 2011), dem follikulären Lymphom (Mir et al., 2015), dem Nasopharynxkarzinom (Hsin et al., 2013) und dem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Chang et al., 2013), die eine negative Assoziation von Serum-CXCL9 und Prognose feststellten.

Wurde ein hohes systemisches CXCL10 gemessen, führte dies im Ovarialkarzinom zu einer schlechteren Prognose (Lambeck et al., 2007), ebenso wie im kolorektalen

Karzinom, in dem zusätzlich die Entwicklung von Fernmetastasen gefördert wurde (Toiyama et al., 2012). Darüber hinaus bewirkte eine hohe Expression von CXCL10 im Tumorgewebe im Ösophaguskarzinom (Blank et al., 2017), Hepatozellulären Karzinom (L. Li et al., 2017), Pankreaskarzinom (Lunardi et al., 2015; Shi et al., 2022) sowie im Prostatakarzinom (Hu et al., 2015) ein reduziertes Gesamtüberleben.

Auf genetischer Ebene ergaben Untersuchungen in mit Tamoxifen behandelten Mammakarzinompatientinnen, dass eine Überexpression des CXCL10-Gens ein kürzeres rezidivfreies Überleben hervorruft. Interessanterweise konnte die CXCL10-Expression als Resistenzfaktor gegen die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie identifiziert werden, welches eine schlechtere Prognose von HR-positiven Patientinnen zur Folge hatte (Mihály et al., 2013). Tymoszuk et al. attribuierten einer hohen CXCL9- und CXCL10-mRNA-Expression ebenfalls ein verringertes rezidivfreies Überleben sowie Gesamtüberleben, sowohl für HR-positive als auch für HR-negative Patientinnen. In dieser Studie wurde allerdings nicht zwischen lokal begrenztem und fernmetastasiertem Mammakarzinom unterschieden (Tymoszuk et al., 2014).

In primär metastasierten Patientinnen konnte der beobachtete prognostisch negative Einfluss des systemischen CXCL9 und CXCL10 nicht bestätigt werden. Dies könnte drauf zurückzuführen sein, dass die durch Chemokine ausgelöste Wirkung auf die Tumorzellen mit nachfolgender Migration in diesem Setting keine signifikante Relevanz mehr hat, da die Metastasierung bereits stattgefunden hat.

Insgesamt scheint die überwiegende Funktionalität der Chemokine in hohem Maße von ihrer Lokalisation und dem Stadium der Erkrankung, d.h. im Setting ohne oder mit primären Fernmetastasen, abhängig zu sein. Werden sie intratumoral exprimiert und üben so Einfluss auf die Tumormikroumgebung aus, scheint vor allem eine tumorsupprimierende Funktion zu resultieren. Werden sie jedoch im peripheren Blut nachgewiesen, könnten eher negative und tumorsupportive Aspekte überwiegen, welche im bereits metastasierten Setting keine Wirkung mehr zu haben scheinen.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass die intratumorale Chemokinkonzentration nicht mit der systemischen korreliert. Hohe periphere Expressionen der CXCR3-Liganden führen zudem zu einer schlechteren Prognose.

5.5 Einsatz des CXCL9 und CXCL10 im Serum als Biomarker

Zahlreiche Arbeiten erforschten bereits die Möglichkeit, die CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 als diagnostische und prognostische Marker des Mammakarzinoms einzusetzen. Dies wurde zum einen für die Genexpression beider Chemokine (Y. Li et al., 2020) als auch für ihre Konzentration auf Proteinebene untersucht.

Die Forschungsgruppe um Ruiz-Garcia et al. konnte im Serum HR-negativer Patientinnen höhere CXCL9-Konzentrationen messen als in Kontrollen (Ruiz-Garcia et al., 2010). Narita et al. stellten ebenfalls eine erhöhte Konzentration beider CXCR3-Liganden im Plasma fest, verglichen mit gesunden Kontrollen (Narita et al., 2016). Darüber hinaus konnte die systemische Konzentration beider Chemokine das Ansprechen auf eine Immuncheckpoint-Inhibitortherapie vorhersagen (Chow et al., 2019).

Diagnostisches Potential für die Einteilung in verschiedene Krankheitsstadien konnte darüber hinaus für das Serum-CXCL9 im Zervixkarzinom (Zhi et al., 2014), im Lungenkarzinom (Shiels et al., 2015) sowie im Glioblastom (Sreekanthreddy et al., 2010) validiert werden. Das zirkulierende CXCL10 bot zudem einen potentiellen Biomarker für die Unterscheidung zwischen Patientinnen mit Zervixkarzinom und gesunden Kontrollen, da es sich bei Patientinnen entsprechend erhöht zeigte (Zhang et al., 2022). Die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass vor allem das systemische CXCL9 und eingeschränkt auch das CXCL10 als negative prognostische Marker im Mammakarzinom fungieren können.

Eine Aussage über das diagnostische Potential der zirkulierenden CXCR3-Chemokine kann aufgrund fehlender Einbeziehung von Kontrollen in dieser Studie nicht getroffen werden.

Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um auch den langfristigen Einfluss beider Chemokine im Serum besser verstehen zu können. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit evaluiert werden, dass die systemische Konzentration keine Rückschlüsse auf die intratumorale Chemokinexpression und das dortige Immunmilieu erlaubt und somit als unabhängig dessen zu beurteilen ist.

Es ist zu beachten, dass eine wesentliche Limitation der vorliegenden Arbeit in der geringen Fallzahl an primär metastasierten Patientinnen besteht. Einige durchgeführte Analysen verlieren hierdurch erheblich an Aussagekraft. Gleiches gilt für die Unterscheidung nach histologischem Subtyp; auch hier sind größere Kollektive notwendig.

