

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün**

**Immunhistologische Analyse der Effekte einer Kombinationstherapie im
Brustkrebsmodell: Inhibition der Kollagensynthese durch PLOD-2-Blockade und
Inhibierung des PD-1/PD-L1 Checkpoints**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Theresa Ruf
aus Kollnau**

Würzburg, September 2022

Referent: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Ko-Referentin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2023

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Brustkrebs.....	1
1.2	Tumormikroumgebung	2
1.3	EZM-Destabilisierung.....	4
1.3.1	Minoxidil.....	4
1.4	Immuntherapeutika	5
1.4.1	Der PD-1 Signalweg	6
1.4.2	BMS-1166.....	9
2	Aufgabestellung und Zielsetzung.....	10
3	Material und Methoden	12
3.1	Verwendete Materialien	12
3.1.1	Chemikalien.....	12
3.1.2	Kits	13
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	13
3.1.4	Färbelösungen.....	14
3.1.5	Software	15
3.1.6	Geräte und Hilfsmittel	15
3.2	Ethik- und Tierversuchsvotum.....	16
3.3	Versuchstiere.....	16
3.4	Vorbereitung des Tumorgewebes	17
3.5	Färbungen	18
3.5.1	Histologische Färbungen	18
3.5.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	18
3.5.1.2	Pikro-Siriusrot-Färbung.....	18
3.5.2	Immunhistochemische Färbungen	19
3.5.2.1	Antikörper	19
3.5.2.2	Prinzip.....	20
3.5.2.3	Diaminobenzidin-Färbung	20
3.5.2.4	Immunfluoreszenz.....	22
3.6	Mikroskopie.....	25
3.6.1	Keyence BZ-9000	25
3.6.2	Konfokales Mikroskop Nikon Eclipse Ti-AI	25
3.7	Bildverarbeitung und Auswertung	26
3.7.1	Auswertung der H.E.-Färbung.....	26

3.7.1.1	Tumore	26
3.7.1.2	Lungen.....	27
3.7.2	Auswertung der PSR-Färbung	27
3.7.2.1	Tumore	27
3.7.2.2	Lungen.....	28
3.7.3	Auswertung der DAB-Färbung mit CD31-Antikörper	28
3.7.4	Auswertung der DAB-Färbung mit Ki67-Antikörper	28
3.7.5	Auswertung der IF-Färbung mit CD31- und F4/80-Antikörper	29
3.7.6	Auswertung der IF-Färbung mit CD4- und CD8-Antikörper	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Auswertung von Tumornekrosen anhand der H.E.-Färbung.....	32
4.2	Auswertung des kollagenen Netzwerks anhand der PSR-Färbung	35
4.3	Auswertung der Tumovaskularisierung mit Anti-CD31-Antikörper	39
4.4	Auswertung der Zellteilungsaktivität mit Anti-Ki67-Antikörper.....	42
4.5	Auswertung der Makrophagendichte mit Anti-F4/80-Antikörper.....	45
4.6	Auswertung der Anzahl an CD4- und CD8-positiven Zellen	49
4.7	Auswertung von Lungenmetastasen	53
5	Diskussion	57
6	Zusammenfassung.....	63
7	Literaturverzeichnis	64
	Appendix.....	71
I	Abkürzungsverzeichnis.....	
II	Abbildungsverzeichnis.....	
III	Tabellenverzeichnis.....	
IV	Danksagung	
V	Lebenslauf.....	

1 Einleitung

Im Jahr 2020 gab es der *International Agency for Research on Cancer* zufolge weltweit rund 19,3 Millionen neue Krebserkrankungen (International Agency for Research on Cancer, 2020a). Dabei ist Brustkrebs bei den Frauen mit knapp 25 % die mit Abstand am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung (International Agency for Research on Cancer, 2020b). Dank intensiver medizinischer Forschung ist eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 88 % für den Zeitraum 2017 bis 2018 bei europäischen Frauen zu verzeichnen (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Dennoch liegt aktuell die Mortalität der von Brustkrebs betroffenen Frauen bei etwa 30 % (International Agency for Research on Cancer, 2020a), dies verdeutlicht den Bedarf an alternativen Behandlungsmethoden für Brustkrebspatientinnen. Dabei öffnet die Immuntherapie für die Behandlung von Brustkrebs neue Türen (Simonian et al., 2021). Die Aufnahme der Wirkstoffe in den Brusttumor stellt allerdings noch eine Herausforderung dar, die es zu optimieren gilt. Davon abhängig ist dementsprechend die Effektivität der Behandlung. Die nachfolgende Arbeit soll Aufschluss darüber geben, wie eine solche Optimierung aussehen könnte.

1.1 Brustkrebs

Die weibliche Brust besteht aus viel exokrinem Drüsengewebe mit Ausführungsgängen und Fett, sowie lockerem Bindegewebe mit Arterien, Venen, Nerven und Lymphgefäßen (Jesinger, 2014). Im Gegensatz zu Krebs beschreibt das lateinische Wort „Tumor“ lediglich den Zustand der Schwellung und unterscheidet nicht in gut- oder bösartig. „Krebs“ ist ein umgangssprachlich verwendeter Begriff. Von Krebs spricht man, wenn sich Zellen durch Genommutationen unkontrolliert teilen und so vermehren können. Dadurch entstehen maligne Neoplasien, bösartige Neubildungen, mit aggressivem Wachstum und Ausbreitungstendenz. Ausgangspunkt der Brustkrebserkrankung kann jede Zelle des Brustgewebes sein. Am häufigsten ist jedoch das Epithel der Ausführungsgänge betroffen. Wenn Epithel den Ursprung darstellt, ist von einem Karzinom die Rede. Das Karzinom der Brust (lat. *mamma*) wird als Mammakarzinom bezeichnet. Die Karzinome können dabei invasiv infiltrierend, metastasierend oder nicht-invasive Krebsvorstufen, sogenannte *carcinoma in situ*, sein (Miller, 2016). Es gibt mehrere Risikofaktoren, die die Entstehung von Brustkrebs begünstigen können. Neben

genetischen und hormonellen Ursachen werden auch Lifestyle Faktoren wie Rauchen, Alkohol und Übergewicht als mögliche Ursachen diskutiert (Rojas & Stuckey, 2016). Brustkrebs kann histologisch je nach Expression verschiedener Rezeptoren in mehrere Subtypen eingeteilt werden. Von Bedeutung für die Klassifizierung sind hierbei vor allem die Hormonrezeptoren von Estrogen und Progesteron sowie der *human epidermal growth factor receptor 2* (Perou et al., 2000). Weist der Tumor keinen dieser Rezeptoren auf, spricht man vom dreifach-negativen Brustkrebs (engl. *triple negative breast cancer*, TNBC). Brusttumore können metastasieren. Dabei wandern Tumorzellen aus dem Primärtumor aus und bilden räumlich getrennt davon neue kleine Tumorherde in anderen Teilen des Körpers. Sie metastasieren hämatogen und lymphogen (Scully et al., 2012) und bilden neben Gehirn-, Lungen- und Lebermetastasen vorrangig Knochenmetastasen (Xiong et al., 2018).

Grundsätzlich wird die Therapie aus den Säulen der Krebstherapie individuell zusammengestellt: operative Tumoresektion, Bestrahlung, neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie, endokrine Therapie und Antikörpertherapie (*Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*, 2021). Jedoch bereitet die charakteristische Tumormikroumgebung (engl. *tumormicroenvironment*, TME) sowohl bei Chemo- als auch bei Immuntherapeutika Schwierigkeiten. Sie hat negativen Einfluss auf die Effektivität der Therapie und ist an der Entwicklung von Resistenzmechanismen beteiligt (Henke et al., 2019).

1.2 Tumormikroumgebung

Die TME bezeichnet Tumorkomponenten, die die entarteten Tumorzellen umgeben. So sind Gefäßsystem, Bindegewebe und die extrazelluläre Matrix (EZM) Teil der TME, genauso wie Immunzellen, die in den Tumor infiltrieren (Henke et al., 2019).

Bei Brustkrebs ist sowohl in der Brustdrüse als auch im Tumor-angrenzenden Stroma eine Versteifung festzustellen, da fibrilläres Kollagen verstärkt gebildet wird und mehr kollagene Quervernetzungen nachgewiesen werden können. Dieser Vorgang wird als Desmoplasie bezeichnet. Außerdem zeigt sich Tumor-angrenzend mit zunehmender Malignität eine Linearisierung der Kollagenfibrillen (Acerbi et al., 2015; Levental et al., 2009). Durch die Quervernetzung und die zunehmende Versteifung des Gewebes, welche sich vor allem sehr stark in der invasiven Front abzeichnet (Acerbi et al., 2015), können fokale Adhäsionen zwischen Tumorzellen und der EZM und schließlich auch die Tumorzellinvasion begünstigt werden (Levental et al., 2009). Diese Veränderungen in

der TME haben zur Folge, dass sich der Tumor vom Umgebungsgewebe abgrenzt und sich eine Barriere bildet, die Medikamente aber auch Sauerstoff und andere Metaboliten davon abhält in den Tumor zu diffundieren. Auch Immunzellen, werden durch diese starre Verkapselung abgelenkt und somit an der Invasion in den Tumor gestört. Durch die Diffusionsbarriere kommt es im Tumor zur Hypoxie und zum metabolischen Stress (Henke et al., 2019).

Unter hypoxischen Bedingungen wird der *hypoxia-inducible factor 1* stabilisiert (HIF-1). HIF-1 induziert unter anderem die Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) und *transforming growth factor β* (TGF- β) (Pezzuto & Carico, 2018; Selnø et al., 2020). MMPs bauen die EZM um und können das Fortschreiten des Tumorwachstums begünstigen, dabei können sie sowohl pro- als auch anti-angiogen wirken (Chang & Werb, 2001). Dafür spricht auch, dass bei Brustkrebs eine Überexpression von MMP-9 vor allem bei Tumoren mit Lymphknotenbefall und bei großen Tumoren zu beobachten ist (Thammineni et al., 2019). VEGF und TGF- β sind im Brustkrebs ebenfalls überexprimiert (Linardou et al., 2012; Sun et al., 2018). Beide Wachstumsfaktoren wirken immunsuppressiv und unterdrücken die Funktion von cytotoxischen T-Zellen (Gavalas et al., 2012; Thomas & Massagué, 2005). Auch Makrophagen, die sich vorrangig in den invasiven Regionen ansammeln, können TGF- β sezernieren (Acerbi et al., 2015; Zhu et al., 2017). Außerdem bleiben negativ regulatorische CD8-positive T-Zellen durch TGF- β in ihrer immunsuppressiven Funktion länger erhalten (Mishra et al., 2021). Unter Einfluss von VEGF A exprimieren aktivierte CD8-positive T-Zellen verstärkt inhibitorische Rezeptoren wie den *programmed cell death receptor 1* (PD-1) (Voron et al., 2015). Außerdem zeigen Brusttumore eine höhere VEGF A-assoziierte Expression des entsprechenden Liganden *programmed death ligand 1* (PD-L1) (Fujii et al., 2020). VEGF A wirkt aber nicht nur über inhibitorische Rezeptoren immunsuppressiv, er kann auch direkt auf negativ regulierende T-Zellen Einfluss nehmen und diese zur verstärkten Proliferation anregen (Terme et al., 2013). Durch VEGF wird zudem das Auswandern von Immunzellen aus Blutgefäßen erschwert, indem die entzündungsbedingte Hochregulierung von endothelialen Adhäsionsmolekülen verhindert wird (Griffioen et al., 1996).

Immunzellen, die in den Tumor infiltrieren haben einen positiven Einfluss auf die Therapie. Viele sogenannte Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs), die sich vor allem im Stroma ansammeln, werden im Rahmen einer Chemotherapie bei Brustkrebs mit einem höheren Therapieansprechen in Verbindung gebracht und sind somit Indikator für eine hohe Überlebensrate (Adams et al., 2014; Denkert et al., 2010). Allerdings kann die

TILs-vermittelte und gegen den Tumor gerichtete Immunantwort eingeschränkt sein. Im Gegensatz zu im Blut zirkulierenden T-Zellen und T-Zell-Infiltraten, die keiner malignen Ursache entspringen, weisen TILs eine erhöhte Expression des immunsuppressiven PD-1 auf. Als Auslöser für diese Hochregulierung von PD-1 wird dabei die TME angesehen (Ahmadzadeh et al., 2009).

Insgesamt ist die TME an vielerlei Mechanismen beteiligt, die den Tumor vor Zerstörung durch Immunsystem und Medikamenten schützen und ist damit von großer therapeutischer Bedeutung.

1.3 EZM-Destabilisierung

Eine Kombination von Chemotherapie und Destabilisierung der EZM hat sich bei Brustkrebs in Vorgängerarbeiten der Arbeitsgruppe bereits als gewinnbringend erwiesen. Das Ansprechen auf die Chemotherapie konnte durch Inhibierung der Lysyl-Oxidase (LOX), welche kollagene Quervernetzungen in der EZM bewirkt, deutlich gesteigert und das Tumorwachstum im 4T1-Brustkrebsmodell reduziert werden. Allerdings führt die EZM Destabilisierung auch gleichzeitig zur verbesserten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors. Bei unterversorgten Tumoren kann sich die EZM-Destabilisierung also auch positiv auf das Wachstum auswirken, was die Bedeutung der Kombinationstherapie hervorhebt (Rossow et al., 2018). Der LOX-Inhibitor beta-Aminopropionitril löst in mehreren Tierversuchen schwere Nebenwirkungen wie Aortenaneurysmen aus (Barrow et al., 1974). Zur EZM-Destabilisierung wird in dieser Arbeit das Medikament Minoxidil eingesetzt, welches auch auf die Kollagensynthese wirkt und im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird.

1.3.1 Minoxidil

Minoxidil ist ein Medikament, welches bereits klinisch erprobt und untersucht ist. Schon in den 70er Jahren wurde es zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt. Des Weiteren findet Minoxidil seit etwa 20 Jahren auch Gebrauch bei der Behandlung von androgenetischer Alopezie (Suchonwanit et al., 2019). Minoxidil und seine Effekte in der Tumorthherapie werden immer weiter erforscht. Minoxidil wirkt inhibitorisch auf das Gen PLOD-2 (engl. *procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2*) (Du et al., 2017). PLOD-2 kodiert für die Lysyl-Hydroxylase 2, welche in Prokollagen Lysin-Reste im Bereich des terminalen Telopeptids hydroxyliert. Dadurch entstehen stabilere Bindungen bei der Quervernetzung von Kollagen. In hydroxylierter Form sind die Lysin-Reste zudem

geschützt vor einer möglichen Zersetzung durch MMPs und der Tumor wird insgesamt fester (Gilkes et al., 2013). Minoxidil hat keinen Einfluss auf die Gesamtzahl der Kollagenquervernetzungen. Allerdings bewirkt die Blockierung von PLOD-2 eine Verschiebung des Verhältnisses von Hydroxylysyl-Pyridinolen hin zu nicht-hydroxylierten Lysyl-Pyridinolen. Nach Minoxidil-Behandlung werden signifikant weniger Hydroxylysyl-Pyridinole, und dadurch weniger stabile kollagene Quervernetzungen beobachtet (Zuurmond et al., 2005).

Bei Brusttumoren, sowie auch bei vielen anderen Tumoren, ist PLOD-2 im Vergleich zum entsprechenden gesunden Gewebe signifikant überexprimiert. Ein wesentlicher Faktor hierbei ist, dass durch die verstärkte Proliferation von Tumorzellen vermehrt Sauerstoff verbraucht wird und es im Tumor zur Hypoxie kommt. Durch HIF-1, beziehungsweise der sauerstoffabhängigen HIF-1 α -Untereinheit wird beispielsweise die Expression von PLOD-2 etwa vierfach verstärkt. Diese Überexpression geht einher mit einer signifikant gesteigerten Mortalität. Außerdem fördert PLOD-2 die Invasion von Tumorzellen in gesundes Gewebe und die pulmonale sowie lymphogene Metastasierung. Deshalb ist die Expression von PLOD-2 bei Brustkrebs als wichtiger spezifischer Prognosefaktor zu werten. Auf das Wachstum des Primärtumors scheint PLOD-2 jedoch keinen Einfluss zu haben (Gilkes et al., 2013).

1.4 Immuntherapeutika

Immuntherapeutika wirken auf das Immunsystem und sind Sammelbegriff für verschiedene Behandlungsformen. Dabei gewinnen sogenannte Immun-Checkpoint-Inhibitoren immer mehr an Bedeutung. Der Begriff Immun-Checkpoint beschreibt den Komplex aus Rezeptor und seinem entsprechenden Liganden, welcher die körpereigene Immunantwort reguliert. Dadurch wird das Gewebe während der Immunreaktion vor Beschädigungen bewahrt und zugleich die Eigentoleranz gefördert (Pardoll, 2012). Im Jahr 2018 erhielten James P. Allison und Tasuku Honjo für ihre Arbeiten an Immun-Checkpoint-Inhibitoren den Nobelpreis. Sie entdeckten und etablierten die Anti-Tumor-Therapie, bei der die negativ regulierenden Immun-Checkpoints *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* und PD-1 mit Antikörpern inhibiert werden (Guo, 2018). Tumore wie das Lungenzellkarzinom, das maligne Melanom, das Plattenepithelkarzinom der Haut und das Merkelzellkarzinom zeigen nicht nur hohe Ansprechraten auf die Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren, sondern auch langfristig gute Erfolge. Die Monotherapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren bei Brustkrebs ist hingegen weniger effektiv (Schardt, 2020). Mammakarzinome verfügen über nur wenige Neoantigene und

TILs und gelten somit als wenig immunogen (Simonian et al., 2021). Allerdings haben sich Immuntherapeutika, speziell die Inhibitoren des PD-1 Signalweges, in Kombination mit anderen Therapien vor allem bei TNBC als vorteilhaft erwiesen (Zhao & Huang, 2020).

1.4.1 Der PD-1 Signalweg

PD-1 wirkt negativ regulatorisch auf das Immunsystem (Chemnitz et al., 2004; Latchman et al., 2001) und wird von aktivierten T- und B-Zellen verstärkt exprimiert (Agata et al., 1996; Cheng et al., 2013; Yamazaki et al., 2002). Inaktiven humanen T-Zellen konnte hingegen keine Expression von PD-1 nachgewiesen werden (Cheng et al., 2013). Das PD-1-Protein lässt sich in eine zytoplasmatische, transmembrane und eine große extrazelluläre Domäne einteilen. Letztere kann in seiner Struktur den Immunglobulinen (Ig) zugeordnet werden und bildet die IgV-Domäne des Rezeptors (Ishida et al., 1992). An den PD-1 binden zwei Liganden: der *programmed cell death ligand 1* und 2 (PD-L1 und PD-L2). PD-L1 ist ähnlich wie PD-1 aufgebaut, beinhaltet allerdings sowohl eine extrazelluläre IgV- als auch eine IgC-Domäne (Latchman et al., 2001). PD-L1 und PD-L2 werden von T-Zellen, antigenpräsentierenden Zellen und verschiedenen Geweben wie Plazenta, Milz und Thymus exprimiert (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001; Yamazaki et al., 2002). Durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors (engl. *t-cell receptor*, TCR) mit dem *major histocompatibility complex* (MHC) und durch CD28-Ko-Stimulierung wird die T-Zelle aktiviert (Chen & Flies, 2013). Die aktivierte T-Zelle exprimiert PD-1 auf der Zelloberfläche und bindet seinen Liganden über die IgV-Domäne in einem 1:1 Komplex (Latchman et al., 2001; Lin et al., 2008). An der zytoplasmatischen Domäne von PD-1 ist das *immunoreceptor tyrosine-based switch motif* zu finden, an welches die Phosphatase *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2* (SHP-2) binden kann. Bei gebundenem Liganden kann PD-1 so über seine SHP-2 die T-Zell-Aktivierung blockieren (Chemnitz et al., 2004). Ohne CD28-Ko-Stimulierung werden die TCR-vermittelten Signalwege und damit die Zytokinproduktion und T-Zell-Proliferation effektiv inhibiert (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). Dabei wird unter anderem die Hochregulierung von Interleukin-2 und des antiapoptotischen Gens Bcl-xL verhindert (Chemnitz et al., 2004) und der Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase-B (PKB) -Signalweg blockiert (Parry et al., 2005). Der Signalweg über PD-1/PD-L1 ist dabei effektiver als von PD-1/PD-L2 (Cheng et al., 2013; Latchman et al., 2001). Insgesamt kommt es zum verstärkten Arrest des Zell-Zyklus der PD-1-exprimierenden Immunzelle in der G0/G1-Phase und laut *Latchman et al.* nicht zur verstärkten Apoptose (Latchman

et al., 2001). Eine neuere Studie aus dem Jahr 2012 von *Gibbons et al.* zeigt allerdings, dass CD8-positive Zellen unter Einfluss von PD-1L doch vermehrt der Apoptose unterliegen. Die Erklärung hierfür ist die Blockierung der PKB, die zur Hochregulation des proapoptotischen Gens Bim führt (Gibbons et al., 2012). Außerdem wird die Apoptose auch durch den Zell-Zyklus Arrest in der G0/G1-Phase induziert (Liu et al., 2020). Diesen Mechanismus nutzen Tumore aus, die auf ihrer Zelloberfläche ebenfalls PD-L1 exprimieren. Dazu zählen unter anderem das Melanom, das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, das Ovarialkarzinom, das Thymom und das Mammakarzinom (Patel & Kurzrock, 2015). Auf diesem Weg können sie sich durch die Interaktion mit PD-1 dem Immunsystem entziehen. Außerdem wird auch die Hochregulierung von PD-1 auf TILs intensiviert. TGF- β 1 liegt in der TME verstärkt vor und bewirkt bei aktivierten T-Zellen über Smad3 die verstärkte Expression von PD-1 (Park et al., 2016). Der PD-1 Signalweg ist in der Abbildung 1 zum besseren Verständnis schematisch dargestellt. Im Vergleich zu gesundem Brustgewebe weisen Brusttumore insgesamt in 20 % und der TNBC sogar in 38 % der Fälle eine Hochregulation von PD-L1 auf. Dabei war die Expression von PD-L1 mit einer hohen T-Zell-Infiltration und schlechten klinisch-pathologischen Prognosemarkern verbunden. Unabhängig davon, zeigte der TNBC aber besseres Metastasen-freies und gesamtspezifisches Überleben (Sabatier et al., 2015). Somit deutet die verstärkte Expression von PD-L1 bei Brusttumoren auf ein besseres klinisches Therapieergebnis hin (Uhercik et al., 2017). Im Gegensatz zu Brusttumoren wird dieses Ergebnis bei anderen PD-L1-exprimierenden Tumoren nicht beobachtet (Wang et al., 2016).

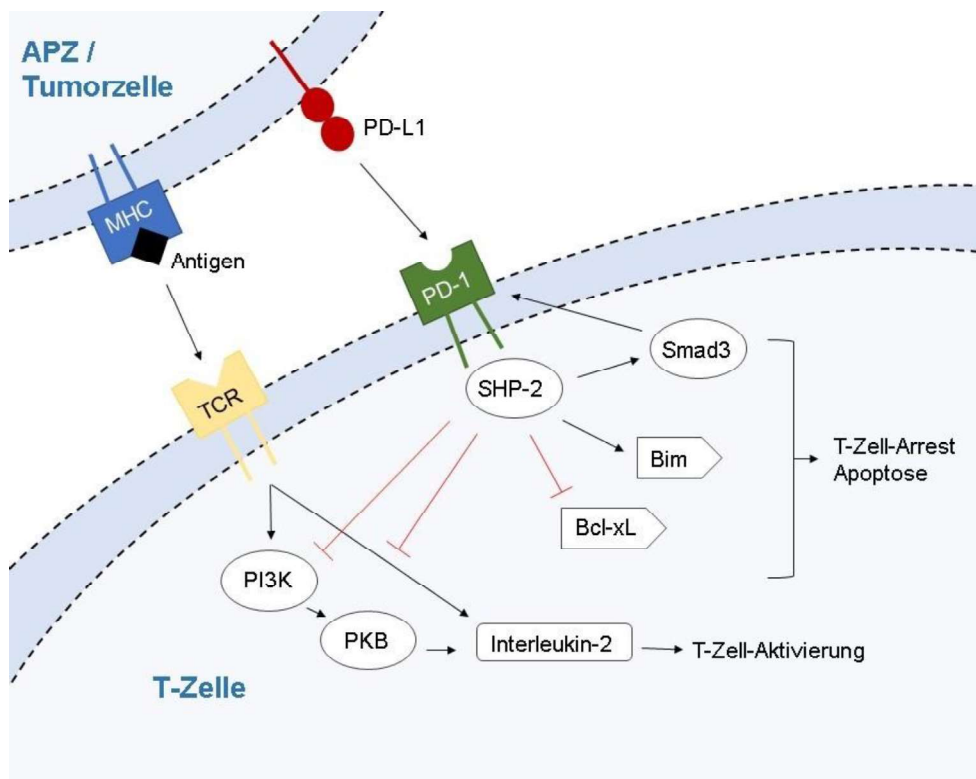


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des PD-1 Signalwegs.

Die über die MHC/TCR-Interaktion aktivierte T-Zelle exprimiert PD-1 auf ihrer Zelloberfläche. Die Bindung von PD-L1 an PD-1 hemmt über die SHP-2 die T-Zell-Aktivierung und führt zum T-Zell-Arrest und zur Apoptose der T-Zelle. Durch Smad3 wird zudem die Hochregulierung von PD-1 vermittelt. Abbildung zusammengestellt aus: (Agata et al., 1996; Chemnitz et al., 2004; Chen & Flies, 2013; Gibbons et al., 2012; Latchman et al., 2001; Park et al., 2016; Parry et al., 2005; Patel & Kurzrock, 2015). APZ: antigenpräsentierende Zelle; MHC: major histocompatibility complex; TCR: t-cell-rezeptor; PD-L1: programmed cell death ligand 1; PD-1: programmed cell death receptor1; SHP-2: Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PKB: Proteinkinase-B; (X): Blockierung.

