

**Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald**

**Vergleich immunhistochemischer Markerprofile Her2/neu
negativer, hormonrezeptorpositiver Mammakarzinome mit dem
Recurrence-Score des OncotypeDX®**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Alisa-Sophia Johanna Beatrice Schneider
aus Schweinfurt**

Würzburg, November 2021



Referent: apl. Prof. Dr. med. Hans-Ullrich Völker (HUV)

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Achim Wöckel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2022

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Risikofaktoren	1
1.1.3 Klassifikation und stadiengerechte Therapie	2
1.1.4 Systemische Therapie.....	5
1.2 Oncotype DX®.....	7
1.2.1 Hintergrund	7
1.2.2 Bewertung und Studienlage.....	7
1.2.3 21-Gen-Expressions-Assay	9
1.3 Ziel der Arbeit.....	10
2. Patientinnen und Methoden.....	11
2.1 Ethikvotum	11
2.2 Patientinnen.....	11
2.3 Tissue-Mikro-Arrays	12
2.4 Immunhistochemie	13
2.5 Statistik.....	15
2.5.1 Statistische Analyse der Marker gegen den Recurrence-Score©	15
2.5.2 Paaranalyse der immunhistochemischen Marker.....	17
2.5.3 Rangkorrelation.....	17
3. Ergebnisse	18
3.1 Immunhistochemische Marker und Recurrence-Score©	18
3.1.1 Interessante Marker.....	18
3.1.2 Marker geringer Relevanz	36
3.2 Paaranalyse immunhistochemischer Marker.....	37
3.3 Ki 67%.....	40
3.3.1 Ki 67% und der Recurrence-Score©.....	40
3.3.2 Paaranalyse mit Ki 67%	42
3.3.3 Recurrence-Score®, Alter und Ki 67%	45
4. Diskussion.....	47
4.1 Allgemeine Aspekte.....	47
4.2 Ausgewählte immunhistochemische Marker und der Recurrence-Score©	49
4.2.1 Ausgeschlossene Marker.....	49
4.2.2 AMACR	51

4.2.3 Bcl 2	53
4.2.4 Cyclin D1 und CDK4	54
4.2.5 GLUT 1	57
4.2.6 p53 und MDM2	59
4.2.7 p27.....	61
4.2.8 pERK	63
4.2.9 PDL-1	65
4.3 Ki 67%.....	68
4.4 Unterschiede in den Altersklassen	70
4.5 Recurrence-Score©, Alter und Ki 67%	72
4.6 Paaranalyse immunhistochemischer Marker.....	73
4.7 Limitationen der Arbeit und Ausblick.....	75
5. Zusammenfassung.....	79
6. Literaturverzeichnis.....	80
Appendix	
I Abkürzungsverzeichnis	
II Abbildungsverzeichnis.....	
III Tabellenverzeichnis	
IV Ergänzende Tabellen.....	
V Danksagung.....	
VI Lebenslauf.....	

1. Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom stellt in den Industrienationen einschließlich Deutschland die häufigste maligne Erkrankung der Frau dar. Ca. 71.500 Frauen erkranken in Deutschland jährlich an Brustkrebs (1). Das Lebenszeitrisko liegt derzeit bei 12,9%, so dass etwa jede achte Frau in ihrem Leben ein Mammakarzinom entwickelt (2).

Während die Inzidenz des Mammakarzinoms langfristig angestiegen ist, geht die Sterblichkeit seit den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts zurück (1). Die verbesserte Früherkennung, neue Therapiekonzepte und die interdisziplinäre Betreuung in zertifizierten Zentren haben insbesondere in den letzten 10 Jahren zu dieser Entwicklung beigetragen (3).

Dennoch geht knapp ein Fünftel der krebsbedingten Todesfälle auf das Mammakarzinom zurück (1). Mit 18 500 Fällen 2019 stellt Brustkrebs die häufigste zum Tode führende Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland dar (4).

88 % der Patientinnen leben durchschnittlich noch fünf Jahre nach Diagnosestellung (relatives 5-Jahres Überleben), 82 % nach zehn Jahren (relatives 10-Jahres-Überleben) (1). Dabei unterscheidet sich die Prognose je nach Altersgruppe. Das mittlere Erkrankungsalter liegt laut dem Bericht des Robert-Koch-Instituts bei 64,3 Jahren (1). Ein Rückgang der Sterblichkeit findet sich nur in den Gruppen der unter 70 Jährigen Patientinnen (1).

1.1.2 Risikofaktoren

Die Entstehung des Mammakarzinoms ist ein multifaktorieller Vorgang. Zu den begünstigenden Faktoren gehören eine familiäre Disposition sowie individuelle Risikofaktoren. Nur 5-10 % aller Mammakarzinome sind erblich bedingt (5). Zu den bekanntesten Prädispositionen gehören hier die Mutationen im BRCA-1 oder BRCA-2-Gen, welche das Brustkrebsrisiko auf bis zu 80% erhöhen (5, 6). Ins Bewusstsein der Gesellschaft rückten diese in den letzten Jahren durch öffentliche Bekenntnisse bekannter

Persönlichkeiten davon betroffen zu sein, wie etwa von Angelina Jolie, welche sich 2013 einer präventiven beidseitigen Mastektomie unterzog (7). Infolgedessen kam es weltweit zu einer vermehrten Nachfrage nach einer diesbezüglichen genetischen Beratung, was als Jolie-Effekt bezeichnet wurde (8). Weitere bekannte genetische Risikofaktoren unterteilen sich in solche mit hoher Penetranz (p53, PTEN, ATM, NBS1, LKB1) und weitere Gruppen mit niedrigerem Durchbruchrisiko wie die Chytochom P450 Gene (CYP1A1, CYP2D6, CYP19), einige Stoffwechselgene (MTHFR, ADH1C), DNA-Reparatur-Gene (XRCC1, XRCC3, ERCC4/XPF) und Signalmoleküle (PR, ER, TNF α , HSP70) (9).

Viel entscheidender erscheinen jedoch auf die gesamte Bevölkerung bezogen die nicht erblichen Risikofaktoren. Hierzu zählen einerseits individuelle Faktoren wie ein Mammakarzinom in der Eigenanamnese, frühe Menarche, späte Menopause, späte Erstparität oder Kinderlosigkeit und eine höhergradige Masthopathie (10,11,12), sowie andererseits die potenziell modifizierbaren Risikofaktoren Adipositas, Diabetes mellitus, Bewegungsmangel, Nikotinabusus und hormonhaltige Medikamente v.a. postmenopausale Ersatztherapie (10,13,14,15). Auch vermehrter Alkoholkonsum kann möglicherweise zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko beitragen (16).

1.1.3 Klassifikation und stadiengerechte Therapie

Fast so vielfältig wie die Risikofaktoren sind die verschiedenen histopathologischen Formen des Mammakarzinoms, deren häufigste das invasive duktales Karzinom (IDC) darstellt, welches nach der WHO seit 2003 offiziell als NST (no special type) bezeichnet wird (17, 18). In die zweite Hauptgruppe fallen die invasiven lobulären Karzinome (ILC), deren Ursprungsort im Gegensatz zum duktales Karzinom im Bereich der Azini liegt (19, 20).

Von den invasiven Karzinomen sind die lokal begrenzten Formen des ductalen Carcinoma in situ (DCIS) und des lobulären Carcinoma in situ (LCIS) abzugrenzen (18), welche auf Grund ihres frühen Stadiums eine deutlich bessere Prognose aufweisen (17).

Von besonderer Bedeutung für die nachfolgende Wahl der Therapie ist die Klassifizierung nach der Tumorbiologie bzw. des Hormonrezeptorstatus des

Mammakarzinoms. Dabei wird im Besonderen nach zwei Hormonrezeptoren gesucht, dem für Östrogen (ER) und dem für Progesteron (PR), (21) sowie nach dem Rezeptor Her2/neu (auch epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 oder ErbB2 genannt), welcher der Familie des Epidermalen Growth Factor Receptor (EGFR) angehört (22). Ist keiner davon in der Immunhistochemie bzw. molekularen Diagnostik positiv, spricht man von einem tripel-negativem Mammakarzinom (23). Weitere molekulare Subtypen gemäß der St. Gallen-Klassifikation stellen Luminal-A und -B, sowie Her2-Type non-luminal und der Basal-like-Typ dar (24). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die zugehörigen Charakteristika.

Tabelle 1 Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms nach dem St.Gallen-Konsensus von 2009 (24)

Subtyp		ER/PR-Status	HER2-Status	Ki-67
Luminal A		positiv	negativ	niedrig
Luminal B	HER2-negativ	positiv	negativ	Hoch
	HER2-positiv		positiv	jeder Wert
HER2-positiv		negativ	positiv	jeder Wert
Triple-negativ		negativ	negativ	jeder Wert

Die Bestimmung des ER- und PR-Status erfolgt immunhistochemisch am Paraffinschnitt mit Hilfe mono- oder polyklonaler Antikörper (25), die des Her2/neu-Status entweder ebenfalls immunhistochemisch (Rezeptor) oder über den Nachweis der Genamplifikation mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bzw. Chromogen-in-situ-Hybridisierung (CISH) (22).

Zusätzlich zum Hormonrezeptorstatus kann ergänzend die Proliferationsrate durch den immunhistochemischen Nachweis des Markers Ki-67 bestimmt werden (23). Hierauf wird in Kapitel 4.3 noch näher eingegangen werden.

Aufgrund einer abgelehnten Empfehlung durch die aktuelle S3-Leitlinien-Gruppe (23) wird auf die nähere Vorstellung der Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 nachfolgend verzichtet. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass sie nach den aktuellen ASCO-Leitlinien zur Entscheidung über den Einsatz einer adjuvanten systemischen Therapie bei ER-/PR positivem und HER2-negativem nodal-negativem Mammakarzinom, herangezogen werden können (23, 26).

Für die Therapiefindung von mindestens so großer Bedeutung wie der immunhistochemische Status des Mammakarzinoms ist dessen klinisch-pathologische Klassifikation. Diese erfolgt leitliniengemäß anhand der TNM-Klassifikation, welche die lokale Gewebeanvasion, den Lymphknotenstatus, sowie eine etwaige vorliegende Fernmetastasierung berücksichtigt (23, 27). Auf dieser Grundlage kann das Stadium der Tumorerkrankung nach UICC festgelegt werden (27).

Das Stadium IV ist gekennzeichnet durch das Auftreten einer Fernmetastasierung (27). In dieser Situation ist zumeist eine palliative Therapie anzustreben. Im Fokus steht hier die Symptomreduktion und vor allem der Erhalt der Lebensqualität. Dies ist jedoch nicht automatisch gleichbedeutend mit dem Verzicht auf eine systemische Therapie. Neben der endokrinen Therapie (s.u.) gibt es in zunehmendem Maße sog. „targeted therapies“, zielgerichtete Therapien, welche tumorassoziierte molekulare Vorgänge ausnutzen. Bekannte Beispiele sind hier Trastuzumab bei positivem Her2/neu Status oder der VEGF-Inhibitor Bevacizumab (23).

Selbstverständlich finden diese modernen Wirkstoffe auch Eingang in die kurative Therapie des Mammakarzinoms. Entscheidend für den Behandlungserfolg ist jedoch noch immer die Operation, welche heute in ca. 70 % brusterhaltend erfolgen kann (28). Voraussetzungen dafür sind eine lokale Begrenzung ohne Infiltration von Haut oder Muskulatur, eine günstige Lage des Tumors so wie eine ausreichende Relation von Tumor und Brustgröße (28). Auch nach einer lokalen R0-Resektion, d.h. tumorfreien Resektionsrändern mit ausreichendem Sicherheitsabstand, folgt in diesem Fall eine Strahlentherapie (23).

Kontraindikationen stellen multizentrische und inflammatorische Mammakarzinome, sowie ein ungünstiges Tumor-Brust-Größenverhältnissen oder die Ablehnung einer Strahlentherapie durch die Patientin dar (23, 28). Therapeutisch erfolgt entsprechend die Mastektomie (23). Eine Bestrahlung kann auch hier indiziert sein und ist abhängig von Tumorstadium und Infiltration (23). Zumeist erfolgt vor der Operation eine Markierung des Sentinel-Lymphknotens, über welchen die Lymphe des Tumorgebietes drainiert wird. Dieser wird extirpiert und pathologisch begutachtet. Bei einem Befall ist eine Entfernung der axillären Lymphknoten bis zu Level II, in seltenen Fällen bis Level III, indiziert (23).

1.1.4 Systemische Therapie

Neben den bereits oben erwähnten „target therapies“ gibt es bei der systemischen Therapie auch die Möglichkeit einer Hormontherapie und einer Chemotherapie. Durch ihren Einsatz kann das Risiko für Fernmetastasen um ca. ein Drittel gesenkt werden (29). Die Therapieentscheidung fällt je nach Risikoeinstufung, auch eine Kombinationstherapie kann indiziert sein.

Bei erwartetem Ansprechen auf eine endokrine Therapie werden je nach menopausalem Status der Patientin das Antiöstrogen Tamoxifen (prämenopausal) oder Aromatasehemmer (postmenopausal) angewandt (23). Auch ein GnRH Agonist, zur Suppression der hormonellen Ovarfunktion, kann zum Einsatz kommen (23).

Eine Indikation zur Chemotherapie besteht dann, wenn der individuelle zu erwartende Nutzen höher ist als mögliche Nebenwirkungen und Spätschäden (23). In welcher Situation dies zutrifft, ist ein viel diskutierter Aspekt der Therapie des Mammakarzinoms. So weisen die St.-Gallen-Empfehlungen von 2009 und 2011 auf die endokrine Sensitivität sowie die molekularen Subtypen als entscheidende Kriterien für die Indikationsstellung zur adjuvanten Chemotherapie hin (23, 24, 30).

Während bei einem hohen Risiko, entsprechend der Risikoeinstufung des Mammakarzinoms nach Konsensus St. Gallen 2009, 2011 (24, 30), in den meisten Fällen eine klare Indikation zur Chemotherapie besteht, besonders bei tripel-negativen Karzinomen, ist diese bei niedrigem Risiko und positivem Therapieansprechen auf die endokrine Behandlung nicht indiziert (23). Die Schwierigkeit der Therapiefindung ergibt sich im mittleren Risikobereich. 70-80% der Patientinnen denen nach standardisierten Risikoprädiktoren, wie unter anderem dem histologischen Grading und dem Lymphknotenstatus, eine Chemotherapie angeboten wird profitieren davon nicht, weil sie auch ohne die Intervention überlebt hätten (28). Selbst Laien ist zumeist bekannt, dass eine Chemotherapie mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen und auch gesundheitlichen Folgerisiken einher geht. Zum einen sind hier die Effekte der akuten Toxizität (z.B. Emesis, Nausea, Alopezie), daneben aber vor allem potenziell langfristig Lebensqualität einschränkende Nebenwirkungen, wie etwa Fatigue, Amenorrhoe, sensorische Polyneuropathie, „Chemobrain“ und im besonderen potenziell lebensbedrohliche

Folgeerkrankungen wie z.B. Herzinsuffizienz und sekundäre Leukämien anzuführen (22, 31-35). Unter diesem Gesichtspunkt ist eine Übertherapie zu vermeiden.

Ebenso wenig ist jedoch der umgekehrte Fall zu riskieren, in dem es durch eine unterlassene Chemotherapie zu einer Prognoseverschlechterung kommt. In den letzten Jahren wurde viel an der Entwicklung belastbarer Tools gearbeitet, welche die Entscheidungsfindung in genau dieser Situation erleichtern sollen (23, 28).

Vorrangig haben sich Gentests des Tumorgewebes auf häufige, prognosebeeinflussende Mutationen etabliert. Als Beispiele für kommerzielle Tests sind hier EndoPredict®, MammaPrint®, Oncotype DX® und Prosigna® zu nennen (23). Diese Aufführung erhebt jedoch keinesfalls Anspruch auf Vollständigkeit.

Seit Januar 2020 sind solche Gentests unter bestimmten Voraussetzungen eine Leistung der gesetzlichen Krankenversicherung (35, 36, 37). Für den Oncotype DX® sind das Hormonrezeptor-Positivität, ein negativer HER2/neu-Status und ein frühes Tumorstadium ohne Fernmetastasierung (36, 37, 38).

Da hierdurch jedoch nicht alle Situationen abgedeckt werden, in denen eine Hilfestellung zur Therapiefindung wünschenswert ist, ist dies zurzeit ein aktiver Forschungsbereich (23) und auch die vorliegende Arbeit möchte einen Beitrag zum Erkenntnisgewinn auf diesem Feld leisten (s. Kapitel 1.3). Der Gentest Oncotype DX® wird unter Kapitel 1.2 noch näher vorgestellt werden.

Ist eine Chemotherapie indiziert, kann diese sowohl neoadjuvant als auch adjuvant durchgeführt werden. Bezüglich des Gesamtüberlebens sind beide Verfahren als gleichwertig anzusehen (23). Möglicherweise führt die neoadjuvante Therapie jedoch zu einer höheren Rate an brusterhaltenden Therapien (23). Leitliniengemäß enthält die adjuvante Chemotherapie ein Taxan und ein Anthrazyklin (z.B. Epirubicin) (23). Eine weitere, häufig in Kombination eingesetzte Substanz ist Cyclophosphamid (23). Der Stellenwert von Gemcitabine und weiteren neuen Substanzen ist in der Therapie des Mammakarzinoms noch umstritten (23).

1.2 Oncotype DX®

1.2.1 Hintergrund

Der OncotypeDX® ist einer der in Deutschland meistgenutzten Multigentests zur Risikostratifizierung des Mammakarzinoms. Entwickelt wurde er 2004 in den USA, 2009 erfolgte die Markteinführung in Europa (39) und seit Januar 2020 war er als erster der prädiktiven Multigentest des Mammakarzinoms eine Kassenleistung (36, 37).

Basierend auf einem 21-Gene umfassenden RT-RNA-Assays (Reverse Transkription) (41, 42) bietet er eine durch zahlreiche klinische Studien validierte Vorhersage (23, 39-49) für die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und den klinischen Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie beim nodal-negativen, ER-positiven, Frühstadium des Mammakarzinoms (40).

Als Untersuchungsmaterial dient das in der primären Operation gewonnene und nach Formalinfixierung eingebettete Tumormaterial, wodurch kein weiterer Eingriff für die Patientinnen notwendig ist und auch eine aufwändige Logistik, wie etwa bei schockgefrostenem Material, entfällt (39, 40, 50). Die Aufarbeitung und Testung der Probe erfolgt standardisiert im Labor von Genomic Health® (Entwickler des Oncotype DX Brustkrebstest), wozu das histologische Präparat über ein zentrales Labor in Frankfurt am Main in die USA versandt wird (39).

Mit dem OncotypeDX® wird die Expression von 16 krebsassoziierten Genen und fünf Referenzgenen untersucht (39, 40). Die Ergebnismitteilung der Analyse erfolgt in Form des Recurrence Score®, dessen Wert zwischen 0 und 100 liegt (41).

1.2.2 Bewertung und Studienlage

Bei einem Wert von 0-10 des Recurrence Score® kann von einem niedrigen Risiko für ein Rezidiv und folglich für die fehlende Notwendigkeit einer Chemotherapie ausgegangen werden (38, 41), wohingegen bei einem Wert größer 26 die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie untermauert wird (38, 41). Für den mittleren Recurrence-Score®-Bereich (Werte von 11 bis 25) wurde das Risiko explizit in der TAILOR X Studie untersucht und als moderat bewertet, so dass nicht von einem allgemeinen Benefit durch

eine Chemotherapie auszugehen ist, sondern vielmehr die Gefahr der Übertherapie besteht (41). Allerdings gibt es hierbei Unterschiede in den Altersgruppen. So zeichnet sich ab, dass in der Gruppe Patientinnen bis einschließlich 50 Jahre mit einem Recurrence-Score® zwischen 16 und 25, im Gegensatz zu älteren Patientinnen und solchen mit einem Recurrence-Score® unter 16, einige von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren könnten (41).

Mit der Tailor-X-Studie konnten Limitationen der gebräuchlichen klinisch-pathologischen Risikoeinstufung aufgezeigt werden (41, 45). Das betrifft nicht nur wie oben ausgeführt die potenzielle Übertherapie. In der Studie zeigte sich, dass es auch eine relevante Fallzahl an Patientinnen gab, die mit der klassischen pathologischen Risikoeinstufung untertherapiert worden wäre: 43 % der Patientinnen aus der Gruppe mit einem Recurrence-Score® ≥ 26 wurden nach der pathologischen Risikobewertung einer niedrigen Risikokategorie zugeordnet (45). Durch eine kombinierte chemo-endokrine Therapie dieser Patientinnen konnte das Auftreten eines Rezidivs im Vergleich zur Erwartungshaltung bei alleiniger endokriner Therapie deutlich gesenkt werden (45).

Mit 10.273 eingeschlossenen Patientinnen stellt die Tailor X-Studie die bisher größte zur adjuvanten Behandlung von Brustkrebs dar (41). Ihre Ergebnisse fanden weltweit Berücksichtigung in der Anpassung von Behandlungsleit- und Richtlinien (23, 24, 26, 51, 52, 53).

Neben der Tailor X Studie untersuchen noch weitere Phase III Studien den Oncotype DX® prospektiv in der klinischen Praxis. Die Westdeutsche Studiengruppe konnte mit der WSG PlanB Studie bei nodal-positiven Patientinnen bzw. nodal-negativen, aber klinischen Hochrisiko-Patientinnen den prädiktiven Wert des Recurrence-Scores® bestätigen und zeigte, dass diese Patientinnen bei einem Recurrence-Score®-Wert ≤ 11 auch ohne adjuvante Chemotherapie ein gutes Outcome haben (44). Die Ergebnisse der RxPONDER-Studie, einer randomisierten klinische Studie bei HR+, HER2-, nodal-positiven Patientinnen, sowie der ADAPT-Studie werden noch erwartet (39, 42).

Durch die TransATAC-Studie und die SWOG-8814-Studie konnte bereits bei nodal-positiven Patientinnen sowohl ein prognostischer (46) als auch ein prädiktiver (54) Informationsgewinn durch den Oncotype DX® bestätigt werden.

Dadurch wurde gezeigt, dass die Fernrezidivrate sowohl bei negativem als auch positivem Nodal-Status mit Zunahme des Recurrence Score® steigt (46, 54, 55). Weiterhin stützen prospektiv gewonnene Daten aus dem SEER-Register die Studienlage zum Oncotype DX® (56).

Damit gebührt dem Recurrence-Score® der Rang eines unabhängigen prognostischen Markers (48, 57). Beim nodal-negativen ER positiven Frühkarzinom bietet er ein akkurateres Maß für die Aggressivität von Brustkrebs und das therapeutische Ansprechen als die Standardmethoden (40).

Der Oncotype DX® wurde bislang weltweit bereits bei über einer Million Patientinnen eingesetzt (39). Kein weiterer Multigentest zur Risikostratifizierung bei Brustkrebs verfügt über eine so umfangreiche Studienlage (23). Für den Oncotype DX® liegen sowohl Daten aus prospektiven klinischen Studien als auch aus Registerstudien vor (23, 56). Aus diesem Grund wurde er als repräsentativer Vertreter der Multigentests für den Vergleich mit immunhistochemischen Markern der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

1.2.3 21-Gen-Expressions-Assay

Beim Oncotype DX® wird das Tumorgewebe mittels quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) auf die Expression von 21 Genen untersucht (39). Diese Gene lassen sich verschiedenen Gruppen zuordnen. Fünf von Ihnen dienen als Referenzgene, welche die Erfassung des zugrundeliegenden Expressionslevels des Gewebes und den Ausgleich von Störfaktoren ermöglichen (40). Die 16 krebsassoziierten Gene des Tests beeinflussen die Proliferation, die hormonelle Regulation über den Östrogenrezeptor, sowie die Invasion und den Her2/neu Signalweg (39, 40). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Gengruppen.

Tabelle 2 Gen-Panel des Oncotype DX® (nach Cronin et al., 2007 (40) und www.oncotypeiq.com, 2021 (40)).

REFERENZGENE	PROLIFERATION	ÖSTROGEN	INVASION	HER ₂	ANDERE
β-Actin	KI-67	ER	Stromelysin 3	HER ₂	GST M ₁
GAPDH	STK ₁₅	PR	Cathepsin L ₂	GBR ₇	CD ₆₈
GUS	Survivin	Bcl ₂			BAG ₁
RPLPO	Cyclin B ₁	SCUBE ₂			
TFRC	MYBL ₂				

Die Auswahl dieser Gene für den Multigenassay erfolgte anhand von drei Korrelationsstudien, welche eine enge Assoziation zwischen den 16 krebsbezogenen Genen und dem Outcome der Patientinnen zeigten, sowie eine konstante Expression der Referenzgene und das Fehlen einer Korrelation zwischen diesen und dem Outcome (40). In den Recurrence-Score® fließen die aus den Expressionsleveln der einzelnen Gene ermittelten Gruppenwerte in unterschiedlicher Gewichtung mit ein (55).

1.3 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit setzt sich zum Ziel die folgenden Fragen zu beantworten:

- Zeigt sich für die ausgewählten immunhistochemischen Marker ein klarer Zusammenhang mit der Höhe des Recurrence-Scores®?
- Gibt es einen oder mehrere immunhistochemische Marker mit prädiktivem Wert für die Recurrence-Score®-Gruppen?
- Zeigen sich diesbezüglich Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven mit Alter ≤ 50 Jahren bzw. > 50 Jahren?
- Existiert ein Zusammenhang zwischen einzelnen Marker untereinander?
- Gibt es ein immunhistochemisches Profil mit Vorhersagewert für den Recurrence-Score®?

2. Patientinnen und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die Patientendaten wurden unumkehrbar anonymisiert. Hierdurch wurden mögliche Rückschlüsse auf einzelne Patientinnen aus der Darstellung der Ergebnisse ausgeschlossen. Die Ausrichtung der Arbeit erfolgte entsprechend der Richtlinien der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg. Ein Votum der Kommission war für die vorliegende Untersuchung nicht erforderlich. Eine Unbedenklichkeitsbescheinigung (Aktenzeichen 2018041301) liegt vor (58).

2.2 Patientinnen

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 79 Fälle von Patientinnen untersucht, bei denen zwischen den Jahren 2012 und 2018 die primäre Diagnose Brustkrebs gestellt wurde. Das Alter bei Diagnosestellung lag zwischen 28 und 76 Jahren. Aufbauend auf dem Kollektiv einer Vorläuferarbeit von Dr. Lea Frey (50), wurden in das Studienkollektiv insgesamt 60 Fälle aus dem Leopoldina Krankenhaus in Schweinfurt (*Leopoldina-Krankenhaus der Stadt Schweinfurt GmbH, Gustav-Adolf-Str. 8, 97422 Schweinfurt*) und 19 Fälle aus der Missionsärztlichen Klinik am Mönchberg in Würzburg, seit 2017 Teil des Klinikums Würzburg Mitte (*Klinikum Würzburg Mitte gGmbH, Salvatorstr. 7, 97074 Würzburg*), aufgenommen.