Zudem standen auch für einige Parameter wie die Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten und den Ki67-Status nur wenig Daten zur Verfügung.

Darüber hinaus sollte die Serumkonzentration der Chemokine auf eine prädiktive Wertigkeit geprüft werden, um den Einfluss der Chemokinkonzentration auf verschiedene Therapieoptionen zu untersuchen. Diese Fragestellung wird derzeit in einem weiteren Teilprojekt unserer Arbeitsgruppe bearbeitet.

6 Literaturverzeichnis

- Addison, C. L., Daniel, T. O., Burdick, M. D., Liu, H., Ehler, J. E., Xue, Y. Y., et al. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*, 165(9), 5269-5277. doi:10.4049/jimmunol.165.9.5269
- Allen, S. J., Crown, S. E. und Handel, T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, 25, 787-820. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529
- Angiolillo, A. L., Sgadari, C., Taub, D. D., Liao, F., Farber, J. M., Maheshwari, S., et al. (1995). Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med*, 182(1), 155-162. doi:10.1084/jem.182.1.155
- Aronica, S. M., Raiber, L., Hanzly, M. und Kisela, C. (2009). Antitumor/antiestrogenic effect of the chemokine interferon inducible protein 10 (IP-10) involves suppression of VEGF expression in mammary tissue. *J Interferon Cytokine Res*, 29(2), 83-92. doi:10.1089/jir.2008.0034
- Bachelier, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A. M., Combadiere, C., Farber, J. M., Graham, G. J., et al. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 66(1), 1-79. doi:10.1124/pr.113.007724
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., et al. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*, 18(1), 59. doi:10.1186/s12964-020-0530-4
- Basu, P., Ponti, A., Anttila, A., Ronco, G., Senore, C., Vale, D. B., et al. (2018). Status of implementation and organization of cancer screening in The European Union Member States-Summary results from the second European screening report. *Int J Cancer*, 142(1), 44-56. doi:10.1002/ijc.31043
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., et al. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*, 24(34), 5373-5380. doi:10.1200/jco.2006.05.9584
- Bazan, J. F., Bacon, K. B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., et al. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385(6617), 640-644. doi:10.1038/385640a0
- Bikfalvi, A. und Billottet, C. (2020). The CC and CXC chemokines: major regulators of tumor progression and the tumor microenvironment. *Am J Physiol Cell Physiol*, 318(3), C542-c554. doi:10.1152/ajpcell.00378.2019
- Billottet, C., Quemener, C. und Bikfalvi, A. (2013). CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1836(2), 287-295. doi:10.1016/j.bbcan.2013.08.002
- Blank, S., Nienhüser, H., Dreikhausen, L., Sisic, L., Heger, U., Ott, K., et al. (2017). Inflammatory cytokines are associated with response and prognosis in patients with esophageal cancer. *Oncotarget*, 8(29), 47518-47532. doi:10.18632/oncotarget.17671
- Böcker, W. (2013). Klassifikation der Mammakarzinome. In G. Klöppel, H. Kreipe, W. Remmele, & M. Dietel (Eds.), *Pathologie - Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen* (Vol. 3., neubearb. Aufl., pp. 89-92). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Bonacchi, A., Romagnani, P., Romanelli, R. G., Efsen, E., Annunziato, F., Lasagni, L., et al. (2001). Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration

- and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem*, 276(13), 9945-9954. doi:10.1074/jbc.M010303200
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. und Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brierley, J., Gospodarowicz, M. und Wittekind, C. (2017). *TNM classification of malignant tumours* (Eighth edition ed.). Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell.
- Bronger, H. (2019). Chemokine und ihre Rezeptoren als neue Zielstrukturen zur Verbesserung der Immuntherapie gynäkologischer Tumore. *Spitzenforschung in der Gynäkologischen Onkologie und Senologie*.
- Bronger, H., Karge, A., Dreyer, T., Zech, D., Kraeft, S., Avril, S., et al. (2017). Induction of cathepsin B by the CXCR3 chemokines CXCL9 and CXCL10 in human breast cancer cells. *Oncol Lett*, 13(6), 4224-4230. doi:10.3892/ol.2017.5994
- Bronger, H., Kraeft, S., Schwarz-Boeger, U., Cerny, C., Stockel, A., Avril, S., et al. (2012). Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 14(1), R30. doi:10.1186/bcr3115
- Bronger, H., Magdolen, V., Goettig, P. und Dreyer, T. (2019). Proteolytic chemokine cleavage as a regulator of lymphocytic infiltration in solid tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 38(3), 417-430. doi:10.1007/s10555-019-09807-3
- Bronger, H., Singer, J., Windmuller, C., Reuning, U., Zech, D., Delbridge, C., et al. (2016). CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer*, 115(5), 553-563. doi:10.1038/bjc.2016.172
- Bule, P., Aguiar, S. I., Aires-Da-Silva, F. und Dias, J. N. R. (2021). Chemokine-Directed Tumor Microenvironment Modulation in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 22(18). doi:10.3390/ijms22189804
- Carter, C. L., Allen, C. und Henson, D. E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 63(1), 181-187. doi:10.1002/1097-0142(19890101)63:1<181::aid-cnrc2820630129>3.0.co;2-h
- Casrouge, A., Decalf, J., Ahloulay, M., Lababidi, C., Mansour, H., Vallet-Pichard, A., et al. (2011). Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest*, 121(1), 308-317. doi:10.1172/jci40594
- Cerny, C., Bronger, H., Davoodi, M., Sharma, S., Zhu, L., Obana, S., et al. (2015). The Role of CXCR3/Ligand Axis in Cancer. *International Trends in Immunity*, 3(2), 19-25. doi:10.18281/iti.2015.2.3
- Chang, K. P., Wu, C. C., Fang, K. H., Tsai, C. Y., Chang, Y. L., Liu, S. C., et al. (2013). Serum levels of chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) are associated with tumor progression and treatment outcome in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 49(8), 802-807. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.05.006
- Chen, D. S. und Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
- Chow, M. T., Ozga, A. J., Servis, R. L., Frederick, D. T., Lo, J. A., Fisher, D. E., et al. (2019). Intratumoral Activity of the CXCR3 Chemokine System Is Required for the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy. *Immunity*, 50(6), 1498-1512.e1495. doi:10.1016/j.immuni.2019.04.010
- Coussens, L. M. und Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867. doi:10.1038/nature01322
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9), 942-949. doi:10.1038/nm1093