1.4.2 BMS-1166

Die Bristol-Myers Squibb (BMS) entwickelte die ersten niedermolekularen Verbindungen, die den PD-1/PD-L1-Signalweg inhibieren (Chupak et al., 2015; Chupak & Zheng, 2015; Guzik et al., 2017). Die BMS-Moleküle verhindern effektiv die PD-1/PD-L1-Interaktion beim Menschen. BMS-1166 bindet an humanes PD-L1. Von großer Bedeutung ist dabei das aromatische Ringsystem. Es bildet sich ein Dimer aus zwei PD-L1-Molekülen in dessen Mitte ein BMS-Molekül die PD-1-Bindestellen an den IgV-Domänen von beiden PD-L1-Molekülen blockiert (Mejías & Guirola, 2019; Skalniak et al., 2017). Die Benzodioxin-Gruppe von BMS-1166 induziert dabei die Tyrosin-56-Seitenkettenbewegung von PD-L1 und es bildet sich ein hydrophober Tunnel (Guzik et al., 2017), was in Abbildung 2 dargestellt ist. BMS-1166 inhibiert nicht nur membranständiges PD-L1 sondern auch lösliches PD-L1 im Blutserum und kann somit von wichtiger therapeutischer Bedeutung sein. Im Vergleich zu zugelassenen PD-1/PD-L1-Antikörpern sind die BMS-Moleküle weniger effektiv. Die Wirkung von BMS-1166 ist dosisabhängig. BMS-1166 kann jedoch in ausreichend hoher Konzentration verabreicht werden, da die Toxizität von BMS-1166 gering ist (Skalniak et al., 2017). Die niedermolekularen BMS-Moleküle haben gegenüber Antikörpern mehrere Vorteile: sie sind stabiler und günstiger in der Herstellung, penetrieren leichter ins Zielgewebe, können oral verabreicht werden und unerwünschte Immunreaktionen reduzieren (Zhan et al., 2016).

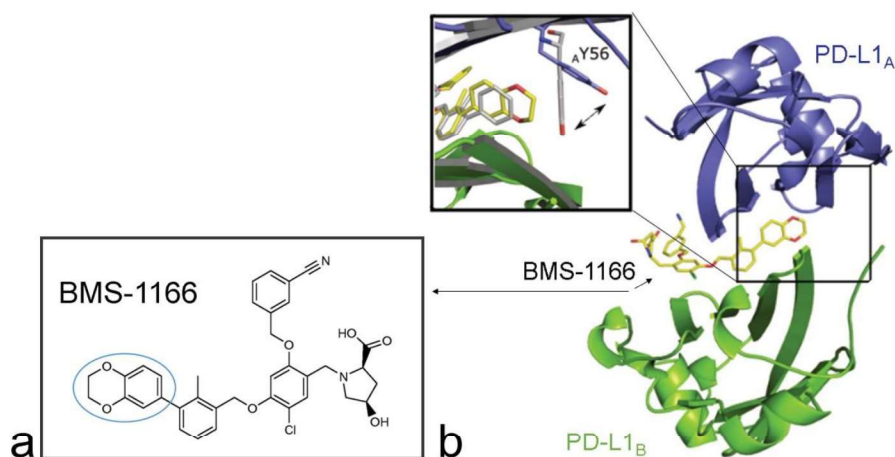


Abbildung 2: BMS-1166.

(a) Strukturformel von BMS-1166. Die Benzodioxin-Gruppe ist blau markiert (modifiziert nach (Chupak et al., 2015)). BMS: Bristol-Myers Squibb. (b) Durch BMS-1166 hervorgerufene Dimerisierung zweier PD-L1-Moleküle A und B. Das gelbe BMS-1166-Molekül ist hierbei verantwortlich für die Tyrosin-56-Seitenkettenbewegung. Zum Vergleich ist ein graues BMS-8-Molekül abgebildet, welches keine Seitenkettenverschiebung bewirkt (modifiziert nach (Skalniak et al., 2017)). BMS: Bristol-Myers Squibb; PD-L1_{A/B}: programmed cell death ligand 1 Molekül A/B; A_{Y56}: Tyrosin-56-Seitenkette des Moleküls PD-L1_A.

2 Aufgabestellung und Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Wirkung des PLOD-2-Inhibitors Minoxidil in Kombination mit dem PD-L1-Inhibitor BMS-1166 auf Brustkrebs untersucht werden. Dazu werden Versuche im murinen AT3-Brustkrebsmodell durchgeführt. Es soll aufgezeigt werden, wie sich die Medikamente jeweils einzeln und dann in Kombination auf den Tumor auswirken. Der Arbeitsgruppe um Dr. E. Henke liegen bereits Daten zur Tumorgroße und -gewicht der unterschiedlichen Behandlungsgruppen vor, welche in Abbildung 3 dargestellt sind. Dabei ist ein signifikant geringeres Tumorgewicht bei den Tumoren der Kombinationstherapie im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen festzustellen. Außerdem sind sie auch signifikant kleiner als die Kontrolltumore.

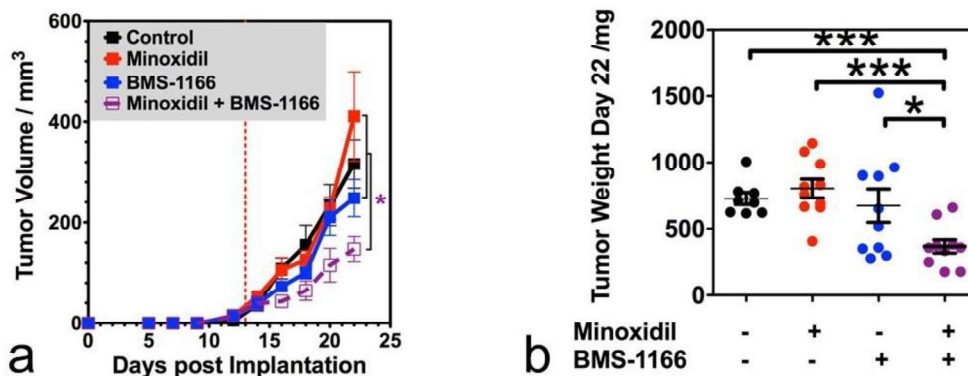


Abbildung 3: Aktueller Kenntnisstand der Arbeitsgruppe um Dr. E. Henke zum Einfluss der Medikamente Minoxidil, BMS-1166 und deren Kombination auf das Tumorstadium.

(a) zeitliche Entwicklung der Tumorgroße in mm³ nach Implantation der AT3-Tumorzellen. Der Behandlungsstart erfolgte an Tag 13 und endete an Tag 20. Die Tumorentnahme wurde an Tag 22 durchgeführt; (b) Tumorgewicht in mg am Tag der Tumorentnahme (Tag 22). BMS: Bristol-Myers Squibb; (*): signifikanter Unterschied auf Basis eines Signifikanzniveaus von 5 % (Wahrscheinlichkeit (p) <0,05); (**): signifikanter Unterschied auf Basis eines Signifikanzniveaus von 5 % (Wahrscheinlichkeit (p) <0,001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden histologische und immunhistologische Färbungen an fixierten murinen AT3-Tumorgewebeschnitten durchgeführt und anschließend anhand von Mikroskopaufnahmen quantitativ ausgewertet. Dabei ist von besonderem Interesse, welche Unterschiede sich bezüglich Nekrosen, Kollagenablagerungen, der Tumorzellproliferation, der Tumovaskularisierung und der Infiltration mit Immunzellen abzeichnen. Die Arbeit soll Aufschluss darüber geben, ob durch Auflockerung der EZM mit Minoxidil eine verbesserte Penetration des Immuntherapeutikums in das Tumorzentrum, und damit eine Wirkungssteigerung, erreicht werden kann. Denn nur wenn das Medikament die Tumorzellen in ausreichender Dosis erreicht, kann es effektiv

seine Wirkung entfalten. Kombinationstherapien haben sich gegenüber der Monotherapien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren als vorteilhaft erwiesen (Keenan & Tolaney, 2020). Ein weiterer Vorteil einer funktionierenden Kombinationstherapie ist, dass aufgrund der höheren Effizienz keine Dosissteigerung zulasten der anderen Organe nötig ist. Dadurch treten weniger Nebenwirkungen auf und es stehen folglich weniger Behandlungsabbrüche in Aussicht (Nandigama et al., 2018).

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: verwendete Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Natriumchlorid	ROTH, Art.Nr. 3957.2
Kaliumchlorid	ROTH, Art.Nr. 6781.1
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem Panreac, Art.Nr. 131679.1211
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Art.Nr. A3620
Citronensäure	AppliChem, A1350,1000
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem, A1351,1000
Nickelsulfat	Merck, Art.Nr. 1.06727.0100
D-(+)-Glukose	AppliChem, A1422,0500
Ammoniumchlorid	Fluka, Art.Nr. 09700
DAB	Sigma-Aldrich, D5637
Glukose-Oxidase	Sigma-Aldrich, G2133
Aluminiumsulfat-18-hydrat	Sigma-Aldrich, Art.Nr. 11044
Kernechtrot	Merck, Art.Nr. 5189
Hämatoxylin	Chroma, Art.Nr. 50837
Natriumjodat	Merck, Art.Nr. 7412159
Kaliumaluminiumsulfat	AppliChem, A2811
Chloralhydrat	AppliChem, A4431
Eosin Y	AppliChem, A0822
Wasserstoffperoxid 35 %	ROTH, Art.Nr. 9683.3
Normales Ziegen Serum (engl. <i>normal goat serum</i> ; NGS)	Sigma-Aldrich, G9023
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, A9647
100 % Ethanol (EtOH)	Nordbrand, Sorte 642 (EtOH mind. 99%)
96 % EtOH	Nordbrand, Sorte 641
Xylol	redestilliert, 99,9% über die Uniklinik Würzburg bezogen
Trizma Base (Tris)	Sigma, T1503-1KG
4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)	Roche, Cat.Nr. 10236276001

Direct Red 80	Sigma-Aldrich, Art.Nr. 365548-5G
Hämatoxylin nach Weigert Lösung A	ROTH, Art.Nr. X906.1
Hämatoxylin nach Weigert Lösung B	ROTH, Art.Nr. X907.1
DePex	Serva, Cat.Nr. 18243.02

3.1.2 Kits

Tabelle 2: verwendete Kits mit Angabe des Herstellers

Kit	Hersteller
ImmPRESS® - Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Peroxidase	Vector Laboratories, MP-6401-15
- 2,5 % Normal Horse Serum	
- Anti-Rabbit-Immunglobulin G	

3.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Zusammensetzung der hergestellten Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
10 mM Citratpuffer (pH 6)	18 ml 0,1M Citronensäure 82 ml 0,1M Tri-Natriumcitrat 900 ml Aquadest
0,5 mM Tris-Puffer (pH 10)	60,57 g Trizma Base 950 ml Aquadest 2,3 ml 5 N Salzsäure, Einstellung pH Auffüllen auf 1L Gesamtvolumen mit Aquadest
0,1 M Phosphat-Puffer (PB) (pH 7,4)	4,9 g Kaliumdihydrogenphosphat 23,3 g Di-Natriumhydrogenphosphat 2 L Aquadest
0,1 M Phosphat-gepufferte Salz-Lösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> ; PBS) (pH 7,4)	40,03 g Natriumchlorid 1 g Kaliumchlorid 6,8 g Di-Natriumhydrogenphosphat 1 g Kaliumdihydrogenphosphat 5 L Aquadest

Mowiol + 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	0,6 g Glycerin 2,4 g Mowiol 6 ml Aquadest 12 ml 0,2 M Tris-HCl 25 mg/ml DABCO
3 % Wasserstoffperoxidlösung	18 ml 35 % Wasserstoffperoxid 192 ml Aquadest
0,2 % BSA/PBS	BSA gelöst in PBS
1 % NGS/ 0,2 % BSA/PBS	NGS gelöst in 0,2 % BSA/PBS
5 % NGS/PBS	NGS gelöst in PBS
80 % EtOH	technisches EtOH 96 % gelöst in Aquadest
70 % EtOH	technisches EtOH 96 % gelöst in Aquadest
50 % EtOH	technisches EtOH 96 % gelöst in Aquadest
4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid 1:5000	DAPI gelöst in PBS

3.1.4 Färbelösungen

Tabelle 4: Zusammensetzung der hergestellten Färbelösungen

Färbelösung	Zusammensetzung
0,1 % Pikro-Siriusrot-Lösung	0,5 g Siriusrot (<i>Direct Red 80</i>) 500 ml gesättigte Pikrinsäure-Lösung
Hämatoxylin nach Weigert	Lösung A : Lösung B im Verhältnis 1:1
Diaminobenzidin (DAB)- Entwicklungslösung	67,5 ml PB-Puffer 1,350 ml Nickelsulfat (13 mg/ml) 1,350 ml Glucose (10%-ig) 0,150 ml Ammoniumchlorid (180 mg/ml) 1,5 ml DAB (22,5 mg/ml) 0,225 ml Glucose-Oxidase (1,2 mg/ml)
0,1 % Kernechtrot-Lösung	50 g Aluminiumsulfat-18-hydrat 1 g Kernechtrot 1 L Aquadest

Hämatoxylin nach Mayer	1 g/L Hämatoxylin 0,2 g/L Natriumjodat 50 g/L Kaliumaluminiumsulfat 50 g/L Chloralhydrat 1 g/L kristalline Citronensäure
Eosin, 0,1 % wässrig	1 g/L Eosin in Aquadest

3.1.5 Software

Tabelle 5: verwendete Softwareprogramme und deren Hersteller

Software	Hersteller
Word, Microsoft 365	Microsoft
Excel, Microsoft 365	Microsoft
Power Point, Microsoft 365	Microsoft
Image J 1.53c	Wayne Rasband, <i>National Institutes of Health, USA</i>
Keyence BZ II Analyser	Keyence
Keyence BZ II Viewer	Keyence
NIS Elements, Imaging Software V.4.13	Nikon
OriginPro 2021	OriginLab Corporation

3.1.6 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 6: verwendete Geräte und Hilfsmittel mit Angabe des Herstellers

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller
Schüttler KL2	Edmund Bühler
Mikrowelle	Severin
Kühlschrank KI18R02/01	Siemens
Finnpipette® 100-1000 µl	Thermo Electron Corporation
Finnpipette® 10-100 µl	Thermo Electron Corporation
Finnpipette® 1-100 µl	Thermo Electron Corporation
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 20 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 100-1200 µl	Ratiolab
Magnetrührer Ikamag® RH	Junke & Kunkel

Vortex Combi Spin FVL-2400N	Boeco
Zentrifuge Typ 1-14	Sigma
PapPen	Kisker Biotech GmbH & Co.KG
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Deckgläser 24 x 50 mm	Menzel-Group
Durchlichtmikroskop Prio Star	Zeiss
Konfokales Mikroskop Nikon Eclipse Ti-AI	Nikon
Keyence Mikroskop BZ-9000	Keyence

3.2 Ethik- und Tierversuchsvotum

Die zur Probengewinnung notwendigen Tierversuche wurden von der zuständigen Aufsichtsbehörde, der Regierung von Unterfranken, begutachtet und genehmigt. Das Aktenzeichen hierzu lautet AZ 55.2-2531.01-02/17.

3.3 Versuchstiere

Für die Experimente wurden C57BL/6J-Mäuse als Versuchstiere herangezogen. Mäuse zeigen mit 70% Übereinstimmung eine hohe Ähnlichkeit der Liganden PD-L1/ PD-L2 im Vergleich zu den humanen Äquivalenten (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). Alle 33 Mäuse waren weiblichen Geschlechts und gleichen Alters. Sie wurden in Gruppen von zwei bis drei Mäusen gehalten und der Zugang zu Wasser und Futter war ihnen frei möglich. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde künstlich mit einem 12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus simuliert. In die Mäuse wurden AT3-Tumorzellen implantiert. 13 Tage nach der Implantation wurde mit der Behandlung gestartet. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tumore vollständig ausgebildet und haben eine Größe von durchschnittlich 50 mm³ erreicht. Die Behandlung wurde für sieben Tage bis Tag 20 fortgeführt. Die Tumorentnahme fand zwei Tage später an Tag 22 statt. Die 33 Mäuse wurden in vier Behandlungsgruppen unterteilt: acht Mäuse bekamen 15 mg/kg Minoxidil, neun Mäuse bekamen 20 mg/kg BMS-1166, acht Mäuse bekamen eine Kombination von beidem und acht Mäuse dienten als Kontrolltiere. Die Kontrollmäuse erhielten die Trägerlösung (engl. *Carrier*) ohne Wirkstoff. Die Medikamente und die Trägerlösungen wurden entsprechend vorbereitet und täglich intraperitoneal injiziert. Minoxidil wurde mit Ethanol zu einer 20 mg/ml Lösung angesetzt und vor der Injektion mit PBS zehnfach verdünnt. BMS-1166

wurde bis 50 mg/ml in DMSO gelöst und zehnfach mit Polyethylenglycol-300 und Wasser verdünnt. Das Endvolumen der Injektionslösung bestand aus 10 % BMS-1166 in DMSO gelöst, aus 30 % Polyethylenglycol-300 und die restlichen 60 % aus Wasser.

3.4 Vorbereitung des Tumorgewebes

Nach der Präparation der Tumore werden diese umgehend in eine 4 % Paraformaldehyd/ PBS-Fixierlösung gegeben. Dort verbleiben die Tumore zunächst für einige Stunden bei Raumtemperatur und anschließend bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler. Dadurch werden nekrotische Schäden verhindert, die durch die Gewebentnahme und die dadurch entstehende Sauerstoffunterversorgung der Zellen entstehen würden (Lang, 2012). Um die verbliebene Luft in den Lungen zu entfernen, werden sie zusätzlich im Exsikkator entgast. Das Fixiermittel wird viermal je 30 Minuten mit PBS und anschließend einmal 30 Minuten mit 70 % EtOH ausgewaschen. In 70 % EtOH verbleiben die Gewebe bis zur Einbettung. Die Paraffineinbettung erfolgt im Einbettkarussell: zuerst wird das Gewebe mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, dann mit Xylol geklärt und anschließend erfolgt die Infiltration mit Paraffin. Der Vorgang ist in Tabelle 7 genauer dargestellt. Danach werden die Paraffinblöckchen gegossen und am Schlittenmikrotom in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Im Wasserbad werden sie gestreckt und dann auf den Objektträger gezogen. Die Schnitte werden über Nacht bei 37 °C im Ofen getrocknet und sind dann für die Färbung fertig vorbereitet.

Tabelle 7: Paraffineinbettung: Dehydrierung, Klärung und Paraffin-Infiltration

Reagenz	Zeit in Stunden
70 % EtOH I	0,5
70 % EtOH II	1
80 % EtOH	3
96 % EtOH	3
100 % Isopropanol I	2
100 % Isopropanol II	2
100 % Isopropanol III	2
Xylol I	2
Xylol II	2
Xylol III	2
Paraffin I	4,5
Paraffin II	4,5

3.5 Färbungen

3.5.1 Histologische Färbungen

3.5.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) ist eine Standardfärbung und dient wegen Anfärbung von Zellkern und Zytoplasma der Übersicht. Durch elektrostatische Wechselwirkungen färbt der basische Farbstoff Hämatoxylin die DNA im Zellkern und der saure Farbstoff Eosin das Zytoplasma (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Die Tumorschnitte und die Lungenschnitte müssen zuerst entparaffinisiert werden. Dazu werden sie für je zehn Minuten in Xylol II und Xylol I gestellt. Anschließend erfolgt die Rehydrierung mit der absteigenden Alkoholreihe: je zwei Minuten werden die Schnitte in 100 % EtOH II, 100 % EtOH I, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH, 50 % EtOH und danach in Aquadest gegeben. Dann werden sie zehn Minuten mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt. Nach kurzem Spülen in Aquadest werden die Schnitte zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Wieder wird kurz mit Aquadest zwischengespült, bevor die Schnitte für zehn Minuten mit 0,1 % Eosin-Lösung gegengefärbt werden. Danach werden sie kurz in Aquadest getränkt und dann zwei Minuten in 96 % EtOH gegeben. Dehydriert wird mit der aufsteigenden Alkoholreihe. Dazu werden die Schnitte je fünf Minuten in 100 % EtOH I, 100 % EtOH II, Xylol I und Xylol II gestellt. Anschließend wird mit Depex eingedeckt.

3.5.1.2 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung (PSR-Färbung) ist eine gängige Färbemethode zur Anfärbung von Kollagen. Die Färbung beruht auf dem Mechanismus der optischen Doppelbrechung. Kollagen und der Farbstoff Siriusrot besitzen anisotrope Eigenschaften. Durch parallele Anordnung zueinander wird dieser Effekt verstärkt und lässt das Kollagen in der Färbung hervortreten (Rittié, 2017).

Die Entparaffinisierung und die Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe erfolgt analog zum Vorgehen der H.E.-Färbung. Es wurden ebenfalls Tumore sowie Lungen gefärbt. Nach der Entparaffinisierung und Rehydrierung kommen die Schnitte für acht Minuten in Hämatoxylin nach Weigert. Nach kurzem Spülen in Aquadest werden sie vorsichtig zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert, bevor sie wieder kurz in Aquadest getaucht werden und dann für eine Stunde mit 0,1 % Pikro-Siriusrot-Lösung gefärbt werden. Danach kommen die Schnitte für dreimal zwei Minuten in 0,5 % Essigsäure I, II, III. Zur Dehydrierung folgt die Alkoholreihe: zwei Minuten bleiben die

Schnitte in 100 % EtOH I, und je fünf Minuten in 100 % EtOH II und III. Anschließend werden sie je zweieinhalb Minuten in Xylol I und II gestellt, bevor sie für fünf Minuten in Xylol III kommen. Zuletzt erfolgt das Eindecken mit DePex.

3.5.2 Immunhistochemische Färbungen

3.5.2.1 Antikörper

Tabelle 8: verwendete Primärantikörper und Demaskierung der Diaminobenzidin-Färbungen

Antikörper	CD31	Ki67
Hersteller	Abcam (ab28364)	Abcam (ab16667)
Ursprung	Rabbit	Rabbit
Verdünnung	1:50	1:100
Demaskierung	0,5M Tris-Puffer (pH 10)	10mM Citrat-Puffer (pH 6)
Entwicklungszeit	10 min	10 min 30 sec
Markierung	Endothelzellen	Proliferierende Zellen

Tabelle 9: verwendete Antikörper und Demaskierung der Immunfluoreszenz Doppelfärbungen

Primär-antikörper	Doppelfärbung		Doppelfärbung	
	CD31	F4/80	CD4	CD8
Hersteller	Abcam (ab28364)	Abcam (ab16911)	Sino Biological (50134-R766)	Invitrogen (14-0808-82)
Ursprung	Rabbit	Rat	Rabbit	Rat
Verdünnung	1:50	1:100	1:100	1:50
Demaskierung	10mM Citrat-Puffer (pH 6)		10mM Citrat-Puffer (pH 6)	
Markierung	Endothelzellen	Makrophagen	Immunzellen	Immunzellen

Tabelle 10: verwendete Sekundärantikörper der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

Sekundär-antikörper	Cy3	Alexa-647
Hersteller	Jackson ImmunoResearch (111-165-003)	Jackson ImmunoResearch (112-605-143)
Ursprung	Goat (Anti-Rabbit)	Goat (Anti-Rat)
Verdünnung	1:600	1:300

3.5.2.2 Prinzip

Die Grundlage der Immunhistochemie (IHC) ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der der Antikörper an das passende Epitop im Gewebe bindet (Lang, 2012). Ein Epitop ist ein kleiner Abschnitt auf dem Antigen an welchen der Antikörper binden kann. Auf einem Antigen können mehrere Epitope vorkommen, diese können sowohl gleich als auch unterschiedlich sein (Bröker et al., 2019). Bei der Fixierung der biologischen Proben kommt es durch Bindung von Formaldehyd zu Veränderungen des Epitops und zu Vernetzungen im Gewebe. Um diese Bindungen wieder aufzulösen und um das Gewebe permeabler für den Antikörper zu machen, erfolgt eine Antigendemaskierung. Bevor die Antikörper zugegeben werden, muss jedoch eine Blockierung unspezifischer Bindungspartner erfolgen, weil Antikörper aufgrund ihrer hydrophoben und elektrostatischen Eigenschaften mit anderen Molekülen im Gewebe wechselwirken und so zu Hintergrundfärbungen führen können. Anschließend wird nach der indirekten Zwei-Schritt-Methode die Antigen-Antikörper-Reaktion eingeleitet. Der Primärantikörper bindet zunächst an ein Epitop und dann bindet der Sekundärantikörper an den Primärantikörper (Lang, 2012). Die Sekundärantikörper sind markiert mit Fluorochromen oder der Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP), wie es bei der Immunfluoreszenz-Färbung beziehungsweise der DAB-Färbung der Fall ist. Sie sind verantwortlich für die eigentliche Färbung (Magaki et al., 2019).

Die folgenden IHC-Färbungen sind nach bereits etablierten Standard-Färbeprotokollen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg durchgeführt worden. Der schematische Ablauf ist in Abbildung 4 gezeigt.

3.5.2.3 Diaminobenzidin-Färbung

Tabelle 11: Entparaffinierung und Rehydrierung der IHC-Färbungen

Reagenz	Zeit in Minuten
Xylol II	10
Xylol I	10
100 % EtOH II	5
100 % EtOH I	5
96 % EtOH	5
80 % EtOH	5
70 % EtOH	5
Aquadest	5

Zur Entparaffinierung werden die Tumorschnitte jeweils für zehn Minuten in Xylol II und Xylol I gestellt. Rehydriert wird mit der absteigenden Alkoholreihe: für je fünf Minuten werden die Schnitte in 100 % EtOH II, 100 % EtOH I, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH und Aquadest gegeben. Die Entparaffinierung und Rehydrierung ist in Tabelle 11 dargestellt. Danach erfolgt die Antigendemaskierung, welche sowohl basisch mit Tris-Puffer als auch sauer mit Citratpuffer, je nach Antikörper und Gewebe, durchgeführt werden kann. Die jeweils gewählten Demaskierungen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Für die Demaskierung werden die Schnitte in den Puffer gestellt und dann in die Mikrowelle gegeben, wo der Puffer insgesamt siebenmal im Abstand von 50 Sekunden für zehn Sekunden zum Kochen gebracht wird. Nach 30 Minuten Abkühlzeit bei Raumtemperatur wird der Puffer fünf Minuten fließend durch Aquadest ersetzt. Nun erfolgt der endogene Peroxidase-Block um unerwünschte Hintergrundfärbungen durch endogene Peroxidasen, wie sie zum Beispiel in Erythrozyten vorkommen, zu vermeiden. Der Block erfolgt hier kompetitiv durch Substratüberschuss (Lang, 2012). Dazu werden die Schnitte für zehn Minuten dunkel auf dem Schüttler in 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung gewaschen. Anschließend werden sie zweimal zweieinhalb Minuten in Aquadest und dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Objektträger werden nun nacheinander einzeln aus dem PBS genommen und vorsichtig getrocknet, dabei ist darauf zu achten, dass das Gewebe nicht austrocknet. Mit PapPen werden die Tumore umkreist, bevor 2,5 % *Normal Horse Serum* aus dem *Horse /Anti-Rabbit-Polymer-KIT* zur Blockierung unspezifischer Bindungspartner auf die Schnitte pipettiert wird. Dieser Vorgang wird mit allen Objektträgern wiederholt. Dunkel und feucht gelagert beträgt die Einwirkzeit der Blocklösung zwei Stunden bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wird mit 0,2 % BSA/PBS verdünnt und auf je einen Tumorschnitt pro Objektträger pipettiert. Die jeweils gewählten Primärantikörper und ihre Verdünnung sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Auf die Negativkontrolle daneben wird nur 0,2 % BSA/PBS gegeben. Die Schnitte werden über Nacht in einer feuchten Dunkelbox bei vier Grad Celsius gelagert.