Primäres Einschlusskriterium war das Vorliegen eines Recurrence Score® Wertes aus der Oncotyp DX® Untersuchung. Veranlasst wurden diese Testungen jeweils nach Empfehlung eines interdisziplinären Tumorboardes mit Zustimmung der Patientinnen. Als empirisch belegter prädiktiver Faktor für den Benefit einer Chemotherapie (23, 39-49), fließt der Recurrence Score® in die Entscheidung zur Indikationsstellung einer Chemotherapie bei Patientinnen in einem frühen Stadium von invasivem Brustkrebs mit ein (23). Die Kriterien des Tumorprofils, welche zur Auswahl der Patientinnen für eine Oncotype DX®-Testung herangezogen wurden, können folglich als sekundäre Einschlusskriterien der Studie betrachtet werden. Diese sind in weitestgehender Übereinstimmung mit dem Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses vom 15. Oktober 2020 (38):

- Mammakarzinom in einem frühen Stadium
- ER+
- HER2-
- Lymphknotenstatus N0-N1

Bei einer Patientin des Leopoldina Krankenhauses wurden aufgrund zweier unterschiedlicher Primarii auch zwei Oncotype DX® Untersuchungen durchgeführt, die zu unterschiedlichen Recurrence Score® Werten führten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden diese als zwei Fälle geführt, da hier der direkte Vergleich des immunhistochemischen Panels mit dem Recurrence Score® interessiert und nicht der Bezug zum Outcome der Patientin.

In der überwiegenden Anzahl der Fälle lag ein Mammakarzinom (Mamma-Ca) vom *non special type* (NST) vor. Daneben wiesen 12 der Fälle Carcinome vom invasiv lobulärem Typ auf. In Einzelfällen fanden sich ein muzinöses, sowie ein invasiv tubuläres, ein invasives ductales und ein papilläres Mamma-Ca mit neuroendokriner Differenzierung (siehe Tabelle A2, IV Anhang). Der Differenzierungsgrad lag bei über 80 Prozent der Fälle im mittleren Bereich (G2). Eingeschlossen wurden Fälle von G1-G3. In ca. der Hälfte der Fälle waren die Lymphknoten tumorfrei (pN0). Die andere Hälfte setzt sich aus pN1 und pN1mi Status-Fällen zusammen.

2.3 Tissue-Mikro-Arrays

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Tissue-Micro-Arrays (TMA) durchgeführt. Erstellt wurden diese manuell unter Verwendung des Gerätes MTA-1 (manuell tissue arrayer-1, Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) mit einem Kerndurchmesser der histologischen Proben von 600µm. Zuvor wurden auf Hämatoxylin und Eosin gefärbte Objektträger je vier repräsentative Bereiche jeder Tumorprobe ausgewählt und auf dem entsprechenden Paraffinblock markiert. Die Übertragung auf die

zwei Empfängerblöcke erfolgte anschließend mittels Stanzverfahren. Als Vergleichsmaterial wurde Gewebe von der Niere und den Tonsillen gewählt.

2.4 Immunhistochemie

Die Vorbereitung der Objektträger und Ausführung der Paraffinschnitte sowie die Durchführung der IHC-Färbungen erfolgte nach den einheitlichen Standardverfahren des pathologischen Institutes der Universität Würzburg (*Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg; Institutsvorstand: Prof. Dr. Andreas Rosenwald*). Nachfolgende Tabelle 3 gibt eine Übersicht zu den hierfür verwendeten Antikörperchargen.

Tabelle 3 Für die Immunhistochemische Färbung verwendete Antikörper mit Verdünnung.

Nr.	Marker	Hersteller	Clone	Verdünnung
1	AMACR	BioLogo	13H4	1:50
2	Bcl 2	Dako	Clone124	1:50
3	Cyclin D1	Leica	P2DMFM	1:20
4	CDK4	DCS	DCS-35	1:200
5	CD56	Leica	1B6	1:50
6	D20-40	Dako	D20-40	1:20
7	Glut 1	Bio Genex	SPM498	1:1 (ready to use)
8	MDM2	Zyted	3G187	1:200
9	MLH1	Leica	ES05	1:100
10	MSH2	Leica	25D12	1:100
11	MSH6	Leica	PU29	1:200
12	PMS2	Leica	MOR4G	1:25
13	p57	Santa Cruz BT	KP39	1:400
14	P27	BD Bioscience	57	1:400
15	pERK	Cell-Signal	D13.14-4E	1:800
16	PDL-1	Quartett	QR1	1:200
17	p53	Dako	D0-7	1:50
18	RB	Medac	3C8	1:800

Die Auswertung erfolgte zum einen durch die Promovendin, zum anderen durch den Betreuer (HUV). Tabelle 4 gibt eine Übersicht zum Auswertungsschema bezogen auf die einzelnen Marker. Bei mehr als zwei Ausprägungen erfolgte in der Datenauswertung eine zusätzliche Analyse mit Zusammenfassung in je zwei Ausprägungsgruppen (im Folgenden als Dichotomisieren bezeichnet). Siehe hierzu Kapitel 3.1 mit Unterpunkten.

Tabelle 4 Auswertungsschema der Marker nach Ausprägung

Nr.	Marker	Anzahl Kategorien	Ausprägung
1	AMACR	2	negativ: normale Expression positiv: Überexpression
2	Bcl 2	3	negativ schwach positiv stark positiv
3	Cyclin D1	3	negativ schwach positiv stark positiv
4	CDK4	3	negativ schwach positiv stark positiv
5	CD56	2	negativ positiv
6	D20-40	2	negativ positiv
7	Glut 1	3	negativ schwach positiv stark positiv
8	MDM2	2	negativ positiv
9	MLH1	2	negativ positiv
10	MSH2	2	negativ positiv
11	MSH6	2	negativ positiv
12	PMS2	3	negativ neutral positiv
13	p57	2	negativ positiv
14	P27	2	negativ positiv
15	pERK	4	negativ Expression < 10% Expression >10% jedoch < 50% Expression > 50%
16	PDL-1	3	negativ: fehlende Expression positiv: normale Expression stark positiv: Überexpression
17	p53	2	negativ positiv
18	RB	2	negativ positiv

2.5 Statistik

Für die vorliegende Arbeit wurden Daten zu 18 immunhistochemischen Markern für 79 Fälle, mit bekanntem Recurrence-Score®-Wert und entsprechender klinisch-pathologischer Einstufung, erhoben. Zusätzlich wurde der im Rahmen der pathologischen Beurteilung routinemäßig bestimmte Wert Ki 67% in die Betrachtung mit aufgenommen.

Datenstrukturierung sowie statistische Analysen und Datenplot erfolgten durch die Promovendin mit den Softwareprogrammen **Excel®** (Version 2009; Microsoft® Excel®365 MSO 16.0.13321.20110) und **R** (RVersion: 4.0.2 (2020-06-22) bzw. **Rstudio** (Version 1.3.1093), *Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>*)

2.5.1 Statistische Analyse der Marker gegen den Recurrence-Score®

Die erhobenen Daten erreichen Nominal- bis Ordinalskalenniveau. Eine einfache Übersicht über die Verteilung erfolgte mittels Boxplots und Histogrammen. Der Vergleich der Mediane zwischen verschiedenen Ausprägungsgruppen der Marker wurde mittels Mann-Whitney-U-Test (Synonym: Wilcoxon-Test) oder bei mehr Stichproben mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Beim Recurrence-Score® handelt es sich um einen medizinischen Risikoscore. Solche Scores werden allgemein entwickelt, um im klinischen Alltag den Vorteil einer quantitativen Datenauswertung nutzen zu können (59). Häufig wird hier das Intervallskalenniveau angenommen, streng mathematisch betrachtet erreichen Sie jedoch meist Ordinalskalenniveau (59).

In der vorliegenden Arbeit wird von einem Quasi-Intervallskalenniveau des Recurrence-Scores® ausgegangen. Insbesondere für die Darstellung der Datenverteilung wird das Intervallskalenniveau angenommen. Für die Verwendung des arithmetischen Mittelwertes dagegen ist diese Annahme nicht hinreichend, deshalb wurde sich in dieser Arbeit auf die Angabe des Medians beschränkt.

Für die Analyse erfolgte eine Transformation der Recurrence-Score®-Daten in Kategorien, welche im Folgenden als Recurrence-Score®-Gruppen (R-Gruppen,

Recurrence-Gruppen) bezeichnet werden. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die einzelnen Analysen und dafür angewandte Reccurrence-Score®-Gruppen.

Tabelle 5 Auswertungsschema der immunhistochemischen Marker gegen die Recurrence-Score®-Gruppen.

Analyse		Kollektiv	Recurrence-Score©-Gruppen				
1		Gesamtkollektiv	4 Gruppen	0	1	2	3
2	2.1	≤ 50 Jahre		0 ≤ 10	11 ≤ 15	16 ≤ 25	≥ 26
	2.2	> 50 Jahre					
3		Gesamtkollektiv	3 Gruppen	0	1	2	
				0 ≤ 10	11 ≤ 25	≥ 26	
4		Gesamtkollektiv	2 Gruppen	0	1		
5	5.1	≤ 50 Jahre		0 ≤ 15	≥ 16		
	5.2	> 50 Jahre					

Die Korrelationsanalyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test). Fallzahlenbedingt konnten die Voraussetzungen des χ^2 -Testes (jeder Kreuztabellenwert sollte ≥ 5 , keiner 0 betragen) nicht für jede Analyse vollständig erfüllt werden. In solchen Fällen kann es zu einer relevanten Abweichung des nach χ^2 -Test geschätzten p-Wertes vom tatsächlichen kommen (59). Daher wurde für alle Analysen zusätzlich der Fisher-Test (genaue Berechnung des p-Wertes) durchgeführt.

Als Korrelationsmaß wurden der Phi-Koeffizient, der Kontingenzkoeffizient, sowie Cramer V herangezogen. Der Phi-Koeffizient ist jedoch nur bei zwei dichotome Merkmale zulässig. Cramer V entspricht der Verallgemeinerung des Phi-Koeffizienten für den Mehrfeldertest, daher ist er bei dichotomen Daten identisch mit dem Phi-Koeffizienten, so dass sich auf die Angabe von Cramer V beschränkt werden kann. Die Interpretation des Kontingenzkoeffizienten ist mit der Schwierigkeit behaftet, dass er nur für große Datensätze mit vielen Variablen wirklich sinnvoll einsetzbar ist, da er den Wert 1 nur bei völliger Unabhängigkeit der Variablen erreichen kann (59). Der Vollständigkeit wegen wird er in dieser Arbeit jedoch mit angegeben.

2.5.2 Paaranalyse der immunhistochemischen Marker

Zur Analyse der Beziehungen zwischen den relevanten Markern erfolgte eine Paaranalyse der einzelnen Marker gegeneinander unter Berücksichtigung des Gesamtkollektives. Eine Multivariate-Analyse war aufgrund des Skalenniveaus der erhobenen Daten nicht möglich (s. 2.5.1). Es erfolgte die Korrelationsanalyse analog zur Anwendung beim Recurrence-Score® (s. 2.5.1) mittels Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test), Fisher-Test, Phi-Koeffizient, Kontingenzkoeffizient, sowie Cramer V.

2.5.3 Rangkorrelation

Der Großteil der in dieser Arbeit gewonnenen Daten erreichte maximal Ordinalskalenniveau, so dass eine Korrelationsanalyse über einen Gruppen- bzw. Kreuztest (X^2 -Test bzw. Fisher-Test) hinaus für diese nicht möglich war (s. o.). Anders verhält es sich für die bereits vorliegenden Daten des Kollektivs zu Alter bei Diagnosestellung und Ki 67%. Letzteres erreicht durch prozentuale Auswertung (in der Routine-Diagnostik validiert) Verhältnisskalenniveau. Das Alter entspricht natürlicherweise einem metrischen Parameter. Diesen gegenüber steht der Recurrence-Score©, für welchen, wie unter 2.5.1 beschrieben, im Rahmen gängiger medizinischer Praxis ein Quasi-Intervallskalenniveau angenommen wird. Eine Korrelation nach Pearson scheidet mit intervallskalierten Daten bereits aus, eine Rangkorrelation nach Spearman dagegen ist möglich. Für die Rangkorrelation des Recurrence-Scores© gegen das Alter und gegen Ki 67% wurde das Intervallskalenniveau angenommen (s. Kapitel 4.5).

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Marker und Recurrence-Score©

Die Analyse der immunhistochemischen Marker gegen den Recurrence-Score erfolgte nach dem in Kapitel 2.5.1 vorgestellten Schema in Gruppen (s. Tabelle 5, Kapitel 2.5.1). Die in der Auswertung berücksichtigten Fälle variierten dabei pro Marker in ihrer Anzahl bedingt durch Ausfälle in der Immunhistochemie und Materialverluste durch die Microarrays bei geringer Ausgangsmenge des Probenmaterials (s. Übersicht zur immunhistochemischen Auswertung Tabelle A1 im Anhang IV). Bei mehr als zwei möglichen Merkmalsausprägungen erfolgte eine zusätzliche Auswertung des entsprechenden Markers nach Datentransformation in ein dichotomes Merkmal.

Nachfolgend werden die Ergebnisse zu den einzelnen Markern mit ihren wichtigsten statistischen Kenngrößen präsentiert. Ausführliche Tabellen mit allen Testergebnissen und den dazugehörigen Bezugsgrößen findet sich im Anhang (s. IV, Tabelle A3 – A9).

3.1.1 Interessante Marker

3.1.1.1 *AMACR*

Für den immunhistochemischen Marker AMACR konnten 72 Fälle in die Auswertung mit aufgenommen werden. In der Verteilung des Recurrence-Scores© zeigte sich eine leichte Links-Schiefe im Histogramm (Abb. 1b). Abb. 1 a lässt einen Unterschied in der Höhe des Recurrence-Scores© mit Zunahme bei stärkerer Ausprägung von AMACR erkennen. Der Unterschied zwischen den Medianen war statistisch signifikant ($p = 0.01881$).

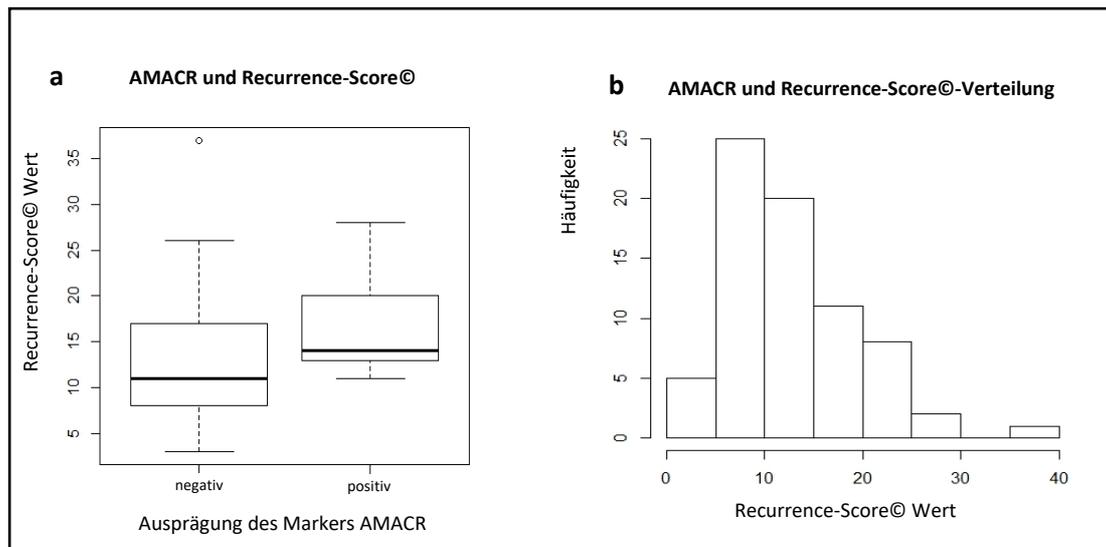


Abb. 1 Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von AMACR im Bezug auf den Recurrence-Score®. **a** Boxplot: p-value = 0.01881 (nach Mann-Whitney-U-Test) **b** Histogramm

Im Wahrscheinlichkeitstest erwies sich ein Zusammenhang von AMACR und den vier Recurrence-Gruppen für das Gesamtkollektiv (Test 1) als hochsignifikant (**Fisher-p-value= 0.004445**, X^2 -p-value = 0.01706). Die Korrelation erreicht eine mittlere Stärke (Cramer V = 0.3761, Kontingenz-Koeffizient = 0.3520).

Auch für die Gruppe der Patientinnen einschließlich 50 Jahre (Test 2.1) kann die Nullhypothese abgelehnt werden (Fisher-p-value= 0.02573, X^2 -p-value = 0.02428). Hier kann sogar von einer starken Korrelation ausgegangen werden (**Cramer V = 0.5064**, Kontingenz-Koeffizient = 0.4518).

Dagegen erreicht der p-value im Kollektiv der Patientinnen über 50 Jahre (Test 2.2) das Signifikanzniveau von 5% nicht, bleibt aber unter der 10 % Grenze (**Fisher-p-value= 0.09879**, X^2 -p-value = 0.1867, Cramer V = 0.3343, Kontingenz-Koeffizient = 0.3170).

Abb. 2 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Fälle in den R-Gruppen für die bisher genannten Analysen.

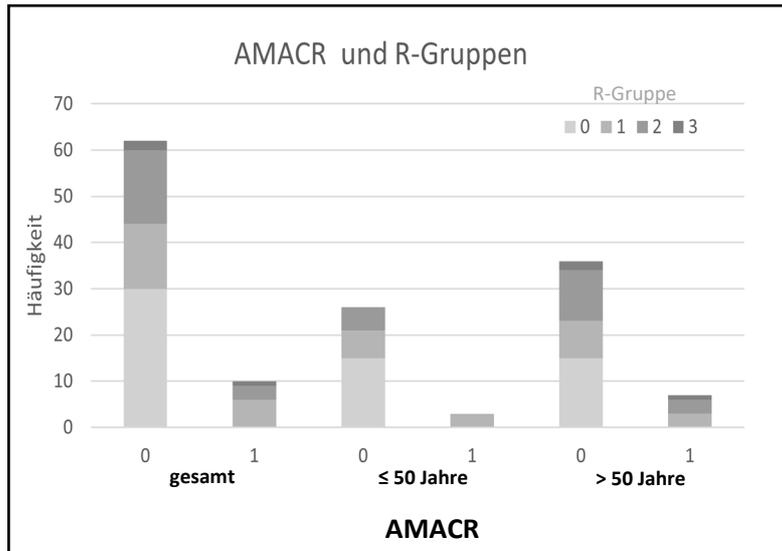


Abb. 2 Häufigkeiten in den vier R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 15$; 2: $16 \leq 25$ und 3: ≥ 26) und AMACR-Ausprägung (0 = negativ, 1 = positiv) für das Gesamtkollektiv, sowie nach Alter.

Für die klassischen Recurrence-Score[©]-Gruppen (Test 3), also low ($0 \leq 10$), intermediate ($11 \leq 15$) und high (≥ 26) erreicht der Zusammenhang mit AMACR ebenfalls das höchste Signifikanz-Level (**Fisher-p-value= 0.006381**; X^2 -p-value = 0.01398) bei einer mittlerer Stärke der Korrelation (Cramer V = 0.3444, Kontingenz-Koeffizient = 0.3256). Die Häufigkeiten in den R-Gruppen hierfür zeigt Abbildung 3.

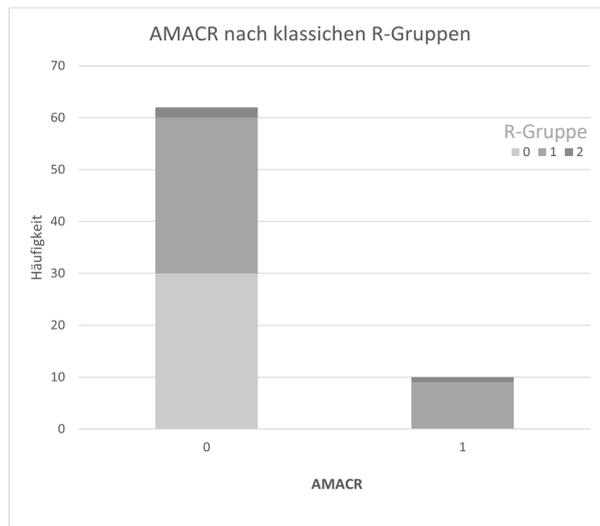


Abb. 3 Die Häufigkeiten in den klassischen R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2 ≥ 26) und AMACR (0 = negativ, 1 = positiv)

Dagegen kann ein Zusammenhang bei der simplifizierten Variante mit nur zwei Recurrence-Gruppen weder für das Gesamtkollektiv (Test 4) noch für die Untergruppen nach Alter (Test 5.1 und 5.2) gefunden werden (jeweils Fisher-p-value > 0.10 ; X^2 -p-value > 0.10).

3.1.1.2 Bcl 2

Für den Marker Bcl 2 wurden 69 Fälle in der Auswertung berücksichtigt. Die Verteilung der Daten wies bezüglich des Recurrence-Scores[©] ebenfalls eine leichte Links-Schiefe im Histogramm (Abbildung 4b) auf. Mit stärkerer Ausprägung von Bcl 2 gingen niedrigere Recurrence-Werte einher, (siehe Abb. 4a). Der Unterschied zwischen den Medianen war statistisch nicht signifikant, lag aber innerhalb des 10% Niveaus ($p=0.07976$).

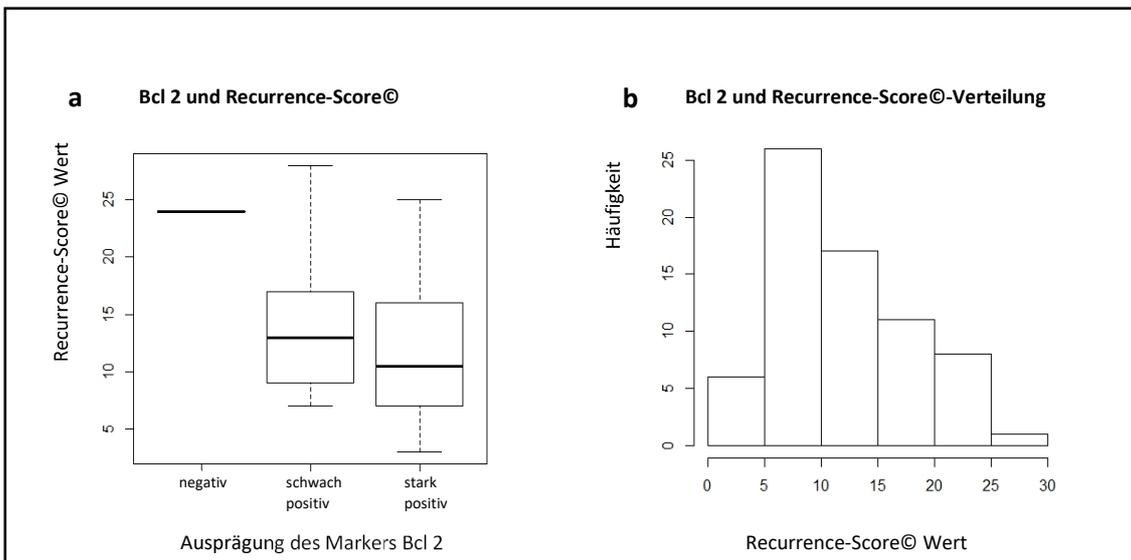


Abb. 4 Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von Bcl 2 im Bezug auf den Recurrence-Score[©]. **a** Boxplot: p-value = 0.07976 (nach Kruskal-Wallis) **b** Histogramm

Für keine der geprüften Konstellationen (s. Kapitel 2.5.1 Tab. 5) konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Marker Bcl 2 und dem Recurrence-Score[©] gefunden werden (jeweils Fisher-p-value > 0.10 ; X^2 -p-value > 0.10)

3.1.1.3 CDK 4

65 Fälle fasste die Stichprobengröße für den immunhistochemischen Marker CDK4. Das Histogramm weist wiederum eine leichte Links-Schiefe für den Recurrence-Score[©] auf

(Abbildung 5b). Abbildung 5a lässt einen Unterschied in der Höhe des Medians des Recurrence-Scores[©] zwischen der stärksten Ausprägung von CDK 4 und den beiden schwächeren erkennen (p-value = 0.07931, nach Mann-Whitney-U-Test). Im statistischen Vergleich der Mediane aller Gruppen nach Kruskal-Wallis erwiesen sich diese als nicht signifikant unterschiedlich (p=0.1022).

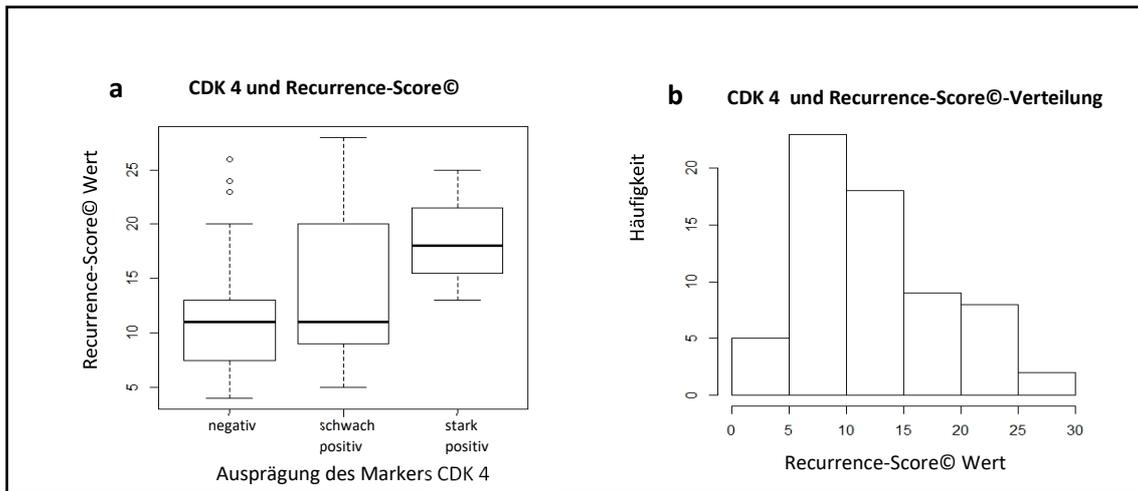


Abb. 5 Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von CDK 4 im Bezug auf den Recurrence-Score[©]. **a** Boxplot: p-value = 0.1022 (nach Kruskal-Wallis) **b** Histogramm

Für einen Zusammenhang zwischen CDK 4 und Recurrence-Score[©] lässt sich in der statistischen Analyse nur ein Hinweis (innerhalb des 10 % Testniveaus) bei Reduktion auf zwei R-Gruppen (0: $0 \leq 15$ und 1: ≥ 26) finden (Test 4; **Fisher-p-value**= 0.06246; X^2 -p-value = 0.08262; Cramer V =0.2770, Kontingenz-Koeffizient =0.2669)

Bei Dichotomisierung der Daten von CDK 4 (negativ vs. Gesamt positiv) erreicht dieser Zusammenhang das Signifikanzniveau von 5 % knapp (**Fisher-p-value** = **0.04891**; X^2 -p-value = 0.07691) die Korrelation ist jedoch nur von schwacher Stärke (Cramer V =0.2551; Kontingenz-Koeffizient =0.2472). Abbildung 6 zeigt die Häufigkeiten für positive und negative CDK 4 Fälle für diese R-Gruppen.