- Datta, D., Flaxenburg, J. A., Laxmanan, S., Geehan, C., Grimm, M., Waaga-Gasser, A. M., et al. (2006). Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res*, 66(19), 9509-9518. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-4345
- DeNardo, D. G. und Coussens, L. M. (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, 9(4), 212. doi:10.1186/bcr1746
- Denkert, C., Loibl, S., Budczies, J., Wienert, S. und Klauschen, F. (2018). [Standardized determination of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer : A prognostic marker for histological diagnosis]. *Pathologe*, 39(6), 520-531. doi:10.1007/s00292-018-0530-y
- Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B. M., Komor, M., et al. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(1), 105-113. doi:10.1200/jco.2009.23.7370
- Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B. I., Weber, K. E., et al. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*, 19(1), 40-50. doi:10.1016/s1470-2045(17)30904-x
- Ding, L., Kim, H. J., Wang, Q., Kearns, M., Jiang, T., Ohlson, C. E., et al. (2018). PARP Inhibition Elicits STING-Dependent Antitumor Immunity in Brca1-Deficient Ovarian Cancer. *Cell Rep*, 25(11), 2972-2980.e2975. doi:10.1016/j.celrep.2018.11.054
- Ding, Q., Lu, P., Xia, Y., Ding, S., Fan, Y., Li, X., et al. (2016). CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. *Cancer Med*, 5(11), 3246-3259. doi:10.1002/cam4.934
- Ehlert, J. E., Addison, C. A., Burdick, M. D., Kunkel, S. L. und Strieter, R. M. (2004). Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J Immunol*, 173(10), 6234-6240. doi:10.4049/jimmunol.173.10.6234
- Ejaeidi, A. A., Craft, B. S., Punekey, L. V., Lewis, R. E. und Cruse, J. M. (2015). Hormone receptor-independent CXCL10 production is associated with the regulation of cellular factors linked to breast cancer progression and metastasis. *Exp Mol Pathol*, 99(1), 163-172. doi:10.1016/j.yexmp.2015.06.002
- Elston, C. W. und 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. *Histopathology*, 19(5), 403-410. doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
- Esfahani, K., Roudaia, L., Buhlaiga, N., Del Rincon, S. V., Papneja, N. und Miller, W. H., Jr. (2020). A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol*, 27(Suppl 2), S87-s97. doi:10.3747/co.27.5223
- Farber, J. M. (1990). A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(14), 5238-5242. doi:10.1073/pnas.87.14.5238
- Fernandez, E. J. und Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 469-499. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838
- Ferraro, E., Drago, J. Z. und Modi, S. (2021). Implementing antibody-drug conjugates (ADCs) in HER2-positive breast cancer: state of the art and future directions. *Breast Cancer Res*, 23(1), 84. doi:10.1186/s13058-021-01459-y
- Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., Brenner, H., et al. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer

- Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 3(4), 524-548. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688
- Forouzanfar, M. H., Foreman, K. J., Delossantos, A. M., Lozano, R., Lopez, A. D., Murray, C. J., et al. (2011). Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*, 378(9801), 1461-1484. doi:10.1016/s0140-6736(11)61351-2
- Gan, S. D. und Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*, 133(9), e12. doi:10.1038/jid.2013.287
- Garcia-Lopez, M. A., Sanchez-Madrid, F., Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M., Acevedo, A., Garcia, M. I., et al. (2001). CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest*, 81(3), 409-418. doi:10.1038/labinvest.3780248
- Gaspar, L. E., Sullivan, D. C., Brookland, R. K., Greene, F. L., Amin, M. B., Schilsky, R. L., et al. (2017). *AJCC Cancer Staging Manual* (8 ed.). Chicago, Illinois: Springer International Publishing.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. und Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31(1), 13-20. doi:10.1002/ijc.2910310104
- Gnant, M., Thomssen, C. und Harbeck, N. (2015). St. Gallen/Vienna 2015: A Brief Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)*, 10(2), 124-130. doi:10.1159/000430488
- Goldberg-Bittman, L., Neumark, E., Sagi-Assif, O., Azenshtein, E., Meshel, T., Witz, I. P., et al. (2004). The expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand, CXCL10, in human breast adenocarcinoma cell lines. *Immunol Lett*, 92(1-2), 171-178. doi:10.1016/j.imlet.2003.10.020
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thurlimann, B. und Senn, H. J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*, 22(8), 1736-1747. doi:10.1093/annonc/mdr304
- Gooden, M. J., de Bock, G. H., Leffers, N., Daemen, T. und Nijman, H. W. (2011). The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*, 105(1), 93-103. doi:10.1038/bjc.2011.189
- Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., et al. (2010). American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(16), 2784-2795. doi:10.1200/jco.2009.25.6529
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., et al. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 66. doi:10.1038/s41572-019-0111-2
- Heimes, A. S., Madjar, K., Edlund, K., Battista, M. J., Almstedt, K., Elger, T., et al. (2017). Subtype-specific prognostic impact of different immune signatures in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 165(2), 293-300. doi:10.1007/s10549-017-4327-0
- Hilborn, E., Sivik, T., Fornander, T., Stål, O., Nordenskjöld, B. und Jansson, A. (2014). C-X-C ligand 10 and C-X-C receptor 3 status can predict tamoxifen treatment response in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 145(1), 73-82. doi:10.1007/s10549-014-2933-7
- Hsin, L. J., Kao, H. K., Chen, I. H., Tsang, N. M., Hsu, C. L., Liu, S. C., et al. (2013). Serum CXCL9 levels are associated with tumor progression and treatment outcome in patients with nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, 8(11), e80052. doi:10.1371/journal.pone.0080052