Am nächsten Tag wird die überschüssige Primärantikörper-Lösung zunächst sanft mit PBS abgespült und dann werden die Schnitte dreimal fünf Minuten in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Nun werden die Objektträger etwas trockengetupft und der Sekundärantikörper, das *Anti-Rabbit-Immunglobulin G* aus dem *Horse /Anti-Rabbit-Polymer-KIT*, wird auf die Tumore pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde in der feuchten Dunkelbox bei Raumtemperatur. Im Anschluss werden die Schnitte dunkel auf dem Schüttler gewaschen: zweimal fünf Minuten in PBS und zweimal fünf Minuten in 0,1 M PB-Puffer (pH 7,4). Jetzt erfolgt die Färbereaktion mit DAB. Für die

Entwicklerlösung wird 67,5 ml 0,1 M PB-Puffer (pH 7,4) vorgelegt und nacheinander zuerst 1350 µl Nickelsulfat, 1350 µl 10 % Glukose, 150 µl Ammoniumchlorid, 1,5 ml DAB und zuletzt 225 µl Glukose-Oxidase dazu pipettiert. Die Tumorschnitte werden in die Entwicklerlösung gegeben, abgedunkelt und unter Kontrolle am DAB-Lichtmikroskop gefärbt. Die Glukose-Oxidase startet die Reaktion, indem sie die Glukose oxidiert. Das dabei anfallende Wasserstoffperoxid wird in einer Redoxreaktion von der, an den Sekundärantikörper gekoppelten, HRP zu Wasser umgesetzt. DAB dient hier als Reduktionsmittel, wird also selbst oxidiert und dadurch zu einem farbigen Produkt umgesetzt (Kuhlmann & Peschke, 1986). Die entsprechenden Entwicklungszeiten für den jeweiligen Antikörper sind in der Tabelle 8 dargestellt. Zum Abstoppen der Reaktion werden die Schnitte in PBS gestellt und dreimal fünf Minuten in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend werden sie kurz in Aquadest getränkt und dann erfolgt die Gegenfärbung für drei Minuten in 0,1 % Kernechtrot. Dann werden die Schnitte zweimal kurz in Aquadest gewaschen, bevor sie zur Dehydrierung die aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen. Dabei werden die Schnitte für je eine Minute in 70 % EtOH, 80 % EtOH und 96 % EtOH und dann je drei Minuten in 100 % EtOH I und 100 % EtOH II gegeben. Jetzt werden die Schnitte noch je fünf Minuten in Xylol I und II gestellt und dann werden sie unter dem Abzug mit DePex eingedeckt.

3.5.2.4 Immunfluoreszenz

Im Rahmen dieser Arbeit werden Immunfluoreszenz (IF)-Doppelfärbungen durchgeführt. Die verschiedenen Primärantikörper dürfen dabei nicht aus der gleichen Spezies stammen, um eine eindeutige Zuordnung von Sekundär- und Primärantikörper zu generieren. Die Sekundärantikörper sind mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt und binden an Primärantikörper der gleichen Spezies. Somit erhält man zwei eindeutige separate Signale. Vorteil davon ist die Möglichkeit der Beurteilbarkeit einer möglichen Lageabhängigkeit der angefärbten Strukturen.

Der erste Tag der IF-Färbung ähnelt sehr stark dem ersten Tag der DAB-Färbung. Die Entparaffinierung, die Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe, die Antigendemaskierung sowie das Waschen der Tumorschnitte in PBS erfolgen analog. Allerdings entfällt der Peroxidase-Block, die Blockierung der unspezifischen Bindungspartner erfolgt mit 5 % NGS/PBS und die Primärantikörper werden in 1 % NGS/0,2 % BSA/PBS verdünnt und aufgetragen. Die Antikörper sowie die gewählten Demaskierungen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Am zweiten Tag werden die Primärantikörper zunächst sanft mit einer Pasteurpipette und PBS abgespült und anschließend in PBS dreimal fünf Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Die Sekundärantikörper, welche der Tabelle 10 zu entnehmen sind, werden in sterilem PBS verdünnt und auf die Tumorschnitte pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt bei Dunkelheit eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach werden die Schnitte dunkel dreimal zwei Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Jetzt erfolgt die Kernfärbung mit 1:5000 in PBS verdünntem DAPI: dazu wird die DAPI-Lösung auf die Schnitte pipettiert und inkubiert dann bei Raumtemperatur zehn Minuten im Dunkeln. Anschließend werden die Schnitte fünfmal drei Minuten in PBS dunkel auf dem Schüttler gewaschen. Das Eindecken erfolgt hier mit einem Gemisch aus Mowiol und DABCO. Dazu werden die Objektträger einzeln nacheinander aus dem PBS geholt, kurz in Aquadest getränkt und vorsichtig trockengetupft, bevor Mowiol und DABCO auf die Schnitte pipettiert und das Deckglas platziert wird. Die eingedeckten Objektträger härten über Nacht im Kühlschrank bei vier Grad Celsius aus, auch die spätere Lagerung der Objektträger erfolgt entsprechend.

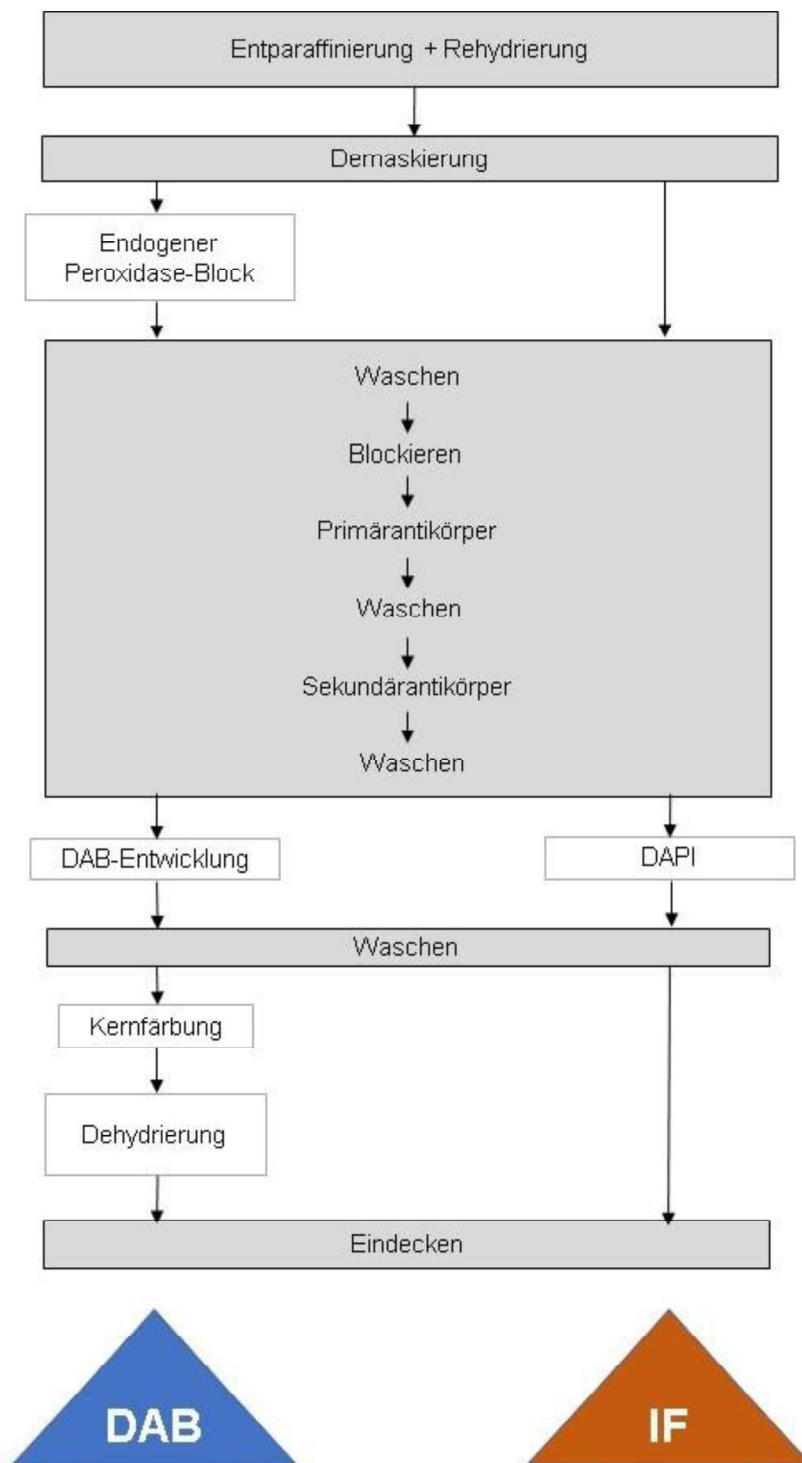


Abbildung 4: Flowchart zur Durchführung der DAB- und IF-Färbungen. Diese Standard-Färbeprotokolle entstammen dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg, welche dort bereits etabliert sind. Viele Schritte stimmen bei der DAB- und der IF-Färbung überein (graue Kästen). DAPI: 4',6-Diamidin-2'-phenylindol- dihydrochlorid; DAB: Diaminobenzidin; IF: Immunfluoreszenz.

3.6 Mikroskopie

3.6.1 Keyence BZ-9000

Das *Keyence Mikroskope BZ-9000* wird für lichtmikroskopische Aufnahmen der H.E.- und PSR-gefärbten Tumore und Lungen, sowie der DAB-gefärbten Tumore herangezogen. Dabei wird die Einstellung Farbkamera gewählt und die Aufnahmen werden im Hellfeld-Modus durchgeführt. Von den H.E.-, PSR- und DAB-gefärbten Tumoren, wie auch von den H.E.-gefärbten Lungen, werden Übersichtsaufnahmen des gesamten Gewebes in zehnfacher Vergrößerung gemacht. Das Keyence Mikroskop macht dabei viele kleine Aufnahmen in zehnfacher Vergrößerung und setzt diese dann zu einer Übersichtsaufnahme in einer Auflösung von 1360 x 1024 Pixel zusammen. Bei den PSR-gefärbten Lungen werden lediglich Metastasen als Einzelaufnahmen in 20-facher Vergrößerung abgelichtet. Die Auflösung der Bilder hierbei ist 2720 x 2048 Pixel.

3.6.2 Konfokales Mikroskop Nikon Eclipse Ti-AI

Von den Tumoren der IF-Färbungen werden am konfokalen Mikroskop *Nikon Eclipse Ti-AI* hochauflösende Einzelbilder in 20-facher Vergrößerung gemacht. Von jedem Tumor werden vier bis fünf 2048 x 2048 Pixel große Aufnahmen in verschiedenen Bereichen des Tumors angefertigt. Es wird darauf geachtet, dass keine nekrotischen Bereiche und auch keine Randbereiche abgebildet werden. Mit Laser unterschiedlicher Wellenlänge werden die Fluorochrom-markierten Sekundäntikörper zum Fluoreszieren angeregt. Für die Aufnahmen werden vier verschiedene Laser benutzt. Der erste Laser mit einer Wellenlänge von 405 nm lässt DAPI fluoreszieren. Der zweite Laser mit der Wellenlänge von 488 nm bringt den Hintergrund, wie beispielsweise autofluoreszierenden Erythrozyten hervor. Der dritte und der vierte Laser mit den Wellenlängen von 561 nm und 647 nm machen die Sekundäntikörper Cy3 und Alexa 647 sichtbar. Eine Aufnahme besteht so aus vier verschiedenen Ebenen, die später im Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ 1.53c* einzeln betrachtet werden können.

3.7 Bildverarbeitung und Auswertung

Zur elektronischen Bildverarbeitung der lichtmikroskopischen Aufnahmen sowie der IF-Aufnahmen wird das Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ 1.53c* herangezogen. Zuvor wird bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen durch Dr. E. Henke ein automatisierter Weißabgleich mit *Photoshop CS5 V.12.0* durchgeführt. In *ImageJ 1.53c* ist es möglich eigene Makros, also eine bestimmte Abfolge von Befehlen, zu erstellen und diese für jedes Bild mit den gleichen Einstellungen anzuwenden. Die Informationen von *ImageJ 1.53c* werden dann zur statistisch-quantitativen Auswertung in *Excel Microsoft 365* und *OriginPro 2021* übertragen. Auf Basis des festgelegten 5 %-Signifikanzniveaus werden die ermittelten Wahrscheinlichkeiten, auch als p-Werte bezeichnet, zur Beurteilung der statistischen Signifikanz herangezogen. Die Graphen werden mit *OriginPro 2021* erstellt. Beim Vergleich der Brusttumore der unterschiedlichen Behandlungsgruppen wird angenommen, dass die Werte einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Die Ergebnisse werden auf unterschiedliche Varianz getestet, wobei bei gleicher Varianz ein unpaarer zweiseitiger T-Test durchgeführt wird. Bei signifikant unterschiedlicher Varianz wird der T-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt. Im Gegensatz zur angenommenen Normalverteilung der primären Brusttumore, kann diese Annahme bei Lungenmetastasen nicht zutreffen. Der Grund dafür liegt in der multifaktoriell bedingten Entstehung und dem Wachstum von Metastasen. Denn nach Injektion der Tumorzellen wachsen Metastasen unterschiedlich schnell, da sie abhängig vom Primärtumorwachstum und der Auswanderung von Tumorzellen ins umliegende Gewebe und in die Gefäße sind. Zur Analyse der Metastasen wird deshalb ein unabhängiger Mann-Whitney-Test angewendet.

3.7.1 Auswertung der H.E.-Färbung

3.7.1.1 Tumore

In *ImageJ 1.53c* wird zunächst der gesamte Tumor von Hand einmal umfahren und die markierte Fläche ausgemessen. Dann werden die nekrotischen Bereiche analog markiert und die gesamte Nekrose des Tumors durch *ImageJ 1.53c* ausgerechnet. Anhand der beiden Flächenwerte wird die prozentuale Nekrose der gesamten Tumorfäche berechnet. Dieser Vorgang wird für alle 33 Tumore wiederholt. Anschließend werden die Mittelwerte jeder Behandlungsgruppe ermittelt und der Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*, SEM) errechnet.

3.7.1.2 Lungen

Ähnlich zur vorherigen Auswertung wird der rechte und der linke Lungenflügel in *ImageJ 1.53c* von Hand umfahren und die markierte Fläche ausgemessen. Dann wird jede Metastase einzeln analog markiert und die Fläche durch *ImageJ 1.53c* berechnet. Zuerst wird die Anzahl an Metastasen pro Lunge ermittelt und dann errechnet, wie viele Metastasen durchschnittlich pro mm² in der jeweiligen Lunge vorkommen. Dieser Vorgang wird für alle 17 Lungen wiederholt. Von beiden Berechnungen werden die Mittelwerte jeder Behandlungsgruppe ermittelt und der SEM errechnet. Danach erfolgt die Analyse der durchschnittlichen Größe der Metastasen. Dazu wird aus allen Flächenwerten der Metastasen in einer Behandlungsgruppe der Mittelwert gebildet und der SEM errechnet.

3.7.2 Auswertung der PSR-Färbung

3.7.2.1 Tumore

Die Auswertung der 33 Tumore erfolgt mithilfe eines Makros in *ImageJ 1.53c*. Dazu wird nicht wie bisher die gesamte Tumorphäche von Hand umfahren, sondern die intakte Tumorphäche wird hier so gut es geht mit mehreren gleich großen Rechtecken erfasst, wobei die nekrotischen Bereiche ausgespart werden. Der Hintergrund ist, dass die Rechenleistung des Makros nicht mit der individuellen Tumorphorm kompatibel ist. Über jedes Rechteck im Tumor wird, nach automatisierter Kontrastverstärkung durch Dr. E. Henke mit *Photoshop CS5 V.12.0*, das Makro laufen gelassen. Durch das Makro wird der ausgewählte Bereich der lichtmikroskopischen Aufnahme in die drei Farbkanäle rot, grün und blau geteilt, um ein Schwarz-Weiß-Bild zu erzeugen. Im Schwarz-Weiß-Bild können die unterschiedlichen Bildpunkte sehr gut voneinander getrennt werden. In diesem Fall wird das rote Kollagenetzwerk der Farbaufnahme am besten im grünen Kanal dargestellt. Grüne Bildpunkte erscheinen weiß und rote Bildpunkte schwarz. Hier kann man einen Schwellenwert festlegen und dadurch unerwünschte Signale rausfiltern, sodass nur die intensivsten roten Signale ausgewertet werden. *ImageJ 1.53c* analysiert im Rahmen des Makros dann wie viele Äste des Kollagenetzwerks im ausgewählten Rechteck zu finden sind, was die durchschnittliche und was die maximale Astlänge ist. Alle Werte, deren maximale Astlänge kleiner als 20 µm ist werden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Es wird die Gesamtfläche des ausgewerteten Tumorgewebes berechnet, welche sich aus der Anzahl und Größe der gewählten Rechtecke ergibt. Dann

wird die Gesamtsumme und die Gesamtlänge der Äste pro mm² Tumor und Mittelwerte mit SEM errechnet.

3.7.2.2 Lungen

Die Einzelaufnahmen in 20-facher Vergrößerung von den PSR-gefärbten Lungen werden lediglich visuell ohne elektronische Hilfe ausgewertet. Hierzu werden die Kategorien Dichte und Färbeintensität des Kollagennetzwerks mit einer eigenen Skala bewertet. Die Skala geht dabei von null (sehr schwach), über eins (schwach) und zwei (mittel) bis drei (stark). Außerdem werden auffällige Besonderheiten der 17 Lungen in Form oder Lage notiert, um die Metastasen miteinander vergleichen zu können.

3.7.3 Auswertung der DAB-Färbung mit CD31-Antikörper

Um die Handhabung bei der DAB-Färbung der insgesamt 16 verschiedenen Objektträger mit 33 Tumoren zu vereinfachen, werden diese in zwei Gruppen à zehn Objektträger geteilt und separat in zwei verschiedenen Ansätzen gefärbt. Die Gruppen werden so gewählt, dass aus jeder Behandlungsgruppe zwei Tumorschnitte in beiden Färbeansätzen vertreten sind. Diese Tumore dienen zur späteren Beurteilung, ob die Werte aus den zwei Ansätzen miteinander vergleichbar sind.

In *ImageJ 1.53c* werden die Übersichtsbilder nun mit einem Makro ausgewertet. Dabei wird das Bild wieder in seine drei Farbkanäle rot, grün und blau geteilt. Die dunkle intensive Färbung der angefärbten Vaskulatur kommt im roten Kanal am besten zur Geltung, weshalb dieser zur Auswertung herangezogen wird. Der Schwellenwert wird so festgelegt, dass unerwünschte Hintergrundsignale verschwinden. Deutlich zu kleine Signale werden zudem mit von *ImageJ 1.53c* vorinstallierten Filtern herausgerechnet und der Hintergrund damit weiter verbessert. Nachdem mit dem Makro nun das vorbereitete Schwarz-Weiß-Bild vorliegt, wird von Hand das intakte Tumorgewebe umfahren. Dabei werden Nekrosen und die Randverfärbungen sowie Falten im Tumorschnitt ausgespart. *ImageJ 1.53c* berechnet dann die markierte Fläche und den prozentualen Anteil der Vaskulatur an der Gesamtfläche. Es werden Mittelwerte mit SEM für jede Behandlungsgruppe berechnet.

3.7.4 Auswertung der DAB-Färbung mit Ki67-Antikörper

In *ImageJ 1.53c* wird zur Auswertung der 33 Tumore wieder mit einem Makro gearbeitet. Dieses Makro ähnelt stark dem Makro der CD31-Auswertung. Die Übersichtsaufnahme

wird in die drei Farbkanäle geteilt und der rote Kanal zur Auswertung herangezogen. Der Hintergrund wird auch durch Festlegung eines Schwellenwerts für die Signalintensität reduziert und mit Filtern aufgebessert. Zuvor werden jedoch rundliche Signale des Proliferationsmarkers, die im Zentrum Signal-frei sind, durch *ImageJ 1.53c* aufgefüllt. Dieser Schritt ist wichtig, damit sie bei der Auswertung vollumfänglich erfasst werden können. Dann wird wieder unter Aussparung von Nekrosen, Falten und Randverfärbungen das intakte Tumorgewebe von Hand markiert. *ImageJ 1.53c* errechnet die markierte Fläche und die Anzahl der Ki67-positiven Zellen. Es werden die Ki67-positiven Zellen in Relation zur Tumorfläche gesetzt und Mittelwerte sowie SEM berechnet.

3.7.5 Auswertung der IF-Färbung mit CD31- und F4/80-Antikörper

Es werden insgesamt 17 Tumore ausgewertet. Die vier verschiedenen Bilder einer IF-Aufnahme werden direkt in *ImageJ 1.53c* mithilfe eines Makros ausgewertet. Von den zwei Bildebenen der Sekundärantikörper Cy3 und A647 werden die Signale des 488 nm-Hintergrundkanals abgezogen. Dadurch werden nur eindeutig positive Signale des entsprechenden Sekundärantikörpers für die Auswertung erfasst. Gearbeitet wird dann nur noch mit den bearbeiteten Bildern der Sekundärantikörper. Im Schwarz-Weiß-Bild der IF-Aufnahme erscheinen positive Signale weiß und der negative Hintergrund schwarz. Um die Signale für die Auswertung durch *ImageJ 1.53c* greifbar zu machen, werden die Farben umgekehrt. Für die nun positiven schwarzen Signale werden jeweils wieder Filter angewendet und je ein Schwellenwert festgelegt, der die eindeutigen Signale von unspezifischen Hintergrundsignalen abgrenzt. Dann wird von *ImageJ 1.53c* der prozentuale Anteil der CD31- und der F480-Signale an der Gesamtfläche des Bildes berechnet. Für jeden Tumor werden Mittelwerte berechnet. Daraus lässt sich wiederum der Mittelwert für die gesamte Behandlungsgruppe und den SEM errechnen. Zusätzlich wurde in der Tabelle notiert, wenn sich Auffälligkeiten in der Anordnung von Makrophagen zu Gefäßen zeigen.

3.7.6 Auswertung der IF-Färbung mit CD4- und CD8-Antikörper

Bei dieser Auswertung von insgesamt 25 Tumoren wird ähnlich zur vorigen Auswertung vorgegangen. Mit einem Makro werden wieder die Hintergrundsignale von den CD4- und CD8-Signalen abgezogen und die Farben umgekehrt sodass nun schwarze CD4- und CD8-positive Signale ausgewertet werden können. Der Hintergrund wird mit Filtern

aufgebessert. Mit *ImageJ 1.53c* werden nun alle Signale einer gewissen Größe gezählt, wodurch kleinere unspezifische Signale unberücksichtigt bleiben. Eindeutig positive Signale sind bei CD4 ab einer Pixelgröße von 300 Pixel² und bei CD8 ab 250 Pixel² am besten dargestellt. Die Auswertung mit der elektronischen Hilfe läuft unter visueller Kontrolle, sodass die Anzahl der positiven Zellen doppelt geprüft wird. Es wird die Anzahl der positiven CD4- und CD8-Zellen eines Tumors auf die Gesamtfläche des Bildes gerechnet. Für jede Behandlungsgruppe wird dann der Mittelwert sowie der SEM berechnet.

4 Ergebnisse

Die murinen AT3-Brustkrebstumore und Lungen wurden gefärbt und mikroskopiert. Es waren acht bis neun Tumore, sowie drei bis fünf Lungen in jeder der vier Behandlungsgruppen Carrier (*carrier tumors/ lungs*, CT/ CL), Minoxidil (*Minoxidil tumors/lungs*, MT/ ML), BMS-1166 (*BMS-1166 tumors/lungs*, BT/ BL) und der Kombination von BMS-1166 und Minoxidil (*BMS-1166 & Minoxidil tumors/ lungs*, BMT/ BML) vertreten. Eine Übersicht dazu ist in der Tabelle 12 dargestellt. Die Carrier-Behandlungsgruppe wurde nur mit der Trägerlösung ohne Wirkstoff behandelt. Sie diente der Kontrolle, weshalb die Gruppe als Kontrollgruppe bezeichnet wurde.

Im Folgenden wurden die Effekte der Kombinationstherapie und der Monotherapien im Vergleich zur Kontrollgruppe analysiert. Als Grundlage für die histologische Analyse dienten die Mikroskopaufnahmen der Tumorschnitte. Zum Vergleich wurden die Mittelwerte mit SEM in positiver und negativer Richtung angegeben (Mittelwert \pm SEM).