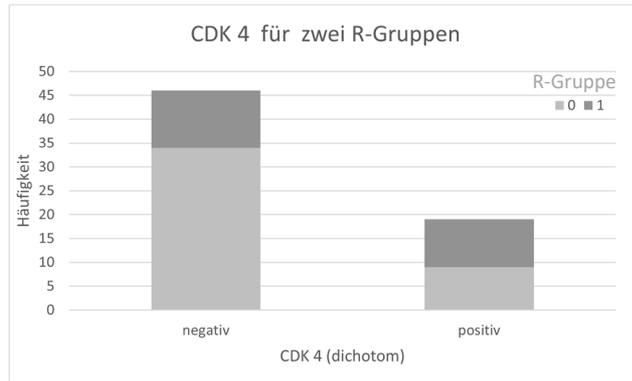


Abb. 6 Die Fallanzahl in den zwei R-Gruppen (0: $0 \leq 15$ und 1: ≥ 26) und CDK 4.

3.1.1.4 Cyclin D1

Für den Marker Cyclin D1 wurden 72 Fälle in der Auswertung berücksichtigt. Die bereits bekannte links-schiefe Verteilung der Daten zum Recurrence-Score[©] konnte auch für diese Stichprobe gefunden werden (Abbildung 7b). Im Vergleich des Medians zwischen den Gruppen unterschiedlicher Ausprägung von Cyclin D1 zeigte sich kein Unterschied (p-value = 0.5878, siehe Abb. 7a).

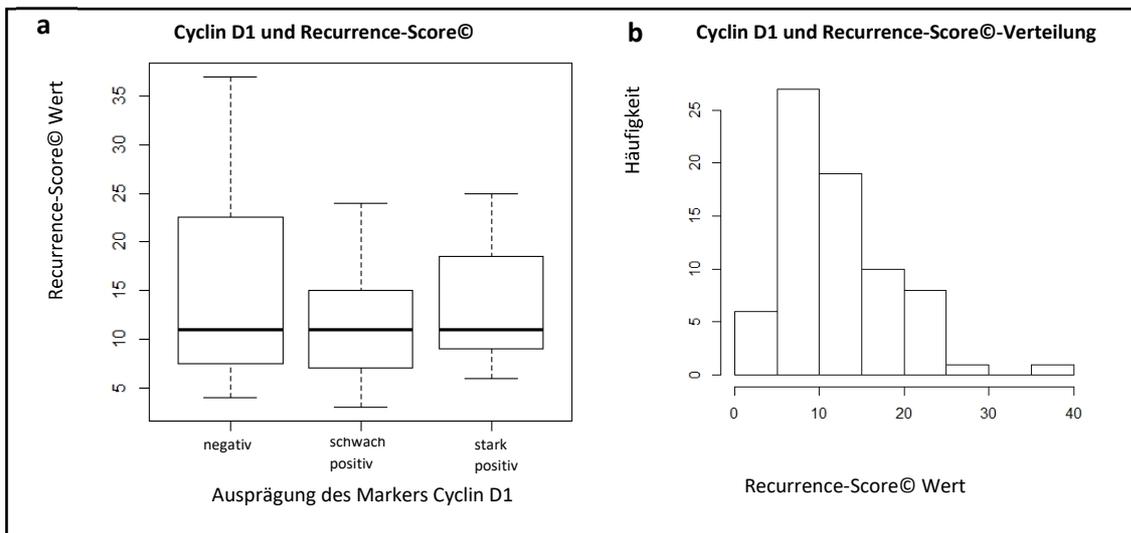


Abb. 7 Graphische Darstellung von Cyclin D1 in Bezug auf den Recurrence-Score[©]. Boxplot p-value = 0.5878 (nach Kruskal-Wallis) **b** Histogramm

Für die klassischen Recurrence-Gruppen (Analyse 3, s. Tabelle 5) konnte ein signifikanter Zusammenhang mittlerer Stärke mit Cyclin D1 gefunden werden (Fisher-p-value =0.0395; χ^2 -p-value=0.001689 ; Cramer V =0.3444; Kontingenz-Koeffizient =0.4402). Die Häufigkeiten zu dieser Analyse werden in Abbildung 8 dargestellt.

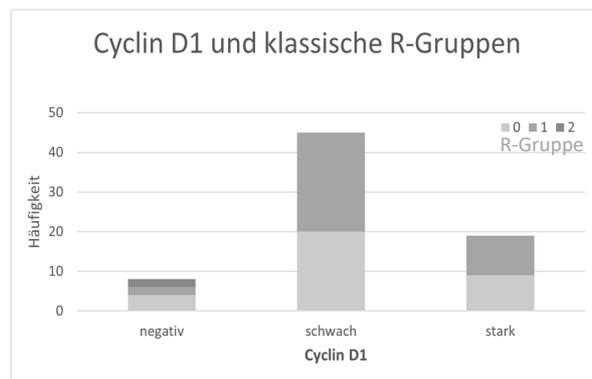


Abb. 8 Häufigkeiten in den klassischen R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2: ≥ 26) und die Cyclin D1 -Ausprägung.

Bei Einteilung in vier Recurrence Gruppen wird das Signifikanzniveau bei zugrunde legen des Fisher-Tests nicht erreicht (Test1: **Fisher-p-value = 0.1177**; χ^2 -p-value=0.006075; Cramer V =0.3542; Kontingenz-Koeffizient =0.4478 ; Test 2.2: **Fisher-p-value =0.09298**; χ^2 -p-value=0.006075; Cramer V =0.4305; Kontingenz-Koeffizient =0.5200).

Wird der Test auf eine für Cyclin D1 positive und eine negative Gruppe reduziert, dann wird das Signifikanzniveau auch für vier R-Gruppen erreicht (**Fisher-p-value =0.02115**; χ^2 -p-value=0.0006265; Cramer V =0.4895; Kontingenz-Koeffizient =0.2163), dies gilt auch für das Kollektiv der über 50 jährigen Patientinnen (**Fisher-p-value =0.0124**; χ^2 -p-value=0.002542; Cramer V =0.5832; Kontingenz-Koeffizient =0.2146) Die Einteilung nach klassischen R-Gruppe bleibt auch in der dichotomen Auswertung von Cyclin D1 signifikant (**Fisher-p-value =0.008093**; χ^2 -p-value=0.0001792; Cramer V =0.4895; Kontingenz-Koeffizient =0.4397).

In Abbildung 9 sind die dazu entsprechenden Häufigkeitsverteilung dargestellt.

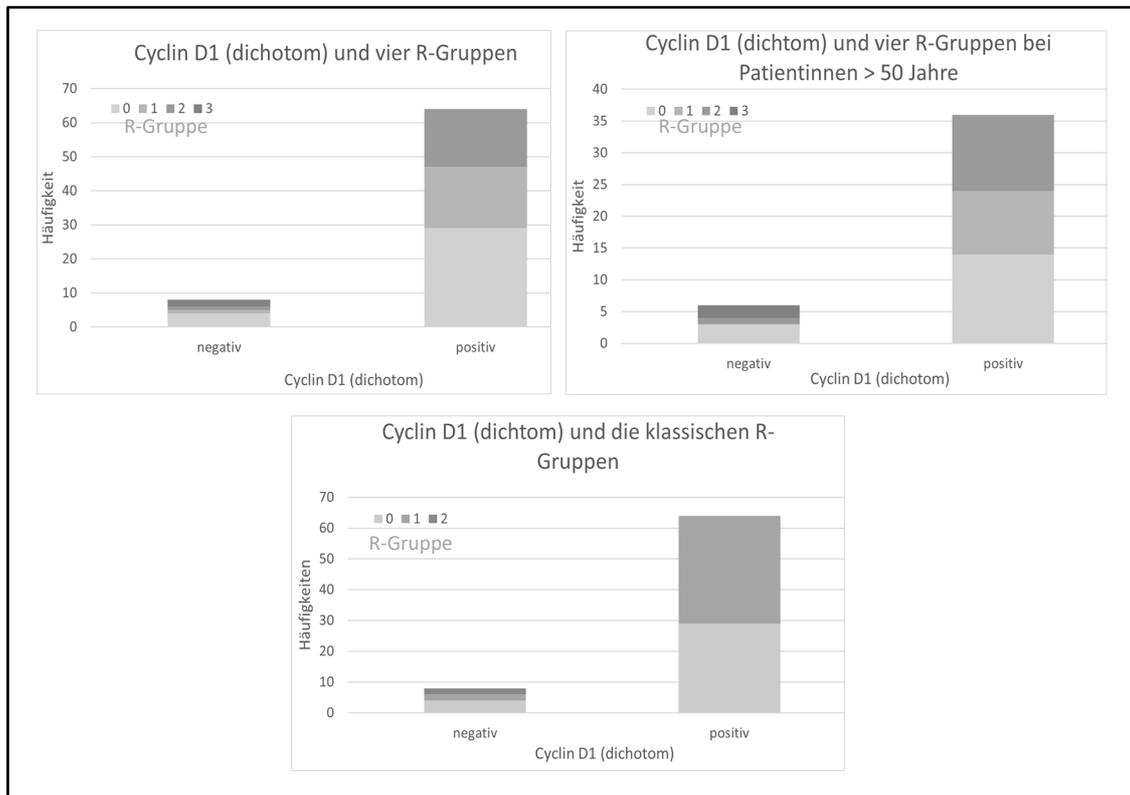


Abb. 9 Cyclin D1 in der dichotomen Variante für vier R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 15$; 2: $16 \leq 25$ und 3: ≥ 26) und die klassischen R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2: ≥ 26) bezogen auf das Gesamtkollektiv und Patientinnen > 50 Jahre.

3.1.1.5 Glut 1

Für den immunhistochemischen Marker Glut 1 konnten 72 Fälle in die Auswertung aufgenommen werden. In der Verteilung des Recurrence-Scores[©] zeigte sich auch für diesen Marker eine leichte Links-Schiefe im Histogramm (Abbildung 10 b). Im Medianvergleich liegt dieser für die mittlere Ausprägung von Glut 1 am höchsten (Abbildung 10 a), der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (p-value = 0.3244).

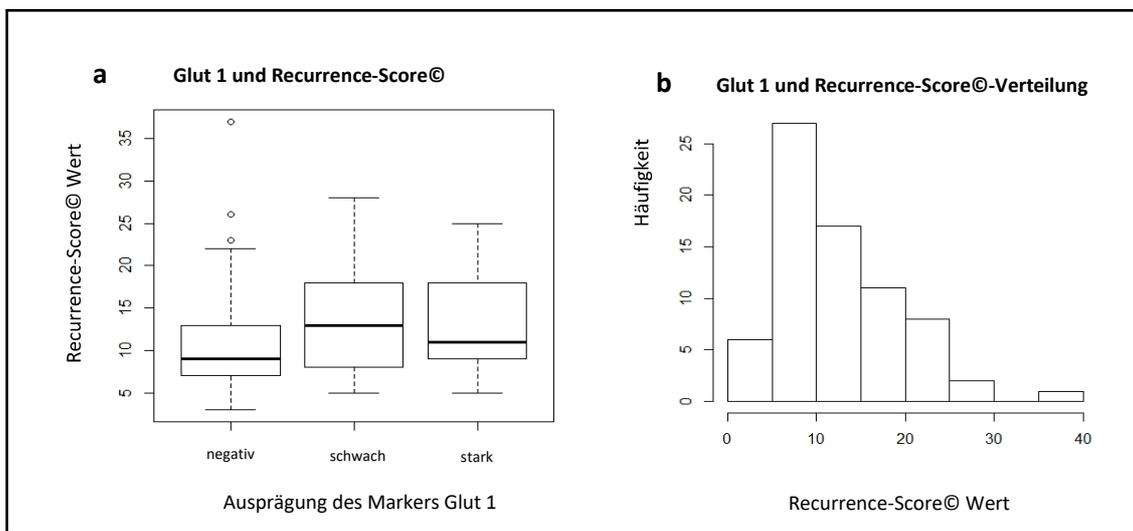


Abb. 10 Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von Glut 1 in Bezug auf den Recurrence-Score[©]. **a** Boxplot: p-value = 0.3244 (nach Kruskal-Wallis) **b** Histogramm

Für keine der geprüften Konstellationen (siehe Kapitel 2.5.1 Tabelle 5) konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Marker Glut 1 und dem Recurrence-Score[©] gefunden werden (jeweils Fisher-p-value > 0.05; χ^2 -p-value > 0.05). Für die klassischen Recurrence-Gruppen (Test 3) erreichte der Zusammenhang bei dichotomisiertem Glut 1 (positiv vs. Negativ) jedoch die 10 % Stufe (**Fisher-p-value** = 0.08681; χ^2 -p-value = 0.1114; Cramer V = 0.2469; Kontingenz-Koeffizient = 0.2397). Von den Glut 1 positiven Fällen gehören hierbei viele der mittleren Risikogruppe an. Abbildung 11 zeigt die Häufigkeitsverteilung dazu.

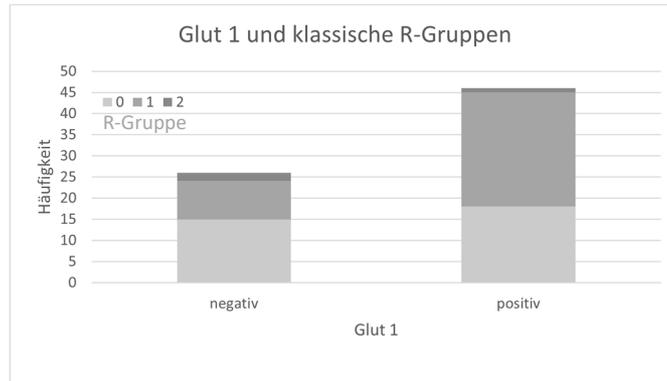


Abb. 11 Die Fallanzahl in den klassischen R-Gruppen Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2: ≥ 26) und Glut 1 (positiv, negativ)

3.1.1.6 MDM2

67 Fälle erreichte die Stichprobengröße für den immunhistochemischen Marker MDM2. Im Histogramm fällt auf, dass die Werte von MDM2 für den Recurrence-Score[©] etwas näher beieinander liegen als in den anderen Stichproben. Die leichte Links-Schiefe ist aber auch hier erkennbar (Abbildung 12 b). Abbildung 12a lässt einen Unterschied in der Höhe des Medians des Recurrence-Scores[©] mit Zunahme bei stärkerer Ausprägung von MDM2 erkennen, die jedoch nicht signifikant war (p-value = 0.2966).

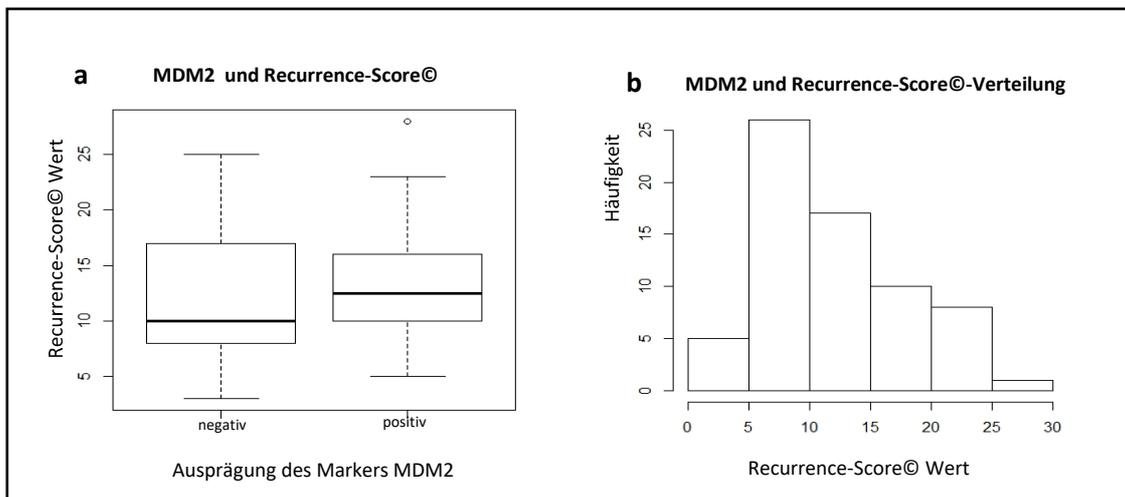


Abb. 12 Graphische Darstellung von MDM2 in Bezug auf den Recurrence-Score[©]. **a** Boxplot p-value = 0.2966 (nach Mann-Whitney-U-Test) **b** Histogramm

Eine deutliche Signifikanz ergab sich für die Korrelation von MDM2 und den Recurrence-Score[®] bei Einteilung in vier R-Gruppen (Test 1: **Fisher-p-value = 0.01432**; X^2 -p-value=0.01844; Cramer V =0.3866; Kontingenz-Koeffizient =0.3606), sowie für die Anwendung der klassischen R-Gruppen (Test3: **Fisher-p-value = 0.03381**; X^2 -p-

value=0.04519 ; Cramer V =0.3040; Kontingenz-Koeffizient =0.2909). Die Abbildungen 13 a und b zeigen die entsprechenden Häufigkeiten für die MDM2-Ausprägungen in den oben genannten Testgruppen.

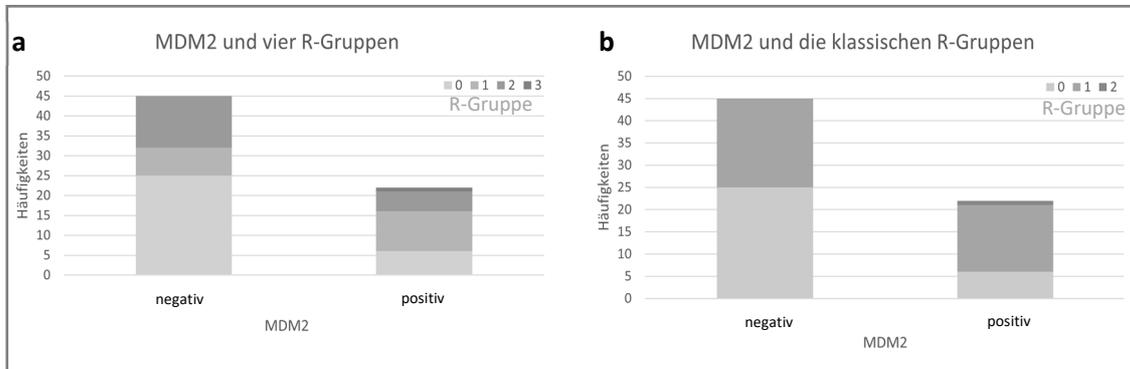


Abb. 13 Häufigkeiten in den vier bzw. klassischen R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2: ≥ 26) und die Ausprägung von MDM2

Bei der Analyse der altersbezogenen Subgruppen konnte die Signifikanz für die Gruppe der über 50 Jährigen Patientinnen und vier R-Gruppen nachgewiesen werden (Test 2.2: **Fisher-p-value** =0.04096; X^2 -p-value=0.04626; Cramer V =0.4526; Kontingenz-Koeffizient =0.4123). Die Häufigkeiten ergeben sich aus Abbildung 14. Bei den unter 50 Jährigen (Test 2.1, s. Tabelle 5) dagegen lag die Wahrscheinlichkeit über dem 5% Testniveau.

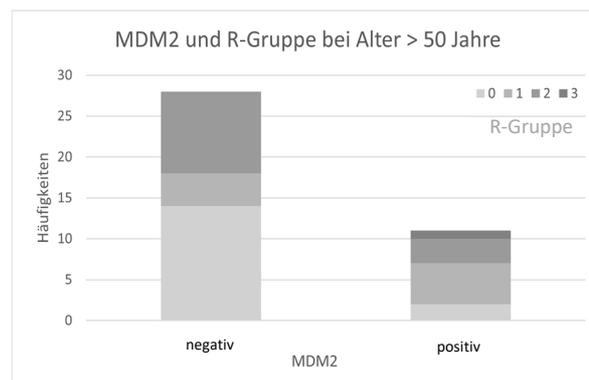


Abb. 14 Häufigkeiten in den vier R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 15$; 2: $16 \leq 25$ und 3: ≥ 26) (s. Tab. 5) und die Ausprägung von MDM2 bei Patientinnen >50 Jahre

3.1.1.7 pERK

Für den Marker pERK wurden 70 Fälle in der Auswertung berücksichtigt. Die Verteilung der Daten wies bezüglich des Recurrence-Scores[©] wie auch bei den bereits beschriebenen Markern eine leichte Links-Schiefe im Histogramm (Abbildung 15 b) auf. Mit stärkerer Ausprägung von pERK gingen geringfügig niedrigere Recurrence-Werte einher (siehe Abb. 15 a). Der Unterschied der Mediane war jedoch nicht signifikant (pERK dichotom:p-value= 0.3056, pERK differenziert: p-value= 0.5392).

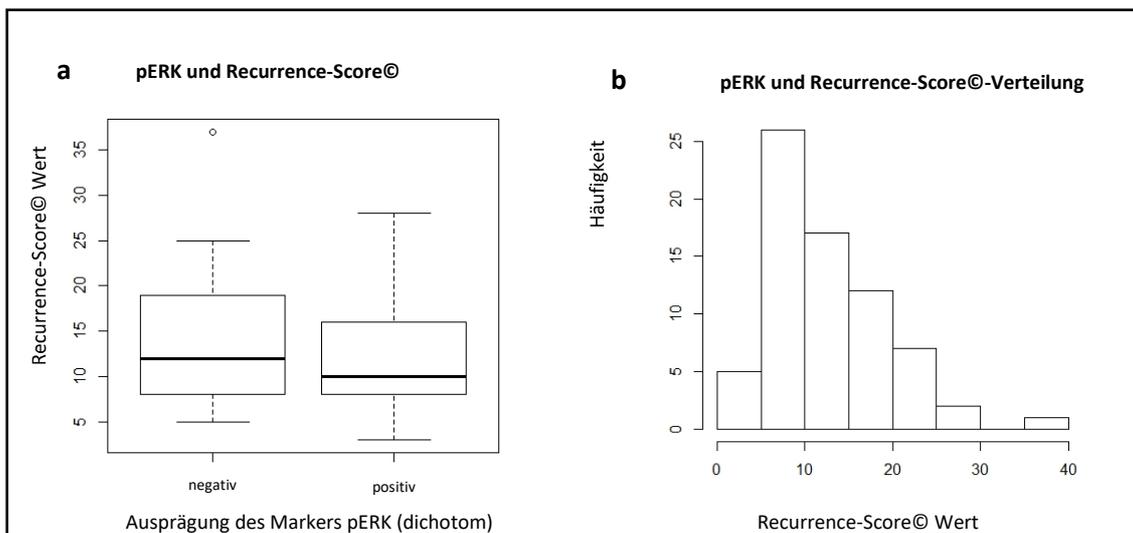


Abb. 15 Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von pERK (positiv, negativ) in Bezug auf den Recurrence-Score[©]. a) Boxplot: p-value= 0.3056 (nach Mann-Whitney-U-Test) b) Histogramm

Es zeigte sich weder für die Reduktion auf zwei Merkmalsausprägungen (positiv, negativ) noch für die weitere Differenzierung (vier Merkmalsausprägungen entsprechend des prozentualen Anteils an pERK, siehe Abbildung 16) ein signifikanter Zusammenhang von pERK mit dem Recurrence-Score[©] (jeweils Fisher-p-value > 0.05; χ^2 -p-value > 0.05).

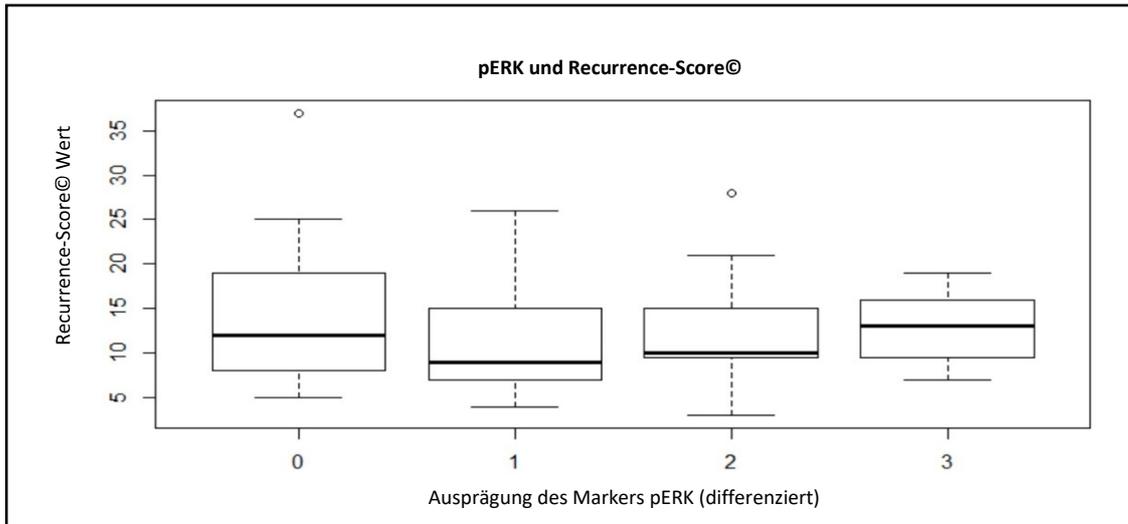


Abb.16 Graphische Darstellung des Markers pERK (differenziert) in Bezug auf den Recurrence-Score©. Immunhistochemische Gruppen von pERK entsprechen:
0 = negativ; **1** = pERK <10%; **2**= pERK >10% und < 50%; **3**= pERK > 50%

3.1.1.8 PDL-1

Mit 74 Fällen ist die Stichprobengröße von PDL-1 unter den höchsten der getesteten immunhistochemischen Marker. Das Histogramm (s. Abbildung 17b) unterscheidet sich nur geringfügig von den vorhergehenden und ist ebenfalls leicht links-schief. Abbildung 17a lässt einen Unterschied in der Höhe des Medians des Recurrence-Scores® zwischen den Ausprägungen von PDL-1 erkennen. Dabei liegt er in der mittleren Gruppe am höchsten, während er in den anderen beiden Ausprägungen etwa gleich ist. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (p-value=0.06579).

Statistisch zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang mittlerer Stärke von PDL 1 und Recurrence-Score sowohl in den klassischen R-Gruppen (Test 3, Fisher-p-value =0.01087; χ^2 -p-value =0.002953; Cramer V =0.3293; Kontingenz-Koeffizient =0.4222) als auch bei Differenzierung in vier R-Gruppen (Test 1, Fisher-p-value =0,02392; χ^2 -p-value= 0.009833; Cramer V =0.3375; Kontingenz-Koeffizient =0.4307).