- Hu, S., Li, L., Yeh, S., Cui, Y., Li, X., Chang, H. C., et al. (2015). Infiltrating T cells promote prostate cancer metastasis via modulation of FGF11→miRNA-541→androgen receptor (AR)→MMP9 signaling. *Mol Oncol*, 9(1), 44-57. doi:10.1016/j.molonc.2014.07.013
- Ignatiadis, M., Van den Eynden, G., Roberto, S., Fornili, M., Bareche, Y., Desmedt, C., et al. (2019). Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients Receiving Trastuzumab/Pertuzumab-Based Chemotherapy: A TRYPHAENA Substudy. *J Natl Cancer Inst*, 111(1), 69-77. doi:10.1093/jnci/djy076
- Jabeen, S., Espinoza, J. A., Torland, L. A., Zucknick, M., Kumar, S., Haakensen, V. D., et al. (2019). Noninvasive profiling of serum cytokines in breast cancer patients and clinicopathological characteristics. *Oncoimmunology*, 8(2), e1537691. doi:10.1080/2162402x.2018.1537691
- Jafarzadeh, A., Fooladseresht, H., Nemati, M., Assadollahi, Z., Sheikhi, A. und Ghaderi, A. (2016). Higher circulating levels of chemokine CXCL10 in patients with breast cancer: Evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism. *Cancer Biomark*, 16(4), 545-554. doi:10.3233/cbm-160596
- Kaplan, E. L. und Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457-481. doi:10.2307/2281868
- Kawada, K., Hosogi, H., Sonoshita, M., Sakashita, H., Manabe, T., Shimahara, Y., et al. (2007). Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene*, 26(32), 4679-4688. doi:10.1038/sj.onc.1210267
- Kawada, K., Sonoshita, M., Sakashita, H., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., Manabe, T., et al. (2004). Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res*, 64(11), 4010-4017. doi:10.1158/0008-5472.Can-03-1757
- Kawai, O., Ishii, G., Kubota, K., Murata, Y., Naito, Y., Mizuno, T., et al. (2008). Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 113(6), 1387-1395. doi:10.1002/cncr.23712
- Kelner, G. S., Kennedy, J., Bacon, K. B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., et al. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 266(5189), 1395-1399. doi:10.1126/science.7973732
- Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J. und Wolchok, J. D. (2016). The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(5), 273-290. doi:10.1038/nrclinonc.2016.25
- Koshiol, J., Castro, F., Kemp, T. J., Gao, Y. T., Roa, J. C., Wang, B., et al. (2016). Association of inflammatory and other immune markers with gallbladder cancer: Results from two independent case-control studies. *Cytokine*, 83, 217-225. doi:10.1016/j.cyto.2016.05.003
- Kruskal, W. H. und Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621. doi:10.2307/2280779
- Kuefer, R., Hofer, M. D., Gschwend, J. E. und Rubin, M. A. (2004). [Tissue microarrays. High-throughput procedures to verify potential biomarkers]. *Urologe A*, 43(6), 659-667. doi:10.1007/s00120-004-0576-8
- Lambeck, A. J., Crijns, A. P., Leffers, N., Sluiter, W. J., ten Hoor, K. A., Braid, M., et al. (2007). Serum cytokine profiling as a diagnostic and prognostic tool in ovarian cancer: a potential role for interleukin 7. *Clin Cancer Res*, 13(8), 2385-2391. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-06-1828
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., et al. (2003). An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med*, 197(11), 1537-1549. doi:10.1084/jem.20021897

- Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P. und Wang, J. (2004). Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol*, 1(2), 95-104.
- Lee, M. H., Laajala, E., Kreutzman, A., Järvinen, P., Nísen, H., Mirtti, T., et al. (2022). The tumor and plasma cytokine profiles of renal cell carcinoma patients. *Sci Rep*, 12(1), 13416. doi:10.1038/s41598-022-17592-3
- Lee, Y. T. (1983). Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. *J Surg Oncol*, 23(3), 175-180. doi:10.1002/jso.2930230311
- Leitlinienprogramm Onkologie, D. K., Deutsche Krebshilfe, AWMF). (2021). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, 2021, AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 17.02.2022).
- Li, L., Zhu, Y. H., Li, Y. und Guan, X. Y. (2017). Identification of chemokine CXCL10 in tumor microenvironment by antibody array as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma*, 64(5), 778-786. doi:10.4149/neo_2017_517
- Li, Y., Liang, M., Lin, Y., Lv, J., Chen, M., Zhou, P., et al. (2020). Transcriptional Expressions of CXCL9/10/12/13 as Prognosis Factors in Breast Cancer. *J Oncol*, 2020, 4270957. doi:10.1155/2020/4270957
- Li, Y., Reader, J. C., Ma, X., Kundu, N., Kochel, T. und Fulton, A. M. (2015). Divergent roles of CXCR3 isoforms in promoting cancer stem-like cell survival and metastasis. *Breast Cancer Res Treat*, 149(2), 403-415. doi:10.1007/s10549-014-3229-7
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., Andre, F., Tordai, A., Mejia, J. A., et al. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 26(8), 1275-1281. doi:10.1200/jco.2007.14.4147
- Liu, J., Lin, P. C. und Zhou, B. P. (2015). Inflammation fuels tumor progress and metastasis. *Curr Pharm Des*, 21(21), 3032-3040. doi:10.2174/1381612821666150514105741
- Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., et al. (1996). Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med*, 184(3), 963-969. doi:10.1084/jem.184.3.963
- Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E. und Moser, B. (1998). Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol*, 28(11), 3696-3705. doi:10.1002/(sici)1521-4141(199811)28:11<3696::Aid-immu3696>3.0.Co;2-w
- Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., et al. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*, 31(7), 860-867. doi:10.1200/jco.2011.41.0902
- Lunardi, S., Lim, S. Y., Muschel, R. J. und Brunner, T. B. (2015). IP-10/CXCL10 attracts regulatory T cells: Implication for pancreatic cancer. *Oncoimmunology*, 4(9), e1027473. doi:10.1080/2162402x.2015.1027473
- Luster, A. D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 338(7), 436-445. doi:10.1056/nejm199802123380706
- Luster, A. D. und Leder, P. (1993). IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med*, 178(3), 1057-1065. doi:10.1084/jem.178.3.1057
- Luster, A. D. und Ravetch, J. V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med*, 166(4), 1084-1097. doi:10.1084/jem.166.4.1084

- Luttmann, W. (2014). *Der Experimentator: Immunologie* (4., vollst. überarb. und korr. Aufl. ed.). Berlin [u.a.]: Springer Spektrum.
- Ma, B., Khazali, A. und Wells, A. (2015). CXCR3 in carcinoma progression. *Histol Histopathol*, 30(7), 781-792. doi:10.14670/hh-11-594
- Ma, X., Norsworthy, K., Kundu, N., Rodgers, W. H., Gimotty, P. A., Goloubeva, O., et al. (2009). CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Mol Cancer Ther*, 8(3), 490-498. doi:10.1158/1535-7163.Mct-08-0485
- Mahmoud, S. M., Paish, E. C., Powe, D. G., Macmillan, R. D., Grainge, M. J., Lee, A. H., et al. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*, 29(15), 1949-1955. doi:10.1200/jco.2010.30.5037
- Mann, H. B. und Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50-60. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2236101>
- Mantovani, A., Savino, B., Locati, M., Zammataro, L., Allavena, P. und Bonecchi, R. (2010). The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(1), 27-39. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.007
- McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P. und Freedman, G. M. (2016). Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med*, 57 Suppl 1, 9s-16s. doi:10.2967/jnumed.115.157834
- Meyer, M., Hensbergen, P. J., van der Raaij-Helmer, E. M., Brandacher, G., Margreiter, R., Heufler, C., et al. (2001). Cross reactivity of three T cell attracting murine chemokines stimulating the CXC chemokine receptor CXCR3 and their induction in cultured cells and during allograft rejection. *Eur J Immunol*, 31(8), 2521-2527. doi:10.1002/1521-4141(200108)31:8<2521::aid-immu2521>3.0.co;2-q
- Mihály, Z., Kormos, M., Lánczky, A., Dank, M., Budczies, J., Szász, M. A., et al. (2013). A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 140(2), 219-232. doi:10.1007/s10549-013-2622-y
- Mir, M. A., Maurer, M. J., Ziesmer, S. C., Slager, S. L., Habermann, T., Macon, W. R., et al. (2015). Elevated serum levels of IL-2R, IL-1RA, and CXCL9 are associated with a poor prognosis in follicular lymphoma. *Blood*, 125(6), 992-998. doi:10.1182/blood-2014-06-583369
- Mohammed, R. A., Martin, S. G., Mahmmod, A. M., Macmillan, R. D., Green, A. R., Paish, E. C., et al. (2011). Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in lymph node-negative breast carcinoma: findings from a large case series with long-term follow-up. *J Pathol*, 223(3), 358-365. doi:10.1002/path.2810
- Mortier, A., Van Damme, J. und Proost, P. (2012). Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett*, 145(1-2), 2-9. doi:10.1016/j.imlet.2012.04.015
- Muller, M., Carter, S., Hofer, M. J. und Campbell, I. L. (2010). Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 36(5), 368-387. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01089.x
- Mulligan, A. M., Raitman, I., Feeley, L., Pinnaduwege, D., Nguyen, L. T., O'Malley, F. P., et al. (2013). Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry. *Clin Cancer Res*, 19(2), 336-346. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-3314
- Nagarsheth, N., Wicha, M. S. und Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 17(9), 559-572. doi:10.1038/nri.2017.49
- Narita, D., Seclaman, E., Anghel, A., Ilina, R., Cireap, N., Negru, S., et al. (2016). Altered levels of plasma chemokines in breast cancer and their association with clinical and pathological characteristics. *Neoplasma*, 63(1), 141-149. doi:10.4149/neo_2016_017