Tabelle 12: Übersicht über die Anzahl von Tumoren und Lungen in den Behandlungsgruppen

Behandlungsgruppe	Anzahl Tumore	Anzahl Lungen
CT - Carrier (Kontrollgruppe)	8	4
MT - Minoxidil	8	3
BT - BMS-1166	9	5
BMT - BMS-1166 + Minoxidil	8	5
Summe	33	17

4.1 Auswertung von Tumornekrosen anhand der H.E.-Färbung

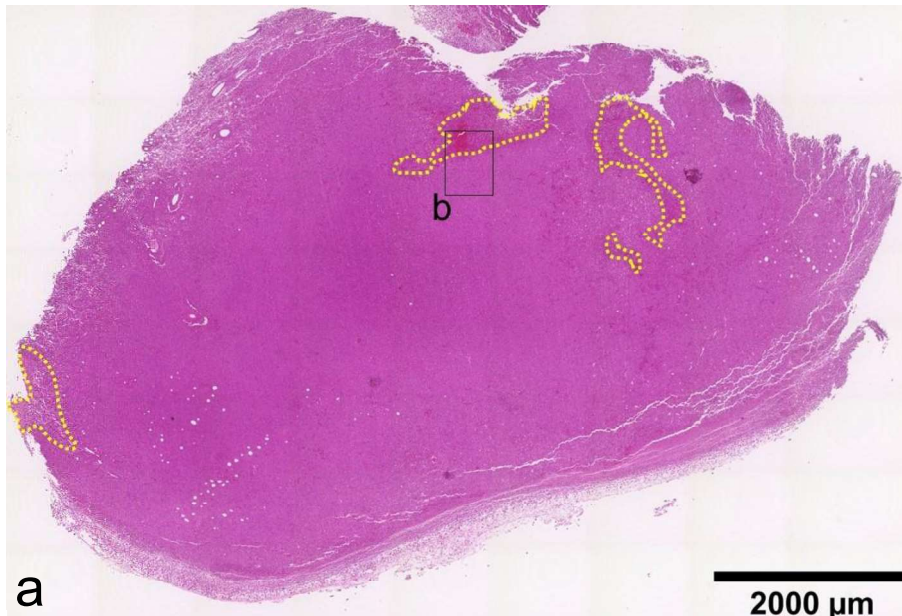


Abbildung 5: H.E.-Färbung eines Minoxidil-behandelten Tumors. (a) Übersichtsaufnahme des ganzen Tumors. Die nekrotischen Bereiche sind gelb markiert und ergeben 2,25 % der gesamten Tumorfläche. (b) Bildausschnitt aus (a). Die Nekrose ist gelb umrandet. Innerhalb der Nekrose sind fragmentierte Zellbestandteile enthalten und auch Einblutungen sind zu erkennen. Das noch intakte Tumorgewebe ist dagegen kompakt und besteht aus Tumorzellen mit großem Zellkern. Lichtmikroskopische Aufnahme mit Keyence BZ-9000. H.E.: Hämatoxylin-Eosin, (N): Nekrose; (T): intaktes Tumorgewebe; (→): Einblutung.

Ziel bei der histologischen H.E.-Übersichtsfärbung der Brusttumore war es herauszufinden, wie viel nekrotisches Gewebe anteilig im Tumor vorkommt und wo die Nekrosen lokalisiert sind. Nekrotische Bereiche gab es in allen Behandlungsgruppen. Diese Areale kennzeichneten sich durch eine aufgelockerte und lose Struktur innerhalb des dichten Tumorzellverbands. Des Weiteren waren in den Nekrosen auch fragmentierte DNA-Bestandteile der untergegangenen Zellen zu erkennen, wodurch man sie gut von den intakten Tumorzellen mit großen Zellkernen abgrenzen konnte. Zum Teil waren auch Einblutungen zu finden. Die Nekrosen zeichneten sich oft im

Tumorzentrum aber auch in Randbereichen ab. In Abbildung 5 sind die Nekrosen zum besseren Verständnis hervorgehoben.

Nach der quantitativen Auswertung aller 33 Tumore zeigte sich bezüglich der nekrotischen Areale im Vergleich zur Kontrollgruppe lediglich bei den BMS-1166-behandelten Tumoren ein signifikanter Unterschied. Bei der Kontrollgruppe war auf die gesamte Tumorfläche gerechnet im Durchschnitt $1,93 \pm 0,59$ % der Fläche nekrotisches Gewebe. Im Gegensatz dazu stach die BT-Gruppe mit einer durchschnittlichen Nekrose von $22,31 \pm 8,56$ % der Tumorfläche hervor. Nach Welch-Korrektur waren die beiden Gruppen mit einem p-Wert von 4,46 % signifikant unterschiedlich. Dieser Unterschied ist in Abbildung 6 exemplarisch dargestellt. Trotz der großen Differenz dieser beiden Mittelwerte fiel der Unterschied nicht noch deutlicher aus, da es innerhalb der BT-Gruppe eine große Abweichung der einzelnen Nekrose-Werte zueinander gab. Die Standardabweichung betrug 25,68 %. Mit Mittelwerten von $3,99 \pm 0,94$ % Nekrose für die doppelt behandelte BMT-Gruppe und $2,18 \pm 0,57$ % Nekrose für die MT-Gruppe, waren beide Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings lag die BMT-Gruppe mit einem p-Wert von 8,42 % nur knapp über dem festgelegten Signifikanzniveau von 5 %. Ähnliches zeigt sich beim Vergleich der BT- mit der BMT-Gruppe, welche sich nach Welch-Korrektur mit einem p-Wert von 6,53 % ebenfalls knapp nicht signifikant unterschieden. In Abbildung 7 ist die statistische Auswertung übersichtlich dargestellt. Der BT2-Tumor-1 konnte aufgrund der hohen nekrotischen Anteile von 81,49 % und Falten im Bereich des intakten Gewebes für die späteren IHC-Auswertungen nicht berücksichtigt werden.

Das meiste untergegangene Tumorgewebe konnte in der Gruppe der Immun-Monotherapie mit BMS-1166 beobachtet werden. Die Tumore der Kombinationstherapie mit Minoxidil und BMS-1166 zeigten trotz fehlender statistischer Signifikanz tendenziell mehr Nekrose als die Kontrolle, aber weniger als die alleinige Behandlung mit dem Immuntherapeutikum.

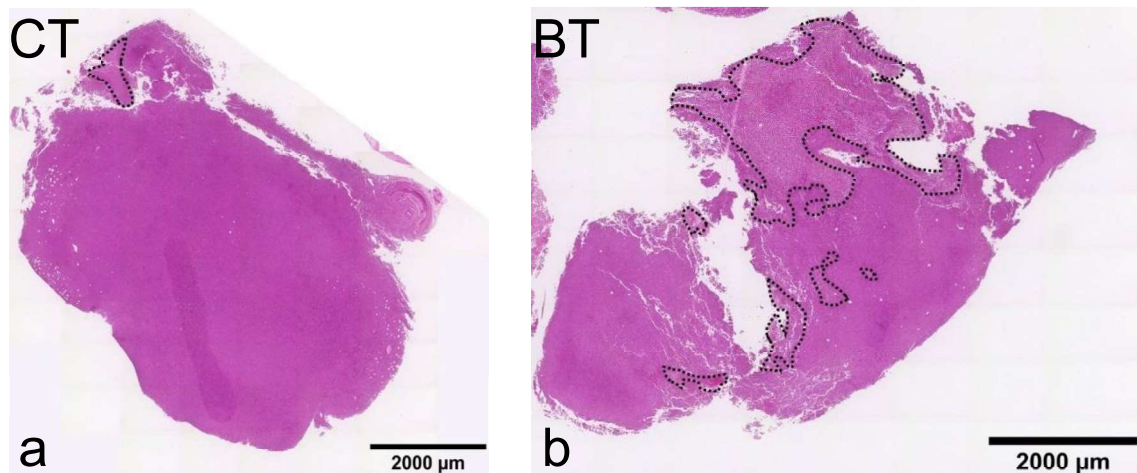


Abbildung 6: Vergleich der nekrotischen Bereiche in der H.E.-Färbung. Signifikant mehr prozentuale Nekrose bei BMS-1166-behandelten Tumoren im Vergleich zu Tumoren der Kontrollgruppe. (a) Übersichtsaufnahme eines Tumors der Kontrollgruppe. Die Nekrose ist schwarz markiert und spiegelt mit einem Anteil von 1,53 % der Tumorfläche etwa den Mittelwert der gesamten Kontrollgruppe wider. (b) Übersichtsaufnahme eines BMS-1166-behandelten Tumors. Die nekrotischen Bereiche sind schwarz markiert und auch dieser Tumor veranschaulicht mit 27,25 % Nekrose gut den Mittelwert der BT-Gruppe. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Keyence BZ-9000. H.E.: Hämatoxylin-Eosin; CT: Carrier tumors; BT: BMS-1166 tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb.

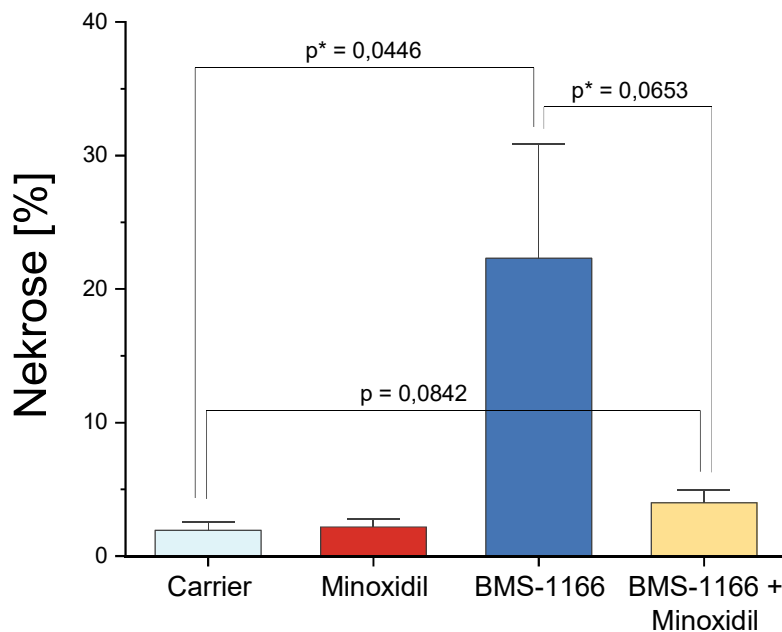


Abbildung 7: Auswertung der prozentualen Nekrose der unterschiedlich behandelten Tumore. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Die MT- und BMT-Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied. Jedoch lag die BMT-Gruppe mit einem p-Wert von 8,42 % nur knapp über dem festgelegten Signifikanzniveau von 5%. Die Monotherapie mit BMS-1166 zeigte mit einem p-Wert von 4,13 % einen signifikanten Unterschied verglichen mit der Kontrolle. Der deutliche Unterschied der beiden Mittelwerte wurde allerdings durch den hohen Standardfehler der BT-Gruppe relativiert. SEM: standard error of the mean; BMS: Bristol-Myers Squibb; MT: Minoxidil tumors; BT: BMS-1166 tumors; BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; p: p-Wert; (*): Welch-Korrektur.

4.2 Auswertung des kollagenen Netzwerks anhand der PSR-Färbung

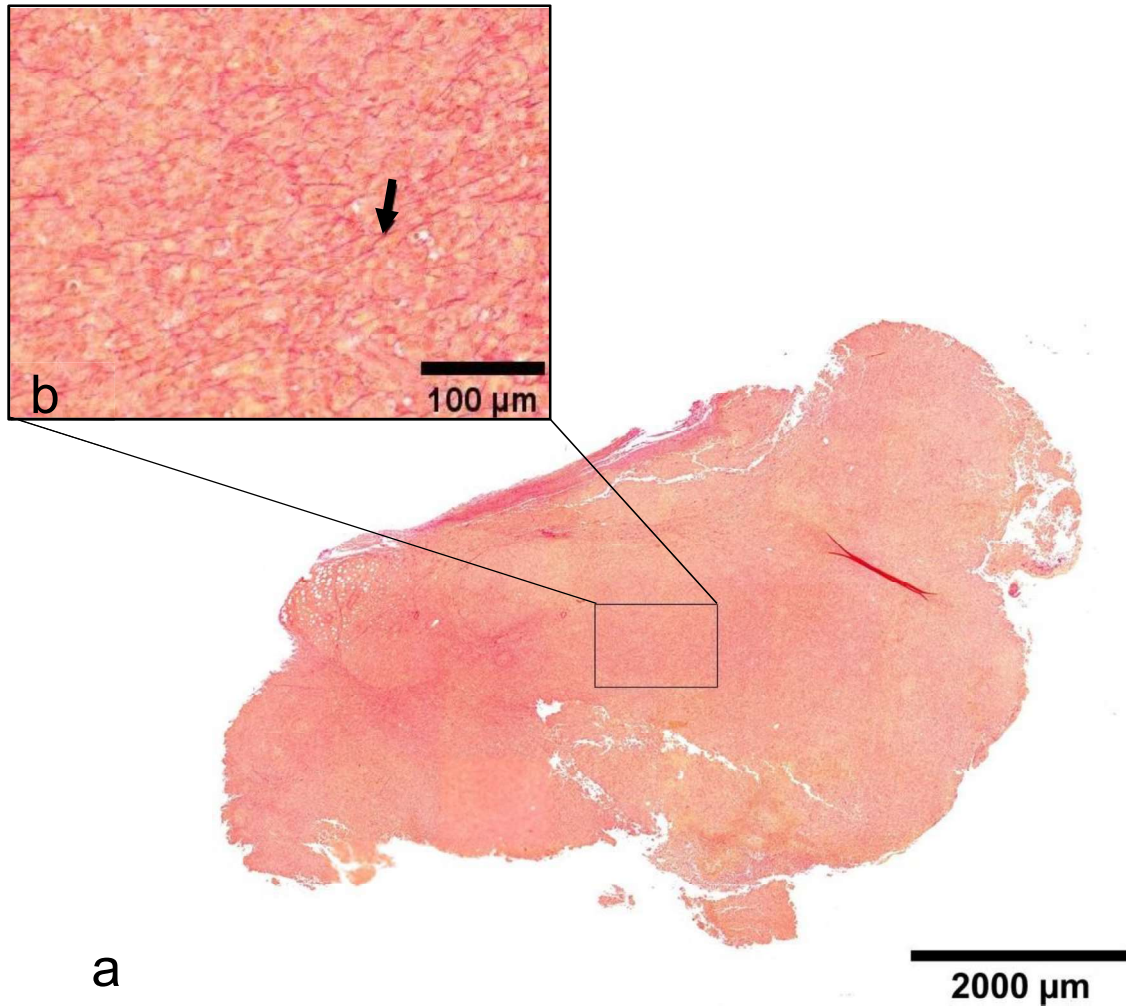


Abbildung 8: PSR-Färbung eines Tumors der BMT-Gruppe.

(a) Übersichtsaufnahme des gesamten Tumors. Die unterschiedlich dichte Verteilung von Kollagen ist hier gut zu erkennen. Im Tumorzentrum ist die Kollagenfärbung intensiver. (b) Bildausschnitt aus dem Inneren des Tumors. Das Kollagennetzwerk ist intensiv rot gefärbt und hebt sich vom Hintergrund ab. Die einzelnen Äste mit Abzweigungen sind gut zu erkennen. Der schwarze Pfeil markiert eine solche Abzweigung. Lichtmikroskopische Aufnahme mit Keyence BZ-9000. (→) Abzweigung im Kollagennetzwerk. PSR: Picro-Siriusrot-Färbung. BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb.

Die PSR-Färbung wurde zur Analyse der kollagenen Ablagerungen im Tumor herangezogen. Dabei war von Interesse, ob mögliche Auswirkungen des Kollagendestabilisierenden Medikaments Minoxidil auf das kollagene Netzwerk beobachtet werden können. Wie die Abbildung 8 zeigt, ist Kollagen intensiv rot gefärbt, wodurch sich das kollagene Netzwerk mit seinen Ästen und Abzweigungen gut über den gesamten Tumor verfolgen und beurteilen lässt.

Bei Betrachtung der insgesamt 33 Tumore war auffällig, dass manche Tumore intensiver rot angefärbt waren als andere. Diese Besonderheit war mehrheitlich in der doppelt behandelten BMT-Gruppe aber vereinzelt auch in den anderen Behandlungsgruppen zu beobachten. Ein solcher Vergleich ist in Abbildung 9 gezeigt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sich die meisten Kollagenablagerungen im Tumorzentrum abbildeten und weniger in Randbereichen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war in der BMT-Gruppe ein signifikant größeres und dichteres Kollagenetzwerk zu verzeichnen. Sowohl die Anzahl der Äste im Netzwerk als auch deren Gesamtlänge waren signifikant größer. Nach Welch-Korrektur waren beide Parameter mit einem p-Wert von 1,59 % für die Anzahl und 3,95 % für die Gesamtlänge der Äste signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Ein exemplarischer Vergleich von zwei Tumoren aus der CT- und der BMT-Gruppe ist in Abbildung 9 dargestellt. Durchschnittlich waren es in der BMT-Gruppe $574,41 \pm 114,34$ Äste mit einer Gesamtlänge von $305,60 \pm 104,33$ mm pro mm² Tumorfläche. Die Tumore der anderen drei Behandlungsgruppen haben weniger Kollagen abgelagert. Sie verfügten über ähnlich viele Äste pro mm² Tumorfläche: $211,62 \pm 43,68$ in der CT-Gruppe, $212,34 \pm 50,98$ in der BT-Gruppe und $216,61 \pm 59,01$ in der MT-Gruppe. Mit $23,00 \pm 12,57$ mm pro mm² Tumorfläche hatten Tumore der BT-Gruppe das insgesamt kürzeste kollagene Netzwerk. Die CT- und die MT-Gruppe wiesen hier Werte von $41,00 \pm 23,31$ mm und $45,01 \pm 29,61$ mm auf. Die Statistik zur Auswertung der PSR-Färbung ist in Abbildung 10 graphisch dargestellt. Von 33 Tumoren konnten wegen der schlechten Bildqualität eines Tumors (MT3-Tumor 1) nur 32 Tumore ausgewertet werden.

Zusammenfassend zeigte sich bei Kombinationstherapie mit dem Immuntherapeutikum BMS-1166 und dem PLOD-2-Inhibitor das größte und dichteste Kollagenetzwerk aller Behandlungsgruppen, welches sich vor allem im Tumorrinneren zu bündeln schien.

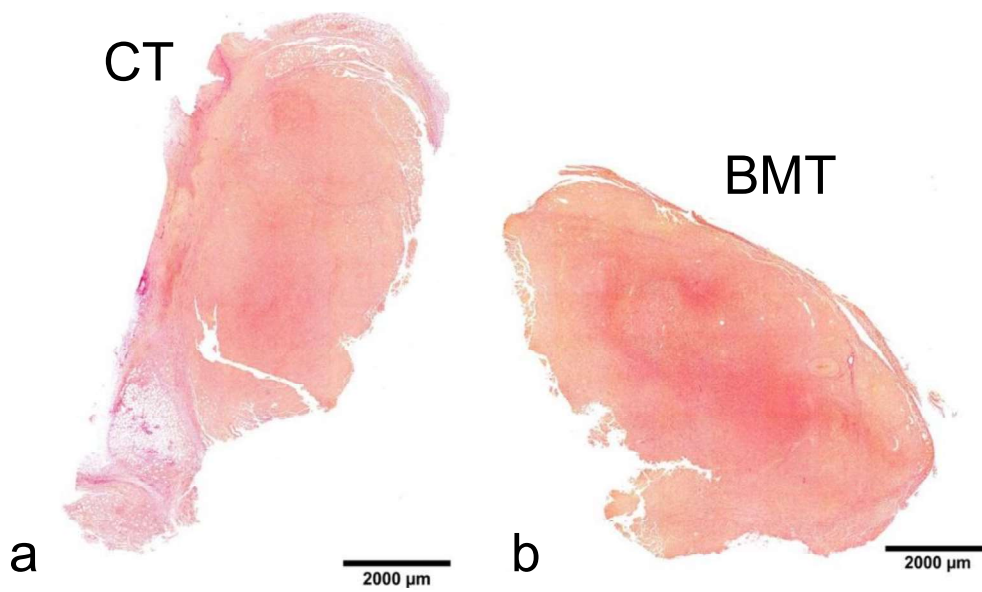


Abbildung 13: Vergleich des kollagenen Netzwerks in der PSR-Färbung.
PSR-gefärbte Tumore aus den Gruppen (a) CT und (b) BMT. Der Unterschied in der Färbeintensität kommt hier gut zur Geltung und ist stellvertretend für die gesamte CT- und BMT-Gruppe. Die BMT-Gruppe hat ein signifikant größeres Kollagenetzwerk als die Kontrolle. Auffällig bei beiden dargestellten Tumoren ist die Kollagenfärbung im Tumorzentrum, welche im Vergleich zur Umgebung deutlich intensiver ausfällt. Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen mit Keyence BZ-9000. PSR: Piko-Siriusrot-Färbung; CT: Carrier tumors; BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb.

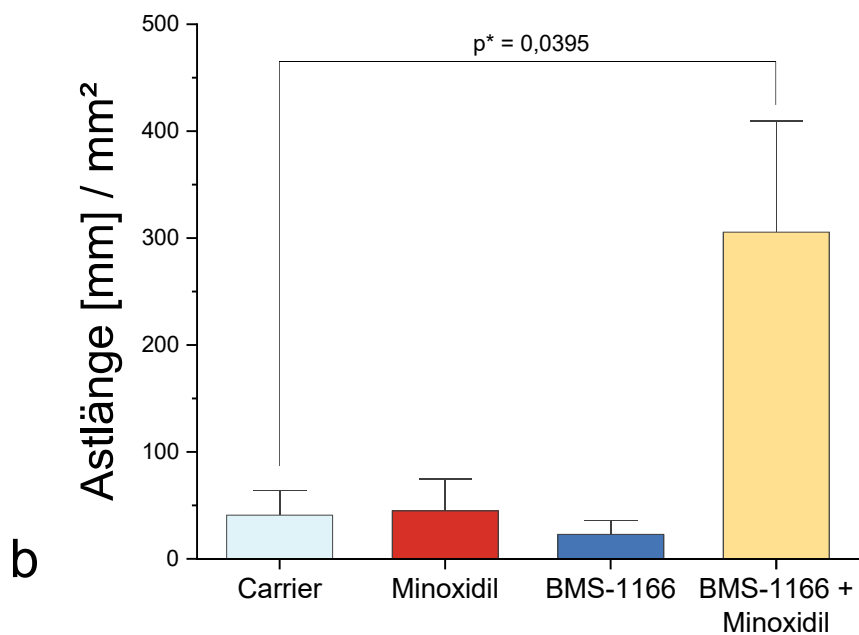
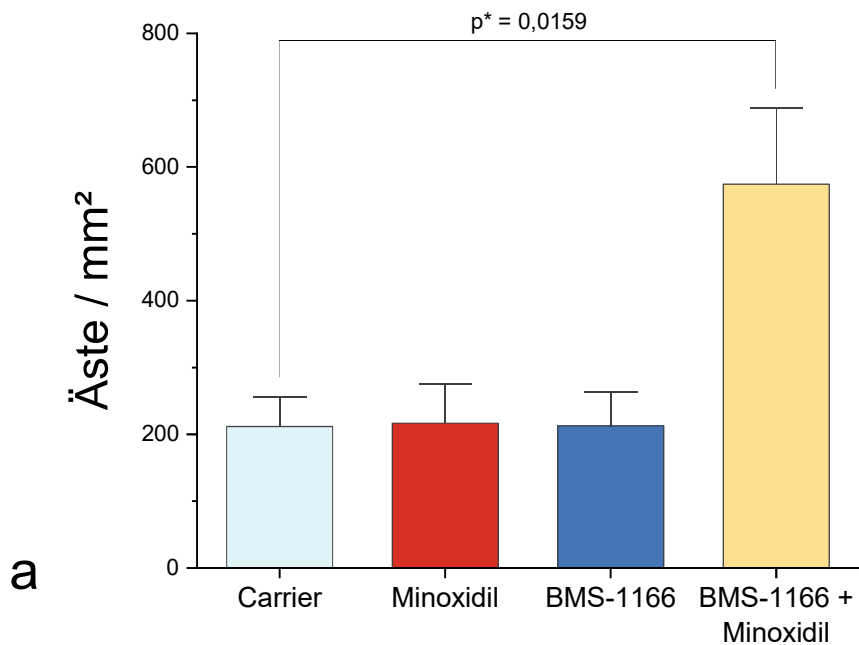


Abbildung 10: Auswertung des Kollagennetzwerks der unterschiedlich behandelten Tumore. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Tumore der BMT-Gruppe hatten das größte und dichteste Kollagennetzwerk. (a) Vergleich der Anzahl an Ästen im kollagenen Netzwerk. Signifikanter Unterschied der BMT-Gruppe zur CT-Gruppe mit einem p-Wert von 1,03 % bei angenommener gleicher Varianz und festgelegtem Signifikanzniveau von 5 %. Die MT- und BT-Gruppe zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied. (b) Vergleich der Gesamtlänge der kollagenen Äste im Tumor. Signifikanter Unterschied der BMT-Gruppe zur CT-Gruppe mit einem p-Wert von 2,67 % bei angenommener gleicher Varianz und festgelegtem Signifikanzniveau von 5 %. Die MT- und BT-Gruppe zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied. SEM: standard error of the mean; BMS: Bristol-Myers Squibb; CT: Carrier tumors; MT: Minoxidil tumors; BT: BMS-1166 tumors; BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; p: p-Wert.

4.3 Auswertung der Tumurvaskularisierung mit Anti-CD31-Antikörper

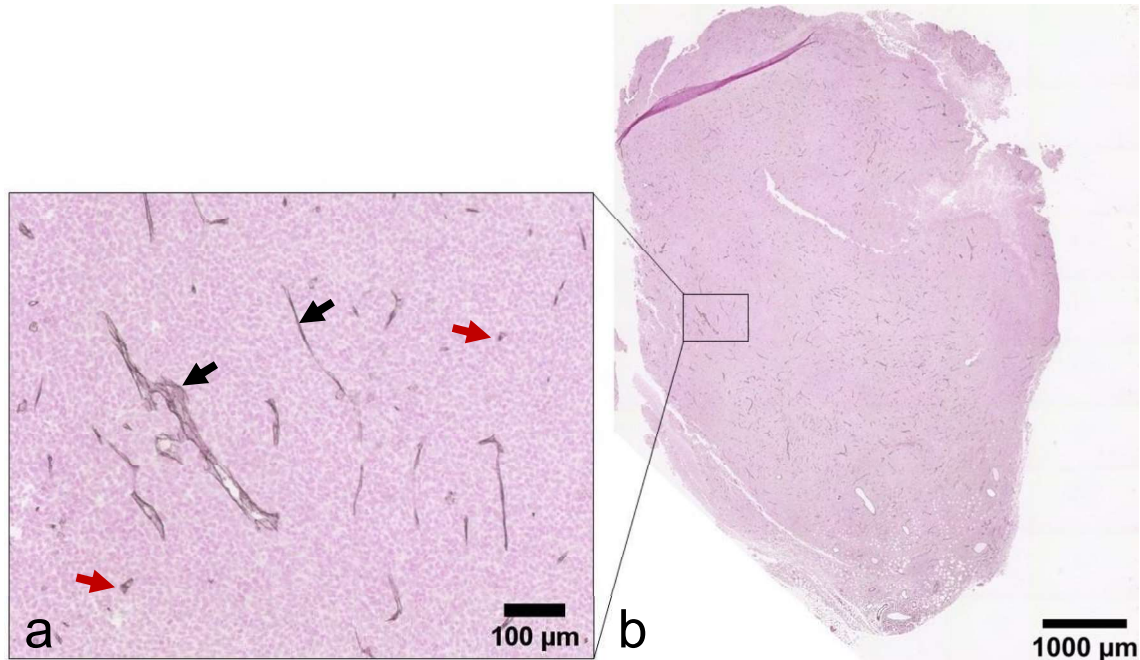


Abbildung 11: DAB-Färbung mit Anti-CD31-Antikörper eines Tumors der BMT-Gruppe.
(a) Bildausschnitt aus der Übersichtsaufnahme. Die braun-schwarz gefärbten Gefäße sind im 5 µm dicken Tumorschnitt entweder längs (schwarze Pfeile) oder quer (rote Pfeile) angeschnitten. (b) Übersichtsaufnahme des gesamten Tumors. Im Rahmen der DAB-Färbung ist eine dunkle Randverfärbung zu beobachten, welche hier gut zu erkennen ist und bei fast allen Tumoren vorkommt. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Keyence BZ-9000. DAB: Diaminobenzidin; BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb.