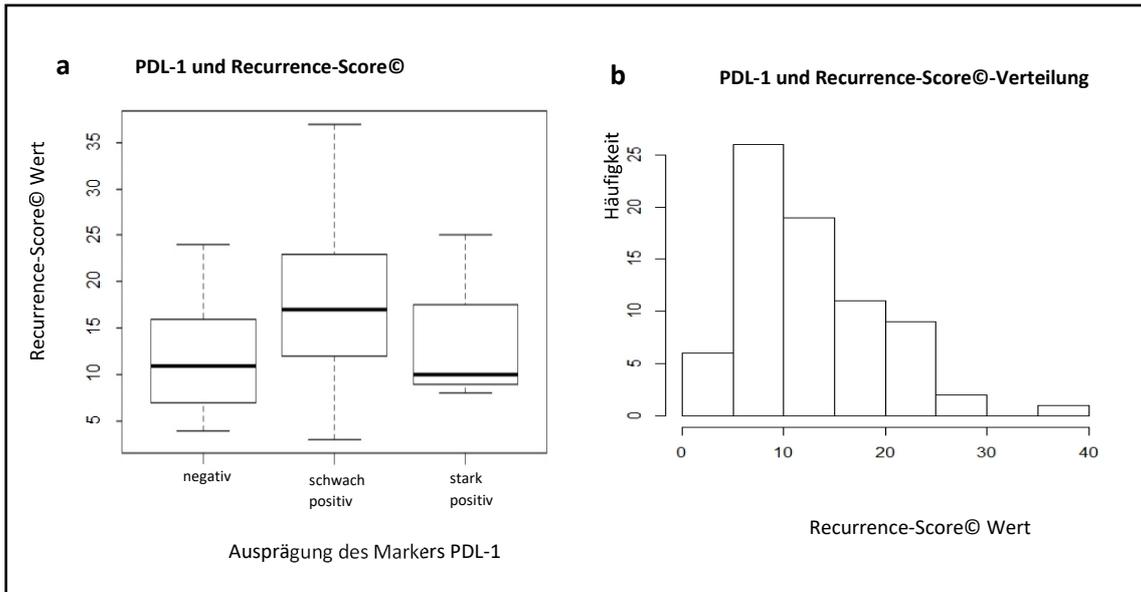


Abb. 17 Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von PDL 1 in Bezug auf den Recurrence-Score®. **a** Boxplot: p-value=0.06579 (nach Kruskal-Wallis) **b** Histogramm

Durch Dichotomisieren von PDL 1 nach Risikoausprägung gegen die normale Expression (geringe und hohe Expression = 0, mittlere Ausprägung = 1) erreichte dieser Zusammenhang das höchste Signifikanzniveau für die oben genannten Einteilungen in R-Gruppen (**Test 1**: Fisher-p-value =0.007244; X^2 -p-value=0.001317; Cramer V =0.4604; Kontingenz-Koeffizient =0.4604; **Test 3**: Fisher-p-value =0.003914; X^2 -p-value=0.0004172; Cramer V =0.4586; Kontingenz-Koeffizient =0.4182).

Die Häufigkeiten in den Gruppen werden durch nachfolgende Abbildungen (Test 1:Abbildung 18, Test 3: Abbildung 19) dargestellt.

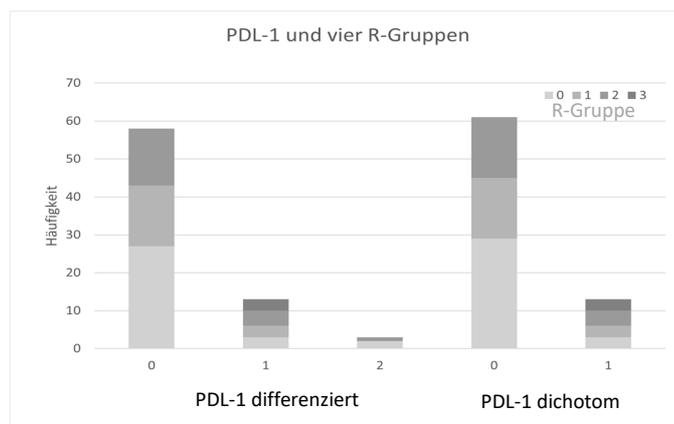


Abb. 18 Häufigkeiten in den vier R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 15$; 2: $16 \leq 25$ und 3: ≥ 26) und die PDL-1-Ausprägung (differenziert: 0 = negativ, 1 = schwach, 2 = stark und dichotom: 0 = negativ, 1 = positiv)

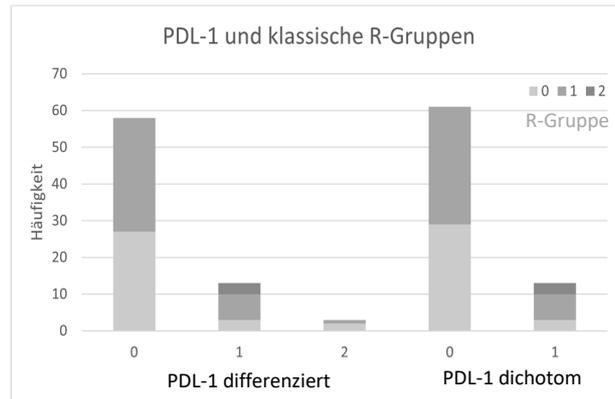


Abb. 19 Häufigkeiten in den drei R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2: ≥ 26) und die PDL-1-Ausprägung (differenziert: 0 = negativ, 1 = schwach, 2 = stark und dichotom: 0 = negativ, 1 = positiv)

Bei Einteilung des Gesamtkollektivs nach dem Alter konnte dieser signifikante Zusammenhang nur für die Gruppe der über 50-jährigen Patientinnen (Test 2.2, s. Tabelle 3) und dichotomisierter PDL 1 Ausprägung gefunden werden (Fisher-p-value = 0.02686; X^2 -p-value = 0.009212) Hierbei zeigte sich eine starke Korrelation (Cramer V = 0.5117; Kontingenz-Koeffizient = 0.4555). Abbildung 20 zeigt hierzu die Häufigkeiten. Bei Differenzierung der PDL-1-Ausprägung verfehlt der Test das Signifikanzniveau von 5 % knapp (Fisher-p-value = 0.05841; X^2 -p-value = 0.05083; Cramer V = 0.3776; Kontingenz-Koeffizient = 0.4123).

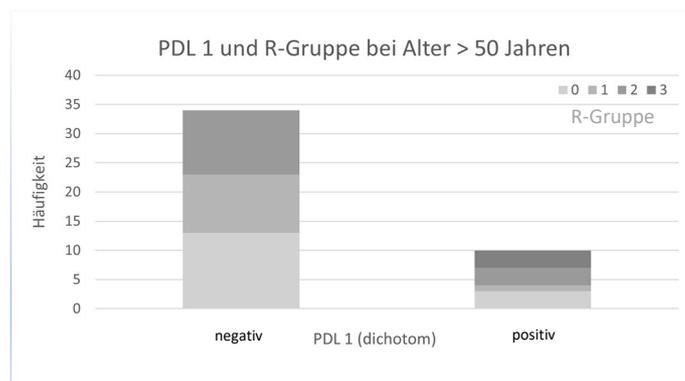


Abb. 20 Häufigkeiten in den vier R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2: ≥ 26) und die PDL-1-Ausprägung (dichotom) bei Patientinnen > 50 Jahre

Im Gegensatz dazu zeigte sich für die jüngere Altersgruppe und auch die weiteren Analysen keine Signifikanz (jeweils Fisher-p-value > 0.05; X^2 -p-value > 0.05).

3.1.1.9 Tumorsuppressoren p53

Für den Marker p53 wurden 71 Fälle in der Auswertung berücksichtigt. Die bereits bekannte links-schiefe Verteilung der Daten zum Recurrence-Score© konnte auch für die Stichprobe des Markers p53 gefunden werden (Abbildung 21b). Im Vergleich des Medians zwischen den Gruppen zeigte sich ein deutlicher Unterschied mit einem höheren Recurrence-Wert bei stärkerer Ausprägung von p 53, welcher auch statistisch signifikant war ($p\text{-value} = 0.02432$, siehe Abb. 21a).

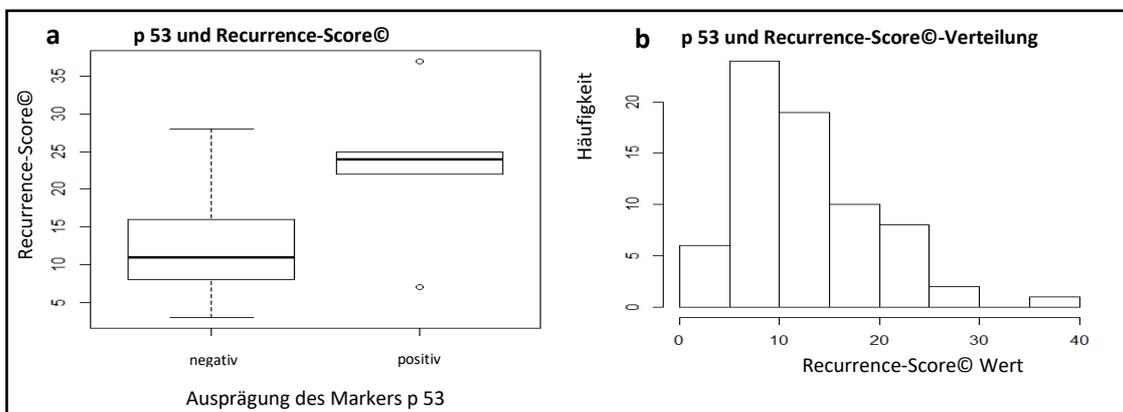


Abb. 21 Graphische Darstellung von p53 in Bezug auf den Recurrence-Score©.
a Boxplot $p\text{-value} = 0.02432$ (nach Mann-Whitney-U-Test) **b** Histogramm

Für einen Zusammenhang zwischen der Expression von p 53 und dem Recurrence-Score wurde das Signifikanzniveau von 5 % bei Unterteilung in vier R-Gruppen (Test 1: **Fisher-p-value** = 0.03812; $X^2\text{-p-value}$ = 0.04935) sowie für die Anwendung von zwei R-Gruppen (Test 4: **Fisher-p-value** = 0.02455; $X^2\text{-p-value}$ = 0.03996) erreicht. Die Korrelation weist jeweils eine mittlere Stärke auf (Test 1: Cramer V = 0.3324; Kontingenz-Koeffizient = 0.3154; Test 4: Cramer V = 0.3041; Kontingenz-Koeffizient =

0.2909). Abbildung 22a zeigt die entsprechenden Häufigkeiten in den Gruppen für Test 1, Abbildung 22b für Test 4.

Bei Anwendung der klassischen Recurrence-Gruppen (Test 3) konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Dies gilt ebenso für die altersbezogenen Gruppenanalysen (jeweils

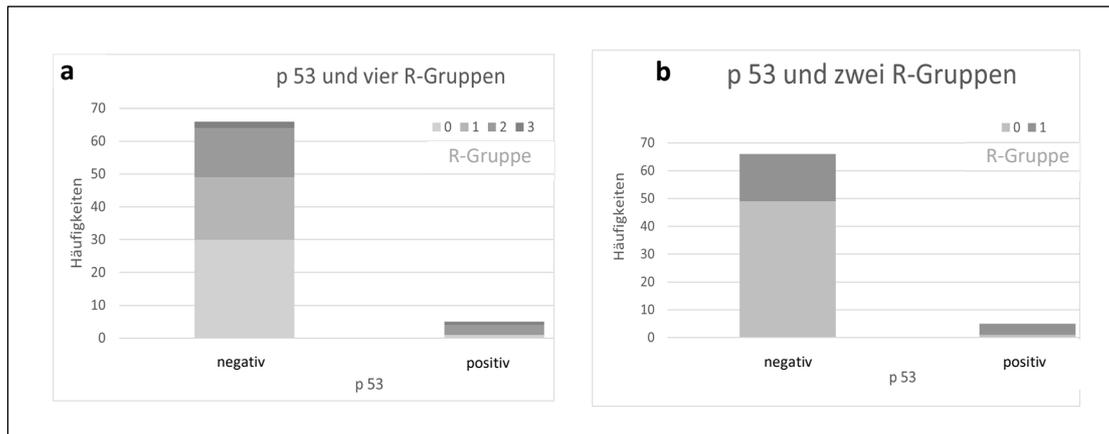


Abb. 22 Häufigkeiten in der Ausprägung von p 53 und a vier R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 15$; 2: $16 \leq 25$ und 3: ≥ 26) und b Häufigkeiten in der Ausprägung von p 53 und den zwei R-Gruppen (0: $0 \leq 15$; 1: ≥ 16)

Fisher-p-value > 0.05). Hier bleibt zu bemerken, dass im Kollektiv der Patientinnen einschließlich 50 Jahre nur wildtypische Expression für p53 zu verzeichnen war. Bei den über 50 Jährigen erreicht die Korrelation das 10 % Niveau bei Reduktion auf zwei R-Gruppen (Test 5.2: **Fisher-p-value** =0.05642; X^2 -p-value=0.1085; Cramer V =0.3318; Kontingenz-Koeffizient = 0.3149).

p 27

64 Fälle erreichte die Stichprobengröße für den immunhistochemischen Marker p 27. Das Histogramm Recurrence-Score© zeigt die bekannte leichte Links-Schiefe der Daten, die darüber hinaus nahe der Normalverteilung liegen (Abbildung 23b). Im Medianvergleich des Recurrence-Score© liegt dieser in der Gruppe mit niedriger Ausprägung von p 27 höher als bei den p 27 positiven Fällen, wie Abbildung 23 a darstellt. Dieser Zusammenhang erwies sich jedoch als nicht signifikant (p-value = 0.3336).

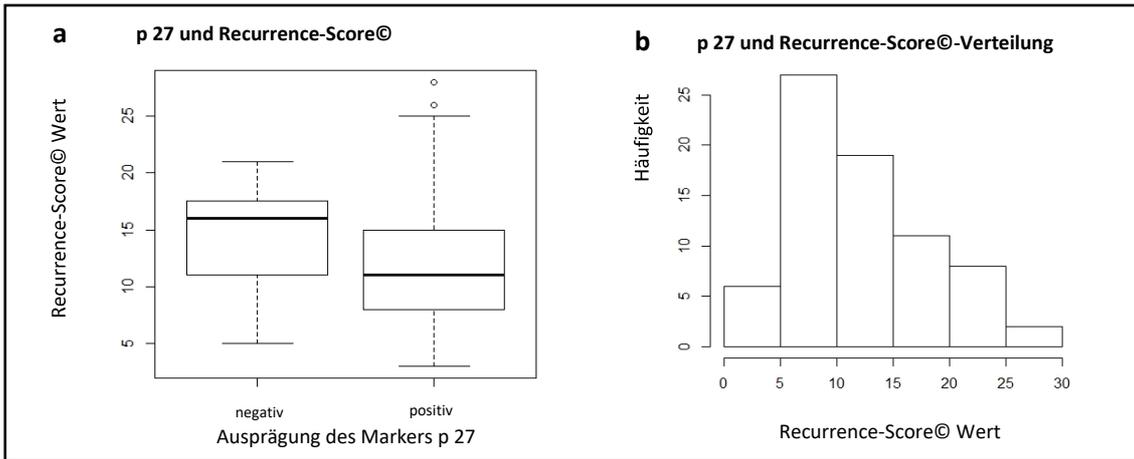


Abb. 23 Graphische Darstellung von p 27 in Bezug auf den Recurrence-Score©.
a Boxplot: p-value = 0.3336 (nach Mann-Whitney-U-Test) **b** Histogramm

Nur für die Gruppe der über 50 Jährigen Patientinnen bei Einteilung in zwei R-Gruppen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen p 27 und dem Recurrence-Score© (Test 5.2: **Fisher-p-value = 0.04282**; X^2 -p-value= 0.07967; Cramer V = 0.3434; Kontingenz-Koeffizient =0.3248).

Im selben Kollektiv wurde für den Test mit vier R-Gruppen zumindest das 10 % Niveau erreicht (Test 2.2: Fisher-p-value = 0.09335; X^2 -p-value=0.07542 ; Cramer V =0.4003; Kontingenz-Koeffizient =0.3717)). Das gilt auch für die Betrachtung des Gesamtkollektiv bei zwei R-Gruppen (Test 4: Fisher-p-value =0.06488; X^2 -p-value=0.08472; Cramer V = 0.2425; Kontingenz-Koeffizient =0.2357).

Abbildung 24a zeigt die Häufigkeiten für das Gesamtkollektiv und die Subgruppe der über 50 jährigen Patientinnen für zwei R-Gruppen, Abbildung 24b die Häufigkeiten für dieselbe Subgruppe, aber bei zugrunde Legen von vier R-Gruppen.

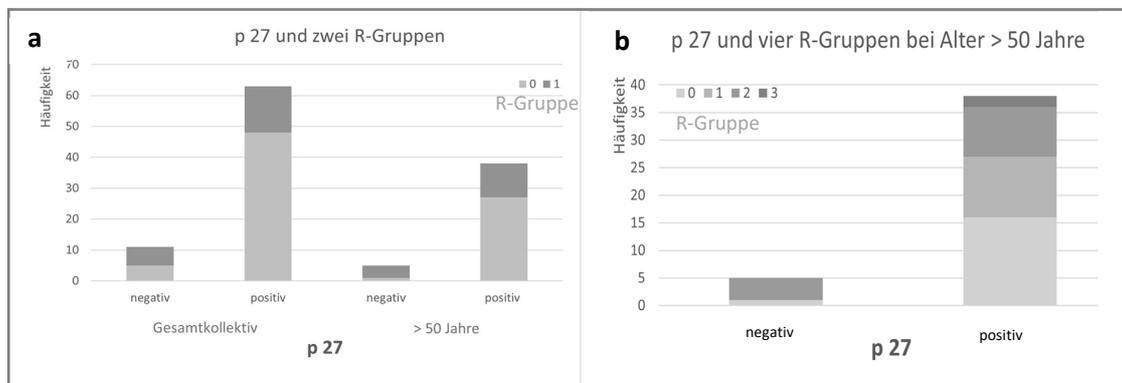


Abb. 24 Häufigkeiten in der Ausprägung von p 27 und **a** den zwei R-Gruppen (0: 0≤15; 1: ≥ 16) im Gesamtkollektiv, sowie bei den über 50-jährigen Patientinnen **b** vier R-Gruppen (0: 0≤10; 1: 11≤15, 2: 16 ≤ 25 3: ≥ 26)

3.1.2 Marker geringer Relevanz

Für acht von den insgesamt 18 untersuchten immunhistochemischen Markern wurde auf eine tiefere statistische Analyse verzichtet. Entweder weil sich für alle Fälle die gleiche Ausprägung des Merkmals zeigte oder lediglich einzelne Fälle eine stärkere oder schwächere Färbung als die restliche Stichprobe zeigten (siehe Tabelle 6). Dies betrifft auch die Marker für die Mikrosatelliten-Instabilität. Alle Fälle waren mikrosatellitenstabil.

Tabelle 6 Marker mit derselben Ausprägung in der Mehrheit der Fälle und ihre Stichprobengröße.

Marker	Stichprobengröße	Fälle
D 20-40	79	alle: diffuse schwache Reagibilität
p57	79	alle: diffuse schwache Reagibilität
RB	70	alle: negativ
CD 56	79	Mehrheit: negativ Ausnahme: 1 Fall hochpositiv (Recurrence-Score®-Wert = 12)
MLH1	69	alle: Mikrosatelliten-stabil
MSH2	67	
MSH6	71	
PMS2	71	

3.2 Paaranalyse immunohistochemischer Marker

Die Paaranalyse der immunohistochemischen Marker erfolgte an einer 65 Fälle umfassenden Stichprobe mit den 10 relevanten Markern, die in der Korrelation gegen den Recurrence-Score® ermittelt wurden (siehe 3.1). Die im Vergleich zum Gesamtkollektiv geringere Stichprobengröße ergab sich (siehe auch 3.1) durch Ausfälle in der Immunhistochemie und Materialverluste durch die Microarrays bei geringer Ausgangsmenge des Probenmaterials. So dass diese Stichprobe der größtmöglichen gemeinsamen Schnittmenge der immunohistochemischen Marker entspricht. Abbildung 25 zeigt hierzu ein Histogramm der Fälle bezogen auf den Recurrence-Score®. In diesem ist eine deutlichere Linksverschiebung zu erkennen als in den Stichproben der einzelnen Marker.

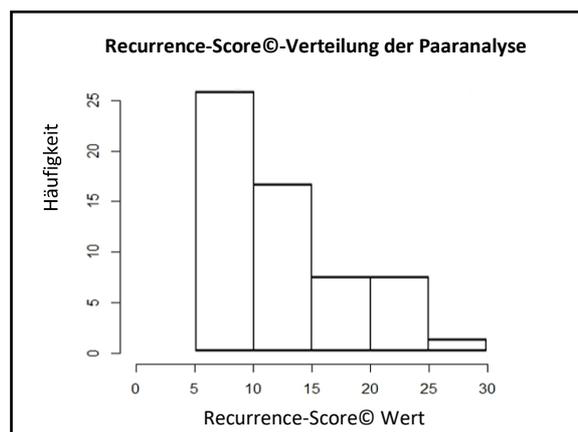


Abb. 25 Histogramm zum Recurrence-Scores® der Stichprobe der Paaranalyse

Die Tabelle 7 stellt die Marker-Kombinationen der gesamten Stichprobe dar für welche ein statistisch signifikanter Zusammenhang mittels X^2 -Test bzw. Fisher-Test festgestellt wurde, Tabelle 8 jene die nicht signifikant waren, jedoch das 10 % Niveau erreichten.

Tabelle 7 Marker-Kombinationen der gesamten Stichprobe für welche nachweislich (X2-Test bzw. Fisher-Test) ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht, p-values und Korrelationsmarker. (d)=dichotom; Hervorgehoben sind hochsignifikante Korrelationen.

Marker 1	Marker 2	p-value nach X ²	p-value nach Fisher	Cramer V	Kontingenz-Koeffizient
AMACR	Bcl 2	0.004879	0.004948	0.4404	0.4030
AMACR	Glut 1	0.02758	0.02113	0.3581	0.3371
AMACR	MDM2	0.003692	0.002053	0.4412	0.4037
CDK4	PDL1	0.01317	0.02837	0.2109	0.2859
CDK4	p53	0.005593	0.009173	0.4304	0.3953
Glut1	PDL1	0.03124	0.04359	0.3079	0.3992
CDK4(d)	p53	0.03207	0.0163	0.3371	0.3581

Tabelle 8 Marker-Kombinationen des Gesamtkollektivs für welche das 10%-Niveau, nicht jedoch Signifikanz (5%) erreicht wird, p-values und Korrelationsmarker. (d)= dichotom

Marker 1	Marker 2	p-value nach X ²	p-value nach Fisher	Cramer V	Kontingenz-Koeffizient
Bcl 2	Cyclin D1	0.08565	0.09198	0.2963	0.2841
Bcl 2	Cyclin D1(d)	0.1737	0.09524	0.2816	0.2711
Cyclin D1	CDK 4	0.1652	0.07865	0.2408	0.3223
Glut 1	MDM2	0.07574	0.07986	0.3036	0.2905
PDL1 (d)	Bcl2	0.1774	0.09341	0.2389	0.2324

Insgesamt konnten acht Kombinationen mit signifikantem Zusammenhang gefunden werden, darunter drei mit hochsignifikanter Korrelation. Diese sind AMACR mit Bcl 2, AMACR mit MDM2, sowie CDK4 mit p53. Abbildung 26 und 27 zeigen die Häufigkeit der einzelnen Kreuzgruppen dazu.

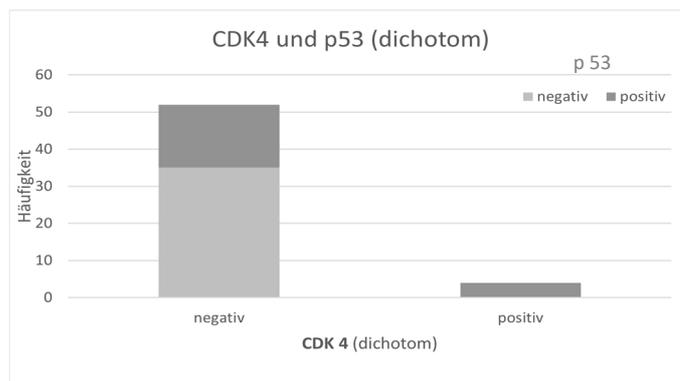


Abb. 26 Häufigkeiten der signifikanten Marker-Paare der Musteranalyse zwischen CDK4 und p 53 mit dichotomisierten Daten

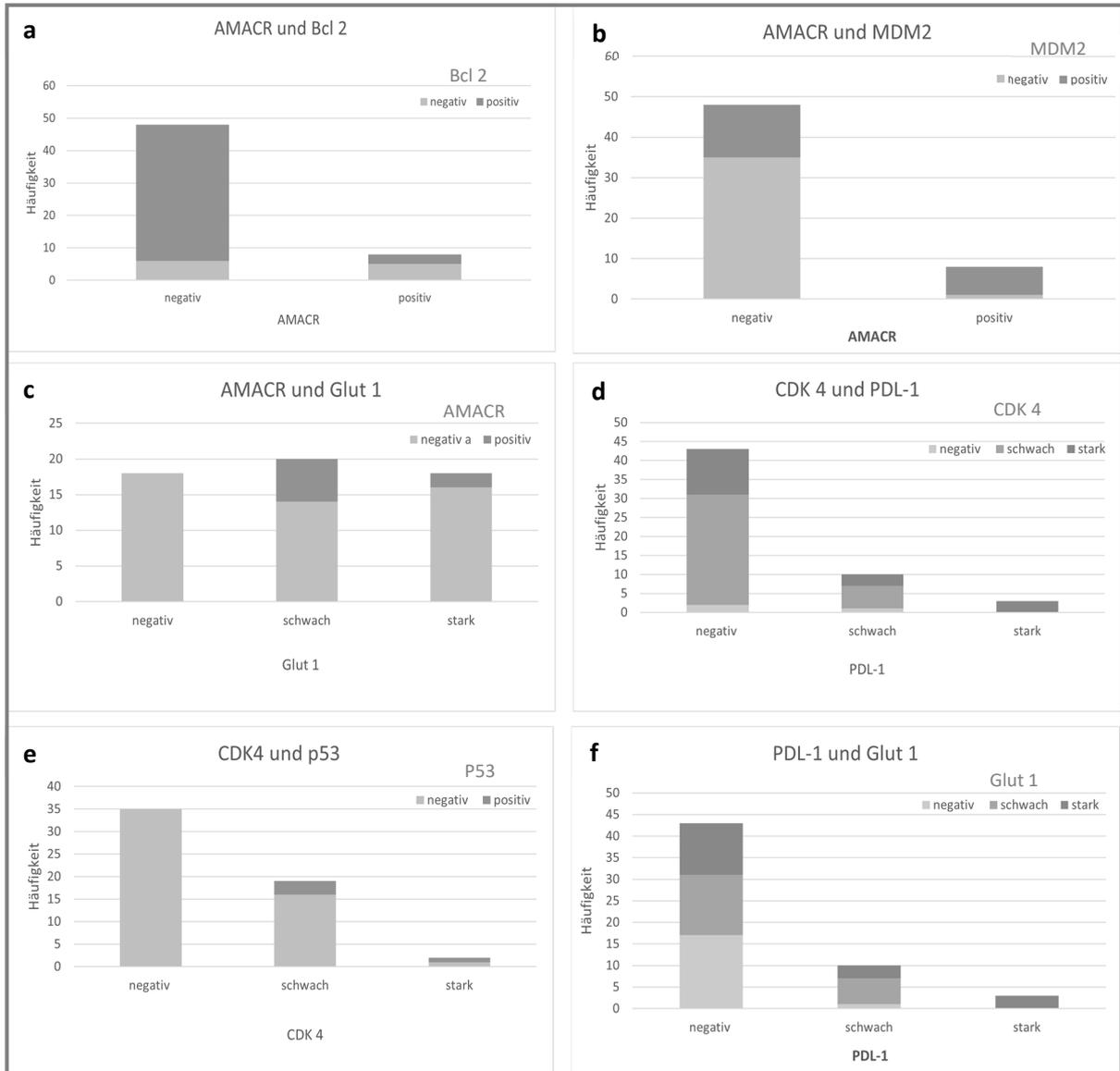


Abb. 27 Häufigkeiten in den signifikanten Proben der Musteranalyse zwischen den einzelnen Markern.
a AMACR und Bcl2 **b** AMACR und MDM2 **c** AMACR und Glut1 **d** CDK4 und PDL-1 **e** CDK 4 und p 53
f PDL-1 und Glut 1

3.3 Ki 67%

3.3.1 Ki 67% und der Recurrence-Score©

Für den Marker Ki 67% lagen zu 71 Fällen Daten aus der histologischen Standarddiagnostik vor. Die Grenze für die positiver Wertung von Ki67% wurde nach den in der Literatur beschriebenen Werten (1) bei 10 % gezogen. Bis $\leq 10\%$ wurde der Fall als Ki67% negativ gewertet, ab $>10\%$ als positiv. Die bereits bekannte leicht links-schiefe Verteilung der Daten zum Recurrence-Score© (siehe Kapitel 3.1) konnte auch in der Stichprobe des Markers Ki67% gefunden werden (siehe Abbildung 28b). Im Vergleich des Medians zwischen den Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p\text{-value} = 0.00431$) mit einem höheren Recurrence-Score bei stärkerer Ausprägung von Ki67% (siehe Abbildung 28a).