- Nevala, W. K., Vachon, C. M., Leontovich, A. A., Scott, C. G., Thompson, M. A. und Markovic, S. N. (2009). Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, 15(6), 1931-1939. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-08-1980
- Nofech-Mozes, S., Vella, E. T., Dhesy-Thind, S. und Hanna, W. M. (2012). Cancer care Ontario guideline recommendations for hormone receptor testing in breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 24(10), 684-696. doi:10.1016/j.clon.2012.04.005
- Ohmori, Y., Schreiber, R. D. und Hamilton, T. A. (1997). Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem*, 272(23), 14899-14907. doi:10.1074/jbc.272.23.14899
- Ohmori, Y., Wyner, L., Narumi, S., Armstrong, D., Stoler, M. und Hamilton, T. A. (1993). Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am J Pathol*, 142(3), 861-870.
- Oldford, S. A., Robb, J. D., Codner, D., Gadag, V., Watson, P. H. und Drover, S. (2006). Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol*, 18(11), 1591-1602. doi:10.1093/intimm/dx1092
- Ostvik, A. E., Granlund, A. V., Bugge, M., Nilsen, N. J., Torp, S. H., Waldum, H. L., et al. (2013). Enhanced expression of CXCL10 in inflammatory bowel disease: potential role of mucosal Toll-like receptor 3 stimulation. *Inflamm Bowel Dis*, 19(2), 265-274. doi:10.1002/ibd.23034
- Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 27(35), 5944-5951. doi:10.1200/jco.2008.19.6147
- Park, M. K., Amichay, D., Love, P., Wick, E., Liao, F., Grinberg, A., et al. (2002). The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. *J Immunol*, 169(3), 1433-1443. doi:10.4049/jimmunol.169.3.1433
- Patel, D. D., Zachariah, J. P. und Whichard, L. P. (2001). CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin Immunol*, 98(1), 39-45. doi:10.1006/clim.2000.4957
- Pio, R., Ajona, D., Ortiz-Espinosa, S., Mantovani, A. und Lambris, J. D. (2019). Complementing the Cancer-Immunity Cycle. *Front Immunol*, 10, 774. doi:10.3389/fimmu.2019.00774
- Pitteri, S. J., Kelly-Spratt, K. S., Gurley, K. E., Kennedy, J., Buson, T. B., Chin, A., et al. (2011). Tumor microenvironment-derived proteins dominate the plasma proteome response during breast cancer induction and progression. *Cancer Res*, 71(15), 5090-5100. doi:10.1158/0008-5472.Can-11-0568
- Polimeno, M., Napolitano, M., Costantini, S., Portella, L., Esposito, A., Capone, F., et al. (2013). Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int*, 112(5), 686-696. doi:10.1111/bju.12068
- Pondé, N., Brandão, M., El-Hachem, G., Werbrouck, E. und Piccart, M. (2018). Treatment of advanced HER2-positive breast cancer: 2018 and beyond. *Cancer Treat Rev*, 67, 10-20. doi:10.1016/j.ctrv.2018.04.016
- Pradelli, E., Karimjee-Soilihi, B., Michiels, J. F., Ricci, J. E., Millet, M. A., Vandenbos, F., et al. (2009). Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. *Int J Cancer*, 125(11), 2586-2594. doi:10.1002/ijc.24665

- Punglia, R. S., Morrow, M., Winer, E. P. und Harris, J. R. (2007). Local therapy and survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 356(23), 2399-2405. doi:10.1056/NEJMra065241
- Rainczuk, A., Rao, J. R., Gathercole, J. L., Fairweather, N. J., Chu, S., Masadah, R., et al. (2014). Evidence for the antagonistic form of CXC-motif chemokine CXCL10 in serous epithelial ovarian tumours. *Int J Cancer*, 134(3), 530-541. doi:10.1002/ijc.28393
- Ramos-Vara, J. A. und Miller, M. A. (2014). When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol*, 51(1), 42-87. doi:10.1177/0300985813505879
- Razis, E., Kalogeras, K. T., Kotsantis, I., Koliou, G. A., Manousou, K., Wirtz, R., et al. (2020). The Role of CXCL13 and CXCL9 in Early Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, 20(1), e36-e53. doi:10.1016/j.clbc.2019.08.008
- Reeves, G. K., Pirie, K., Beral, V., Green, J., Spencer, E. und Bull, D. (2007). Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *Bmj*, 335(7630), 1134. doi:10.1136/bmj.39367.495995.AE
- Robert Koch-Institut. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. In (pp. 24-89): Robert Koch-Institut.
- Romagnani, P., Beltrame, C., Annunziato, F., Lasagni, L., Luconi, M., Galli, G., et al. (1999). Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 10(12), 2518-2526.
- Rossi, D. und Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 18, 217-242. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.217
- Ruiz-Garcia, E., Scott, V., Machavoine, C., Bidart, J. M., Lacroix, L., Delalogue, S., et al. (2010). Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening. *Br J Cancer*, 102(3), 462-468. doi:10.1038/sj.bjc.6605511
- Rüschoff, J., Lebeau, A., Kreipe, H., Sinn, P., Gerharz, C. D., Koch, W., et al. (2017). Assessing HER2 testing quality in breast cancer: variables that influence HER2 positivity rate from a large, multicenter, observational study in Germany. *Mod Pathol*, 30(2), 217-226. doi:10.1038/modpathol.2016.164
- Salgado, R., Junius, S., Benoy, I., Van Dam, P., Vermeulen, P., Van Marck, E., et al. (2003). Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer*, 103(5), 642-646. doi:10.1002/ijc.10833
- Scapini, P., Morini, M., Tecchio, C., Minghelli, S., Di Carlo, E., Tanghetti, E., et al. (2004). CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *J Immunol*, 172(8), 5034-5040. doi:10.4049/jimmunol.172.8.5034
- Shen, J., Zhao, W., Ju, Z., Wang, L., Peng, Y., Labrie, M., et al. (2019). PARPi Triggers the STING-Dependent Immune Response and Enhances the Therapeutic Efficacy of Immune Checkpoint Blockade Independent of BRCAness. *Cancer Res*, 79(2), 311-319. doi:10.1158/0008-5472.Can-18-1003
- Shi, T. und Gao, G. (2022). Identify potential prognostic indicators and tumor-infiltrating immune cells in pancreatic adenocarcinoma. *Biosci Rep*, 42(2). doi:10.1042/bsr20212523
- Shiels, M. S., Katki, H. A., Hildesheim, A., Pfeiffer, R. M., Engels, E. A., Williams, M., et al. (2015). Circulating Inflammation Markers, Risk of Lung Cancer, and Utility for Risk Stratification. *J Natl Cancer Inst*, 107(10). doi:10.1093/jnci/djv199
- Shirman, Y., Lubovsky, S. und Shai, A. (2023). HER2-Low Breast Cancer: Current Landscape and Future Prospects. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 15, 605-616. doi:10.2147/bctt.S366122
- Shurin, G. V., Yurkovetsky, Z. R., Chatta, G. S., Tourkova, I. L., Shurin, M. R. und Lokshin, A. E. (2007). Dynamic alteration of soluble serum biomarkers in healthy aging. *Cytokine*, 39(2), 123-129. doi:10.1016/j.cyto.2007.06.006
- Siegel, R. L., Miller, K. D. und Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 70(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21590