Die Vaskularisierung der unterschiedlich behandelten Tumore wurde anhand der IHC-Färbung mit dem Anti-CD31-Antikörper (s. Tabelle 8) beurteilt. Das Oberflächenprotein CD31 konzentriert sich vor allem zwischen Endothelzellen, wodurch bei der Färbung Gefäße sichtbar gemacht werden konnten. In Abbildung 11 ist die angefärbte Vaskulatur gut zu erkennen.

Zur Vereinfachung der Handhabung bei der Färbung der 33 Tumore wurde eine Methode etabliert, die es ermöglicht zwei separat gefärbte Probensätze zu vergleichen. Dazu wurden die Tumore aller Behandlungsgruppen in zwei gleich große Sätze aufgeteilt, die dann nacheinander, demselben Protokoll folgend, gefärbt wurden. Jeweils zwei Tumore aus jeder Behandlungsgruppe wurden in beiden Sätzen gefärbt, um Abweichungen zwischen den Färbeansätzen quantifizieren zu können. Dabei ergab sich bei den doppelt gefärbten Tumoren, die zur Kontrolle der Vergleichbarkeit dienten, im direkten Vergleich eine Übereinstimmung von 97,23 % und eine Standardabweichung von 9,76 %. Diese

geringe Abweichung wurde als vertretbar angenommen und machte eine Gesamtauswertung aller CD31-gefärbten Tumore möglich. Dabei floss für die doppelt gefärbten Tumore der jeweilige Mittelwert in die Auswertung ein. Eine Gegenüberstellung eines Tumors, der in beiden Färbeansätzen gefärbt wurde, ist in Abbildung 12 gezeigt.

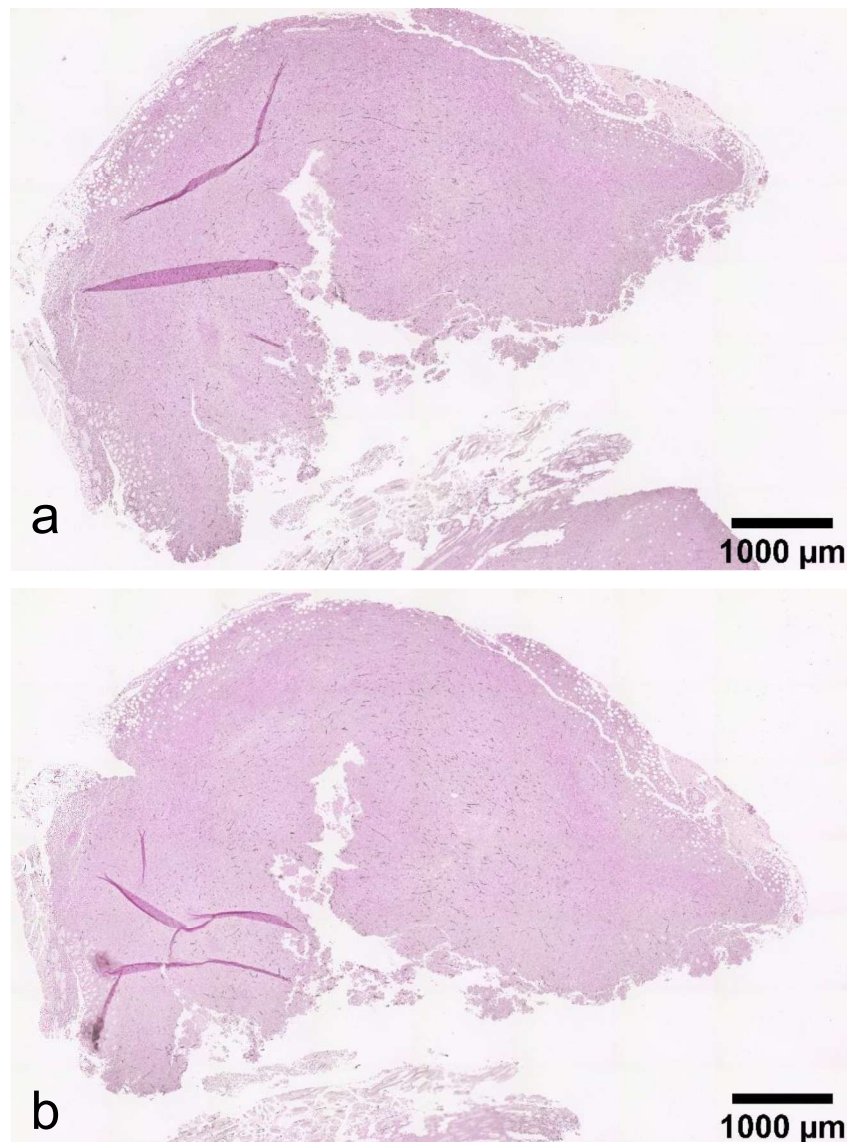


Abbildung 12: Gegenüberstellung zweier separat gefärbten Tumorschnitte des gleichen Tumors. DAB-Färbungen mit Anti-CD31-Antikörper. Dieser Minoxidil-behandelte Tumor wurde bei beiden Färbeansätzen mitgefärbt, um in der Auswertung die Vergleichbarkeit der zwei Proben beurteilen zu können. (a) Tumor aus der ersten DAB-Färbung. Unter Aussparung von Nekrose, Falten und Randverfärbungen wies dieser Tumor einen Anteil von 3,32 % an CD31-positiver Tumorfläche auf. (b) Tumor aus der zweiten DAB-Färbung. Unter Aussparung von Nekrose, Falten und Randverfärbungen wies dieser Tumor einen Anteil von 3,14 % an CD31-positiver Tumorfläche auf. Der direkte Vergleich dieser beiden Werte ergab 105,73 %. Insgesamt lag der direkte Vergleich aller doppelt gefärbten Tumore bei 97,23 % und die Standardabweichung bei 9,76 %. Durch diese gute Übereinstimmung konnten die Tumore der beiden Färbeansätze gemeinsam ausgewertet werden. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Keyence BZ-9000. DAB: Diaminobenzidin; MT: Minoxidil tumors.

In dieser Auswertung können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Mittelwerte der prozentualen Gefäßdichte am intakten Tumorgewebe betragen bei allen vier Behandlungsgruppen zwischen drei und vier Prozent. Mit $3,96 \pm 0,41$ % CD31-positiver Tumorfläche wies die Kontrollgruppe die größte Gefäßdichte auf. Das Mittelfeld bildeten die BT-Gruppe mit $3,48 \pm 0,25$ % und die MT-Gruppe mit $3,14 \pm 0,21$ % CD31-positiver Tumorfläche. Die geringste Gefäßdichte besaß die BMT-Gruppe mit $3,04 \pm 0,32$ % CD31-positiver Tumorfläche. Eine übersichtliche Darstellung dieser Auswertung ist der Abbildung 13 zu entnehmen.

Die Kontrolltumore hatten gegenüber den anderen Behandlungsgruppen tendenziell eine höhere Gefäßdichte. Es konnte hier allerdings nicht mit statistischer Sicherheit nachgewiesen werden, dass durch Behandlung mit Minoxidil, BMS-1166 oder deren Kombination wirklich eine Verringerung der Gefäßdichte erzielt wurde.

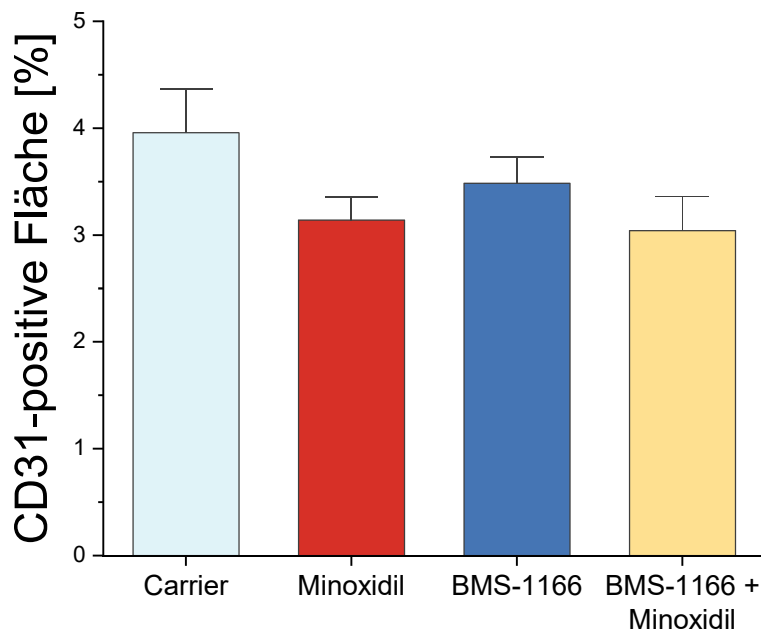
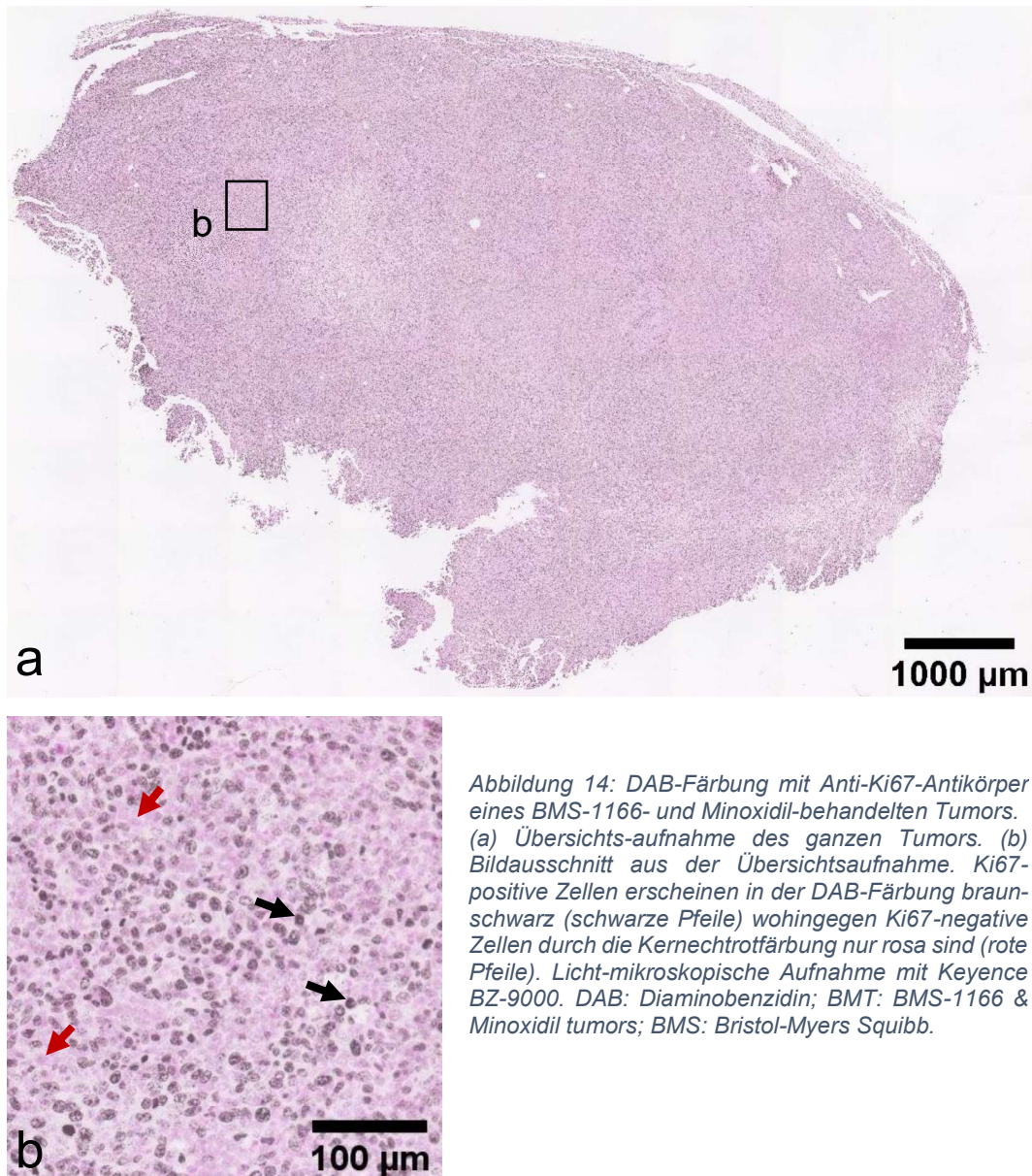


Abbildung 13: Auswertung der prozentualen Anteile an CD31-positiver Fläche am intakten Tumorgewebe. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Mit Mittelwerten von 3-4 % verfügten alle Behandlungsgruppen über eine ähnliche Gefäßdichte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte keine der Behandlungsgruppen MT, BT und BMT einen signifikanten Unterschied. SEM: standard error of the mean; MT: Minoxidil tumors; BT: BMS-1166 tumors; BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb.

4.4 Auswertung der Zellteilungsaktivität mit Anti-Ki67-Antikörper



Um die Zellteilungsaktivität der Tumore zu untersuchen, wurde der Proliferationsmarker Ki67 mit dem Anti-Ki67-Antikörper (s. Tabelle 8) durch eine IHC-Färbung sichtbar gemacht. Die Färbung ist in Abbildung 14 dargestellt. Auch hier wurde analog zur vorigen Färbung versucht die Handhabung durch zwei separate Färbeansätze zu vereinfachen. Im Gegensatz zur Gefäßfärbung waren die Werte bei der Ki67-Färbung jedoch nicht vergleichbar. Sie weichten zu stark und unregelmäßig in beide Richtungen voneinander ab. Ein weiterer Versuch zur Vereinfachung der Handhabung wurde nicht unternommen.

Alle 16 Objektträger mit insgesamt 33 Tumoren wurden in einem Färbetrog gefärbt und dann zusammen ausgewertet.

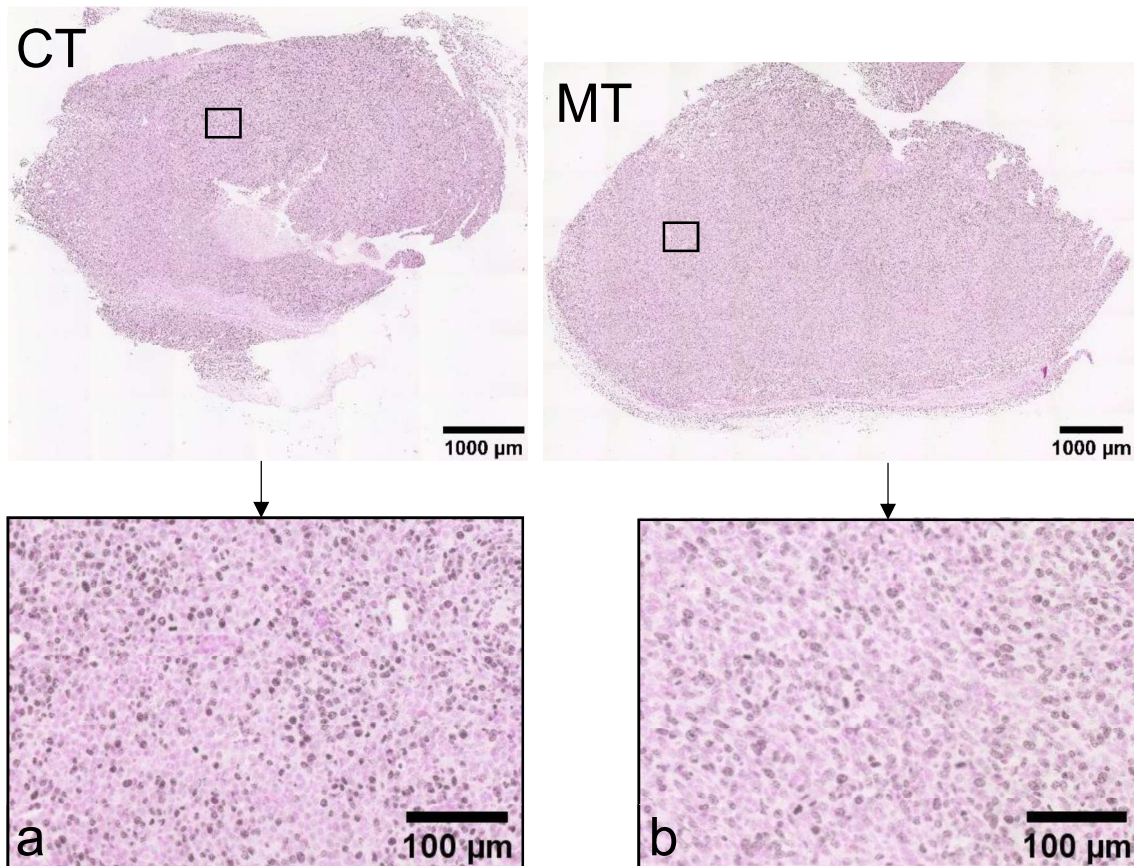


Abbildung 15: Vergleich der Zellteilungsaktivität in der DAB-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper. Signifikant weniger Ki67-positive Zellen bei Minoxidil-behandelten Tumoren im Vergleich zu Tumoren der Kontrollgruppe. (a) Kontrolltumor: insgesamt wurden 596,03 Ki67-positive Zellen pro Quadratmillimeter Tumorfäche registriert. (b) Minoxidil-behandelter Tumor: insgesamt wurden 246,84 Ki67-positive Zellen pro Quadratmillimeter Tumorfäche registriert. Beide Tumore spiegeln in etwa den Mittelwert der gesamten jeweiligen Behandlungsgruppe wider. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Keyence BZ-9000. (□) vergrößerter Bildausschnitt. DAB: Diaminobenzidin.

Nach der quantitativen Auswertung zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied nur bei der Minoxidil-Monotherapie. In der CT-Gruppe waren durchschnittlich $679,08 \pm 118,79$ Ki67-positive Zellen pro mm^2 Tumorfäche zu finden. Im Gegensatz dazu war bei der MT-Gruppe ein geringerer Mittelwert von $320,75 \pm 62,12$ Ki67-positiven Zellen pro mm^2 Tumorfäche zu verzeichnen. Die beiden Gruppen waren mit einem p-Wert von 1,82 % signifikant unterschiedlich. Ein exemplarischer Vergleich von zwei Tumoren aus der CT- und der MT- Gruppe ist in Abbildung 15 dargestellt. In der BT-Gruppe wurden $734,62 \pm 74,45$ und in der BMT-Gruppe $558,95 \pm 118,02$ Ki67-positive Zellen pro mm^2 Tumorfäche registriert. Im Vergleich zur Kontrolle konnten

sowohl bei der BT- als auch bei der BMT-Gruppe keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Zusammengefasst zeigte sich in Minoxidil-behandelten Tumoren die geringste Zellteilungsaktivität. Ausgehend von der Kontrolle konnte die Reduzierung der Zellteilungsaktivität bei Minoxidil-Behandlung mit statistischer Sicherheit nachgewiesen werden.

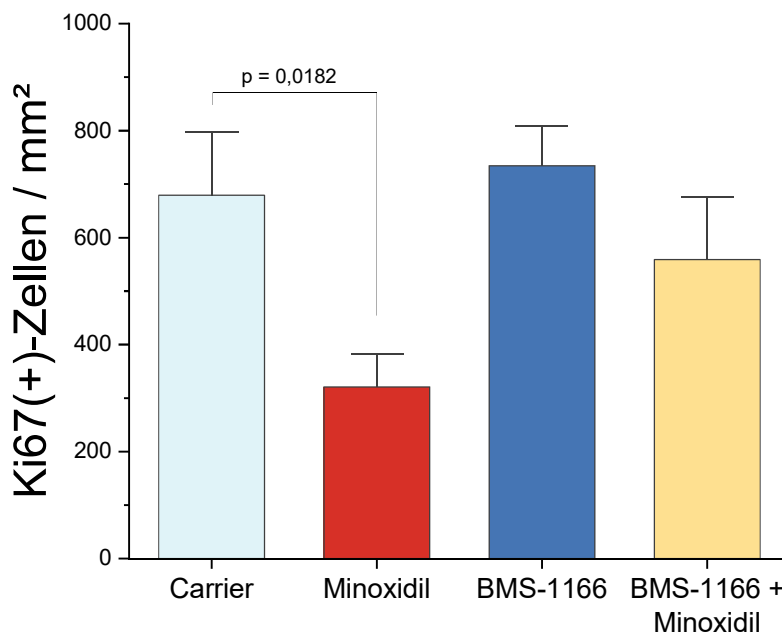


Abbildung 16: Auswertung der Anzahl an Ki67-positiven Zellen pro mm² Tumorfläche. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Die Monotherapie mit Minoxidil wies mit einem p-Wert von 1,82 % eine signifikant geringere Zellteilungsaktivität verglichen mit der Kontrolle auf. Die BT- und BMT-Gruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. SEM: standard error of the mean; BMS: Bristol-Myers Squibb; BT: BMS-166 tumors; BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; p: p-Wert.

4.5 Auswertung der Makrophagendichte mit Anti-F4/80-Antikörper

Anhand der IF-Färbung mit den Antikörpern Anti-F4/80 und Anti-CD31 wurde die Situation bezüglich der Infiltration mit Makrophagen beurteilt. In der IF-Aufnahme flossen die Informationen des Makrophagenmarkers F4/80 und des Endothelzellmarkers CD31 zusammen. Dabei konnte eine mögliche Lageabhängigkeit voneinander beurteilt werden.

Von 17 gefärbten Tumoren wurden lediglich 16 Tumore bei der Auswertung berücksichtigt. Ein Tumor (MT3-Tumor 1) konnte wegen massiven Aufkommens von Fettzellen nicht ausgewertet werden. An der ausgewerteten Tumorfläche der Kontrollgruppe waren im Durchschnitt $2,01 \pm 0,26$ % der Fläche CD31-positiv und $3,38 \pm 1,66$ % der Fläche F4/80-positiv. Im Vergleich dazu weichte in dieser Auswertung lediglich ein Wert signifikant ab. In der BMT-Gruppe wurde mit $2,88 \pm 0,17$ % signifikant mehr CD31-positive Fläche registriert. Der Anteil der F4/80-positiven Fläche an der ausgewerteten Tumorfläche ähnelte mit einem Mittelwert von $3,53 \pm 1,33$ % aber dem der Kontrollgruppe. Verglichen mit der Kontrolle wurden bei den Monotherapien keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Die BT-Gruppe zeigte durchschnittlich $1,75 \pm 0,20$ % CD31-positiv und $3,55 \pm 0,99$ % F4/80-positiv Flächen. Bei der MT-Gruppe machten die CD31-positiven Flächen einen Anteil von $1,05 \pm 0,53$ % und die F4/80-positiven Flächen einen Anteil von $1,16 \pm 0,21$ % aus. Eine graphische Gegenüberstellung aller Werte ist in Abbildung 17 gezeigt.

Ein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Behandlungen auf die Makrophagendichte und die Verteilung von Makrophagen im Tumor konnte in keiner Behandlungsgruppe festgestellt werden.

Allerdings ist in der BMT-Gruppe eine besondere Aufnahme gelungen. In Abbildung 18 ist eine Aufnahme gezeigt, bei der eine invasive Zone getroffen wurde. Dies ist an den noch intakten Anschnitten der Milchdrüsen-Ausführungsgänge zu erkennen. Hier sammeln sich im Vergleich zur restlichen Tumorfläche überdurchschnittlich viele Makrophagen. Zum Vergleich ist eine Aufnahme eines BMS-1166- und Minoxidil-behandelten Tumors in Abbildung 19 gezeigt, die keine Anzeichen einer invasiven Tumorregion aufweist.

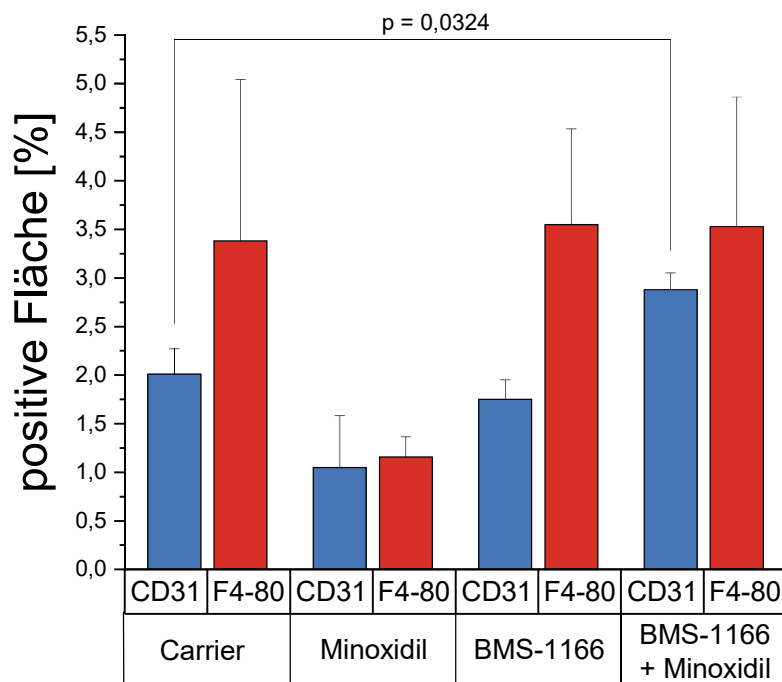


Abbildung 17: Auswertung der CD31- und F4/80-positiven Flächen an der ausgewerteten Tumorfläche. Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Signifikante Unterschiede in der Makrophagendichte konnten keine festgestellt werden. Einzig die BMT-Gruppe zeigte bezüglich des Anteils an CD31-positiver Fläche mit einem p-Wert von 3,24 % einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. SEM: standard error of the mean; MT: Minoxidil tumors; BT: BMS-1166 tumors; BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb p: p-Wert.