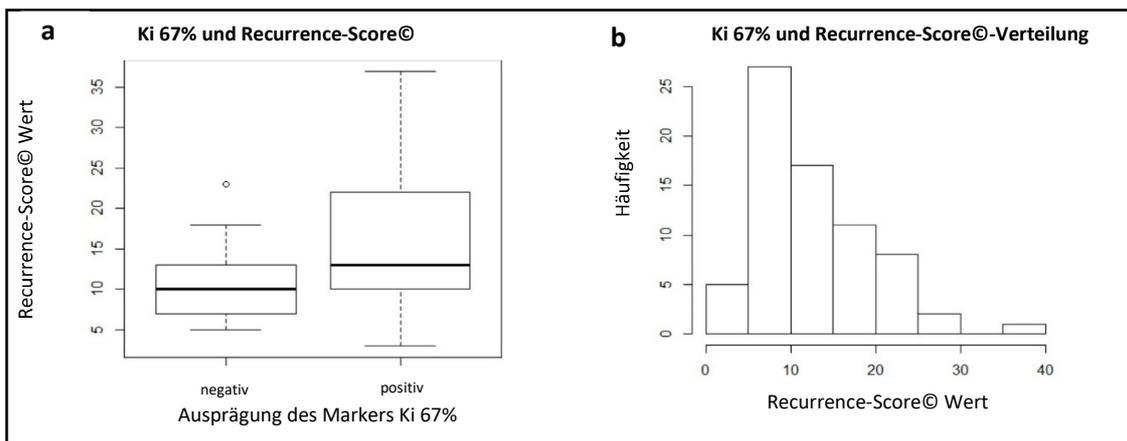


Abb. 28 Graphische Darstellung von Ki67% in Bezug auf den Recurrence-Score©.
a Boxplot $p\text{-value} = 0.00431$ (nach Mann-Whitney-U-Test) b Histogramm

Für Ki 67% wurden dieselben Paaranalysen bezogen auf den Recurrence-Score wie auch für die übrigen Marker (siehe 3.1) durchgeführt. Dazu sei hier noch einmal auf Tabelle 5 aus Kapitel 2.5.1 verwiesen.

Es zeigte sich, dass Ki 67% für fast alle untersuchten Gruppen in einem signifikanten Zusammenhang mit dem Recurrence-Score© steht. Eine Ausnahme bildet hierbei das Kollektiv der Patientinnen bis einschließlich des 50. Lebensjahres. Dabei war es irrelevant, ob eine Einteilung in vier (Test 2.1) oder zwei R-Gruppen (Test 5.1) erfolgte, der Zusammenhang war nicht signifikant (siehe Tabelle 9).

Tab. 9 p-Values und Korrelationsmaße für den Zusammenhang von Ki67% und dem Recurrence-Score©.

Analyse	X ² -p-value	Fisher-p-value	Cramer V	Kontingenz-Koeffizient
1	0.02942	0.02781	0.3558	0.3353
2.1	0.6519	0.6306	-	-
2.2	0.01513	0.01506	0.5110	0.4551
3	0.02882	0.02444	0.3161	0.3014
4	0.01843	0.01761	0.3107	0.2967
5.1	1	1	-	-
5.2	0.006425	0.00337	0.4831	0.4350

Abbildung 29 zeigt die entsprechenden Häufigkeiten in den Gruppen für Test 1 und Test 2.2.

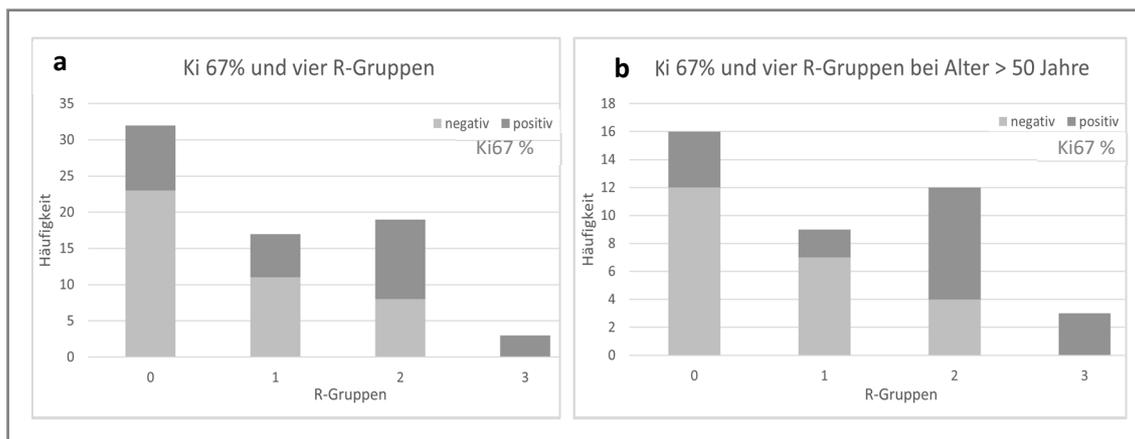


Abb. 29 Häufigkeiten in den vier R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2: ≥ 26) für das Gesamtkollektiv von Ki67%, sowie für Patientinnen > 50 Jahre.

In den klassischen R-Gruppen zeigte sich die in Abbildung 30 dargestellte Häufigkeitsverteilung für den Marker Ki67%.

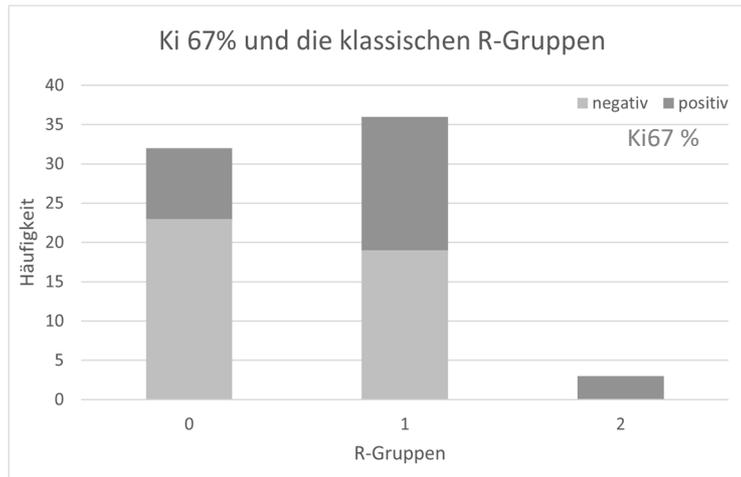


Abb. 30 Häufigkeiten für das Gesamtkollektiv von Ki67% in den klassischen R-Gruppen (0: $0 \leq 10$, 1: $11 \leq 25$, 2: ≥ 26)

Die Häufigkeiten für den Marker Ki67 % bei Reduktion auf nur zwei R-Gruppen wird durch Abbildung 31 dargestellt.

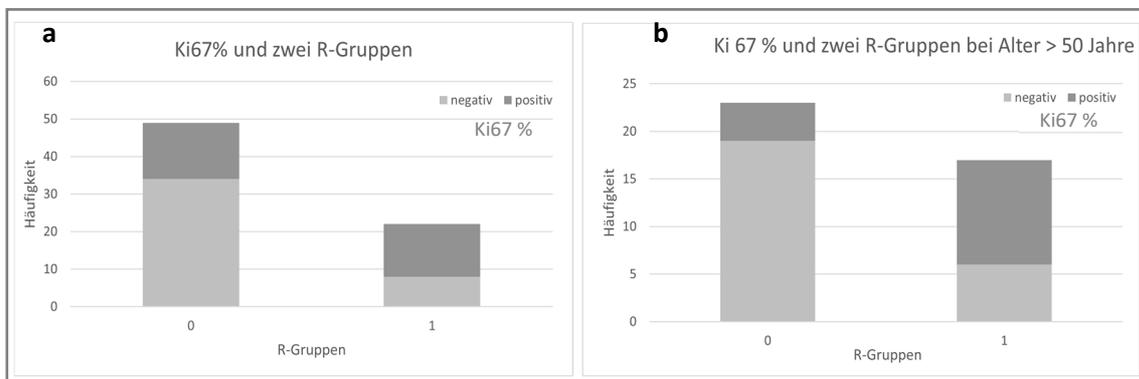


Abb. 31 Häufigkeiten in den zwei R-Gruppen (0: $0 \leq 15$; 1: ≥ 16) für das Gesamtkollektiv von Ki67%, sowie für Patientinnen > 50 Jahre.

3.3.2 Paaranalyse mit Ki 67%

Im Vergleich zur allgemeinen Paaranalyse der immunhistochemischen Marker untereinander (siehe 3.2) war die Stichprobe für Ki 67% noch einmal reduziert, da nicht zu allen Fällen Daten über den Ki 67%-Status vorlagen. Sie umfasst 43 Fälle. Abbildung 32 zeigt das zugehörige Histogramm, welches ebenfalls eine ersichtliche Linksschiefe aufweist.

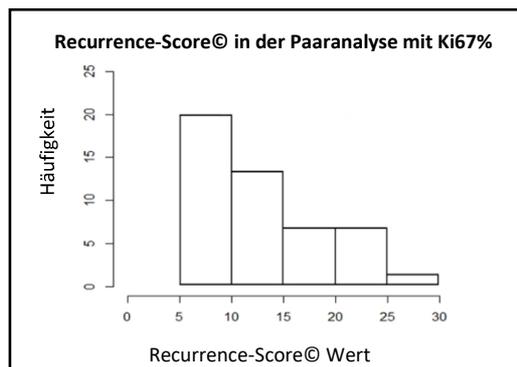


Abb. 32 Histogramm zum Recurrence-Score® der Stichprobe der Paaranalyse mit Ki67%

Für die Analyse dieser Stichprobe im Gesamten, wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang für Ki 67% mit CDK 4 (sowohl differenziert als auch dichotom) festgestellt, genauso wie für das dichotomisierte pERK. Tabelle 10 zeigt die entsprechenden Korrelationsgrößen dazu, sowie zusätzlich für Marker, die innerhalb des 10 % Niveaus lagen. Die Korrelationsstärke lag jeweils im mittleren Bereich.

Tabelle 10 Ki 67 % und die signifikanten Marker der Musteranalyse für die Stichprobe im Gesamten.

Gesamt	CDK4	CDK4 d	pERK	pERK d	PDL-1
Ki67%					
Fisher	0.04245	0.02675	0.05644	0.03365	0.0612
X ²	0.0453	0.04215	0.07565	0.0477	0.06507
Wert	6.1889	4.129	6.8852	3.9204	5.4645
Cramer V	0.3794	0.3587	0.4002	0.3485	0.3565
Kontingenz Koeffizient	0.3547	0.3376	0.3715	0.3291	0.3358

Die nachfolgenden Abbildungen (Abb. 33 bis Abb. 35) zeigen die Häufigkeiten zu den signifikanten Markerpaarungen mit Ki 67%. Es ist zu beobachten, dass in für die Marker CDK4 und pERK (jeweils differenziert und dichotom) sowie für PDL-1 (differenziert) mit Zunahme der Ausprägungsstärke auch im Verhältnis mehr Fälle Ki 67%-positiv waren.

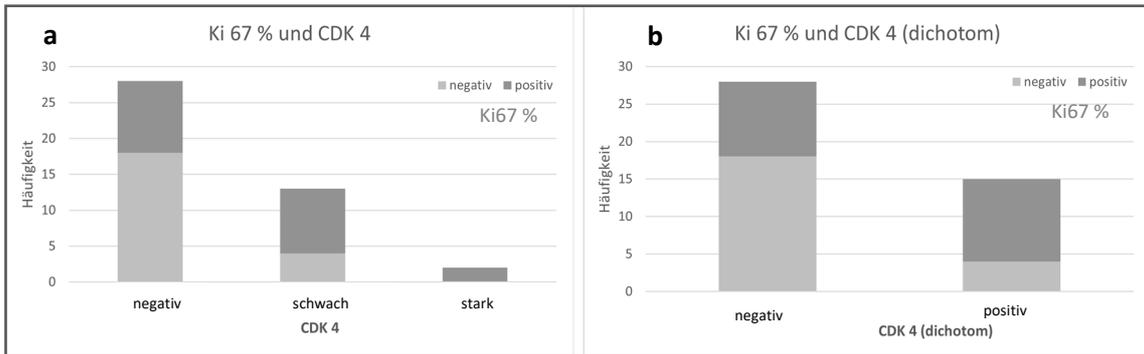


Abb. 33 Häufigkeiten für CDK 4 **a** differenziert und **b** dichotom für die gesamte Stichprobe Ki 67%

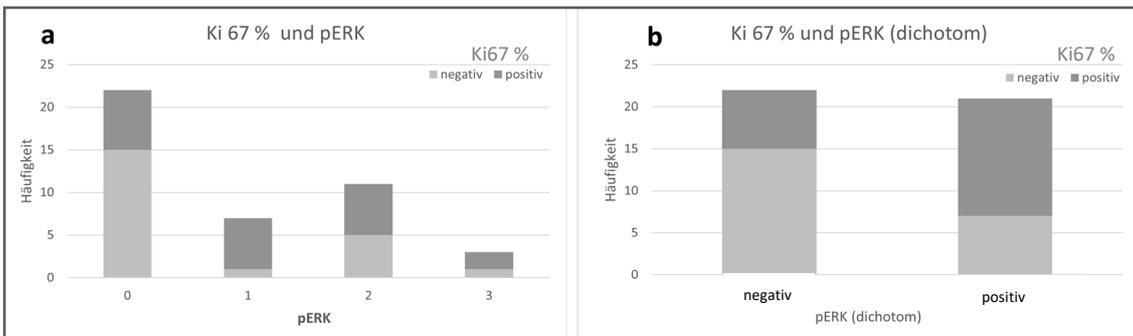


Abb. 34 Häufigkeiten für pERK **a** differenziert (0: negativ; 1: < 10%; 2: > 10% und < 50%; 3: > 50%) und **b** dichotom für die gesamte Stichprobe Ki 67%.

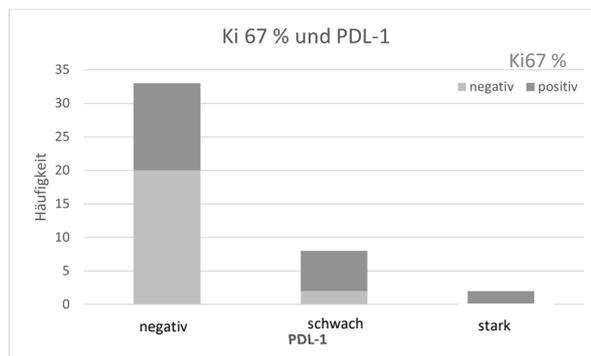


Abb. 35 Häufigkeiten für PDL-1 für die gesamte Stichprobe Ki 67%

3.3.3 Recurrence-Score®, Alter und Ki 67%

Für die Parameter Alter bei Diagnosestellung und prozentuales Ki 67% wurde jeweils eine Rangkorrelation nach Spearman gegen den Recurrence-Score® durchgeführt. Zusätzlich erfolgte auch eine Korrelation der beiden Parameter gegeneinander, um einen möglichen Confounder-Effekt zu ermitteln. Für das Alter bei Diagnosestellung konnte auf das Gesamtkollektiv zurückgegriffen werden (79 Fälle). Für Ki 67% lagen zu 71 Fälle Daten vor.

Es zeigte sich ein hochsignifikanter positiver Zusammenhang, mittlerer Stärke zwischen Ki 67% und dem Recurrence-Score® (p-value: 4.874e-05; Rangkorrelationskoeffizient: 0.4625881). Der Recurrence-Score-Wert steigt demzufolge mit dem prozentualen Anteil des positiven Markers Ki 67%. Abbildung 36 gibt die zugehörigen Daten im Streudiagramm wieder.

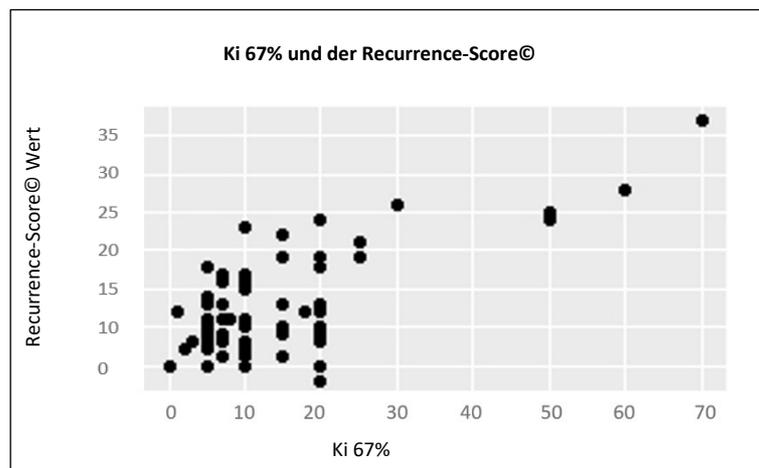


Abb. 36 Streudiagramm zu Ki67% und dem Recurrence- Score®

Für das Alter bei Diagnosemitteilung konnte ebenfalls ein signifikanter, positiver Zusammenhang mit dem Recurrence-Score® gefunden werden (p-value: 0.01693). Dieser war jedoch nur von schwacher Korrelationsstärke (Rangkorrelationskoeffizient: 0.2680302). Hierzu sind in Abbildung 37 die Werte im Streudiagramm aufgetragen.

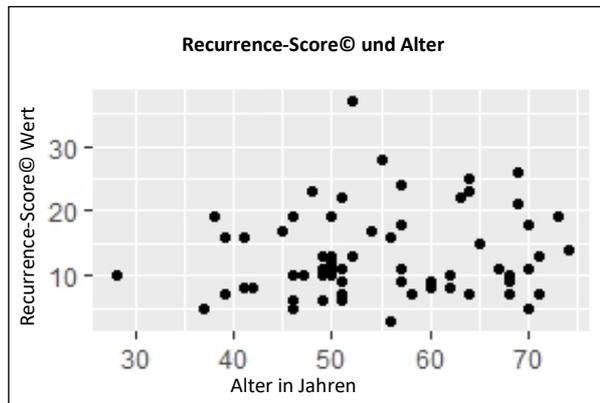


Abb. 37 Streudiagramm zum Alter bei Diagnosestellung und dem Recurrence-Score®

Die Korrelation von Ki 67% gegen das Alter dagegen war nicht signifikant (p-value: 0.6953; Rangkorrelationskoeffizient: 0.04729137). Eine Übersicht zur Datenverteilung gibt hierzu Abbildung 38 wieder.

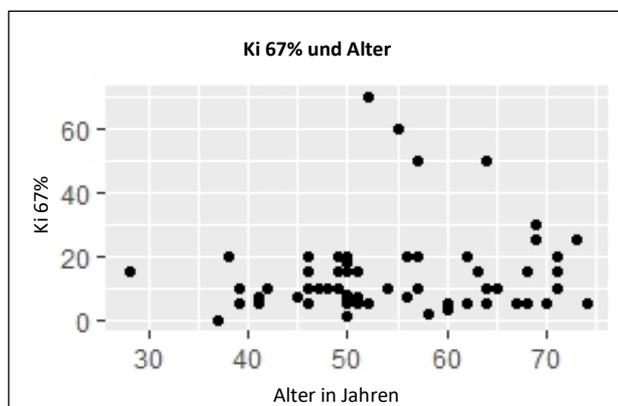


Abb. 38 Streudiagramm zum Alter bei Diagnosestellung und Ki 67%

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Aspekte

Individualisierte Medizin – ist vielleicht das Schlagwort des prospektiven Gesundheits-Managements des kommenden Jahrzehnts (Synonyme: personalisierte, stratifizierte oder maßgeschneiderte Medizin) (60). Was jedoch nach für jeden einzelnen Patienten eigens entwickelt und hochmodern klingt, hat bereits seit langem festen Bestand in der Medizin und basiert im Wesentlichen auf Subgruppen-Spezifizierung. So kann beispielsweise die Bestimmung von Blutgruppen vor einer Transfusion als individualisierte Medizin (60) klassifiziert werden und diese gehört seit Mitte des letzten Jahrhunderts zum Standard (61). Und auch schon in der Lehre von Hippokrates finden sich hierfür erste Ansätze (62).

Nichtsdestotrotz ist stratifizierte Medizin ein Zukunftsthema, vor allem weil immer mehr biotechnologische und insbesondere molekulargenetische Methoden zur Verfügung stehen, welche die Basis für moderne Ansätze stellen.

Mit dem Oncotype DX[©] liegt ein mächtiges Tool zur Risikostratifizierung bei Brustkrebs vor (siehe 1.2). Der Test weist eine ausgezeichnete Datenlage (23, 39-49) auf und hat sich auch in der Praxis bewährt, was sich nicht zuletzt in der Kostenübernahme durch die Krankenkassen (36, 37) widerspiegelt.

Dennoch sind die Grenzen dafür eng gesteckt (38), so dass nicht alle Patientinnen, für die eine solche Risikostratifizierung sinnvoll wäre, auch davon profitieren können. Desweiteren bleiben die hohen Kosten von mehreren tausend Euro (63) pro Test zu bedenken, welche das Gesundheitssystem belasten.

Vor diesem Hintergrund lohnt es sich das Szenario aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten. Ähnlich der „individualisierten Medizin“ ist auch der Nachweis von Genexpression, welcher für den Oncotype DX[©] genutzt wird, nichts neues in der Medizin, lediglich das biochemische Informationslevel ist ein anderes. Immunhistochemische Färbungen gehören zu den Standardmethoden der klinischen Histopathologie und werden täglich auch an Brustkrebsgewebeproben durchgeführt. Durch sie kann mittels passender Antikörper nachgewiesen werden ob bestimmte Proteine in relevanter Menge im Gewebe vorliegen. Handelt es sich bei diesen Proteinen um die Genprodukte der zu untersuchenden Gene, stellt ihre Ausprägung ein indirektes

Maß für die Genexpression dar. Wichtige routinemäßig bestimmte immunhistochemische Marker des Mamma-Ca. sind der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteron-Rezeptor) und der Her2-neu-Status. Daneben spielt Ki 67 häufig noch eine Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte immunhistochemische Marker auf ihren Zusammenhang mit dem Recurrence-Score[®] des Oncotype DX[®] untersucht.

Die Auswahl erfolgte nach zwei Kriterien. Zum einen wurden Gene bzw. Genprodukte berücksichtigt, welche im Panel des Oncotype DX[®] enthalten sind, zum anderen wurden vielversprechende Kandidatengene aus klinischer Praxis und Literatur eingeschlossen.

Das Patientenkollektiv umfasste 79 Fälle und bestand ausschließlich aus Patientinnen mit einem östrogenrezeptorpositiven Mammafrühkarzinom und negativem Her2-neu-Status, sowie einem Lymphknotenstatus bis maximal N1.

Ziel der Arbeit war die Identifikation immunhistochemischer Marker oder Muster mit möglichem prädiktivem Wert für den Recurrence-Score[®]. Aufgrund des Skalenniveaus der immunhistochemischen Daten war die Einteilung des Recurrence-Scores[®] in Gruppen zum Vergleich sinnvoll. Sie erfolgte nach bereits in der Literatur vorgestellten Grenzen (41, 45). Dabei wurde zunächst auf die klassischen Recurrence-Gruppen der Risikostratifizierung zurückgegriffen, die sich in low-risk ($0 \leq 10$), intermediate ($11 \leq 25$) und high-risk ($26 \leq 100$) unterteilen (23, 41). Da es Hinweise in der Literatur gibt, dass sich die Risikogruppe je nach Alter bis 50 Jahre oder darüber andersverhalten (41) und sich hierbei eine Einteilung <16 bzw. ≥ 16 interessant erwies (41), wurden diese Parameter in weiteren Analysen berücksichtigt. Zum einen erfolgte die Differenzierung in vier R-Gruppen ($0 \leq 10$, $11 \leq 15$, $16 \leq 25$ und ≥ 26), zum anderen wurde das Kollektiv in zwei Gruppen zusammengefasst ($0 \leq 15$, ≥ 16). Dieses Vorgehen bezieht sich auf die Einzelanalysen der immunhistochemischen Marker und wird unter Kapitel 4.2 vertieft. Die Paaranalyse (siehe hierzu Kapitel 4.6.), in der vielversprechende Marker auf einen gegenseitigen Zusammenhang hin untersucht wurden, erfolgte ausschließlich am Gesamtkollektiv, abzüglich der nicht auswertbaren Fälle (s.IV, Tabelle A1).

4.2 Ausgewählte immunhistochemische Marker und der Recurrence-Score©

Für den Vergleich mit dem Recurrence-Score© wurden 18 immunhistochemische Marker nach den oben beschriebenen Gesichtspunkten ausgewählt. Zehn dieser Marker erwiesen sich in der primären Datenauswertung als interessant und wurden statistisch auf einen signifikanten Zusammenhang mit dem Recurrence-Score© untersucht (siehe 3.1). Zusätzlich wurde der Marker Ki 67% aus der Routinediagnostik mit in die Analyse aufgenommen (siehe 3.3). Die Ergebnisse hierzu werden ab Kapitel 4.2.2 jeweils ausführlich diskutiert.

4.2.1 Ausgeschlossene Marker

Die von der weiteren Analyse ausgeschlossenen Marker unterteilen sich in die Mikrosatelliten-Gruppe (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), sowie vier weitere Marker: CD56, D20-40, p57 und RB.

Mikrosatelliten-Instabilität ist ein gelegentlich beobachtetes Phänomen bei malignen Tumoren (64). Mit dem Verlust dieser Gene fehlt der Zelle die Funktion des Mismatch-Repairs. Damit ist die Fähigkeit zur DNA-Schaden-Reparatur beeinträchtigt (64, 65). Am bekanntesten ist dieser Vorgang für Colon-Karzinome beim Vorliegen eines HNPCC-Syndroms. Hierbei liegt der Gendefekt heterozygot bereits angeboren vor und prädisponiert besonders für Darmkrebs (Lebenszeitrisiko für Frauen 32-59%), aber auch für einige weitere Tumorerkrankungen (65). Aus gynäkologischer Sicht betrifft das HNPCC vor allem das Endometriums-Karzinom mit 39-50% Lebenszeitrisiko und mit 7-8% deutlich seltener das Ovarial-Karzinom (65). Auch das Mammakarzinom wird bei Patientinnen mit HNPCC etwas häufiger als in der Allgemeinbevölkerung beobachtet (65, 66, 67), ebenso einige weitere Tumorentitäten wie das Blasenkarzinom und das Prostatakarzinom, dennoch zählt man diese nicht zum typischen HNPCC-Spektrum (65).