- Sinn, H. P. und Kreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*, 8(2), 149-154. doi:10.1159/000350774
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905), 707-712. doi:10.1126/science.2470152
- Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., et al. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18), 10393-10398. doi:10.1073/pnas.1732912100
- Soysal, S. D., Tzankov, A. und Muenst, S. E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*, 82(3-4), 142-152. doi:10.1159/000430499
- Specht, K., Harbeck, N., Smida, J., Annecke, K., Reich, U., Naehrig, J., et al. (2009). Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 118(1), 45-56. doi:10.1007/s10549-008-0207-y
- Sreekanthreddy, P., Srinivasan, H., Kumar, D. M., Nijaguna, M. B., Sridevi, S., Vrinda, M., et al. (2010). Identification of potential serum biomarkers of glioblastoma: serum osteopontin levels correlate with poor prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(6), 1409-1422. doi:10.1158/1055-9965.Epi-09-1077
- Stenström, J., Hedenfalk, I. und Hagerling, C. (2021). Regulatory T lymphocyte infiltration in metastatic breast cancer-an independent prognostic factor that changes with tumor progression. *Breast Cancer Res*, 23(1), 27. doi:10.1186/s13058-021-01403-0
- Strieter, R. M., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., et al. (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, 270(45), 27348-27357. doi:10.1074/jbc.270.45.27348
- Struyf, S., Proost, P. und Van Damme, J. (2003). Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. *Adv Immunol*, 81, 1-44. doi:10.1016/s0065-2776(03)81001-5
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., et al. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, 13(11), 1387-1397. doi:10.7150/ijbs.21635
- Teixeira, L., Rothé, F., Ignatiadis, M. und Sotiriou, C. (2016). Breast Cancer Immunology. *Oncology Times*, 38(9), 18-19. doi:10.1097/01.COT.0000483221.52404.e3
- Thompson, S., Martínez-Burgo, B., Sepuru, K. M., Rajarathnam, K., Kirby, J. A., Sheerin, N. S., et al. (2017). Regulation of Chemokine Function: The Roles of GAG-Binding and Post-Translational Nitration. *Int J Mol Sci*, 18(8). doi:10.3390/ijms18081692
- Thor, A. D., Liu, S., Moore, D. H., 2nd und Edgerton, S. M. (1999). Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J Clin Oncol*, 17(2), 470-477. doi:10.1200/jco.1999.17.2.470
- Toiyama, Y., Fujikawa, H., Kawamura, M., Matsushita, K., Saigusa, S., Tanaka, K., et al. (2012). Evaluation of CXCL10 as a novel serum marker for predicting liver metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Int J Oncol*, 40(2), 560-566. doi:10.3892/ijo.2011.1247
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., et al. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, 63, 40-47. doi:10.1016/j.ctrv.2017.11.007
- Tsubaki, T., Takegawa, S., Hanamoto, H., Arita, N., Kamogawa, J., Yamamoto, H., et al. (2005). Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9