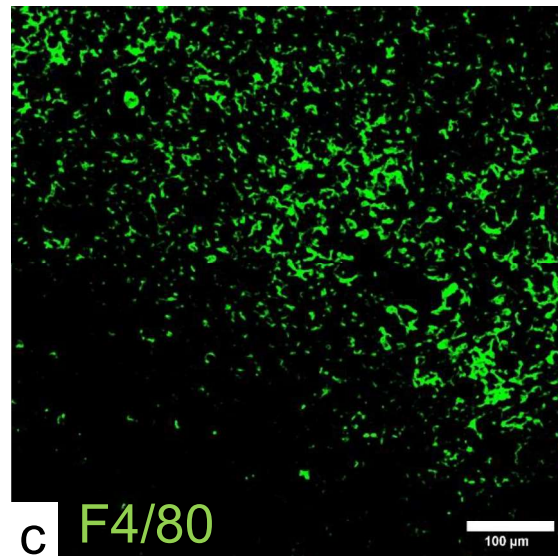
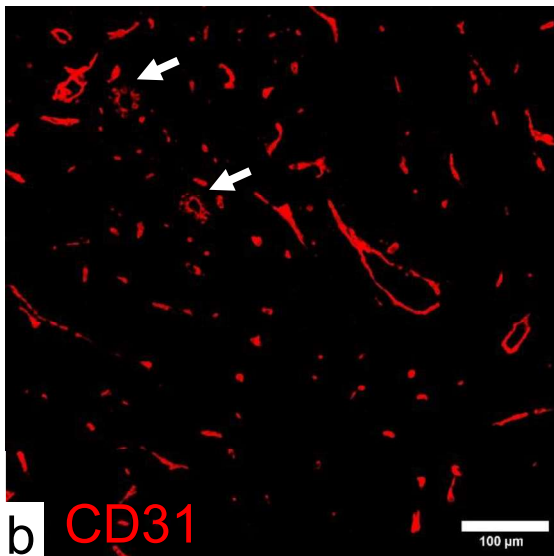
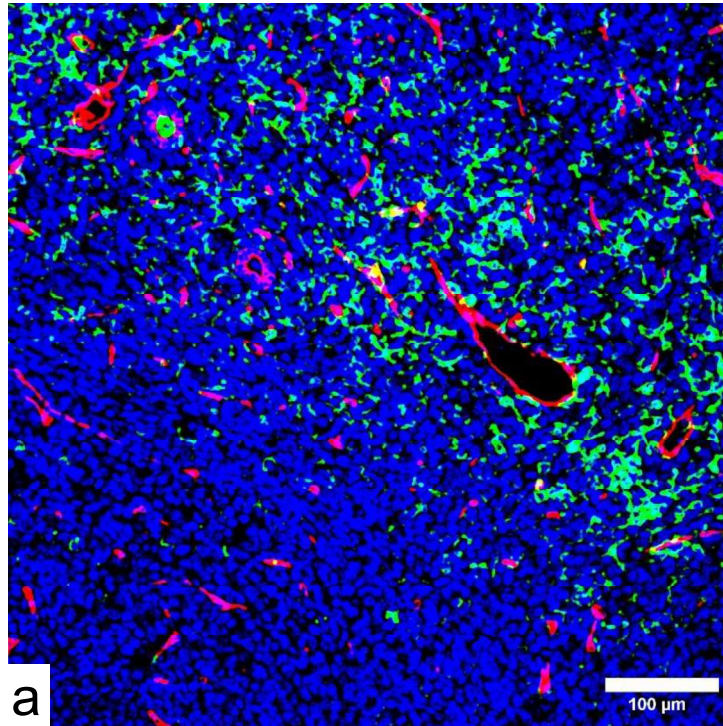


Abbildung 18: Invasive Tumorregion in IF-Färbung mit Anti-CD31- und Anti-F4/80-Antikörper. Hohes Aufkommen von Makrophagen in invasiver Tumorregion eines BMS-1166- und Minoxidil-behandelten Tumors. (a) zeigt die bearbeitete Aufnahme mit überlagernden Signalen abzüglich der Hintergrundsignale und herausgefilterten unspezifischen Nebensignalen. Sie ist in folgende Kanäle aufgetrennt: (b) Cy3-Kanal 561,0 nm und (c) Alexa647-Kanal 647 nm. Dabei sind die Signale von DAPI blau, von Anti-CD31 rot und von Anti-F4/80 grün. In (b) sind die Ausführungsgänge der Milchdrüsen markiert. In (c) ist die große Ansammlung von F4/80-positiven Makrophagen in diesem Bereich zu sehen. (←): Drüsen-Ausführungsgänge. Konfokale Mikroskopaufnahme mit Nikon Eclipse Ti-AI. BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol.

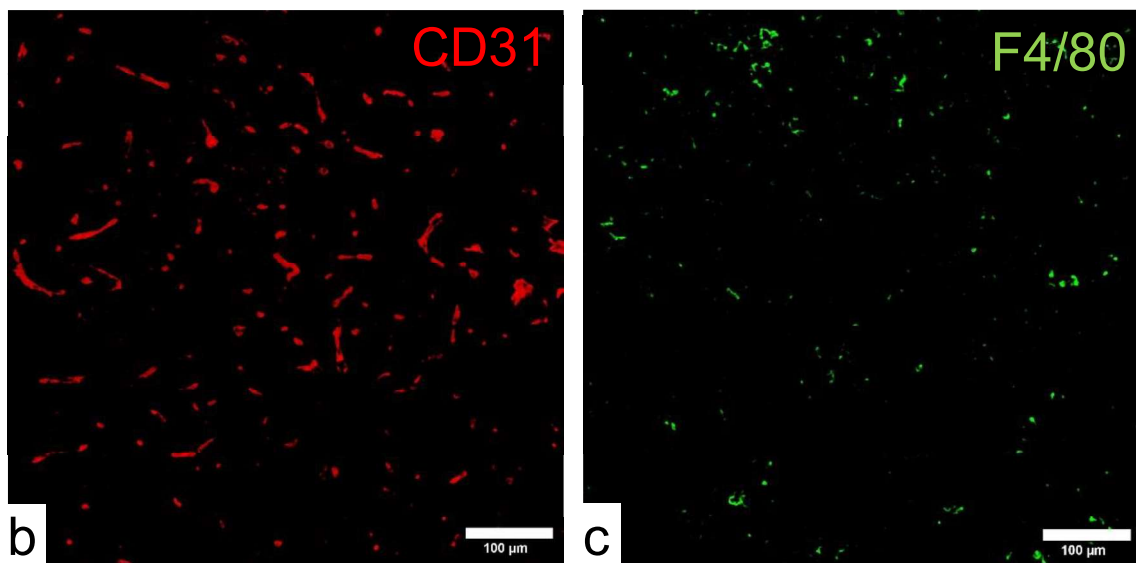
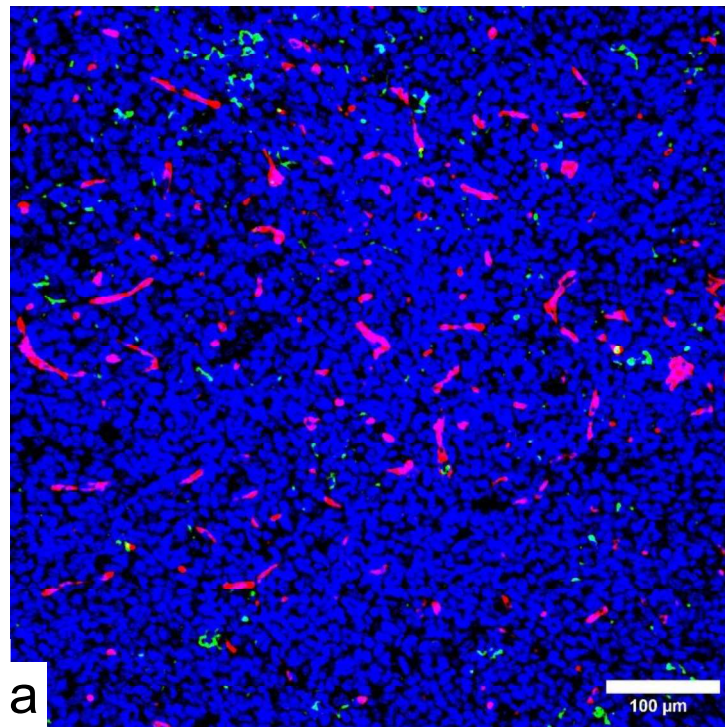


Abbildung 19: IF-Färbung eines Tumors der BMT-Gruppe mit Anti-CD31- und Anti-F4/80-Antikörper. (a) zeigt die bearbeitete Aufnahme mit überlagernden Signalen abzüglich der Hintergrundsignale und herausgefilterten unspezifischen Nebensignalen. Sie ist in folgende Kanäle aufgetrennt: (b) Cy3-Kanal 561,0 nm und (c) Alexa647-Kanal 647 nm. Dabei sind die Signale von DAPI blau, von Anti-CD31 rot und von Anti-F4/80 grün. Konfokale Mikroskopaufnahme mit Nikon Eclipse Ti-AI. BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol.

4.6 Auswertung der Anzahl an CD4- und CD8-positiven Zellen

In einer weiteren IF-Färbung mit den Antikörpern Anti-CD4 und Anti-CD8 konnten Rückschlüsse auf die Infiltration und auch auf das Verhältnis von CD4- zu CD8-positiven Immunzellen gezogen werden. CD4- und CD8-positive Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems und erkennen Antigene, welche über MHC-II beziehungsweise MHC-I präsentiert werden. CD8-positive Zellen fungieren dabei als cytotoxische T-Zellen (Bröker et al., 2019).

Dieser IF-Doppelfärbung gingen mehrere Versuche einer Dreifachfärbung mit zusätzlicher Anti-CD31-Antikörper zur Anfärbung der Gefäße voraus. Es gelang jedoch nicht die Signale aller drei Antikörper eindeutig hervorzubringen. Aus diesem Grund wurde auf die Dreifachfärbung verzichtet und der finale Versuch nur mit Anti-CD4- und Anti-CD8-Antikörper durchgeführt. Daher war keine Aussage zu einer möglichen Lagebeziehung von Gefäßen und Immunzellen zu machen.

Bei der Auswertung der 25 gefärbten Tumore war festzustellen, dass grundsätzlich in allen Behandlungsgruppen mehr CD4-positive als CD8-positive T-Zellen vorkamen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich beim Vergleich mit der Kontrollgruppe lediglich bei der MT-Gruppe in der Anzahl an CD8-positiven Zellen. Die Kontrollgruppe besaß im Durchschnitt $37,16 \pm 9,67$ CD8-positive Zellen pro mm^2 Tumorfläche. Im Vergleich dazu waren es in der MT-Gruppe durchschnittlich $11,93 \pm 4,18$ CD8-positive Zellen pro mm^2 Tumorfläche. Dies stellte mit einem p-Wert von 3,77 % einen signifikanten Unterschied dar. Bezüglich der CD4-positiven Zellen zeigten die Mittelwerte von $79,58 \pm 21,38$ für die MT-Gruppe und $108,97 \pm 21,05$ für die Kontrolle aber keine signifikante Abweichung. Zur Veranschaulichung ist anschließend jeweils eine Ausschnittsaufnahme eines Tumors aus der Kontrollgruppe und der MT-Gruppe dargestellt. Die Abbildung 20 zeigt dabei die Kontrollgruppe und die Abbildung 21 die MT-Gruppe. Die BT- und die BMT-Gruppe hatten ähnlich viele CD8-positive Zellen vorzuweisen wie die Kontrollgruppe. In der BT-Gruppe waren es durchschnittlich $38,23 \pm 13,60$ CD8-positive Zellen und in der BMT-Gruppe durchschnittlich $37,34 \pm 6,32$ CD8-positive Zellen. Mit $82,74 \pm 23,91$ CD4-positiven Zellen bewegte sich die BT-Gruppe, sowie auch die BMT-Gruppe mit $89,67 \pm 14,67$ CD4-positiven Zellen im Mittelfeld. Eine übersichtliche Darstellung dieser Auswertung ist in Abbildung 22 gezeigt.

Die Behandlungen mit Minoxidil, BMS-1166 und deren Kombination hatten keinen Einfluss auf die Anzahl an CD4-positiven T-Helferzellen. Eine signifikante Reduzierung der Anzahl an CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen wurde durch die Monotherapie mit Minoxidil beobachtet.

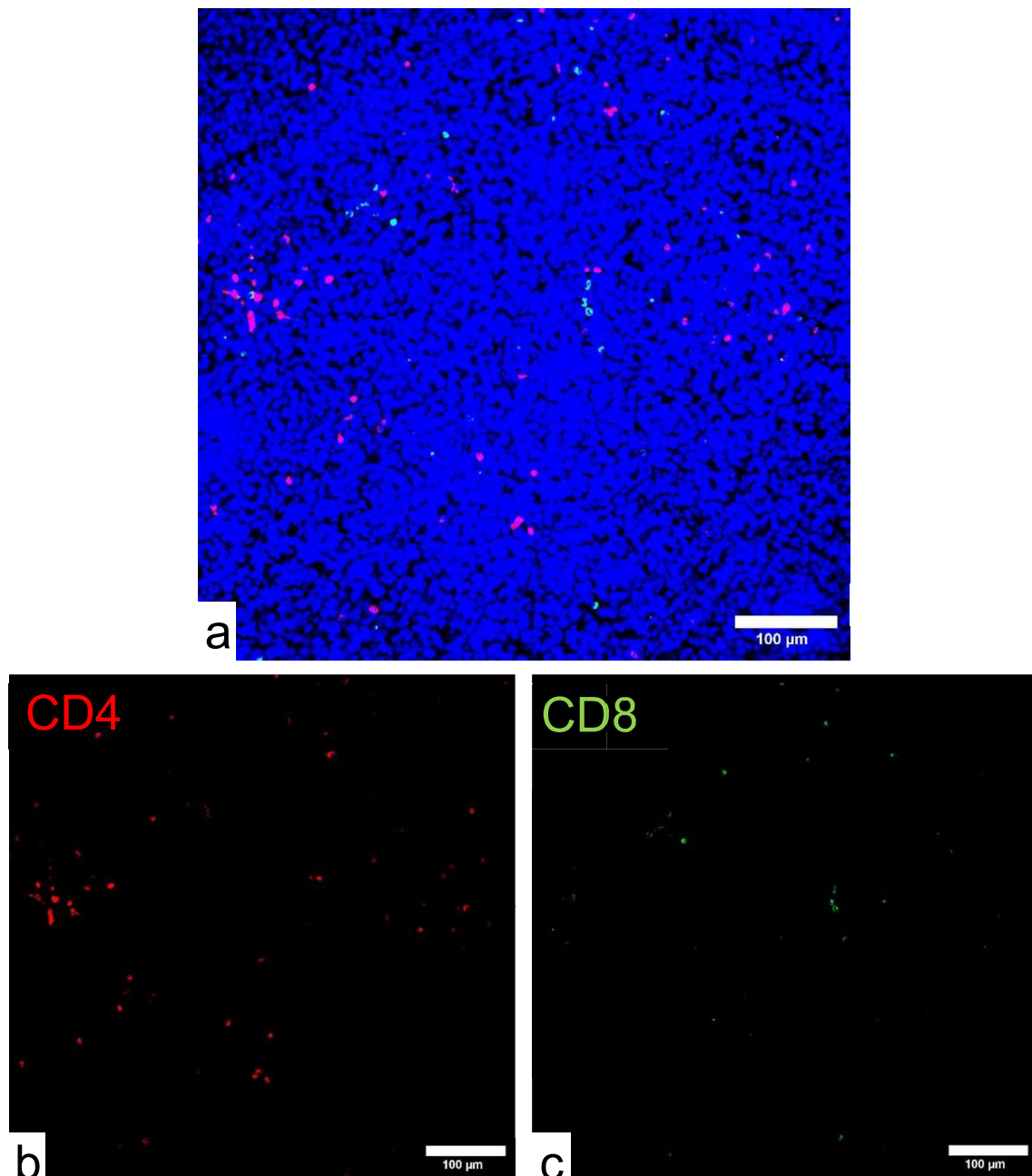


Abbildung 20: Verteilung von CD4- und CD8-positiven Zellen in einem Kontrolltumor. (a) zeigt die bearbeitete Aufnahme mit überlagernden Signalen abzüglich der Hintergrundsignale und herausgefilterten unspezifischen Nebensignalen. Sie ist in folgende Kanäle aufgetrennt: (b) Cy3-Kanal 561,0 nm und (c) Alexa647-Kanal 647 nm. Dabei sind die Signale von DAPI blau, von Anti-CD4 rot und von Anti-CD8 grün. Konfokale Mikroskopaufnahme mit Nikon Eclipse Ti-AI. DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol.

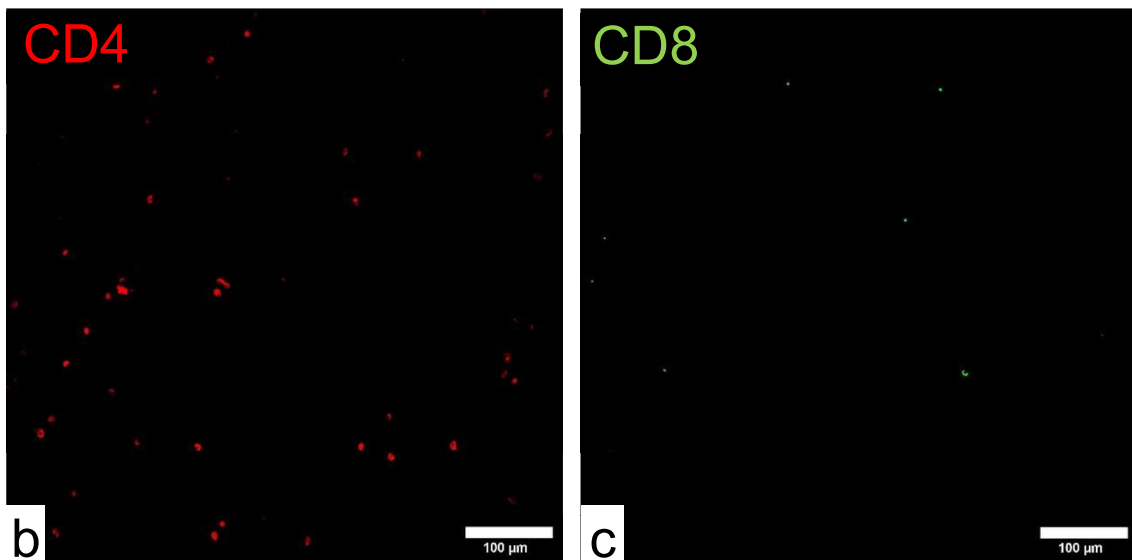
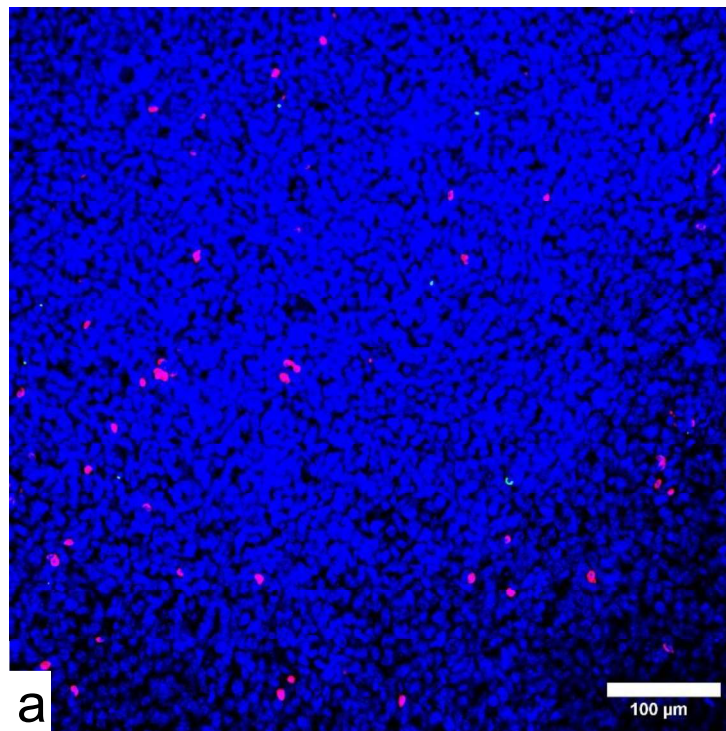


Abbildung 21: Verteilung von CD4- und CD8-positiven Zellen in einem Minoxidil-behandeltem Tumor. (a) zeigt die bearbeitete Aufnahme mit überlagernden Signalen abzüglich der Hintergrundsignale und herausgefilterten unspezifischen Nebensignalen. Sie ist in folgende Kanäle aufgetrennt: (b) Cy3-Kanal 561,0 nm und (c) Alexa647-Kanal 647 nm. Dabei sind die Signale von DAPI blau, von Anti-CD4 rot und von Anti-CD8 grün. Konfokale Mikroskopaufnahme mit Nikon Eclipse Ti-AI. DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol.

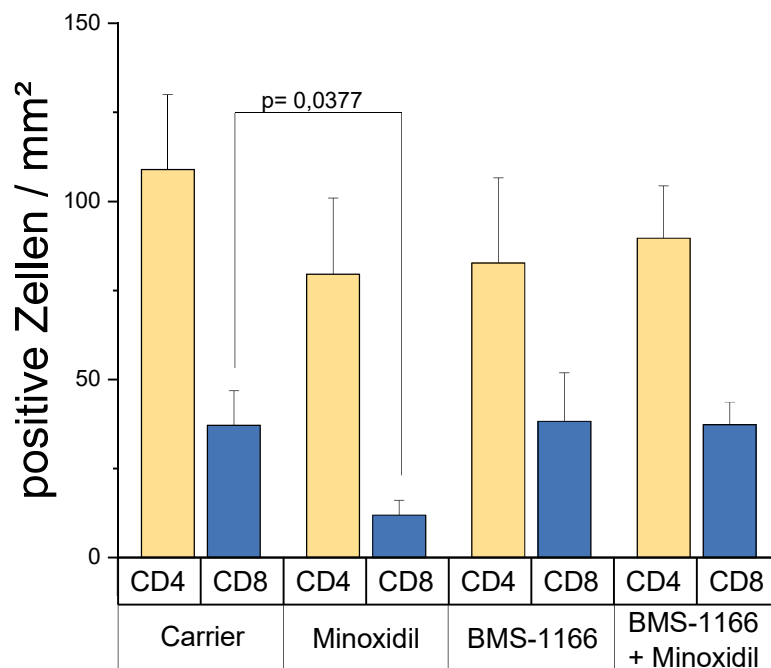


Abbildung 22: Auswertung der Anzahl an CD4- und CD8-positiven Zellen an der ausgewerteten Tumorfläche.

Angegeben sind die Mittelwerte mit SEM. Insgesamt wurden in jeder Behandlungsgruppe weniger CD8- positive Zellen als CD4- positive Zellen registriert. Die BT- und BMT-Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. In der MT-Gruppe waren mit einem p-Wert von 3,77 % signifikant weniger CD8- positiven Zellen als in der Kontrolle vorhanden. SEM: standard error of the mean; MT: Minoxidil tumors; BT: BMS-1166 tumors; BMT: BMS-1166 & Minoxidil tumors; BMS: Bristol-Myers Squibb p: p-Wert.

4.7 Auswertung von Lungenmetastasen

Eine quantitative Auswertung der Metastasen in den insgesamt 17 Lungen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen wurde durch die H.E.-Übersichtsfärbung ermöglicht. Es war festzustellen, dass in jeder Behandlungsgruppe Metastasen vorkamen. Sie waren im gesamten Lungenparenchym anzufinden, vor allem aber um die Bronchien und Bronchiolen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe konnten allerdings nicht ausgemacht werden. Die Kontrollgruppe hatte mit $0,39 \pm 0,17$ im Durchschnitt die meisten Metastasen pro Quadratmillimeter Lungenfläche. Die Behandlungsgruppen ML und BL bewegten sich in ihrer durchschnittlichen Anzahl an Metastasen pro mm^2 Lungenfläche auf ähnlichem Niveau. Die ML-Gruppe wies einen Wert von $0,28 \pm 0,18$ und die BL-Gruppe einen Wert von $0,28 \pm 0,13$ auf. In der BML-Gruppe kamen mit $0,06 \pm 0,02$ Metastasen pro mm^2 Lungenfläche durchschnittlich die wenigsten Metastasen vor. In Abbildung 23 a ist die Auswertung dazu graphisch gezeigt.

Von Interesse war nicht nur die Anzahl, sondern auch die Größe der Lungenmetastasen. Dazu wurden die absoluten Größen der einzelnen Metastasen bestimmt und analysiert. In Abbildung 23 b sind die einzelnen Werte jeder Behandlungsgruppe gegeneinander aufgetragen. In der Kontrollgruppe besaßen die Metastasen eine durchschnittliche Größe von $0,02 \pm 0,00 \text{ mm}^2$. Im Vergleich dazu waren die Metastasen der BML-Gruppe mit einer mittleren Größe von $0,11 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ und die Metastasen der ML-Gruppe mit durchschnittlich $0,22 \pm 0,15 \text{ mm}^2$ signifikant größer. Dabei betrug der p-Wert für die BML-Gruppe 4,45 % und für die ML-Gruppe 2,65 %. Die Metastasen der BL-Gruppe ähnelten in ihrer Größe mit einem Mittelwert von $0,03 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ denen der Kontrollgruppe.