Neben dem HNPCC-Syndrom finden sich bei Tumoren auch immer wieder gehäuft sporadische Mutationen in den Mikrosatelliten-Genen, welche zur Tumorgenese beitragen (64, 65). Für das Mamma-Ca scheint dieser Mechanismus möglich (68-71) jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein (72) und auch die Daten aus der

vorliegenden Analyse (siehe Kapitel 3.1.2) geben keinen Anlass zu einer davon abweichenden Einschätzung in unserer Kohorte.

Mit einer Ausnahme waren alle Fälle des Kollektivs für den immunhistochemischen Marker CD56 negativ. Für eine relevante Rolle in der Tumorprogression und -genese beim Mamma-Karzinom bieten sich daher keine Anhaltspunkte aus den vorliegenden Daten. Der einzelne positive Fall geht auf einen Mamma-Carcinom mit vermutlich neuroendokrinen Eigenschaften zurück. Ein prognostischer Wert ergibt sich aus diesem Zusammenhang jedoch nicht.

D20-40 ist durch einigen Studien als vielversprechender Marker für den Lymph- und Blutgefäßeinbruch beim Mamma-Carcinom entdeckt worden (73, 74, 75). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang von D20-40 und der Höhe des Recurrence-Scores® zur Risikostratifizierung beim Mamma-Carcinom gefunden werden. Es ergab sich für alle Fälle eine gleichmäßige der Expression von D20-40.

Dies gilt ebenso für den Marker p57, dessen „Downregulierung“ in den Vorgang der Tumorprogression involviert ist (76). Eine negative Expression konnte in verschiedenen Studien (76,77, 78) mit einem höheren Risiko zur Tumorprogression assoziiert werden. Yang et al. (2015) untersuchten mittels Immunhistochemie p57Kip2 und Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) in Bezug zu klinisch-pathologische Parametern auf einen Zusammenhang mit der Prognose von Brustkrebspatientinnen (76). Sie konnten zeigen, dass zwischen diesen beiden Parametern eine negative Korrelation besteht (76). Bei starker Expression von skp2 und geringer Ausprägung von p57Kip2 hatten die Patientinnen eine schlechte Prognose (76). In der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede in der Ausprägung von p57 gefunden werden. Möglicherweise liegt dies daran, dass nur Patientinnen mit Mamma-Frühkarzinom in das Kollektiv aufgenommen wurden, welche im Vergleich zu der Gesamtheit der Brustkrebspatientinnen eine deutlich bessere Prognose aufweisen (23).

Unter den bekannten Tumorsuppressorgenen ist das Retinoblastom-Gen (RB) zusammen mit p53 schon eine Art Klassiker der Molekulargenetik. Beide sind häufig in den Prozess der Tumorigenese involviert (79). Für das Mamma-Karzinom gibt es eine Reihe von Studien, die den Zusammenhang mit der Expression von RB untersucht haben (80-83).

Dabei scheint dieser für verschiedene Subgruppen des Mamma-Cas unterschiedliche Bedeutung zuzukommen (81, 82, 83). Allgemein geht ein Verlust der RB-Expression eher mit einer schlechteren Prognose der Patientinnen einher (80, 81). Für die Entität der ER-negativen Karzinome spricht laut Ertel et al. (2010) der RB-Verlust jedoch für ein besseres Ansprechen der Chemotherapie (80). Witkiewicz et al. (2012) wiesen diesen Effekt bei neoadjuvanter Chemotherapie, sowohl für ER-positive, als auch ER-negative Karzinome nach (81). Der Tabelle 6 (siehe Kapitel 3.1.2) kann entnommen werden, dass sich die Expression von RB für das Gesamtkollektiv der vorliegenden Arbeit homogen negativ zeigte. Als Marker zur Risikostratifizierung kommt ihm damit anzunehmender Weise keine Bedeutung zu. Zwar mag bei RB-Negativität ein gutes Ansprechen auf eine Chemotherapie vorliegen, über die Notwendigkeit dieser gibt das jedoch keinen Aufschluss.

4.2.2 AMACR

A-Methylacyl-CoA racemase (AMACR) ist ein Enzym mit Funktion im Fettstoffwechsel, das immunhistochemisch in Vesikeln des Zytoplasmas nachgewiesen werden kann, welche zu den Mitochondrien und Peroxisomen transportiert werden (84). Mit einer besonders hohen physiologischen Expression liegt AMACR in Leber- und Nierenparenchym vor (85). Abbildung 39a zeigt die Positivkontrolle am Nierenparenchym als Nachweis der erfolgreichen immunhistochemische Färbungen. In 39b und 39c sind Mamma-Ca mit positivem AMACR-Status dargestellt.

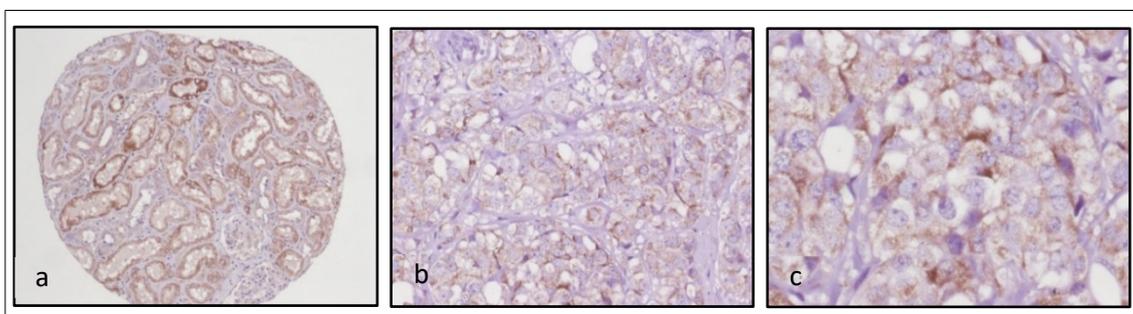


Abb. 39 Positive immunhistochemische Färbungen von AMACR a Positivkontrolle (Niere, Vergrößerung 10fach)
b Mamma-Ca. (150fach) c Ausschnittsvergrößerung von b

AMACR wird in normalem Brustgewebe auf niedrigem Niveau exprimiert, in invasiven Carcinomen dagegen wird es überexprimiert (84). Die Expressionsrate liegt laut Witkiewicz et al. (2005) für high grade Carcinome im Vergleich zu Low-grade Carcinomen nochmal höher (84). In der vorliegenden Arbeit konnten statistisch signifikant höhere Recurrence-Score Werte[©] bei starker Ausprägung des Markers AMACR gefunden werden ($p = 0.01881$).

AMACR erscheint damit als vielversprechender Kandidat für einen immunhistochemischen Marker mit prädiktivem Wert für den Recurrence-Score[©]. Die Ergebnisse der Recurrence-Gruppen-Analyse stützen diese Annahme (siehe 3.1.1.1). So zeigten sich die positiven und negativen AMACR-Fälle hochsignifikant nicht gleichverteilt auf die vier bzw. drei R-Gruppen (vier Gruppen: Fisher-p-value= 0.004445, drei Gruppen: Fisher-p-value= 0.006381). Dabei liegt das Gewicht auf der jeweils niedrigsten Risikogruppe, in der sich kein Fall positiv für AMACR zeigte. Die höheren Risikogruppen kamen sowohl bei den negativen als auch bei den positiven AMACR-Fällen vor. Somit ist klar, dass durch AMACR allein keine sichere Vorhersage der Recurrence-Gruppe erfolgen kann, aber Negativität für diesen immunhistochemischen Marker kann als Hinweis auf ein niedrigeres Risiko für die Rückfallwahrscheinlichkeit beim Mamma-Ca gewertet werden.

Nassar, A., et al. (2005) untersuchten ausgehend von positiven Befunden für die Überexpression von AMACR beim Prostata-Karzinom diesen Zusammenhang für weitere Karzinome, so auch für das Mamma-Ca. (86). Sie konnten einige Brustkrebsfälle mit Überexpression finden, der überwiegende Anteil war jedoch negativ für AMACR, wie auch das normale Brustdrüsengewebe (86). Da die positiven AMACR-Fälle für das Colon-Ca deutlich höher lagen, schlugen sie AMACR unter anderem als differentialdiagnostischen Marker zwischen Mamma-Ca und Colon-Ca bei unbekanntem Primarius vor (86). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sowie von Witkiewicz et al. (2005) weisen dagegen auf ein intrinsisches Risikogefälle zwischen AMACR-Positivität und -Negativität bei Brustkrebs hin (84).

4.2.3 Bcl 2

BCL 2 ist ein Anti-Apoptose Protein (87) mit wichtigen regulatorische Aufgaben in der Stabilisierung der MOMP (mitochondrial outer membrane permeability)(88). Es wird in ungefähr 75% der Mamma-Carcinome exprimiert und zeigt eine Assoziation mit low-grade Tumoren und ER-Positivität (88). Nach Dawson et al. (2010) ist BCL 2 ein unabhängiger prognostischer Marker für eine gute Prognose beim Mamma-Frühkarzinom (87). In der Auswahl potenziell interessanter immunhistochemischer Marker für die Risikostratifizierung bei Brustkrebs wurde er daher berücksichtigt, zudem ist die Bcl2-Expression Teil des Oncotype-DX© Assays (40, 55, 89). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls der Trend einer stärkeren Ausprägung von Bcl 2 bei niedrigeren Recurrence-Werten gefunden werden. Der Unterschied zwischen den Medianen der Gruppen unterschiedlicher Bcl Ausprägung war statistisch jedoch nicht signifikant, wobei er noch innerhalb des 10% Niveaus lag ($p= 0.07976$). Auch in der Analyse nach Recurrence-Gruppen konnte für keine der geprüften Konstellationen ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Marker Bcl 2 und der Höhe des Recurrence-Scores© gefunden werden (jeweils Fisher-p-value > 0.10 ; X^2 -p-value > 0.10). Hierbei bleibt jedoch zu bemerken, dass es im Kollektiv nur einen einzigen negativen Bcl 2-Fall gab und die übrigen Fälle nach ihrer Intensität zwei positiven Bcl 2-Gruppen zugeordnet wurden, zudem überwiegen die niedrigen Risikogruppen in der Fallsammlung. Abbildung 40 zeigt immunhistochemische Färbungen verschiedener Ausprägung zu Bcl 2.

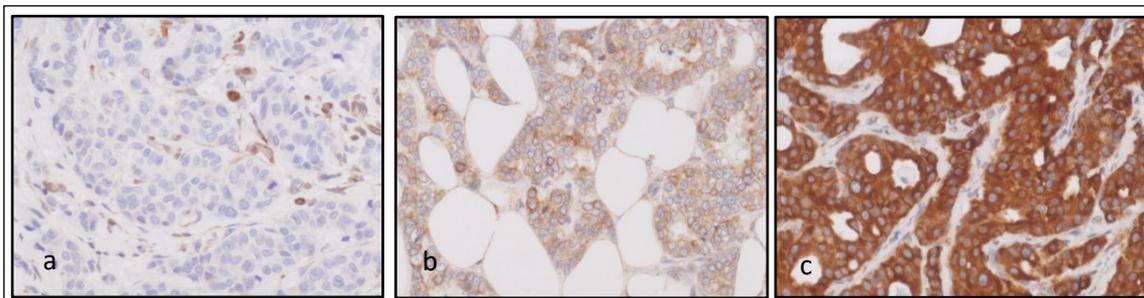


Abb. 40 Immunhistochemische Färbungen von Bcl 2. a negativ b schwach positiv c stark positiv

Mit einem Recurrence-Wert von 24 liegt der negative Bcl 2-Fall zwar innerhalb der intermediaten Gruppe, aber nahe der Grenze zur high-risk Gruppe. Daher widersprechen

die gefundenen Daten Dawson et al. (2010) und Hwang et al. (2018) nicht (87, 90). Vielmehr ergänzen sie diese um die Information, dass eine weitere Differenzierung der Bcl2-Expression vermutlich keinen zusätzlichen Informationsgewinn hinsichtlich der Risikostratifizierung des Mamma-Karzinoms erbringt.

4.2.4 Cyclin D1 und CDK4

Cyclin D1 und CDK4 (Cyclin dependent kinase 4) sind wichtige Akteure mit regulatorischer Funktion im Zellzyklus (91-96). Das Retinoblastom Tumorsuppressor Gen (RB), welches bereits unter 4.2.1 als immunhistochemischer Marker diskutiert wurde, spielt hierbei ebenfalls eine entscheidende Rolle. Es reguliert die Progression von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (91, 94, 96). Über extrazelluläre Signale wird die Expression von Cyclin D1 induziert (91, 94, 96). Dieses aktiviert CDK4 und CDK6, das RB-Protein wird anschließend von CDK4 phosphoryliert und wirkt über die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie progressiv auf den Zellzyklus (91, 94, 97, 98). p16 wiederum ist ein CDK4-Inhibitor, der dazu führt, dass RB unphosphoryliert bleibt und damit das Voranschreiten des Zellzyklus inhibiert (91). Abbildung 41 veranschaulicht diese Zusammenhänge des RB-Pathways für den Zellzyklus.

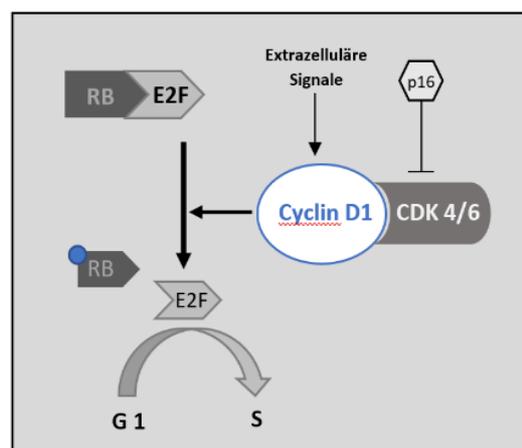


Abb. 41 Regulation des Übergangs von G1/S im Zellzyklus durch Cyclin D1, CDK4 und p16. Blauer Punkt= Phosphorylierung. (modifiziert nach Peurala et al. 2013 (91))

Nach Peurala et al. 2013 korreliert eine hohe Cyclin D1 Expression mit niedrigem Tumorgrad, positiven Hormonrezeptorstatus und geringer Proliferations-Aktivität in

Mamma-Karzinomen, sowie mit einem besseren brustkrebspezifischen und Gesamtüberleben der Patientinnen (91).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Höhe des Recurrence-Scores zwischen den Gruppen mit verschiedener Expressionsstärke von Cyclin D1 (siehe Abbildung 42 zu immunhistochemischen Färbungen von Cyclin D1) gefunden werden (p -value= 0.5878), vielmehr lagen die Mediane fast auf einer Ebene.

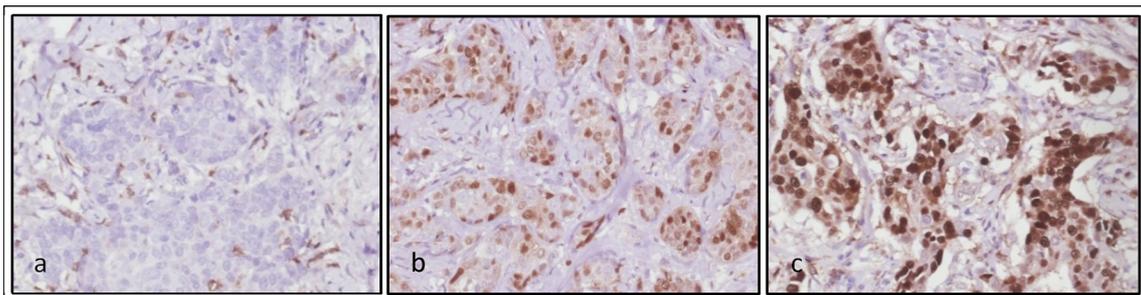


Abb. 42 Immunhistochemische Färbungen von Cyclin D1
a negativ b normal positiv c stark positiv

Die Analyse nach Recurrence-Gruppen erbrachte jedoch einen signifikanten Zusammenhang für die Anwendung der klassischen Risikostufen ($p= 0.0395$). Bei Betrachtung der Häufigkeiten ist das Augenmerk darauf zu legen, dass in den beiden Cyclin D1 positiven Gruppen nur Fälle zu finden waren, die einen Recurrence-Wert hatten, welcher einer der beiden unteren Risikostufe entsprach. Alle high-risk Fälle waren negativ für Cyclin D1. Damit passen die Ergebnisse zu den Daten von Peurala et al. 2013 (91).

Schwierig war es für Cyclin D1 die richtige Auswahl für eine dichotome Variante zu treffen. So wird Cyclin D1 in normalen Brustgewebe nicht oder nur wenig exprimiert (98). Als potenzielles Oncogen steht eine Expression von Cyclin D1 häufig im Zusammenhang mit der Carcinogenese, so findet es sich in der Literatur auch für das Mamma-Ca beschrieben (98, 93, 97). Eine Überexpression geht wie oben erwähnt häufig mit einer guten Prognose des Mamma-Ca einher (91, 98), dagegen wird es in Tripel-negativen und Carcinomen mit erhöhtem Risiko selten exprimiert (98). Davon ausgehend, dass die Expression in normalen Brustdrüsengewebe bei der Vorauswahl bekannter Mamma-Karzinome keine relevante Rolle spielt, wurde sich hier für die Variante entschieden eine Einteilung in Cyclin D1 positiv und negativ zu treffen.

Durch das Dichotomisieren konnte die Signifikanz auf die höchste Stufe gesteigert werden und hierbei kann sogar von einer starken Korrelation ausgegangen werden (Klassische R-Gruppen: $p = 0.008093$, vier R-Gruppen: $p = 0.0124$, Cramer $V = 0.5832$).

Die Ergebnisse stützen somit die aus der Literatur bekannte Beobachtung, dass eine hohe Cyclin D1 Expression bei Mamma-Ca Patientinnen für eine bessere Prognose spricht (91,98), die hier mit dem niedrigen Recurrence-Wert assoziiert wird. Damit ist Cyclin D1 ein Marker von Interesse im Hinblick auf ein immunhistochemisches Panel mit prädiktivem Wert für den Recurrence-Score©.

Für CDK4 sieht die Situation nicht ganz eindeutig aus. Zwar konnte eine signifikante Korrelation zwischen CDK4 und dem Recurrence-Score gefunden werden, jedoch nur nach Dichotomisieren (positiv vs. negativ) und Zusammenfassen in zwei der R-Gruppen ($p=0.04891$). Möglicherweise ist die Stichprobengröße der vorliegenden Arbeit hier zu klein, um diesen Zusammenhang besser herauszuarbeiten, da auch nur eine schwache Stärke der Korrelation festgestellt werden konnte (Cramer $V = 0.2551$).

Fernerhin ist davon auszugehen, dass die angewandte Einteilung in Gruppen nach Expressionsstärke bzw. korrekter nach Färbeintensität einen bedeutenden Einfluss auf die ermittelte Korrelation hat. In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei Gruppen für CDK 4 gearbeitet (negativ, schwach-mittel, stark positiv). Entscheidendes Kriterium für die Einteilung in die stark positive CDK 4 Gruppe war hierbei die gesamt-zelluläre Färbung, also sowohl der nukleare als auch cytoplasmatische Nachweis von CDK4. Abbildung 43 zeigt hierzu exemplarische Färbungen. Eine Modifikation dieser Einteilung führt denkbarer Weise auch zu veränderten Korrelationsdaten. So finden sich in der Literatur z.T. differenziertere Auswertungsschemata (Vgl. Proteinatlas, 99).

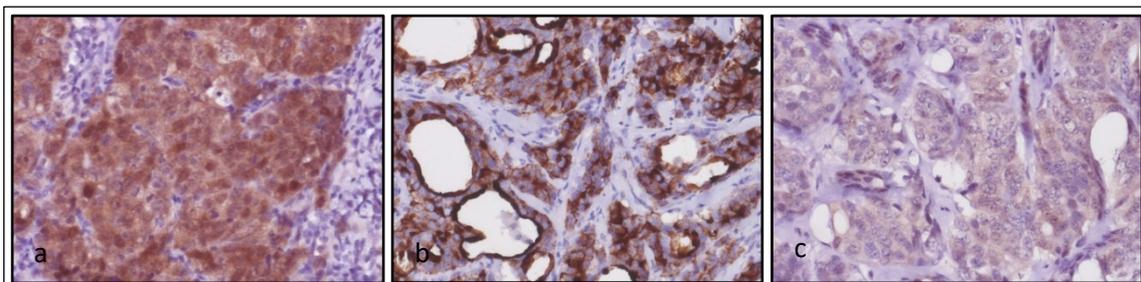


Abb. 43 Positive immunohistochemische Färbungen von CDK 4 und ihre zugehörigen Gruppen
a stark positiv (= 2) b schwach-mittel (= 1) c schwach-mittel (=1)

Zumindest wird die Richtung des vermuteten Zusammenhanges bei Betrachtung der zugrundeliegenden Häufigkeiten klar, da die CDK4 negative Gruppe besonders viele Fälle mit niedrigem Recurrence-Score beinhaltet. Damit passen die Daten sehr gut zudem was Peurala et al. 2013 gefunden haben. Sie beschreiben, dass CDK4 trotz Expression in ca. 70% ihrer Tumorgewebeproben keine Korrelation mit der Überlebensrate der Patientinnen zeigte, konnten aber eine Tendenz von CDK4 nachweisen, bei positivem Status mit einem höheren Tumorgrad assoziiert zu sein (91).

CDK4 ist bekannt dafür, positiv auf die Tumorzellproliferation zu wirken (92, 93, 100). Daher ist es auch in den Fokus therapeutischer Ansätze gerückt. Es gibt diverse Studien die CDK4-Inhibitoren auf ihre therapeutische Eignung beim Mamma-Carcinom hin untersuchen (92, 101, 102). Vielversprechend scheint dieser Ansatz bereits bei ER+ Karzinomen zu sein (92, 101).

Als prädiktiver immunhistochemischer Marker könnte CDK4 durchaus berücksichtigungswert sein. So beschrieben bereits An et al. (1999) eine Assoziation zwischen der Überexpression dieses Markers und einer hohen Proliferationsrate beim sporadischen Mamma-Ca (103). Dabei erwies er sich jedoch unabhängig von anderen klinischen Faktoren (103). Auch Peurala et al. 2013 konnten keinen Zusammenhang mit weiteren von Ihnen untersuchten Faktoren feststellen. Sie kamen zu dem Schluss, dass insbesondere Cyclin D1, CDK4 und p16 unabhängig beim Mamma-Ca fungieren (91). In jedem Fall konnte in der vorliegenden Arbeit der Trend beobachtet werden, dass eine starke Ausprägung von CDK4 mit einem hohen Recurrence-Score[©] einher ging ($p = 0.07931$). Im Vergleich der Mediane zwischen allen CDK4-Gruppen (negativ, schwach, stark) zeigte sich der Unterschied jedoch nicht signifikant ($p = 0.1022$).

4.2.5 GLUT 1

GLUT1 ist im menschlichen Körper der am meistens verbreitetste Glucose-Transporter und verantwortlich für die basale Glucose-Aufnahme in die Zellen (104). In vielen Krebsarten, inklusive Brustkrebs, wird er exprimiert (105). Kommt es zur Abhängigkeit der Tumorzellen von Glykolyse zur Energiegewinnung anstelle der oxidativen

Phosphorylierung (Warburg-Effekt), so nehmen diese Krebszellen vermehrt Glucose auf, um ihren gesteigerten Energiebedarf zu decken (104, 106). Dabei geht eine hohe Expression von Glut 1 in Tumorzellen mit einer schlechten Prognose, auch beim Mamma-Ca, einher (104, 105, 107). Insbesondere ist die Glut-1 Überexpression mit einem hohen Tumor-Grading, negativem Hormonrezeptorstatus, sowie hoher EGFR und p53 Expression assoziiert (104, 105, 108).

Einen signifikanten Zusammenhang der Expression von Glut 1 und der Höhe des Recurrence-Scores[©] konnte die vorliegende Arbeit nicht nachweisen. Bei Betrachtung der klassischen R-Gruppen und Vergleich des Glut1-Status (positiv vs. negativ) ergab sich jedoch ein Hinweis darauf ($p = 0.08681$). So wiesen viele Fälle der intermediären, also zweithöchsten, Risikogruppe einen positiven Glut1-Status auf. Diese Daten sind somit mit den in der Literatur (104, 105, 107) gefundenen vereinbar, wenn sie jene auch nicht direkt stützen. Möglicherweise gelänge dies durch eine Erweiterung des Stichprobenumfangs, insbesondere durch Einschluss von deutlich mehr high-risk Fällen in das Kollektiv. Zu bemerken bleibt auch, dass Hussein et al. (2011) eine Korrelation zwischen ER- und PR- Negativität mit der Höher der Glut1-Expression beschrieben haben (105), in der vorliegenden Arbeit, aufgrund der Einschlusskriterien für einen Onctotype DX[©]-Test, lediglich Hormonrezeptor positive Fälle berücksichtigt wurden.

In jedem Fall scheint Glut 1 ein interessanter Kandidat für ein prädiktives immunhistochemisches Panel bezüglich des Mamma-Karzinoms zu sein, wenn auch noch nicht klar ist in welcher Gewichtung. Yu et al. 2017 kamen in ihrer Metaanalyse zu Glut1 in der Tumorgenese zu dem Schluss, dass dieser Marker einen prädiktiven Wert für verschiedene Krebserkrankungen hat (109). Es ergab sich eine Assoziation zu geringer Differenzierung, positivem Lymphknotenstatus und Tumorgröße (109). Sie postulierten einen Zusammenhang zwischen Glut1-Überexpression mit dem invasivem Potential und der Proliferationsaktivität des Tumors, sowie der Überlebensrate (109). Jang et al. 2012 konnten die Glut 1 Überexpression als unabhängigen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben bei Brustkrebs identifizieren (110). Sie untersuchten diesen Aspekt insbesondere an invasiven ductalen Mammakarzinomen. Besonders hohe Glut1-Expressionsraten zeigten sich auch hier bei geringem

Differenzierungsgrad, großen Tumoren und bei Lymphknoteninvasion (110). Daneben trat eine Überexpression von Glut 1 insbesondere bei Östrogen- oder Progesteronrezeptor negativen Tumoren, sowie bei Tripel-negativen Karzinomen auf (110).

4.2.6 p53 und MDM2

p 53 ist das wohl bekannteste Tumorsuppressorgen. Es hat eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischer Stabilität mit dem Schutz gegen maligne Transformationen inne, die unter anderem durch die Apoptose-Induktion, bei Zellen mit einem nicht mehr zu reparierenden DNA-Schaden, einhergeht (111, 112). Daneben fungiert es als Inhibitor der Angiogenese (111, 112).