- by synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 141(2), 363-371. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02850.x
- Tymoszuk, P., Charoentong, P., Hackl, H., Spilka, R., Müller-Holzner, E., Trajanoski, Z., et al. (2014). High STAT1 mRNA levels but not its tyrosine phosphorylation are associated with macrophage infiltration and bad prognosis in breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 257. doi:10.1186/1471-2407-14-257
- Uguccioni, M., Gionchetti, P., Robbiani, D. F., Rizzello, F., Peruzzo, S., Campieri, M., et al. (1999). Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol*, 155(2), 331-336. doi:10.1016/s0002-9440(10)65128-0
- Untch, M., Jackisch, C., Thomssen, C., Nitz, U., Von Minckwitz, G. und Kaufmann, M. (2006). Adjuvant treatment with the humanized monoclonal antibody trastuzumab in patients with early breast cancer. *Deutsches Arzteblatt*, 103(50), A3406-3410.
- Van Raemdonck, K., Van den Steen, P. E., Liekens, S., Van Damme, J. und Struyf, S. (2015). CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(3), 311-327. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.11.009
- Vandercappellen, J., Van Damme, J. und Struyf, S. (2008). The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*, 267(2), 226-244. doi:10.1016/j.canlet.2008.04.050
- Vanguri, P. und Farber, J. M. (1990). Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine. *J Biol Chem*, 265(25), 15049-15057.
- Walser, T. C., Ma, X., Kundu, N., Dorsey, R., Goloubeva, O. und Fulton, A. M. (2007). Immune-mediated modulation of breast cancer growth and metastasis by the chemokine Mig (CXCL9) in a murine model. *J Immunother*, 30(5), 490-498. doi:10.1097/CJI.0b013e318031b551
- Walser, T. C., Rifat, S., Ma, X., Kundu, N., Ward, C., Goloubeva, O., et al. (2006). Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 66(15), 7701-7707. doi:10.1158/0008-5472.Can-06-0709
- Wendel, M., Galani, I. E., Suri-Payer, E. und Cerwenka, A. (2008). Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Res*, 68(20), 8437-8445. doi:10.1158/0008-5472.Can-08-1440
- Windmuller, C., Zech, D., Avril, S., Boxberg, M., Dawidek, T., Schmalfeldt, B., et al. (2017). CXCR3 mediates ascites-directed tumor cell migration and predicts poor outcome in ovarian cancer patients. *Oncogenesis*, 6(5), e331. doi:10.1038/oncsis.2017.29
- Winter, D., Moser, J., Kriehuber, E., Wiesner, C., Knobler, R., Trautinger, F., et al. (2007). Down-modulation of CXCR3 surface expression and function in CD8+ T cells from cutaneous T cell lymphoma patients. *J Immunol*, 179(6), 4272-4282. doi:10.4049/jimmunol.179.6.4272
- Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., et al. (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 31(31), 3997-4013. doi:10.1200/jco.2013.50.9984
- Wörmann, B., Aebi, S., Balic, M., Decker, T., Fehm, T., Greil, R., et al. (2018). Onkopedia Leitlinie: Mammakarzinom der Frau, <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.html> (abgerufen am: 24.02.2022)
- Wu, X., Sun, A., Yu, W., Hong, C. und Liu, Z. (2020). CXCL10 mediates breast cancer tamoxifen resistance and promotes estrogen-dependent and independent proliferation. *Mol Cell Endocrinol*, 512, 110866. doi:10.1016/j.mce.2020.110866
- Yan, X. J., Dozmorov, I., Li, W., Yancopoulos, S., Sison, C., Centola, M., et al. (2011). Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 118(19), 5201-5210. doi:10.1182/blood-2011-03-342436

- Yang, X., Chu, Y., Wang, Y., Zhang, R. und Xiong, S. (2006). Targeted in vivo expression of IFN-gamma-inducible protein 10 induces specific antitumor activity. *J Leukoc Biol*, 80(6), 1434-1444. doi:10.1189/jlb.0306212
- Youngs, S. J., Ali, S. A., Taub, D. D. und Rees, R. C. (1997). Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 71(2), 257-266. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19970410)71:2<257::aid-ijc22>3.0.co;2-d
- Zander, H., Müller-Egert, S., Zwiewka, M., Groß, S., van Zandbergen, G. und Engelbergs, J. (2020). [Checkpoint inhibitors for cancer therapy]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 63(11), 1322-1330. doi:10.1007/s00103-020-03221-9
- Zeng, J., Xie, K., Wu, H., Zhang, B. und Huang, C. (2012). Identification and functional study of cytokines and chemokines involved in tumorigenesis. *Comb Chem High Throughput Screen*, 15(3), 276-285. doi:10.2174/138620712799218608
- Zhang, J., Dong, D., Wei, Q. und Ren, L. (2022). CXCL10 serves as a potential serum biomarker complementing SCC-Ag for diagnosing cervical squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 22(1), 1052. doi:10.1186/s12885-022-10142-0
- Zhi, W., Ferris, D., Sharma, A., Purohit, S., Santos, C., He, M., et al. (2014). Twelve serum proteins progressively increase with disease stage in squamous cell cervical cancer patients. *Int J Gynecol Cancer*, 24(6), 1085-1092. doi:10.1097/igc.0000000000000153
- Zlotnik, A. und Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2), 121-127. doi:10.1016/s1074-7613(00)80165-x
- Zlotnik, A. und Yoshie, O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36(5), 705-716. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.008
- Zuckerman, N. S., Yu, H., Simons, D. L., Bhattacharya, N., Carcamo-Cavazos, V., Yan, N., et al. (2013). Altered local and systemic immune profiles underlie lymph node metastasis in breast cancer patients. *Int J Cancer*, 132(11), 2537-2547. doi:10.1002/ijc.27933

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Holger Bronger bedanken, der mich während meiner gesamten Promotionslaufbahn stets unterstützt hat. Danke für dein Vertrauen.

Vielen Dank an Dr. med. Lukas Rief für die Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit, an der Chemokin 1-Studie mitzuwirken.

Ich danke meinem Mentor Prof. Dr. rer. nat. Viktor Magdolen für die guten Anregungen, Verbesserungsvorschläge und die Begleitung über die Jahre.

Mein Dank gilt außerdem der gesamten AG Bronger sowie den Mitarbeiter*innen der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik für das tolle Arbeitsklima im Labor sowie die zahlreichen Hilfestellungen. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Tobias Dreyer bedanken für seine Geduld, Motivation, tollen Ideen und ständige Hilfsbereitschaft sowie bei Christoph Stange für die sorgfältige Einarbeitung ins Labor und die stete Versorgung mit Kaffee und Keksen. Danke an Anke Bengel für die zahlreichen Tipps und Tricks zu den verschiedenen Labormethoden.

Ich möchte mich zudem bei meinem Mann Martin bedanken, der durch seine Exzellenzfähigkeiten und klugen Einwände erheblich zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen hat.

Auch meiner Familie möchte ich einen großen Dank aussprechen für die Unterstützung in den Jahren meiner Promotion.

Danke auch an Julia und Laura für die gemeinsame Schreibzeit und Motivation.