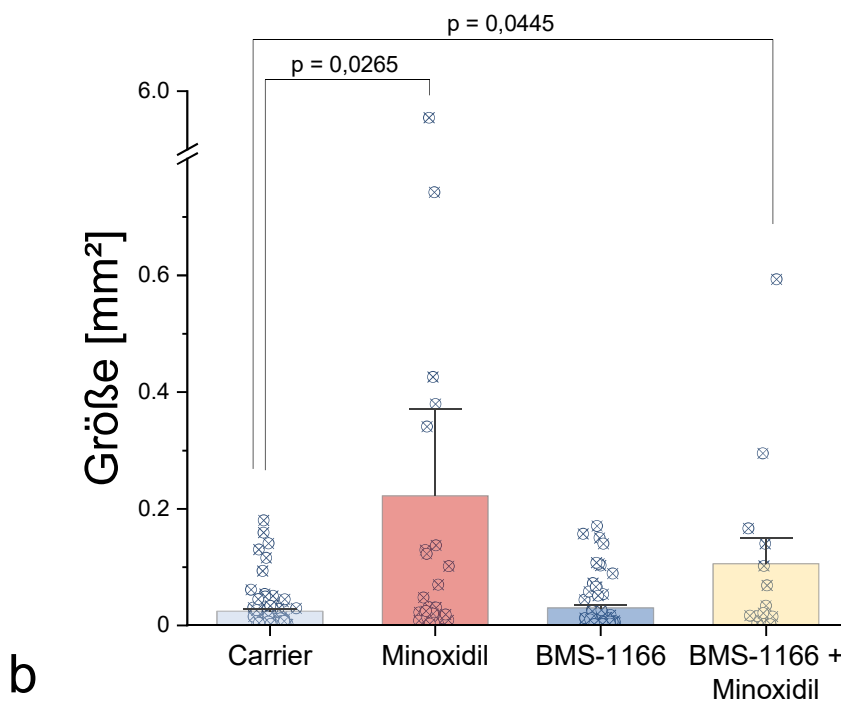
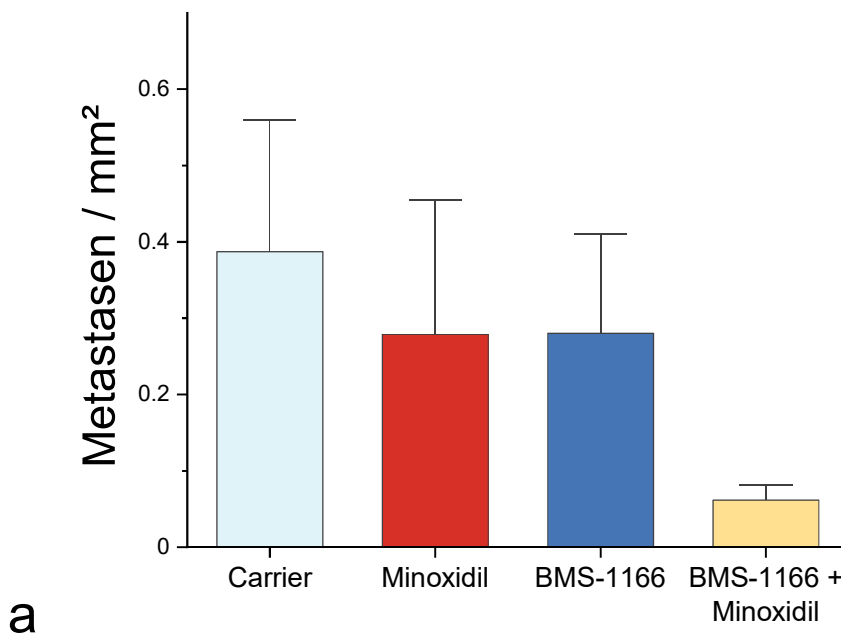


Abbildung 23: Statistische Auswertung der Lungenmetastasen.

(a) Vergleich der Anzahl an Lungenmetastasen pro Quadratmillimeter Lungenfläche in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen. (b) Vergleich der absoluten Größe von Metastasen in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte jeder Behandlungsgruppe. In (b) sind zusätzlich die einzelnen Messwerte im Säulendiagramm dargestellt. Die Fehlerbalken sind in positiver Richtung dargestellt und geben den SEM an. Die Metastasen der Kombinationstherapie sind zwar tendenziell weniger, dafür aber signifikant größer. Dabei ist das Signifikanzniveau auf 5 % festgelegt und die gleiche Varianz wird angenommen. SEM: standard error of the mean; ML: Minoxidil lungs; BL: BMS-1166 lungs; BML: BMS-1166 & Minoxidil lungs; BMS: Bristol-Myers Squibb.

Die Kombinationsbehandlung mit BMS-1166 und Minoxidil hatte Auswirkungen auf Lungenmetastasen. Hier fanden sich im Vergleich zur Kontrolle zwar tendenziell weniger, dafür aber größere Metastasen in den Lungen. Die Abbildung 24 zeigt diese Beobachtung exemplarisch. Minoxidil hatte dabei nicht nur in Kombination, sondern auch als Monotherapie Einfluss auf die Größe der Lungenmetastasen.

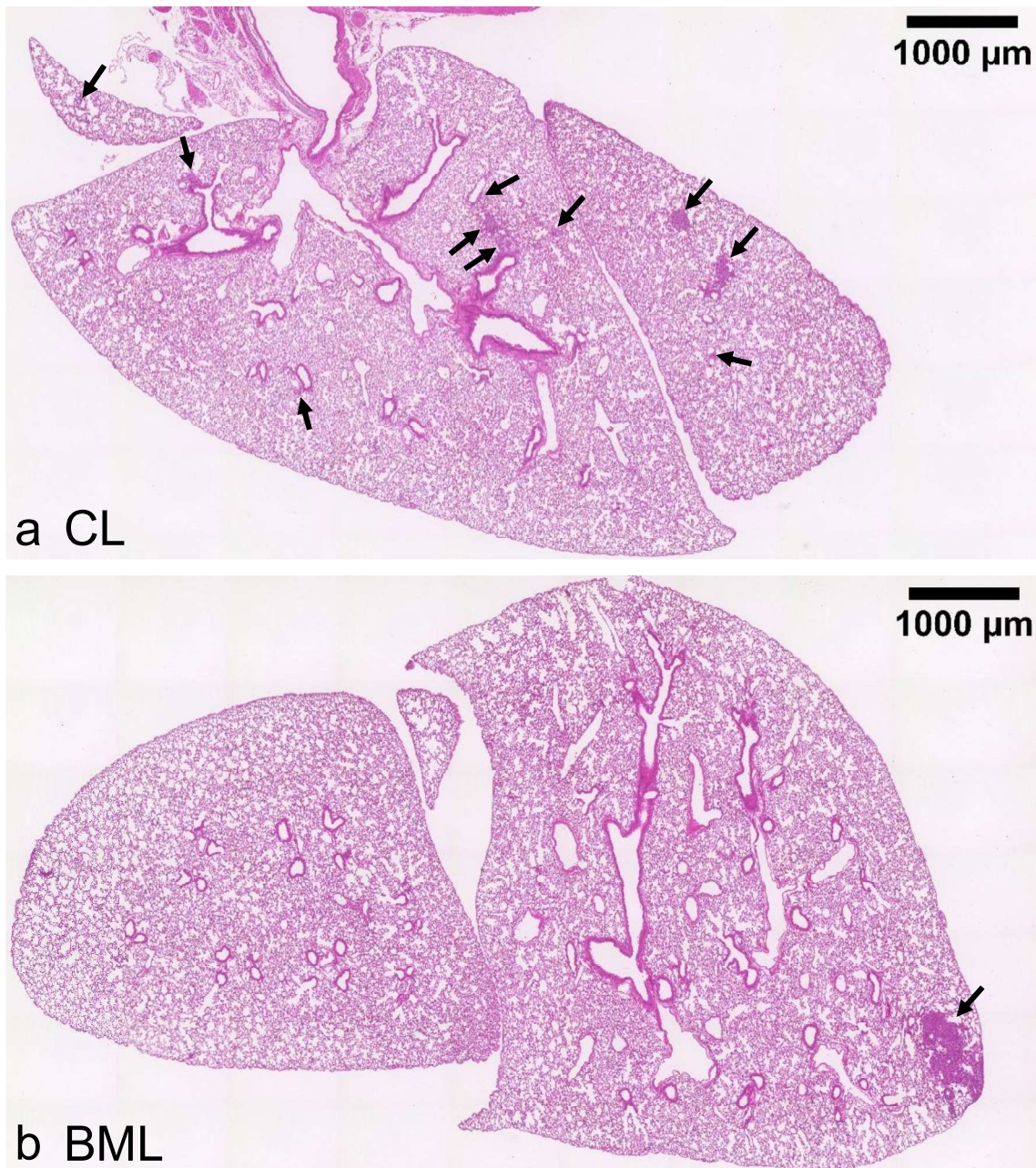


Abbildung 2449: H.E.-gefärbte Lungenflügel der Behandlungsgruppen (a) CL und (b) BML. Die Metastasen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Der Größenunterschied der Metastasen zwischen den beiden Behandlungsgruppen ist deutlich zu erkennen. In (a) sind ein Zehntel mehr Metastasen als in (b) zu finden. Licht-mikroskopische Übersichtsaufnahmen mit Keyence BZ-9000. (→): Metastase. H.E.: Hämatoxylin-Eosin; CL: Carrier lungs; BML: BMS-1166 & Minoxidil lungs; BMS: Bristol-Myers Squibb.

Eine Aussage über den Aufbau der Metastasen sollte bei der Auswertung der PSR-gefärbten Lungen getroffen werden. Allerdings zeigten die Metastasen innerhalb derselben Behandlungsgruppe eine sehr hohe Heterogenität. Dies erschwerte die Vergleichbarkeit und die Klassifizierung und verhinderte eine repräsentative Auswertung. Am Beispiel der Kontrollgruppe wird die Heterogenität der Lungenmetastasen in Abbildung 25 aufgezeigt.

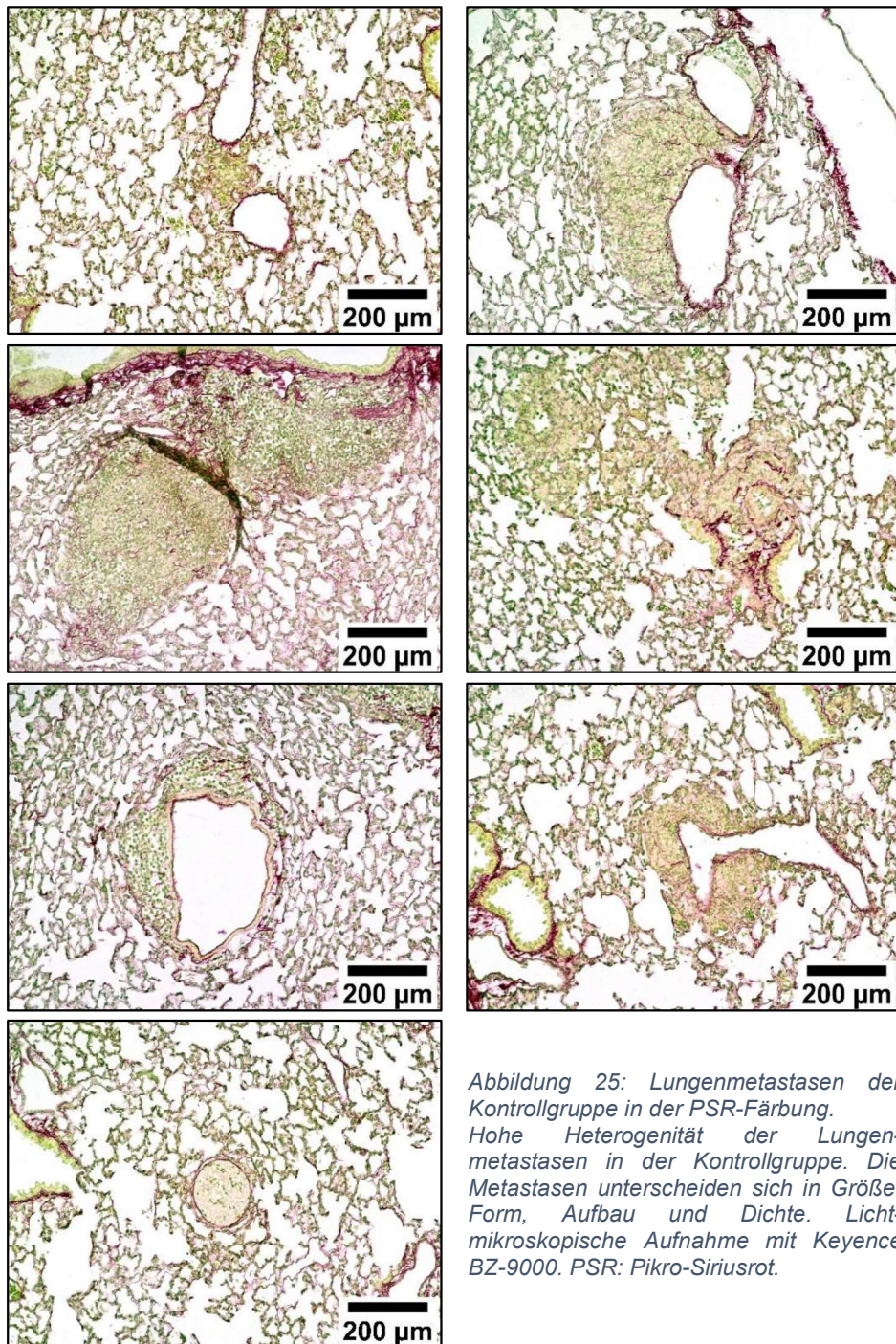


Abbildung 25: Lungenmetastasen der Kontrollgruppe in der PSR-Färbung. Hohe Heterogenität der Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe. Die Metastasen unterscheiden sich in Größe, Form, Aufbau und Dichte. Lichtmikroskopische Aufnahme mit Keyence BZ-9000. PSR: Pikro-Siriusrot.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Kombinationstherapie von BMS-1166 und Minoxidil auf Brustkrebs untersucht. Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob synergistische Effekte beobachtet werden können, die eine Optimierung der Brustkrebstherapie ermöglichen. Die Analyse erfolgte anhand von Mikroskopaufnahmen der histologisch und immunhistologisch gefärbten Tumore und Lungen aus vier unterschiedlichen Behandlungsgruppen: Minoxidil, BMS-1166, BMS-1166 mit Minoxidil in Kombination und eine, lediglich mit der Trägerlösung behandelte, Kontrollgruppe.

Die hier vorgestellten histologischen und immunhistologischen Analysen sollten weitere Analysen der Arbeitsgruppe um Dr. E. Henke zum gleichen Medikamentenspektrum ergänzen. Unter anderem wurden bereits Auswirkungen dieser Medikamentenkombination mittels einfacherer Tumorbetrachtung oder fluoreszenzaktivierter Zellanalysen in der Durchflusszytometrie untersucht. Die vorgestellten Ergebnisse sind somit als Teilergebnisse des Gesamtprojekts zur Kombination von Inhibition der Kollagensynthese durch PLOD-2-Blockade und Inhibierung des PD-1/PD-L1 Checkpoints zu interpretieren.

Die Kombinationstherapie zeigte in den Brusttumoren ein ausgeprägtes kollagenes Netzwerk. Diese doppelt-behandelten Tumore wiesen tendenziell mehr Nekrosen als die Kontrolltumore auf, aber bezüglich der Infiltration mit Immunzellen waren hier keine Unterschiede zu vermerken. Des Weiteren wurden in den Lungen der Kombinationstherapie die größten Metastasen gefunden.

Die Behandlung mit dem Immuntherapeutikum BMS-1166, welches den PD-1/PD-L1-Signalweg inhibiert, lässt eine erhöhte Tumornekrose durch eine größere Anzahl an aktivierten T-Zellen erwarten. Der PD-1/PD-L1-Signalweg ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Er ist verantwortlich für die Hemmung der T-Zell-Aktivierung und führt dazu, dass T-Zellen im Arrest verharren und verstärkt dem programmierten Zelltod zugeführt werden (Chemnitz et al., 2004; Gibbons et al., 2012; Latchman et al., 2001). Durch den Wegfall des PD-1/PD-L1-vermittelten immunsuppressiven Effekts sollten folglich die Tumorzellen effektiver bekämpft werden können und in einer verstärkten Tumornekrose resultieren. Dieser Erwartung entsprechen die Ergebnisse der H.E.-Auswertung.

Zunächst ist aber wichtig festzustellen, dass in den Kontrolltumoren kaum Nekrosen nachgewiesen werden konnten. Diese Feststellung ist wichtig, denn eine hohe

prozentuale Nekrose des Tumors allein kann auch durch einen gesteigerten, hohen Verbrauch an Sauerstoff und Metaboliten im Rahmen des Stoffwechsels der Tumorzellen zustande kommen und somit Indiz für ein aggressives Tumorstadium sein (Karsch-Bluman et al., 2019). So kann aber davon ausgegangen werden, dass AT3-Brusttumore wenig aggressiv wachsen oder zumindest so gut versorgt sind, dass es zu keiner akuten Unterversorgung der Tumorzellen kommt, die eine Nekrose zur Folge hätte. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BMS-1166-behandelte Tumore signifikant mehr nekrotisches Gewebe aufweisen als Tumore der Kontrollgruppe. Dies kann als Anzeichen dafür gesehen werden, dass die Behandlung anspricht und die erhöhten Werte der prozentualen Nekrose auf das Immuntherapeutikum zurückzuführen sind. Dafür spricht auch, dass Gefäßdichte und Zellteilungsaktivität in den Tumoren der Kontroll- und BT-Gruppe ähnlich waren. Dies lässt vermuten, dass die nekrotischen Areale nicht Ursache einer akuten generellen Unterversorgung darstellen, sondern als Reaktion auf die Behandlung mit BMS-1166 zu werten sind.

Allerdings ist in der BT-Gruppe eine breite Streuung der Einzelergebnisse zu verzeichnen (Standardabweichung 25,68 %). Somit können hier mit der Monotherapie zwar gute, jedoch keine konstanten Erfolge bezüglich der induzierten Nekrosen verzeichnet werden. Bei der kombinierten Gabe von BMS-1166 und Minoxidil sind die Ergebnisse einheitlicher, aber die nekrotischen Tumoranteile auch insgesamt kleiner. Minoxidil scheint also den Nekrose-induzierenden Effekt von BMS-1166 abzuschwächen. Jedoch hebt sich auch die BMT-Gruppe von der Kontrollgruppe ab. Der Unterschied ist hier mit 8,42 % Wahrscheinlichkeit zwar knapp nicht signifikant, zeigt aber eine klare Tendenz, die mit einer größeren Stichprobe eventuell bestätigt werden könnte.

Eine mögliche Ursache für diesen verminderten Effekt des Immuntherapeutikums in der Kombinationstherapie mit Minoxidil könnte das eindeutig größte und dichteste kollagene Netzwerk der Tumore sein. Die Netze aus Kollagen ziehen sich durch das ganze Tumorgewebe und zeigen sich bei vielen Tumoren verstärkt im Zentrum. Die zentrale Kollagenansammlung ist bei mehreren Tumoren zu beobachten und stellt keine Besonderheit der BMT-Gruppe dar. Das große kollagene Netzwerk und die Fibrosierung erschwert die Penetration der Medikamente ins Tumorzentrum und könnte das verminderte Ansprechen auf das Immuntherapeutikum erklären. Durch solche Fibrosen sind Rezidive, Metastasierung und ein tödlicher Ausgang der Erkrankung wahrscheinlicher (Hasebe et al., 2002). Die alleinige EZM-Destabilisierung mit Minoxidil zeigt diesen Effekt nicht. Es muss also davon ausgegangen werden, dass durch die

Kombination mit dem Immuntherapeutikum diese Veränderung in der TME hervorgerufen wird.

Jedoch gilt es bei der Auswertung der PSR-Färbung zu beachten, dass es sich zwar um eine etablierte aber nicht ganz spezifische histologische Kollagenfärbung handelt. Eine eindeutige Darstellung des kollagenen Netzwerks ist nur mit der linearen Polarisationsmikroskopie zu generieren und auszuwerten (Rittié, 2017). Der Zugang zu einem solchen Mikroskop war nicht gegeben. Dass es Unterschiede zwischen den Tumoren der Kombinationstherapie und den Tumoren der anderen Behandlungsgruppe gibt, ist allerdings auch ohne Polarisationsmikroskopie deutlich zu erkennen. Um diese Besonderheit der kollagenen Strukturen in Tumoren der Kombinationstherapie näher zu untersuchen, ist es empfehlenswert die Tumore noch einmal intensiver mittels linearer Polarisationsmikroskopie zu betrachten.

Vorausgehende Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Dr. E. Henke zeigen, dass die Tumore der Kombinationstherapie eindeutig die kleinsten und leichtesten sind. Dies darf bei der Einschätzung der Wirksamkeit der Kombinationstherapie nicht außer Acht gelassen werden. Bezüglich des Wachstums scheint es also einen synergistischen Effekt der Kombination aus Immuntherapeutikum und PLOD-2-Inhibitor zu geben. Der makroskopisch festgestellte positive Einfluss der Kombinationstherapie auf die Brusttumore sollte mikroskopisch begründet werden können. Die besondere Auffälligkeit im kollagenen Netzwerk der mit BMS-1166- und Minoxidil-behandelten Tumore scheint also mit dem geringeren Wachstum der BMT-Gruppe in Zusammenhang zu stehen. Die EZM-Versteifung kann, abhängig vom Tumor, sowohl in einer erhöhten als auch einer reduzierten Tumorzellproliferation und daraus folgend in einem verstärkten beziehungsweise reduzierten Tumorwachstum resultieren. (Rossow et al., 2018). Die AT3-Brusttumore reagieren hier offenbar als Folge einer Diffusionsbarriere für Nährstoffe sowie Sauerstoff unabhängig von der Gefäßdichte mit einem verringerten Wachstum. Allerdings kann diese Hypothese nicht mit der Auswertung der Proliferationsaktivität bestätigt werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der BMT-Gruppe und der Kontrollgruppe ausgemacht werden. Des Weiteren zeigte die MT-Gruppe die geringste Zellteilungsaktivität, obwohl diese Tumore eindeutig die größten und schwersten waren. Um herauszufinden was zu diesen gegensätzlichen Ergebnissen führte, empfiehlt es sich die Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 zu wiederholen und neu auszuwerten.

Die Infiltration der Tumore mit Immunzellen wurde anhand von IF-Färbungen unter dem konfokalen Mikroskop ausgewertet. Bei diesen Auswertungen und Ergebnissen

Färbungen ist jedoch zu beachten, dass diese nur durch Tumorauschnitte von insgesamt wenigen Tumoren zustande gekommen sind. Aufgrund der langen Aufnahmezeiten am konfokalen Mikroskop wurden weniger Tumore als bei den anderen Färbungen gefärbt und ausgewertet. Mit dem konfokalen Mikroskop sind Übersichtsaufnahmen nur schwer realisierbar, deshalb wurden diese Tumore nur anhand von zufällig gewählten Ausschnitten ausgewertet. Eine für den gesamten Tumor repräsentativ quantitative Auswertung ist deshalb nicht möglich. Die Ergebnisse sind folglich vielmehr als zwar stichprobenartige, aber auch objektive Einblicke in den Tumor zu verstehen, die Tendenzen wiedergeben. Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen sollten aber dennoch auffallen. Wobei hier Vorsicht geboten ist, denn bei der Auswertung des CD31-Antikörpers im Rahmen der DAB- beziehungsweise IF-Färbung wurden unterschiedliche Ergebnisse notiert. In diesem Fall gilt die Tumorgesamtauswertung als aussagekräftige Basis und die IF-Auswertung als modulierender Einblick. Für zukünftige Versuche ist es jedoch empfehlenswert den ganzen Tumor auch bei IF-Färbungen auszuwerten. So könnte zukünftig eine deutliche Verbesserung von quantitativen Analysen erzielt werden. Eine dafür geeignete Methode gilt es in nachfolgenden Arbeiten zu etablieren. Dann ist auch die Beurteilung einer möglichen Lageabhängigkeit der angefärbten Strukturen bei IF-Färbungen etwas aussagekräftiger. Allerdings bleibt weiter zu beachten, dass es sich bei den Proben um 5 µm dünne Gewebsschnitte handelt und die Lage nur in zwei Dimensionen beurteilt werden kann. An einer Möglichkeit der dreidimensionalen Darstellung von dickeren IF-gefärbten Tumorproben wird derzeit unter anderem in der Arbeitsgruppe um Dr. E. Henke geforscht.

Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der TME. Sie können durch Chemotaxis das Tumorstadium und die Metastasierung fördern, weshalb sie mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Pollard, 2008; Qiu et al., 2018). In einer Mikroskopaufnahme wurde eine invasive Tumorfront abgebildet. Hier konnte eine sehr hohe Dichte an Makrophagen beobachtet werden, die die tumorprogressive Rolle dieser Zellen stützen könnte.

Bei der Auswertung der Makrophagendichte konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Tendenziell wiesen die Minoxidil-behandelten Tumore die wenigsten Makrophagen pro Fläche auf. Entsprechend dem starken Wachstum dieser Tumore und der tumorfördernden Rolle der Makrophagen wurden hier eher viele Makrophagen erwartet. Des Weiteren wurde in den schnell wachsenden Minoxidil-behandelten Tumoren signifikant weniger cytotoxische CD8-positive T-Zellen als in der

Kontrollgruppe beobachtet. Das Immunsystem schafft es mit weniger cytotoxischen Zellen vermutlich nicht den Tumor in seiner Ausbreitung effektiv zu bekämpfen, was das große Wachstum dieser Tumore erklären könnte. Außerdem können Makrophagen CD8-positive cytotoxische T-Zellen in ihrer Funktion und deren Proliferation hemmen (Ruffell et al., 2014). Um eindeutige Rückschlüsse aus den Ergebnissen ziehen zu können, ist deshalb die Auswertung des kompletten Tumors sehr zu empfehlen.

Die Infiltration von CD4- und CD8-positiven T-Zellen ist von besonderem Interesse für die Beurteilung der Wirksamkeit des eingesetzten Immuntherapeutikums BMS-1166. Viele CD4- und CD8-positive T-Zellen im TNBC machen das Überleben wahrscheinlicher. Allerdings werden bei einem hohen Anteil an CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen die immunsuppressiven Immun-Checkpoint-Moleküle PD-1 und PD-L1 verstärkt exprimiert (Oshi et al., 2020). Durch die PD-L1-Inhibition mit BMS-1166 soll die immunsuppressive Wirkung des PD-1/PD-L1-Signalwegs verhindert werden, weshalb in den mit BMS-1166-behandelten Tumoren eine höhere Anzahl an T-Zellen zu erwarten ist. Diese Erwartung kann durch die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Die BT-Gruppe, sowie auch die BMT-Gruppe liegen in ihrer Anzahl an CD4- und CD8-positiven Zellen auf ähnlichem Niveau mit der Kontrollgruppe. Dass das Immuntherapeutikum keine Auswirkungen auf die Anzahl der Immunzellen zeigt ist schwer vorstellbar. Eine mögliche Erklärung hierfür wären die stichprobenartigen Ausschnittsaufnahmen, die unabhängig des Aufnahmeorts miteinander verglichen wurden. So sind CD4- und CD8-positive T-Zellen am Tumorrand häufiger als im Tumorzentrum (Wang et al., 2017). Eine Tumorgesamtauswertung ist hier von großer Bedeutung, um die Auswirkungen der Immuntherapie auf die Immunzellen genau zu untersuchen und dabei auch Aussagen zur Lokalisation dieser Zellen treffen können. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Etablierung einer Methode zur Aufnahme von IF-gefärbten Tumoren als Ganzes.