In Mamma-Karzinomen ist die Inaktivierung des „p53-Pathways“ häufig zu finden. Je nach molekularem Subtyp tritt eine p 53 Mutation in 12-84% der Brustkrebsfälle auf und ist dann mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert. (113, 114)

Neben einer Mutation von p 53, kann die Inaktivierung dieses „Pathways“ auch durch eine Erhöhung von MDM2 (MURINE DOUBLE MINUTE 2) vermittelt werden (113). MDM2 ist ein Protoonkogen, welches als negativer Regulator von p53 fungiert (113). Dabei ist es selbst eines der wichtigsten „Downstream“-Gene von p53 (115). MDM2 ubiquitiniert p53 (E3 Ubiquitin Ligase) und sorgt so für dessen Abbau, kann aber auch direkt die Transkriptionsaktivität von p53 negativ beeinflussen (115, 116, 117). Es liegt somit in gesunden Zellen ein selbstregulierter Feedbackloop mit stabilisierender Funktion für den Zellzyklus vor (118). In vielen Tumorzellen, auch bei Brustkrebs, ist MDM2 dagegen amplifiziert und überexprimiert (113).

Die nun erhobenen Daten spiegeln die oben beschriebenen Zusammenhänge von p53 und MDM2 bei Brustkrebs in Bezug auf den Recurrence-Score[©] wider. Dabei zeichnet sich besonders für p53 ein eindeutiger Zusammenhang mit der Höhe des Recurrence-Scores[©] ab.

Der Median der Recurrence-Werte war bei der p53 positiven Gruppe, einer Überexpression entsprechend, signifikant höher als bei den p53 negativen Fällen (p= 0.02432). Signifikant zeigte sich der Zusammenhang auch bei Auswertung nach Recurrence-Gruppen. Hierbei scheint insbesondere interessant zu sein, ob der

Recurrence-Score[®] kleiner oder größer bzw. gleich 16 ist, da für die klassische Recurrence-Score[®]-Einteilung mit drei Gruppen keine Signifikanz erreicht wurde ($p = 0.1745$), wohl aber bei zugrunde legen von vier ($p = 0.03812$) oder zwei ($p = 0.02455$) Risikogruppen, welche jeweils auf dieser Stufe differenzieren.

Die Überexpression von p53, welche durch Mutation p53 verursacht wird, ist für verschiedene Tumoren, darunter auch das Mamma-Ca, beschrieben worden (119-123). Besonders häufig ist sie bei negativem Hormonrezeptorstatus und einem höheren Grad der Dedifferenzierung zu finden (119-123). Friedrichs et al. (1993) identifizierten die p53 Überexpression in Mamma-Karzinomen als unabhängiger Prädiktor für ein Rezidiv und für eine geringere Überlebensrate (119), was den Marker zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen in Hinblick auf ein immunhistochemisches Panel sicherlich interessant erscheinen lässt.

Auch MDM2 hat in dieser Hinsicht Potenzial. Zwar zeigte sich im Medianvergleich noch kein signifikanter Unterschied in der Höhe des Recurrence-Scores[®] zwischen der Gruppe der MDM2 positiven Fällen und jener mit negativen Fällen ($p = 0.2966$), dafür konnte aber eine deutliche Signifikanz für die Korrelation von MDM2 und den Recurrence-Score bei Einteilung in vier R-Gruppen ($p=0.01432$), sowie für die Anwendung der klassischen R-Gruppen ($p = 0.0338$) gefunden werden.

Zu bedenken gilt es jedoch, dass das MDM2-Genprodukt in mindestens 72 verschiedene Transkripte gespliced werden kann (113) zu denen in der vorliegenden Arbeit keine Differenzierung erfolgt ist, sondern lediglich die Unterscheidung in negatives oder positives immunhistochemisches Färbeverhalten für MDM2 (vgl. Abbildung 44).

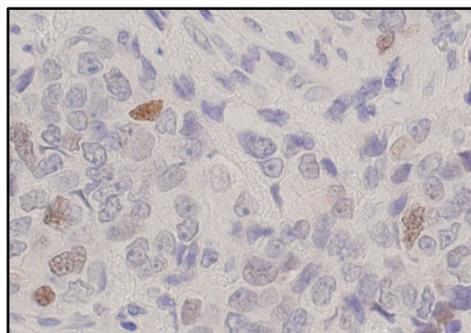


Abb. 44 MDM2 positive Färbung in der Immunhistochemie

Die Isoformen A, B und C der Splice-Varianten wurden in verschiedenen Tumortypen gefunden und sind mit einer fortgeschrittenen Erkrankung und schlechter Prognose assoziiert (113). Typ B ist die am weitesten verbreitetste Form in multiplen Tumoren und geht mit einer Akkumulation von mutiertem p 53, sowie einer von p 53 unabhängigen Einflussnahme auf den Zellzyklus einher (113). Es gibt jedoch auch Varianten der MDM2 Expression, welche mit einer guten Prognose einhergehen (113). Die Rolle der MDM2 Expression ist somit nicht konstant und bislang liegt nur ein limitiertes Verständnis der Splice-Varianten vor (113). Als Themengebiet aktueller Forschung (113) sind hier jedoch in den nächsten Jahren weitere Erkenntnisse zu erwarten, so dass es sich im Hinblick auf den Einschluss von MDM2 in ein immunhistochemisches Panel lohnt, diese zu verfolgen.

4.2.7 p27

p27 ist einer der wichtigsten Regulatoren im Zellzyklus und fungiert als Inhibitor Cyclin-abhängige-Kinasen (124). Während der G0/G1 akkumuliert er im Zellkern (125) und wird durch den TSC1/TSC2 Komplex (tuberous sclerosis gen 1 bzw. 2) aktiviert (124). Die Regulation der Transkription von p27 dagegen ist an ein funktionelles BRCA-Protein gebunden (125). Dies spiegelt sich in dem Umstand wider, dass p27 in BRCA1 mutierten Mamma-Karzinom-Zellen downreguliert ist (124, 126). Eine verminderte Expression von p27 ist im Allgemeinen mit aggressiveren Tumortypen vergesellschaftet, welche sich durch ein höheres Grading, sowie der Invasion in Lymph- und Blutgefäße mit früher Metastasierung in die Lymphknoten auszeichnen (124). Speziell bei Brustkrebs ist der Verlust der p27 Expression mit einem frühen Rezidiv, sowie reduziertem krankheitsspezifischem und Gesamtüberleben assoziiert (127). Bereits Catzavelos et al. (1997) beschrieben den p27 Status als unabhängigen prognostischer Faktor bei Brustkrebs (128).

Vergleicht man die Mediane der Gruppe mit immunhistochemischer p27 Ausprägung und der p27 negativen, so ist erkennbar, dass der Recurrence-Score© bei p27 Ausprägung niedriger liegt. Dies entspricht dem aus der Literatur bekannten negativen Korrelation zwischen p27 Expression und Schwere der Tumorerkrankung (127-130). Der Unterschied war für das Kollektiv der vorliegenden Arbeit im Mann-Whitney-U-Test jedoch nicht

signifikant ($p= 0.3336$). Anhand von Abbildung 45 ist exemplarisch die Zuordnung in immunhistochemisch p 27 positiv bzw. negativ nachzuvollziehen.

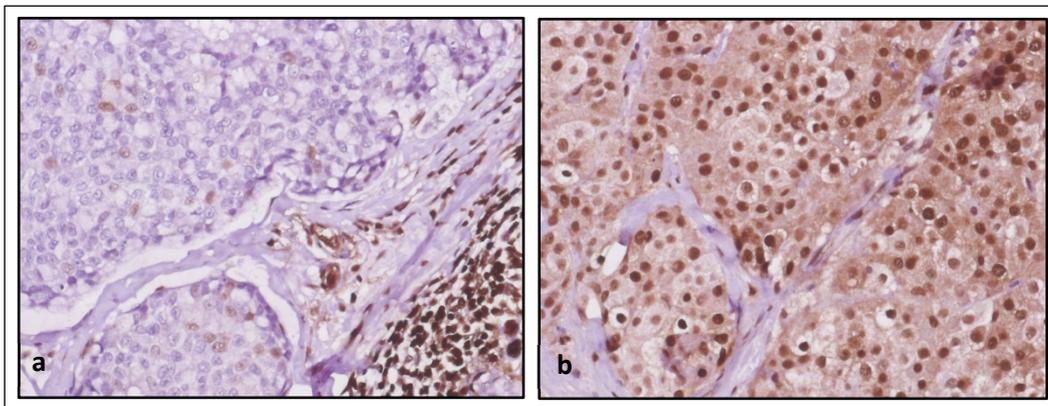


Abb. 45 Immunhistochemische Färbungen von p27 a negativ b positiv

Auch im Test-Assay nach verschiedenen Recurrence-Gruppen ergab sich für die meisten Tests keine klare Signifikanz. Eine Ausnahme stellt das Kollektiv der über 50-jährigen Patientinnen dar. Bei zugrunde legen zweier Recurrence-Risiko-Gruppen (<16 bzw. ≥ 16) wurde das 5% Signifikanzniveau erreicht ($p = 0.04282$). Bei vier R-Gruppen wurde in diesem Kollektiv zumindest das 10% Niveau unterschritten ($p = 0.09335$). Es zeigte sich hierbei, dass eine fehlende p27 Ausprägung bzw. Expression mit einer höheren Recurrence-Gruppe einhergeht (siehe Abbildung 24 in Kapitel 3.1.1.9). Auch für das Gesamtkollektiv konnte dieser Trend gefunden werden ($p = 0.06488$).

Damit ist p 27 als Kandidat für ein immunhistochemisches Panel interessant, auch wenn noch eine Validierung durch eine Ausweitung der Stichprobengröße sinnvoll erscheint. Gestützt wird dies durch die Ergebnisse von Catzavelos et al. (1997) und Dressler et al.(2013) (124, 128).

4.2.8 pERK

pERK ist die Kurzform der Bezeichnung PKR-like ER (Endoplasmatisches Retikulum) Kinase (131). Hierbei handelt es sich um ein transmembranes Signalprotein des ER, welches eine „unfolded protein response“ (UPR) zusammen mit IRE1 α (Inositol Requiring 1 α) und ATF6 α (activating transcription factor 6 α) vermittelt (131, 132). UPR stellt eine Antwort auf Zellstress dar, welcher durch die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen entsteht (131, 132). Detektiert wird diese Akkumulation durch die Zelle über das Auftreten von HSPA5 (Heat Shock 70 kDa Protein) (131). Durch UPR kann einerseits die Apoptose induziert werden, andererseits aber auch in einer modulierten Form bei Krebszellen ein pro-survival Faktor geschaffen werden, der zu Chemoresistenz der Tumorzellen führen kann. (131, 132).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein direkter Zusammenhang zwischen pERK und dem Recurrence-Score[©] des Oncotype DX[©] gefunden werden. Es erfolgte hierzu sowohl eine Auswertung nach gesamt positiven Fällen gegen pERK-Negativität, als auch eine differenzierte Analyse der positiven Fälle entsprechend des prozentualen Anteils von pERK. Nachfolgende Abbildung 46-48 lassen die diesbezügliche Zuordnung nachvollziehen.

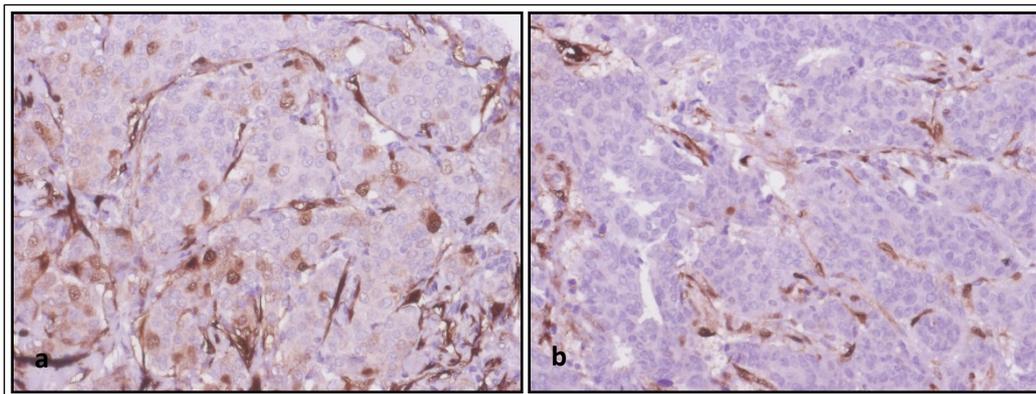


Abb. 46 Immunhistochemische Färbung von pERK.
Differenzierung zwischen **a** pERK < 10% und **b** pERK negativ

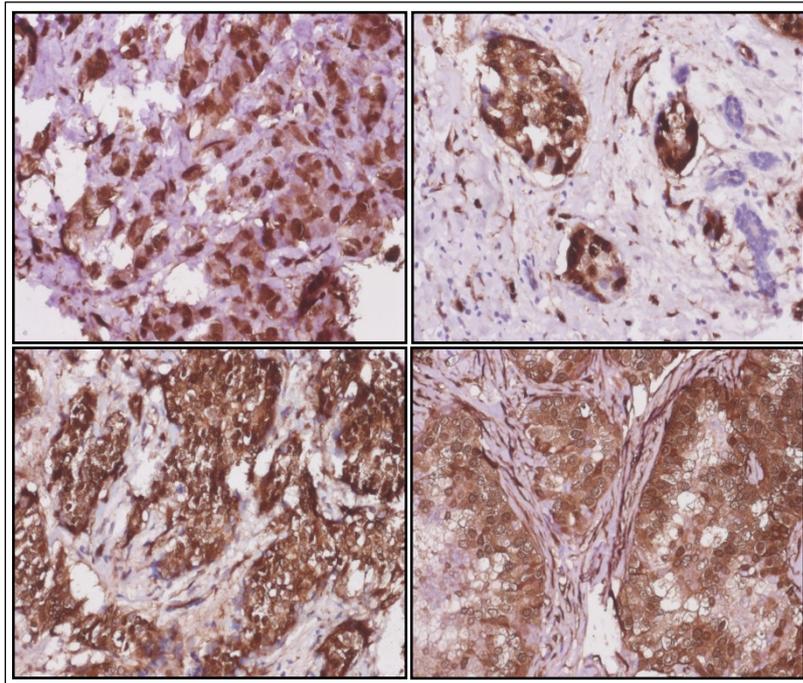


Abb. 477 Beispiele für positive immunhistochemische Färbungen von pERK.

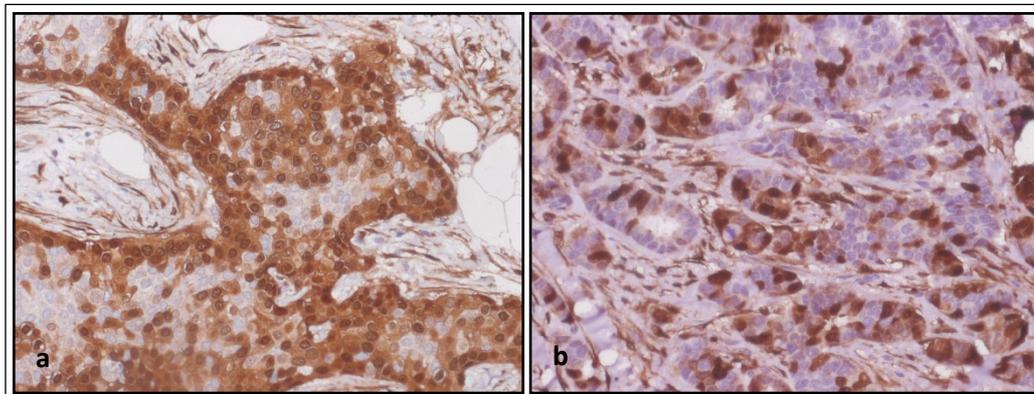


Abb. 48 Immunhistochemische Färbung von pERK.
Differenzierung zwischen **a** pERK > 50% und **b** pERK < 50%

Es gibt Hinweise in der Literatur darauf, dass pERK zumindest bei HER2-positivem Brustkrebs einen prognostischen Wert haben könnte, da der Marker hier signifikant mit einem höheren Grading und einer höheren Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten assoziiert ist (131). Das Kollektiv der vorliegenden Arbeit umfasste jedoch nur HER2 negative Fälle.

Auch therapeutisch scheint die Inhibition des ER-Stress-Pathways eine interessante Option zu sein (131, 132). Hierzu gibt es bereits einige Studien (132, 134-136).

4.2.9 PDL-1

Programmed death-ligand-1 (PDL1) wird unter anderem in Tumorzellen, T-Zellen, Natural Killer-Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert (137). Es ist ein glykosyliertes Transmembranprotein, welches als Ligand des Rezeptors PD-1 fungiert (137). Eine Bindung zwischen beiden Proteinen hemmt die Immunantwort unter anderem durch Anstoßen der Genexpression von Interleukin-10 in Monozyten (138). Dieser Mechanismus ist die Grundlage der Immunevasion vieler Tumoren (137). Eine starke Expression von PDL-1 steht hierbei in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose bei soliden Tumoren (137, 139-144). Fehlende Expression von PDL-1 dagegen ist mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen wie etwa Lupus erythematosus assoziiert (137, 145).

Obwohl in den letzten Jahren eine zunehmende Anzahl an Studien präsentiert wurden, die sich des Themas auf unterschiedliche Weise annahmen, ist die Rolle des PD-1/PDL-1 Pathways bei Brustkrebs noch nicht hinreichend geklärt. Nach Muenst et al (2013) besteht eine negative Korrelation zwischen einer hohen PDL-1 Expression und der Gesamtüberlebensrate bei verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms (146). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Bapista et al. (2016), die von einer PDL-1 Expression in etwa der Hälfte ihres Brustkrebskollektives berichteten und eine Korrelation mit einer höheren Gesamtüberlebensrate fanden (147). Beim triple negativen Brustkrebs liegt die PDL-1-Expression nach Beckers et al. (2016) bei bis zu 93% und ist mit einem geringeren brustkrebspezifischen Sterberisiko assoziiert, sowie bei stromaler Expression mit einem geringen Gesamtsterberisiko (148). Davon abweichende Zahlen ergeben sich je nach Subtyp und Studie (149, 150, 151). Sabatier et al. (2015) untersuchten die PDL-1 mRNA-Expression retrospektiv an nahezu 5500 Mammakarzinomen (152). Sie fanden in 20% aller klinischen Fälle eine im Vergleich zur Expression in tumorfreiem Brustdrüsengewebe erhöhte Expression, beim basalen Typ des Mammakarzinoms sogar in 38% der Fälle (152).

Eine hohe Expression war hierbei nach Sabatier et al. (2015) mit schlechten Prognose-Markern (u.a. hohes Grading, Hormonrezeptornegativität, hohe Proliferation, Tumorgroße, Subtyp) assoziiert und ging mit einer starken lokalen zytotoxischen Immunantwort einher (152). Für Mammakarzinomen vom basalen Typ fanden sie eine Korrelation der gesteigerten PDL-1 Expression sowohl mit dem Gesamtüberleben als auch mit der Metastasenfreiheit, nicht jedoch für das Gesamtkollektiv. Zusätzlich scheint eine hohe PDL-Expression beim basal-lichen Mammakarzinom für ein gutes Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie zu stehen (152). In der Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die Vorgänge des PD1/PDL-1 Pathways beim Mammakarzinom hochkomplex und vor allem noch nicht ausreichend verstanden sind. Nach Li et al. (2016) geht ein Teil der Unterschiede anzunehmender Weise jedoch auf Differenzen in den gewählten Methoden und deren Ausführung zurück (149). Wie in den meisten Studien wurde auch in der vorliegenden Arbeit mit Tissue-Micro-Arrays gearbeitet. Es folgte die Immunhistochemische-Analyse und vergleichende Statistik mit dem Recurrence-Score[®]. Abbildungen 49 und 50 geben Einblick in die Auswertung der immunhistochemischen Färbung von PDL-1. Ab 1 % der Fläche des Tumorgewebes wurde der Marker als positiv gewertet. Fälle mit 5% bzw. 10% entsprechen sehr hohen Werten und wurden als Überexpression gewertet.

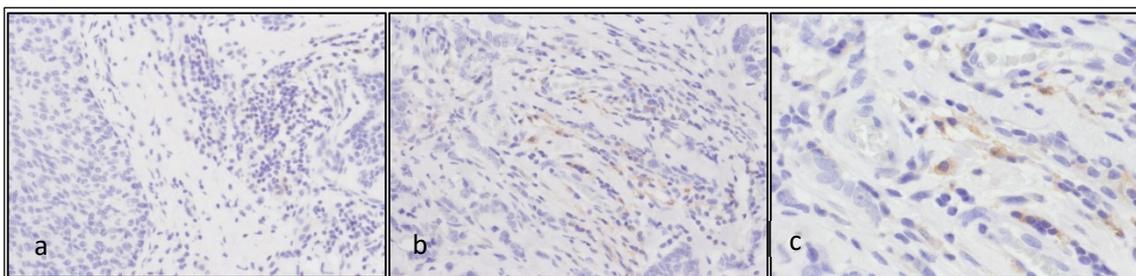


Abb. 49 Immunhistochemische Färbungen von PDL-1. Differenzierung zwischen negativem Status und normaler Expression. Ab 1% der Fläche wurde der Marker als positiv gewertet.
a negativ b positiv c Ausschnitts-Vergrößerung von b

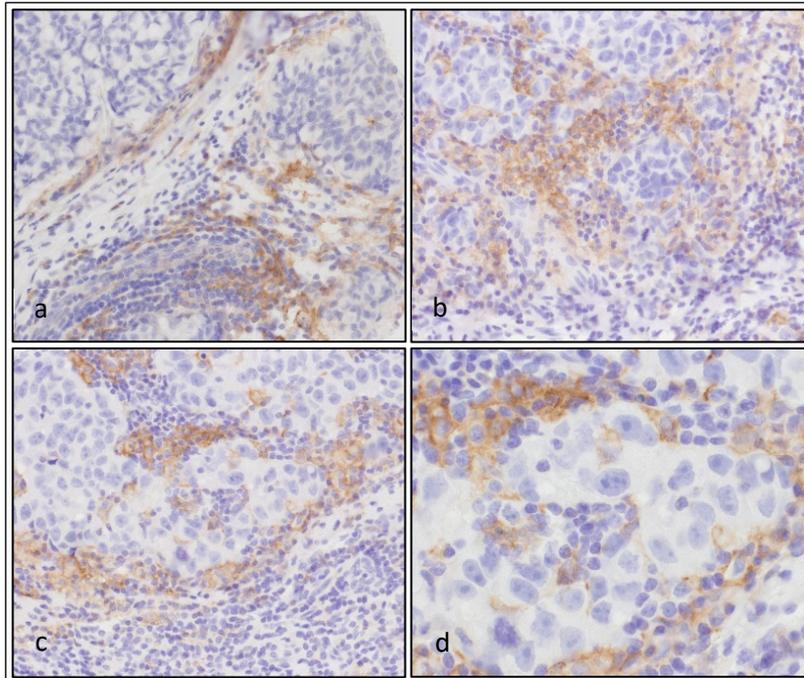


Abb. 50 Beispiele (a-d) für starke positive immunhistochemische Färbungen von PDL-1 einer Überexpression entsprechend. d stellt eine Ausschnittsvergrößerung von c dar.

Es zeigte sich, dass die Gruppe mit der intermediären PDL-1 Expression, den höchsten Median in Bezug auf den Wert des Recurrence-Scores[©] hat (s. 3.1.1.8). Statistisch ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zu den Gruppen starker und fehlender oder geringer Expression.

Bei Betrachtung des Recurrence-Scores[©] in zusammengefassten Risikogruppen, dagegen ändert sich dies. Sowohl für die klassischen R-Gruppen (p-value =0.01087) als auch in der Variante mit vier Risikogruppen (p-value =0,02392) wurde das Signifikanzniveau erreicht und damit ein Zusammenhang mittlerer Stärke nachgewiesen. Besonders hervorzuheben ist, dass durch das Zusammenfassen der Gruppen mit geringer und starker PDL-1 Expression zu einem Cluster der Unterschied zur Gruppe mit intermediärer Expression hochsignifikant (p-value =0.007244) wurde. PDL-1 kommt damit als Marker für ein immunhistochemisches Panel, welches sich mit dem Recurrence-Score[©] vergleicht, durchaus in Frage.

Wichtig bleibt jedoch sich der Limitation der Aussagekraft bewusst zu bleiben. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich hormonrezeptorpositive Mammakarzinome

in einem frühen Stadium, mit Her2/neu-Negativität und günstigem Lymphknotenstatus betrachtet. Die Diversität der oben aufgeführten Studienergebnisse ermahnt zur genauen Betrachtung des situativen Hintergrundes, sowohl des klinischen als auch des histopathologischen.

Es sollte nicht unerwähnt bleiben, dass die PDL-1-Expression bereits erfolgreich als Marker eingesetzt wird, wenn auch in einem anderen Kontext. Immun-Checkpoint-Inhibitoren haben sich innerhalb der letzten Jahre zu einer schnell etablierten Therapieform onkologischer Erkrankungen entwickelt. Ausgehend von den Arbeiten James Patrick Allison und Tasuku Honjo (153, 154), welche 2018 hierfür den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielten, entstanden im Verlauf erste Therapiekonzepte mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren, die zunächst beim multiplen Melanom Anwendung fanden (155). Heute umfasst ihr Anwendungsgebiet viele solide Tumoren (156, 157, 158) und auch zur Therapie des Mammakarzinoms gibt es bereits klinische Studien (159). Die Bestimmung der PDL-1 Expression dient der Vorhersage eines Ansprechens auf die Immuntherapie mittels Antikörper, welche an PD-1 binden und so die Aktivierung des Pathways und damit die Immunsuppression verhindern (160). Eine hohe PDL-1 Expression spricht hierbei für ein positives Therapieansprechen (160). In diesem Zusammenhang soll auch noch einmal auf die Beobachtung von Sabatier et al. verwiesen werden, welche bei einer hohen PDL-1 Expression ein gutes Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie des basalen Mammakarzinoms gesehen haben (152). Es lässt sich somit festhalten, dass Potential im Einsatz von PDL-1 als Marker steckt.

4.3 Ki 67%

Ki 67% ist ein Proliferationsindex, welcher bei verschiedenen onkologischen Erkrankungen, darunter auch beim Mamma-Ca, in der histopathologischen Diagnostik zur Risikostratifizierung eingesetzt wird (161). Die Basis des Index ist eine immunhistochemische Anfärbung der Tumorprobe mittels eines Antikörpers gegen ein nukleäres Protein, welches kein Histonprotein darstellt (162). Hierdurch können Zellen identifiziert werden, welche sich außerhalb der G₀-Phase befinden und somit einer der proliferativen Phasen (G₁,S,G₂ oder M-Phase) angehören (161, 162). Deren prozentualer

Anteil an der Gesamtzellzahl ergibt den Proliferationsindex Ki67. Ein Kritikpunkt an Ki-67 als Prognosemarker ist, dass es bislang keine einheitlichen Grenzwerte in der Anwendung beim Mamma-Ca gab und in Studien Werte zwischen 1-30% herangezogen wurden (23, 26). Nach einer offenen Empfehlung der S3-Leitliniengruppe von Februar 2020, welche sich auf die Metaanalyse von Petrelli et al. (163) stützt, kann bei einer Ki-67-Positivität $\geq 25\%$ des Mammakarzinoms von einem erhöhten Risiko ausgegangen werden (23). Bei einem Ki-67-Wert $\leq 10\%$ liegt beim Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen Mammakarzinom nach der aktuellen Leitlinie in der Regel ein niedriges Risiko vor (23). Dieser Wert wurde in der vorliegenden Arbeit als Cut-off für die, entsprechend der statistischen Analyse, obligatorische Einteilung in positiv und negativ herangezogen.