Lungenmetastasen kommen in jeder Behandlungsgruppe vor. Tendenziell wiesen die doppelt behandelten Tumore der BMT-Gruppe die wenigsten Lungenmetastasen auf. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht ausgemacht werden. Trotzdem lässt diese Beobachtung vermuten, dass der Brusttumor nicht nur im lokalen Wachstum, sondern auch in seiner Ausbreitung in die Lunge gehemmt wird. Die Metastasen, die es schaffen sich in der Lunge festzusetzen, sind hingegen signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Minoxidil scheint hierbei einen starken Einfluss zu haben, denn in der ML-Gruppe konnten noch größere Metastasen festgestellt werden.

Für die Metastasierung ist zum einen die Auswanderung der Tumorzellen des Primärtumors ins Gefäßsystem aber auch die Festsetzung der Tumorzellen in das Lungenparenchym von Bedeutung. Hierfür kommen der Tumolvaskularisierung und auch den Makrophagen für die Intra- sowie Extravasation wichtige Schlüsselrollen zu (Qian et al., 2009). Die Tumolvaskularisierung und auch die Makrophagendichte im Primärtumor unterschieden sich in diesem Versuch jedoch nicht signifikant. Hinzukommt, dass keine Auffälligkeiten im Aufbau der Metastasen festgestellt werden konnten. Diese waren sehr heterogen und scheinen dabei keinem Muster zu folgen. Es kann somit nicht mit Sicherheit gesagt werden, woher das große Wachstum der Lungenmetastasen in Zusammenhang mit Minoxidil herrühren könnte. Außerdem ist die Metastasierung ein komplexer Vorgang und besteht aus vielen unterschiedlichen Komponenten (Scully et al., 2012).

Alles in Allem zeigt die Kombinationstherapie aus Minoxidil und BMS-1166 vielversprechende Ansätze bei der Behandlung von AT3-Brusttumoren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Immuntherapie anschlügt und in Kombination mit dem PLOD2-Inhibitor zu einer Veränderung im kollagenen Netzwerk führt. Die starken Kollagenablagerungen in dieser Behandlungsgruppe werden als Ursache für das geringe Tumorstadium angesehen und sind als Erfolg zu verzeichnen. Jedoch sollten zur weiteren Abklärung, auch bezüglich der Situation der Infiltration mit Immunzellen, weitere Untersuchungen folgen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die histologischen und immunhistologischen Auswirkungen der Kombination aus Inhibition des PD-1/PD-1L-Checkpoints und PLOD-2-Blockade untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Immuntherapie anschlägt und dabei als Monotherapie die stärksten Tumornekrosen induzierte. Das Ansprechen auf die Immuntherapie mit BMS-1166 war jedoch sehr unterschiedlich. In der Kombination mit dem PLOD-2-Inhibitor Minoxidil wurden hingegen einheitlichere, aber auch geringere Nekroseanteile festgestellt. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Kombinationsbehandlung die stärkste Auswirkung auf das Tumorwachstum hatte. So waren diese Tumore die kleinsten und leichtesten, was in Zusammenhang mit dem ausgeprägten kollagenen Netzwerk dieser Gruppe stehen könnte. Die Kombination zeigte keine Auswirkung auf die Tumolvaskularisierung und die Zellteilungsaktivität, sowie auch keine Auffälligkeiten bezuglich der Infiltration mit Immunzellen. Lungenmetastasen kamen in allen Behandlungsgruppen vor. Bei der Kombinationsbehandlung waren jedoch die durchschnittlich größten Lungenmetastasen festzustellen.

In dieser Arbeit konnte keine klare signifikante Verbesserung der Brustkrebstherapie durch die Kombination von Inhibition der Kollagensynthese durch PLOD-2-Blockade und Inhibierung des PD-1/PD-1L-Checkpoints aufgezeigt werden. Das kollagene Netzwerk war auffällig und sollte genauer untersucht werden. Es lohnt sich weiter an Kombinationen aus Immuntherapeutikum und EZM-Destabilisierung zu arbeiten. Die TME muss dabei weiterhin Ansatzpunkt der Forschung bleiben, um eine erleichterte Penetration der Medikamente in den Tumor zu erzielen. Hier ist der Austausch des Medikaments zur EZM-Destabilisierung empfehlenswert. Die LOX-Inhibierung hat sich bereits in Kombination mit Chemotherapie als vorteilhaft erwiesen (Rossow et al., 2018) und sollte nachfolgend in einem ähnlichen Versuchsaufbau mit dem Immuntherapeutikum BMS-1166 ausprobiert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., Chen, Y. Y., Liphardt, J., Hwang, E. S., & Weaver, V. M. (2015). Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol (Camb)*, 7(10), 1120-1134. <https://doi.org/10.1039/c5ib00040h>
- Adams, S., Gray, R. J., Demaria, S., Goldstein, L., Perez, E. A., Shulman, L. N., Martino, S., Wang, M., Jones, V. E., Saphner, T. J., Wolff, A. C., Wood, W. C., Davidson, N. E., Sledge, G. W., Sparano, J. A., & Badve, S. S. (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol*, 32(27), 2959-2966. <https://doi.org/10.1200/jco.2013.55.0491>
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., & Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*, 8(5), 765-772. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765>
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537-1544. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>
- Barrow, M. V., Simpson, C. F., & Miller, E. J. (1974). Lathyrism: a review. *Q Rev Biol*, 49(2), 101-128. <https://doi.org/10.1086/408017>
- Bröker, B., Schütt, C., & Fleischer, B. (2019). *Grundwissen Immunologie* (Vol. 4). Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58330-2>
- Chang, C., & Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 11(11), S37-43. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02122-5](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02122-5)
- Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., & Riley, J. L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*, 173(2), 945-954. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.945>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13(4), 227-242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Cheng, X., Veverka, V., Radhakrishnan, A., Waters, L. C., Muskett, F. W., Morgan, S. H., Huo, J., Yu, C., Evans, E. J., Leslie, A. J., Griffiths, M., Stubberfield, C., Griffin, R., Henry, A. J., Jansson, A., Ladbury, J. E., Ikemizu, S., Carr, M. D., & Davis, S. J. (2013). Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J Biol Chem*, 288(17), 11771-11785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448126>
- Chupak, L. S., Ding, M., Martin, S. W., Zheng, X., Hewawasam, P., Connolly, T. P., Xu, N., Yeung, K., Zhu, J., Langley, D. R., Tenney, D. J., & Scola, P. M. (2015). *Compounds useful as immunomodulatory* (US Patent No. W. I. P. Organization. <https://patentimages.storage.googleapis.com/b1/63/c4/17f7a6ba815e72/WO2015160641A2.pdf>

- Chupak, L. S., & Zheng, X. (2015). *Compounds useful as immunomodulatory* (US Patent No. W. I. P. Organization). <https://patentimages.storage.googleapis.com/b2/71/8b/048d30f3c8b252/WO2015034820A1.pdf>
- Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B. M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., von Törne, C., Weichert, W., Engels, K., Solbach, C., Schrader, I., Dietel, M., & von Minckwitz, G. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(1), 105-113. <https://doi.org/10.1200/jco.2009.23.7370>
- Du, H., Pang, M., Hou, X., Yuan, S., & Sun, L. (2017). PLOD2 in cancer research. *Biomed Pharmacother*, 90, 670-676. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.023>
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192(7), 1027-1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Fujii, T., Hirakata, T., Kurozumi, S., Tokuda, S., Nakazawa, Y., Obayashi, S., Yajima, R., Oyama, T., & Shirabe, K. (2020). VEGF-A Is Associated With the Degree of TILs and PD-L1 Expression in Primary Breast Cancer. *In Vivo*, 34(5), 2641-2646. <https://doi.org/10.21873/invivo.12082>
- Gavalas, N. G., Tsiatas, M., Tsitsilonis, O., Politi, E., Ioannou, K., Ziogas, A. C., Rodolakis, A., Vlahos, G., Thomakos, N., Haidopoulos, D., Terpos, E., Antsaklis, A., Dimopoulos, M. A., & Bamias, A. (2012). VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *Br J Cancer*, 107(11), 1869-1875. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.468>
- Gibbons, R. M., Liu, X., Pulko, V., Harrington, S. M., Krco, C. J., Kwon, E. D., & Dong, H. (2012). B7-H1 limits the entry of effector CD8(+) T cells to the memory pool by upregulating Bim. *Oncoimmunology*, 1(7), 1061-1073. <https://doi.org/10.4161/onci.20850>
- Gilkes, D. M., Bajpai, S., Wong, C. C., Chaturvedi, P., Hubbi, M. E., Wirtz, D., & Semenza, G. L. (2013). Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Mol Cancer Res*, 11(5), 456-466. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-12-0629>
- Griffioen, A. W., Damen, C. A., Blijham, G. H., & Groenewegen, G. (1996). Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. *Blood*, 88(2), 667-673. <https://doi.org/10.1182/blood.V88.2.667.bloodjournal882667>
- Guo, Z. S. (2018). The 2018 Nobel Prize in medicine goes to cancer immunotherapy (editorial for BMC cancer). *BMC Cancer*, 18(1), 1086. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5020-3>
- Guzik, K., Zak, K. M., Grudnik, P., Magiera, K., Musielak, B., Törner, R., Skalniak, L., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2017). Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. *J Med Chem*, 60(13), 5857-5867. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00293>
- Hasebe, T., Sasaki, S., Imoto, S., Mukai, K., Yokose, T., & Ochiai, A. (2002). Prognostic significance of fibrotic focus in invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective

- observational study. *Mod Pathol*, 15(5), 502-516. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880555>
- Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S. (2019). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci*, 6, 160. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00160>
- Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.* (2021, Juni 2021). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
- International Agency for Research on Cancer. (2020a). *Breast Factsheet*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
- International Agency for Research on Cancer. (2020b). *Estimated number of new cases in 2020, worldwide, females, all ages*. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo j*, 11(11), 3887-3895. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC556898/pdf/emboj00096-0084.pdf>
- Jesinger, R. A. (2014). Breast anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol*, 17(1), 3-9. <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002>
- Karsch-Bluman, A., Feiglin, A., Arbib, E., Stern, T., Shoval, H., Schwob, O., Berger, M., & Benny, O. (2019). Tissue necrosis and its role in cancer progression. *Oncogene*, 38(11), 1920-1935. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0555-y>
- Keenan, T. E., & Tolaney, S. M. (2020). Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 18(4), 479-489. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.7554>
- Kuhlmann, W. D., & Peschke, P. (1986). Glucose oxidase as label in histological immunoassays with enzyme-amplification in a two-step technique: coimmobilized horseradish peroxidase as secondary system enzyme for chromogen oxidation. *Histochemistry*, 85(1), 13-17. <https://doi.org/10.1007/bf00508648>
- Lang, G. (2012). *Histotechnik, Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* (Vol. 2). SpringerWienNewYork.
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Bousiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., . . . Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*, 2(3), 261-268. <https://doi.org/10.1038/85330>
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Wenginger, W., Yamauchi, M., Gasser, D. L., & Weaver, V. M. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), 891-906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>

- Lin, D. Y., Tanaka, Y., Iwasaki, M., Gittis, A. G., Su, H. P., Mikami, B., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., & Garboczi, D. N. (2008). The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(8), 3011-3016. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712278105>
- Linardou, H., Kalogeras, K. T., Kronenwett, R., Kouvatseas, G., Wirtz, R. M., Zagouri, F., Gogas, H., Christodoulou, C., Koutras, A. K., Samantas, E., Pectasides, D., Bafaloukos, D., & Fountzilias, G. (2012). The prognostic and predictive value of mRNA expression of vascular endothelial growth factor family members in breast cancer: a study in primary tumors of high-risk early breast cancer patients participating in a randomized Hellenic Cooperative Oncology Group trial. *Breast Cancer Res*, *14*(6), R145. <https://doi.org/10.1186/bcr3354>
- Liu, H., Li, Z., Huo, S., Wei, Q., & Ge, L. (2020). Induction of G0/G1 phase arrest and apoptosis by CRISPR/Cas9-mediated knockout of CDK2 in A375 melanocytes. *Mol Clin Oncol*, *12*(1), 9-14. <https://doi.org/10.3892/mco.2019.1952>
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie* (Vol. 6). Thieme. <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, *1897*, 289-298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Mejías, C., & Guirola, O. (2019). Pharmacophore model of immuncheckpoint protein PD-L1 by cosolvent molecular dynamics simulations. *J Mol Graph Model*, *91*, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2019.06.001>
- Miller, M. E. (2016). *Cancer*. Momentum Press. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/ub-wuerzburg/detail.action?docID=5349375>
- Mishra, S., Liao, W., Liu, Y., Yang, M., Ma, C., Wu, H., Zhao, M., Zhang, X., Qiu, Y., Lu, Q., & Zhang, N. (2021). TGF- β and Eomes control the homeostasis of CD8⁺ regulatory T cells. *J Exp Med*, *218*(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20200030>
- Nandigama, R., Upcin, B., Aktas, B. H., Ergun, S., & Henke, E. (2018). Restriction of drug transport by the tumor environment. *Histochem Cell Biol*, *150*(6), 631-648. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1744-z>
- Oshi, M., Asaoka, M., Tokumaru, Y., Yan, L., Matsuyama, R., Ishikawa, T., Endo, I., & Takabe, K. (2020). CD8 T Cell Score as a Prognostic Biomarker for Triple Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, *21*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186968>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, *12*(4), 252-264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Park, B. V., Freeman, Z. T., Ghasemzadeh, A., Chattergoon, M. A., Rutebemberwa, A., Steigner, J., Winter, M. E., Huynh, T. V., Sebald, S. M., Lee, S. J., Pan, F., Pardoll, D. M., & Cox, A. L. (2016). TGF β 1-Mediated SMAD3 Enhances PD-1 Expression on Antigen-Specific T Cells in Cancer. *Cancer Discov*, *6*(12), 1366-1381. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-15-1347>
- Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B., & Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit

- T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25(21), 9543-9553. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.21.9543-9553.2005>
- Patel, S. P., & Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*, 14(4), 847-856. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-14-0983>
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Pezzuto, A., & Carico, E. (2018). Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review. *Curr Mol Med*, 18(6), 343-351. <https://doi.org/10.2174/1566524018666181109121849>
- Pollard, J. W. (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol*, 84(3), 623-630. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107762>
- Qian, B., Deng, Y., Im, J. H., Muschel, R. J., Zou, Y., Li, J., Lang, R. A., & Pollard, J. W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One*, 4(8), e6562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006562>
- Qiu, S. Q., Waaijer, S. J. H., Zwager, M. C., de Vries, E. G. E., van der Vegt, B., & Schröder, C. P. (2018). Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev*, 70, 178-189. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.08.010>
- Rittié, L. (2017). Method for Picosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods Mol Biol*, 1627, 395-407. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26
- Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*, 59(4), 651-672. <https://doi.org/10.1097/grf.0000000000000239>
- Rosow, L., Veitl, S., Vorlová, S., Wax, J. K., Kuhn, A. E., Maltzahn, V., Upcin, B., Karl, F., Hoffmann, H., Gätzner, S., Kallius, M., Nandigama, R., Scheld, D., Irmak, S., Herterich, S., Zerneck, A., Ergün, S., & Henke, E. (2018). LOX-catalyzed collagen stabilization is a proximal cause for intrinsic resistance to chemotherapy. *Oncogene*, 37(36), 4921-4940. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0320-2>
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C. M., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E. S., Rugo, H. S., & Coussens, L. M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*, 26(5), 623-637. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.006>
- Sabatier, R., Finetti, P., Mamessier, E., Adelaide, J., Chaffanet, M., Ali, H. R., Viens, P., Caldas, C., Birnbaum, D., & Bertucci, F. (2015). Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, 6(7), 5449-5464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3216>

- Schardt, J. (2020). [The use of immune checkpoint inhibitors in routine oncology]. *Z Rheumatol*, 79(8), 809-817. <https://doi.org/10.1007/s00393-020-00876-2> (Der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren im onkologischen Alltag.)
- Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G., & Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*, 9(5), 311-320. <https://cgp.iijournals.org/content/cgp/9/5/311.full.pdf>
- Selnø, A. T. H., Schlichtner, S., Yasinska, I. M., Sakhnevych, S. S., Fiedler, W., Wellbrock, J., Klenova, E., Pavlova, L., Gibbs, B. F., Degen, M., Schnyder, I., Aliu, N., Berger, S. M., Fasler-Kan, E., & Sumbayev, V. V. (2020). Transforming growth factor beta type 1 (TGF- β) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) transcription complex as master regulators of the immunosuppressive protein galectin-9 expression in human cancer and embryonic cells. *Aging (Albany NY)*, 12(23), 23478-23496. <https://doi.org/10.18632/aging.202343>
- Simonian, M., Haji Ghaffari, M., & Negahdari, B. (2021). Immunotherapy for Breast Cancer Treatment. *Iran Biomed J*, 25(3), 140-156. <https://doi.org/10.29252/ibj.25.3.140>
- Skalniak, L., Zak, K. M., Guzik, K., Magiera, K., Musielak, B., Pachota, M., Szelazek, B., Kocik, J., Grudnik, P., Tomala, M., Krzanik, S., Pyrc, K., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2017). Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget*, 8(42), 72167-72181. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20050>
- Suchonwanit, P., Thammarucha, S., & Leerunyakul, K. (2019). Minoxidil and its use in hair disorders: a review. *Drug Des Devel Ther*, 13, 2777-2786. <https://doi.org/10.2147/dddt.S214907>
- Sun, J., Cui, H., Gao, Y., Pan, Y., Zhou, K., Huang, J., Lan, J., Wei, Q., Liu, X., Liu, L., & Xian, C. J. (2018). TGF- α Overexpression in Breast Cancer Bone Metastasis and Primary Lesions and TGF- α Enhancement of Expression of Pro-cancer Metastasis Cytokines in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Res Int*, 2018, 6565393. <https://doi.org/10.1155/2018/6565393>
- Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A. F., Tartour, E., & Taieb, J. (2013). VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 73(2), 539-549. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-2325>
- Thammineni, K. L., Thakur, G. K., Kaur, N., & Banerjee, B. D. (2019). Significance of MMP-9 and VEGF-C expression in North Indian women with breast cancer diagnosis. *Mol Cell Biochem*, 457(1-2), 93-103. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03515-w>
- Thomas, D. A., & Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8(5), 369-380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>
- Uhercik, M., Sanders, A. J., Owen, S., Davies, E. L., Sharma, A. K., Jiang, W. G., & Mokbel, K. (2017). Clinical Significance of PD1 and PDL1 in Human Breast Cancer. *Anticancer Res*, 37(8), 4249-4254. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11817>
- Voron, T., Colussi, O., Marcheteau, E., Pernot, S., Nizard, M., Pointet, A. L., Latreche, S., Bergaya, S., Benhamouda, N., Tanchot, C., Stockmann, C., Combe, P., Berger, A., Zinzindohoue, F., Yagita, H., Tartour, E., Taieb, J., & Terme, M. (2015). VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med*, 212(2), 139-148. <https://doi.org/10.1084/jem.20140559>

- Wang, K., Shen, T., Siegal, G. P., & Wei, S. (2017). The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*, 69, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.09.012>
- Wang, X., Teng, F., Kong, L., & Yu, J. (2016). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*, 9, 5023-5039. <https://doi.org/10.2147/ott.S105862>
- Xiong, Z., Deng, G., Huang, X., Li, X., Xie, X., Wang, J., Shuang, Z., & Wang, X. (2018). Bone metastasis pattern in initial metastatic breast cancer: a population-based study. *Cancer Manag Res*, 10, 287-295. <https://doi.org/10.2147/cmar.S155524>
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D. M., Okumura, K., Azuma, M., & Yagita, H. (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol*, 169(10), 5538-5545. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5538>
- Zentrum für Krebsregisterdaten. (2018, 29.11.2021). *Mammakarzinom*. Robert Koch Institut. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html
- Zhan, M. M., Hu, X. Q., Liu, X. X., Ruan, B. F., Xu, J., & Liao, C. (2016). From monoclonal antibodies to small molecules: the development of inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 pathway. *Drug Discov Today*, 21(6), 1027-1036. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.011>
- Zhao, J., & Huang, J. (2020). Breast cancer immunology and immunotherapy: targeting the programmed cell death protein-1/programmed cell death protein ligand-1. *Chin Med J (Engl)*, 133(7), 853-862. <https://doi.org/10.1097/cm9.0000000000000710>
- Zhu, L., Fu, X., Chen, X., Han, X., & Dong, P. (2017). M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway. *Cell Biol Int*, 41(9), 960-968. <https://doi.org/10.1002/cbin.10788>
- Zuurmond, A. M., van der Slot-Verhoeven, A. J., van Dura, E. A., De Groot, J., & Bank, R. A. (2005). Minoxidil exerts different inhibitory effects on gene expression of lysyl hydroxylase 1, 2, and 3: implications for collagen cross-linking and treatment of fibrosis. *Matrix Biol*, 24(4), 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.04.002>

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

BMS	Bristol-Myers Squibb
BMT/ BML	<i>BMS-1166 & Minoxidil tumors/ lungs</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BT/ BL	<i>BMS-1166 tumors/lungs</i>
CT/ CL	<i>carrier tumors/ lungs</i>
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	Mowiol + 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
LOX	Lysyl-Oxidase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMPs	Matrix-Metallo-Proteasen
MT/ ML	<i>Minoxidil tumors/lungs</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
PB	Phosphat-Puffer
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed cell death receptor 1</i>
PD-L1/ PD-L2	<i>programmed death ligand 1/2</i>
PKB	Proteinkinase-B
PLOD-2	<i>procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>
PSR	Pikro-Siriusrot
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SHP-2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i>
TCR	<i>t-cell receptor</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TME	<i>tumormicroenvironment</i>
TNBC	<i>triple negative breast cancer</i>
Tris	<i>Trizma Base</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung des PD-1 Signalwegs.
- Abbildung 2 BMS-1166.
- Abbildung 3 Aktueller Kenntnisstand der Arbeitsgruppe um Dr. E. Henke zum Einfluss der Medikamente Minoxidil, BMS-1166 und deren Kombination auf das Tumorstadium.
- Abbildung 4 Flowchart zur Durchführung der DAB- und IF -Färbungen.
- Abbildung 5 H.E.-Färbung eines Minoxidil-behandelten Tumors.
- Abbildung 6 Vergleich der nekrotischen Bereiche in der H.E.-Färbung.
- Abbildung 7 Auswertung der prozentualen Nekrose der unterschiedlich behandelten Tumore.
- Abbildung 8 PSR-Färbung eines Tumors der BMT-Gruppe.
- Abbildung 9 Vergleich des kollagenen Netzwerks in der PSR-Färbung.
- Abbildung 10 Auswertung des Kollagenetzwerks der unterschiedlich behandelten Tumore.
- Abbildung 11 DAB-Färbung mit Anti-CD31-Antikörper eines Tumors der BMT-Gruppe.
- Abbildung 12 Gegenüberstellung zweier separat gefärbten Tumorschnitte des gleichen Tumors.
- Abbildung 13 Auswertung der prozentualen Anteile an CD31-positiver Fläche am intakten Tumorgewebe.
- Abbildung 14 DAB-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper eines BMS-1166- und Minoxidil-behandelten Tumors.
- Abbildung 15 Vergleich der Zellteilungsaktivität in der DAB-Färbung mit Anti-Ki67-Antikörper.
- Abbildung 16 Auswertung der Anzahl an Ki67-positiven Zellen pro mm² Tumorfäche.
- Abbildung 17 Auswertung der CD31- und F4/80-positiven Flächen an der ausgewerteten Tumorfäche.
- Abbildung 18 Invasive Tumorregion in IF-Färbung mit Anti-CD31- und Anti-F4/80-Antikörper.
- Abbildung 19 IF-Färbung eines Tumors der BMT-Gruppe mit Anti-CD31- und Anti-F4/80-Antikörper.
- Abbildung 20 Verteilung von CD4- und CD8-positiven Zellen in einem Kontrolltumor.
- Abbildung 21 Verteilung von CD4- und CD8-positiven Zellen in einem Minoxidil-behandeltem Tumor.
- Abbildung 22 Auswertung der Anzahl an CD4- und CD8-positiven Zellen an der ausgewerteten Tumorfäche.
- Abbildung 23 Statistische Auswertung der Lungenmetastasen.
- Abbildung 24 H.E.-gefärbte Lungenflügel der Behandlungsgruppen (a) CL und (b) BML.
- Abbildung 25 Lungenmetastasen der Kontrollgruppe in der PSR-Färbung.

III Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1</u>	verwendete Chemikalien und deren Hersteller
<u>Tabelle 2</u>	verwendete Kits mit Angabe des Herstellers
<u>Tabelle 3</u>	Zusammensetzung der hergestellten Puffer und Lösungen
<u>Tabelle 4</u>	Zusammensetzung der hergestellten Färbelösungen
<u>Tabelle 5</u>	verwendete Softwareprogramme und deren Hersteller
<u>Tabelle 6</u>	verwendete Geräte und Hilfsmittel mit Angabe des Herstellers
<u>Tabelle 7</u>	Paraffineinbettung: Dehydrierung, Klärung und Paraffin-Infiltration
<u>Tabelle 8</u>	verwendete Primärantikörper und Demaskierung der Diaminobenzidin-Färbungen
<u>Tabelle 9</u>	verwendete Antikörper und Demaskierung der Immunfluoreszenz Doppelfärbungen
<u>Tabelle 10</u>	verwendete Sekundärantikörper der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen
<u>Tabelle 11</u>	Entparaffinierung und Rehydrierung der IHC-Färbungen
<u>Tabelle 12</u>	Übersicht über die Anzahl von Tumoren und Lungen in den Behandlungsgruppen

IV Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Süleyman Ergün für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit zur Erlangung der Doktorwürde in seinem Institut für Anatomie und Zellbiologie durchführen und schreiben zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei Dr. Erik Henke für die hervorragende Betreuung während der Versuchsphase und auch für die Unterstützung bei der abschließenden schriftlichen Ausarbeitung der durchgeführten Arbeit.

Dem ganzen Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg, vor allem aber den medizinisch-technischen Angestellten und allen voran Frau Erna Kleinschroth, möchte ich hiermit meinen Dank für die große Hilfe und Unterstützung bei Anliegen jeglicher Art aussprechen.

Liebe Mit-Doktoranden, euch danke ich sehr für den gegenseitigen Austausch und die Hilfe bei Problemen im Labor, am Mikroskop oder beim Schreiben.

Meiner Schwester Franziska danke ich für das ausführliche Korrekturlesen meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit. Und zu guter Letzt möchte ich mich aufrichtig bei meinen Eltern bedanken – Ihr seid meine größten Unterstützer. Danke für alles was Ihr mir ermöglicht.