Im Vergleich der Mediane des Recurrence-Scores[©] zwischen diesen beiden Gruppen zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied (p-value = 0.00431) mit einem höheren Recurrence-Score[©] in der Ki67% positiven Gruppe. Dieses Ergebnis entspricht dem Konsens der Literatur zu Ki67% und dem Oncotype DX[©], dass eine starke Korrelation zwischen den beiden Parametern besteht (161, 164, 165). Signifikant war der Zusammenhang auch bei Clusterung des Recurrence-Scores[©] in Risikogruppen (siehe Kapitel 3.3.1). Eine Ausnahme bildet hierbei das Kollektiv der Patientinnen bis einschließlich des 50 Lebensjahres. Dies wird in Kapitel 4.4 noch aufgegriffen werden.

Ki67% präsentiert sich damit als solider Kandidat für ein Panel mit prädiktivem Wert für den Recurrence-Score[©]. Nach Sahebjam, S., et al. (2011) bestimmt dieser Proliferationsindex zu einem wesentlichen Teil die Höhe des den Recurrence-Scores[©], kann diesen aber nicht allein vorhersagen (161). Allison et al. (2012) schlugen auf Basis des Ki67%-Index und weiterer histopathologischer Routineparameter einen Algorithmus zur Anwendung des Oncotype DX[©] vor (166). Danach kann beim Hormonrezeptor positivem, HER2/neu negativem Mamma-Karzinom mit niedrigem Grading, ohne Lymphknoteninvasion und einem Ki67%-Wert $\leq 10\%$ von einem als niedrig zu erwartetem Recurrence-Score[©] ausgegangen werden (166). Umgekehrt spricht das Vorliegen eines Progesteronrezeptor und Her2/neu negativen, Östrogenrezeptor positiven, Karzinoms mit hohem Grading (Grad 3), negativer Lymphknoteninvasion und einem Proliferationsindex $>10\%$ für das Auftreten eines hohen Recurrence-Scores[©] (166). In beiden Fällen schlagen Allison et al. vor eine Oncotype DX[©]-Testung entfallen

zu lassen, nicht jedoch bei davon abweichenden histopathologischen und klinischen Eigenschaften des Tumors (166). Ähnliches zeigt sich auch bei dem von Cuzick et al. (2011) entwickelten Score, dem ebenfalls der Ki67%-Proliferationsindex und klinische sowie histopathologische Routinemarkers zugrunde liegen (167).

4.4 Unterschiede in den Altersklassen

Bezüglich des Recurrence-Scores und dem Alter bei Diagnosestellung gibt es nur wenige aktuelle Studien, die sich des Zusammenhanges annehmen. Zudem kommen die Autoren zu sehr unterschiedlichen Schlüssen. Paik et al. (2004) stellten für ihr Kollektiv (Östrogenrezeptor positiv, Lymphknoten negativ) fest, dass der Recurrence Score unabhängig vom Alter der Patientinnen und der Tumorgröße war (43). Swain et al. (2015) dagegen sahen bei östrogenrezeptorpositive Brustkrebspatientinnen einen höheren Anteil an unter 40 Jahre alten Patientinnen in der „high-risk“ Recurrence-Gruppe im Vergleich mit Patientinnen die älter als 70 Jahre waren (168). Einschränkend sei hier jedoch erwähnt, dass sowohl Swain et al. als auch Paik et al. andere Grenzwerte des Recurrence-Scores®, entsprechend low <18, intermediate 18-30 und high-risk >30, für die Einteilung in die Risikogruppen genutzt haben als die in der vorliegenden Arbeit gewählten (s. Kapitel 1.2.2). Anders als in den oben zitierten Arbeiten konnte hier ein positiver Trend zu einem höheren Recurrence-Score© mit zunehmendem Alter bei Diagnosestellung gefunden werden. Hierauf wird in Kapitel 4.5 noch eingegangen werden.

Von Interesse war fernerhin auch ob es Unterschiede in den Altersklassen beim Vergleich der potenziellen Marker mit dem Recurrence-Score© gab. Dies kann nicht grundsätzlich verneint werden. Zum einen gab es Unterschiede in der Signifikanz von Zusammenhängen zwischen Markern und Recurrence-Score für die Alterssubgruppen, zum anderen konnten auch geringe Unterschiede in der Anzahl der jeweils positiven Fälle gefunden werden. Die Relevanz dieser Beobachtungen darf jedoch in Frage gestellt werden. So sei zunächst einmal darauf hingewiesen, dass es im Gesamtkollektiv nur eine relativ geringe Anzahl an „high-risk“-Fällen gab. Nach der Alterssubgruppen-Differenzierung fanden sich diese alle im Kollektiv der über 50-jährigen Patientinnen wieder. Es konnte gehäuft beobachtet werden, dass ein für das Gesamtkollektiv

signifikanter Zusammenhang zwischen einem Marker und dem Recurrence-Score[©] nur in der Subgruppe der über 50-jährigen Patientinnen wieder zu finden war, nicht jedoch in der niedrigeren Altersklasse (u.a. für Cyclin D1, MDM2, PDL 1, siehe Tabelle A3-5 und A7-9 im Anhang, Kapitel IV). Es ist naheliegend dies auf die ungleiche Verteilung der „high-risk“ Fälle zurückzuführen. Der Großteil der Patientinnen ≤ 50 Jahre konnte nach dem Ocotype DX[©] Ergebnis der niedrigsten Risikogruppe zugeordnet werden. Tabelle 11 zeigt Häufigkeits-Verteilung in den Altersgruppen.

Tabelle 11 Häufigkeits-Verteilung der Risikogruppen nach Alterskollektiv
(nicht homogen: χ^2 -p-value = 0,2529; χ^2 : 4,0803, df:3; fisher-p-value= 0,30)

Recurrence	≤ 50 Jahre	>50 Jahre
≤ 10	17	17
11-15	9	11
16-25	7	15
≥ 26	0	3
gesamt	33	46

Interessant für die genauere Betrachtung dieses Alterskollektivs sind jedoch die Fälle der intermediären Risikogruppe. Nach Sparano et al. (2018) besteht für die intermediäre Risiko-Gruppe bei den Patientinnen ≤ 50 Jahre im Vergleich zu älteren Patientinnen ein erhöhtes Rezidiv-Risiko, wenn der Recurrence Score[©] ≥ 16 liegt (41). Es konnte kein Marker gefunden werden, der innerhalb dieser Gruppe überproportional häufig positiv ausfiel. Für weiterführende Analysen in Bezug auf diese Fragestellung wäre eine Erweiterung des Kollektivs wünschenswert.

4.5 Recurrence-Score©, Alter und Ki 67%

Somit war die Clusterung nach Altersgruppen bezogen auf den Recurrence-Score© und die Testmarker in der vorliegenden Arbeit nur bedingt aussagekräftig. Anders verhält es sich für die bereits vorliegenden Daten des Kollektivs zu Alter bei Diagnosestellung und Ki 67%. Aufgrund des höheren Skalenniveaus dieser Daten erfolgte eine Rangkorrelation nach Spearman. Hierfür wurde für den Recurrence-Score© das Intervallskalenniveau angenommen (siehe Kapitel 2.5.1). In der Korrelation mit dem prozentualen Ki 67%-Anteil zeigte sich ein hochsignifikanter positiver Zusammenhang, mittlerer Stärke (p-value: 4.874e-05; Rangkorrelationskoeffizient: 0.4625881). Der Recurrence-Score© Wert steigt demnach mit dem Marker Ki 67%. Dieses Ergebnis entspricht dem Konsens, zu einer positiven Korrelation zwischen den beiden Parametern, in der entsprechenden Literatur (161, 165, 166). Für das Alter bei Diagnosemitteilung konnte ebenfalls ein signifikanter, positiver Zusammenhang in der Rangkorrelation mit dem Recurrence-Score© gefunden werden (p-value: 0.01693). Dieser war jedoch nur von schwacher Korrelationsstärke (Rangkorrelationskoeffizient: 0.2680302). Bereits in der Vorstudie (50) der vorliegenden Arbeit, auf deren Kollektiv das aktuelle aufbaut, wurde die Tendenz gesehen, dass je höher die Risikogruppe war desto höher auch der Median des Alters bei Diagnosestellung lag. Vergleichbares wurde in der aktuellen Literatur nicht gefunden.

Um einen möglichen Confounder Effekt zu ermitteln erfolgte zusätzlich auch eine Korrelation der beiden Parameter, Ki 67% und Alter bei Diagnosestellung, gegeneinander. Diese Korrelation war nicht signifikant (p-value: 0,6953; Rangkorrelationskoeffizient: 0,04729137). Damit ist es unwahrscheinlich, dass diese beiden Parameter im vorliegenden Fall abhängig voneinander sind, jedoch nicht ausgeschlossen. Onkologische Vorgänge sind hochkomplex und im Detail nur schwer nachzuvollziehen. Aufgrund der Vielzahl beteiligter Parameter können nicht alle gleichzeitig Beachtung finden. Daher besteht immer die Gefahr eines Confounder-Effektes. Für die Korrelation des Recurrence-Scores mit dem Alter bei Diagnosestellung ist diese als hoch einzuschätzen, gerade auch wegen der Inkonstanz zu diesem Thema in der Literatur.

4.6 Paaranalyse immunohistochemischer Marker

Neben dem Bezug der einzelnen Marker zum Recurrence-Score® interessierte auch ob es einen Zusammenhang zwischen einzelnen Marker untereinander gibt. Dieser Fragestellung wurde mit der Paaranalyse Rechnung getragen, in welcher sich wesentliche Ergebnisse der Recurrence-Score® Analyse (s. Kapitel 4.1.2 - 4.1.9) widerspiegeln.

Die statistische Auswertung der Markerpaare erfolgte wiederum mittels X^2 - bzw. Fisher-Test sowie Cramer V. Hochsignifikant zeigten sich AMACR-BCL2 ($p = 0,004948$), AMACR-MDM2 ($p = 0,002053$) und CDK4-p53 ($p = 0,009173$). Hierbei ging eine niedrige Ausprägung von AMACR mit einer hohen Intensität von BCL2 einher, sowie eine hohe Ausprägung von AMACR mit einer ebenfalls hohen Intensität von MDM2.

AMACR kann als Marker für ein hohes Risiko (84, 86) angesehen werden (s. 4.1.2) und BCL2 steht beim Mamma-Ca tendenziell für eine eher gute Prognose (87). Es besteht im Bezug auf das Mamma-Ca. somit ein negativer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern, für AMACR und MDM2 dagegen ein positiver, entsprechend des ebenfalls erhöhten Risikos beim Mamma-Ca mit steigender Expression von MDM2 in der entsprechenden Splicevariante (113) (s. Kapitel 4.2.6).

Für CDK4 und p53 zeigte sich in Konkordanz zur Recurrence-Score®-Analyse eine hohe Übereinstimmung der jeweils negativen Fälle.

Weitere signifikante Markerpaare mit positivem Zusammenhang stellen AMACR-GLUT1 ($p = 0,02113$), CDK4-PDL1 ($p = 0,02837$), GLUT1-PDL1 ($p = 0,04359$) und CDK4(d)-p53 ($p = 0,0163$) dar. Dies ist besonders interessant, da für GLUT1 und CDK4 in der Recurrence-Analyse zwar eine Tendenz für einen Anstieg mit dem Recurrence-Score® gesehen, das 5%-Signifikanz-Niveau jedoch nicht ganz erreicht wurde. Der signifikant positive Zusammenhang mit einem starken Marker untermauert hier ihre Bedeutung als potenzielle prädiktive Marker.

Auch in der Paaranalyse mit dem ergänzenden Marker Ki 67% ergaben sich positive Zusammenhänge, etwa für CDK4 - Ki 67% ($p = 0,04245$) und CDK4 (d) - Ki 67% ($p = 0,02675$), die sehr gut ins Gesamtbild passen, sowie etwas überraschend der ebenfalls signifikante Zusammenhang zwischen pERK (d)-Ki 67% ($p = 0,03365$). Für pERK

konnte in der Recurrence-Analyse der vorliegenden Arbeit kein direkter Zusammenhang gefunden werden. Die positive Korrelation mit Ki 67% lässt jedoch vermuten, dass pERK durchaus relevant sein könnte.

In der Paaranalyse konnte noch weitere Zusammenhänge zwischen Markern gesehen werden, die konkordant zur Recurrence-Analyse waren jedoch nur das 10% Niveau erreichten (s. 3.2).

Eine Übersicht der gefundenen Muster in der Paaranalyse gibt die nachfolgende Tabelle 12:

Tabelle 12 Marker mit statistisch relevantem Zusammenhang, (d)= dichotom, () = nur innerhalb des 10%-Signifikanzniveaus, + = positive Korrelation, - = negative Korrelation

	AMACR	CDK 4/ (d)	GLUT1	Cyclin D1	Ki 67 %
BCL2	-			(-)	
MDM2	+		(+)		
GLUT 1	+				
CDK 4				(+)	+
PDL-1		+	+	(-)	(+)
P53		+			
pERK (d)					+

Da die gefundenen Markerpaarungen in Konkordanz zum Recurrence-Score stehen erlauben sie eine vorsichtige Interpretation in Hinblick auf die Ableitung einer Risikogruppe. So könnte beispielsweise das Vorliegen einer hohen BCL2-Expression bei gleichzeitig niedriger AMACR-Intensität als Hinweis auf eine niedrige Recurrence-Risiko-Gruppen-Zugehörigkeit verstanden werden. Ebenso könnte eine gleichermaßen hohe Expression von AMACR und MDM2 auf ein erhöhtes Risiko hinweisen. Gleiches lässt sich für die weiteren oben genannten Marker-Paare durchspielen. Die Betrachtung mehrerer Markerkombinationen erhöht hier die Trefferwahrscheinlichkeit. Hieraus könnten sich, nach Validierung der Daten, Muster mit prädiktivem Wert für den Recurrence-Score® ableiten lassen. Nicht zu vergessen, bleibt jedoch, dass für eine solche Interpretation zunächst ein signifikanter Zusammenhang des individuellen Markes

mit dem Recurrence-Score® grundlegend ist. Die konkordante Korrelation der Marker untereinander unterstreicht hier nur den Zusammenhang.

Damit bietet sich ein interessanter Ansatz zur Risiko-Einordnung eines Mamma-Carcinoms nach immunhistochemischer Diagnostik. Es ist jedoch eine Validation an einem größeren Patientenkollektiv notwendig bevor hieraus Schlüsse gezogen werden können, denen therapeutische Konsequenzen folgen.

4.7 Limitationen der Arbeit und Ausblick

Durch die vorliegende Arbeit ergeben sich neue Perspektiven zur Risikostratifizierung des Mamma-Carcinoms. Multigentests wie der hier zum Vergleich herangezogene Oncotype DX® haben einen hohen Stellenwert in diesem Bereich und sind wissenschaftlich wie auch klinisch validierte Tools, welche in zunehmendem Maße Einfluss auf die Therapiefindung nehmen.

Ihr Einsatz soll durch den Ansatz der hier vorliegenden Arbeit nicht in Frage gestellt werden. Es bleiben jedoch hohe Kosten sowie relevante logistische wie technische Herausforderung, die ihren Anwendungsbereich beschränken (siehe Kapitel 1.2.1), wohingegen die Immunhistochemie ein einfaches, verhältnismäßig kostengünstiges und flächendeckend etabliertes Verfahren darstellt.

Damit steht eine immunhistochemische Risikostratifizierung nicht in direkter Konkurrenz zu Multigentests. Vielmehr kann durch ihren Einsatz ein breiteres Feld an Patientinnen abgedeckt werden, welche sonst keinen Zugang zu einer Risikostratifizierung haben. Denkbar ist diese erweiterte immunhistochemische Diagnostik auch als Vorstufe mit Indikationsprüfung zur Anwendung von Multigentests.

Bevor ein solches Procedere jedoch klinisch umgesetzt werden kann, bedarf es zunächst einer methodischen Ausarbeitung der immunhistochemischen Risikostratifizierung. Die vorliegende Arbeit bildet die Basis dafür, sie unterliegt jedoch einigen Limitationen, welche nachfolgende Studien erforderlich erscheinen lassen.

Das Patientenkollektiv bestand aus 79 Fällen, welche entsprechend der unter 2.4 vorgestellten Methodik unterschiedlich in Risikogruppen eingeteilt wurden. Nach Anwendung der derzeit propagierten Recurrence-Gruppen (41) lag der Großteil der Fälle im niedrigen (34 Fälle) und mittleren (42 Fälle) Risikobereich. Auf das Gesamtkollektiv kamen nur drei Fälle, welche in die höchste Risikogruppe fielen. Dennoch konnten eindeutige statistische Zusammenhänge gesehen werden, welche unter 4.1-4.6 vorgestellt wurden. Eine Validation der Ergebnisse anhand eines größeren Patientenkollektivs, welches erwartungsgemäß auch mehr sogenannte „high risk“-Fälle einschließt stellt eine logische Konsequenz dar. Daten aus einer solchen Folgestudie könnten anschließend zur Entwicklung eines immunhistochemischen Risiko-Scores genutzt werden, vergleichbar mit dem Recurrence-Score® des Oncotype DX®.

Die Einteilung des Patientenkollektivs der vorliegenden Arbeit in eine Entwicklungs- und eine Kontrollgruppe zur Erarbeitung eines solchen Scores wurde diskutiert, aufgrund der Fallzahlen jedoch verworfen. Der Focus lag somit auf der Ermittlung grundlegender Zusammenhänge zwischen immunhistochemischen Markern und dem Recurrence-Score®.

Die Möglichkeit einen Score aus der Kombination klinischer und histopathologischer Marker beim Mamma-Carcinom abzuleiten mit welchem ein Vergleich zum Recurrence-Score® durchführbar ist, haben bereits Cuzick et al. 2011 aufgezeigt (167). Sie bezogen neben dem Hormonrezeptorstatus noch Ki-67 und den Her2/neu Status mit ein und erreichten damit bereits beachtenswerte Resultate. Durch eine Erweiterung des immunhistochemischen Panels um die in der vorliegenden Arbeit als prädiktiv relevant herausgearbeiteten Marker könnte ein immunhistochemisches Tool entstehen, welches sich mit dem Recurrence-Score® messen kann.

Als relevante Marker in diesem Sinne sind zum einen AMACR, Cyclin D1, p53, MDM2 und PDL1 wegen ihres klar statistisch signifikanten Zusammenhanges zum Recurrence-Score® aufzuführen. Dies gilt auch für CDK4, wenn gleich hier die Signifikanz nur bei Auswertung als dichotomer Parameter erreicht wurde. Ein Merkmal, welches bei Aufstellung eines Scores Berücksichtigung finden sollte, sofern es sich nicht mit Zunahme der Stichprobengröße nivelliert.

Darüber hinaus sollten die Marker p27, Bcl2 und Glut 1 aufgrund des Erreichens eines niedrigeren Signifikanzniveaus bei entsprechend vielversprechender Datenlage in der Literatur bzw. aufgrund ihrer Signifikanz in der Markerpaaranalyse (Bcl2, Glut 1) auf die Aufnahme in einen immunhistochemischen Score beim Mamma-Ca hin geprüft werden.

Um wie oben erläutert ein möglichst breites Patientinnenkollektiv durch die Risikostratifizierung mit einem immunhistochemischen Score erreichen zu können, sollte auch die Anwendung auf Her2/neu positive und Hormonrezeptor negative Fälle geprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit bestand das Kollektiv nur aus Fällen Hormonrezeptor positiver, Her2/neu negativer Mamma-Frühkarzinome mit niedrigem Grading und niedrigem Lymphknotenstatus. Diese Einschlusskriterien ergaben Sinn, da sie auch den wesentlichen Kriterien zur Indikationsstellung für den Oncotype DX® entsprechen. So ist die Fragstellung an diesen Test letztendlich, ob eine Chemotherapie im mittleren Risikobereich (nach klinisch-pathologischen Kriterien) empfohlen werden soll. Bei niedrigem Risiko und positivem Ansprechen auf antihormonelle Therapie erscheint der Oncotype® aufgrund fehlender Therapieindikation ebenso entbehrlich (167), wie bei Tripel-negativen-Karzinomen, welche, außer bei infauster Prognose, nahezu immer mit einer chemotherapeutischen Behandlung einhergehen (23).

Im Bereich der dazwischen liegenden Fälle wie beispielsweise ER+, aber PR- Fälle oder solchen mit positivem Her2/neu- aber negativem Hormonrezeptorstatus dagegen, erscheint eine Risikostratifizierung ebenfalls sinnvoll. So fanden Sughayer et al. 2020 heraus, dass ER+/PR- Mamma-Carcinome mit einem signifikant höheren Recurrence-Score® einher gehen (169). Bei fehlender Kostenübernahme durch die Kassen in einem solchen Fall (28, 36, 38), liegen auch hier Chancen für die Anwendung eines immunhistochemischen Risiko-Score, der dann folgerichtig an einem entsprechenden Fallkollektiv validiert werden muss.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass das Potential der Immunhistochemie im Bereich der onkologischen Risikostratifizierung trotz ihres Status als etablierte Standardmethode noch nicht voll ausgeschöpft ist. Mit dem Einzug der modernen Molekulargenetik in die klinische Routinediagnostik kam eine Euphorie auf, die mit dem

Impuls zu ihrer ubiquitären Anwendung einher ging. Gerade im onkologischen Bereich wurden hier bemerkenswerte Durchbrüche erzielt. Das betrifft insbesondere die Entwicklung neuer Therapieformen wie zum Beispiel die Immuncheck-Point-Inhibition beim malignen Melanom (153-155), aber auch den Bereich der Risikostratifizierung durch Multigentests (23). Ein Verharren auf ewig gestrigen Methoden liegt offenkundig nicht im medizinischen Interesse. Ein ergänzendes „back to the roots“ hingegen trägt zum erweiterten Erkenntnisgewinn bei.

Moderne Medizin braucht beides, sowohl die molekulargenetische Spitzendiagnostik als auch solide und flächig verfügbare Routinemethoden wie die Immunhistochemie, um den bestmöglichen Stand der Versorgung zu erreichen und zu halten. Die vorliegende Arbeit versteht sich hier als ein wesentliches Element der Schnittstellenarbeit zwischen beiden Bereichen.

5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt in den Industrienationen einschließlich Deutschland die häufigste maligne Erkrankung der Frau dar (1). Nach aktuellem medizinischen Wissenstand ist bei der Diagnose Brustkrebs nicht automatisch eine Chemotherapie indiziert. Zur Entscheidungshilfe in der Therapiefindung haben sich neben den klinischen und histopathologischen Kriterien in den letzten Jahren vorrangig Multigentests etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem Oncotyp DX® sowie immunhistochemischen Markern aus der Tumorbiologie untersucht. Die Analyse erfolgte an 78 Fällen von Patientinnen des Leopoldina Krankenhauses Schweinfurt und des Klinikums Würzburg Mitte mit einem hormonrezeptorpositiven, Her2/neu negativen Mammafrühkarzinom und niedrigem Lymphknotenstatus. Für insgesamt 18 interessante immunhistochemische Marker wurden Färbung an Microtissue-Arrays der Tumorproben durchgeführt und anschließend standardisiert ausgewertet. Für die Marker AMACR, Cyclin D1, p53, MDM2 und PDL1 ergab sich eine klare statistisch signifikante Korrelation zum Recurrence-Score® des Oncotyp DX®. Dies gilt mit Einschränkungen auch für CDK4. Die Marker p27, Bcl2 und Glut 1 erreichten ein etwas niedrigeres Signifikanzniveau in der statistischen Analyse. Der aus der Routinediagnostik bereits vorliegender Marker Ki67% wurde in die Analyse mit aufgenommen und zeigte eine hochsignifikante Korrelation mit dem Recurrence-Score® sowohl im X^2 -Test bzw. Fisher-Test als auch in der Rangkorrelation nach Spearman. Zusätzliche erfolgte eine Korrelationsanalyse interessanter Markerpaare miteinander. Hierbei zeigten sich hochsignifikante Korrelationen zwischen AMACR-BCL2 (negativ), AMACR-MDM2 (positiv) und CDK4-p53 (positiv), sowie noch weitere signifikante positive Markerpaarkorrelationen. Es konnte zudem ein Trend zu einem höheren Recurrence-Score® mit zunehmendem Alter bei Diagnosestellung gefunden werden.

Durch die vorliegende Arbeit ergeben sich neue Perspektiven zur Risikostratifizierung des Mamma-Carcinoms. Die hier vorgestellten immunhistochemischen Marker mit signifikanter Korrelation zum Recurrence-Score®, sowie die interessanten Markerpaarkorrelationen unterstützen die konsekutive Entwicklung eines immunhistochemischen Scores mit prädiktivem Wert für den Recurrence-Score®, welcher klinisch Anwendung als Prätest oder als eigenständiges Stratifizierungstool bei Brustkrebs finden könnte.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Barnes B et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Robert Koch-Institut. Doi: 10.17886/rkipubl-2016-014
- 2 Rhiem K, Schmutzler R K. Risikofaktoren und Prävention des Mammakarzinoms. *Onkologe*. 2015; 21, S. 202–210. doi:10.1007/s00761-014-2837-5
- 3 Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft. Brustkrebs. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs-definition-und-haeufigkeit.html> (Stand: 20.03.21 11.45 Uhr)
- 4 Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung Nr. N 010 vom 3. Februar 2021 https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html (Stand 20.03.21, 12.39 Uhr)
- 5 Fackenthal JD Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12): 937-948.
- 6 Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 48, 232–242
- 7 Jolie A. My Medical Choice. *New York Times*. Section A 2013 May 14: 25
- 8 Misslbeck A. Der Jolie-Effekt- *Ärztezeitung- Springer Medizin* 2015 Aug 21:4
- 9 Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005; 9(1): 208-221.
- 10 Lee A et al. BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. *Genet Med* 2019 21(8): 1708-1718.
- 11 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2012;13:1141–1151.
- 12 Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V. Million Women Study Collaborators. Comparison of the effects of genetic and environmental risk factors on in situ and invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer*. 2012; 131:930–937.
- 13 Hunter DJ et al. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:2496–2502.
- 14 Beral V, Reeves G, Bull D, Green J, Million Women Study Collaborators. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:296–305.
- 15 Nelson HD, Zakher B, Cantor A, et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2012;156:635–648.
- 16 Heng YJ et al. The Association of Modifiable Breast Cancer Risk Factors and Somatic Genomic Alterations in Breast Tumors: The Cancer Genome Atlas Network. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2020 29(3): 599-605.
- 17 Sinn H, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. In: *Breast Care*. 2013 8 (2), doi: 10.1159/000350774.
- 18 Salgado R et al. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Breast Tumours*. WHO Classification of Tumours. World Health Organization 2019; 5th Edition, Volume 2. ISBN: 978-92-8324500-1

- 19 Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol.* 2012; 23 Suppl 10: x207-210.
- 20 Ellis IO et al. Invasive breast carcinoma Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IaRC Press Lyon* 2003; pp. 9-110
- 21 Fitzgibbons PL, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):966-78
- 22 Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene.* 2000;19(53):6102-14)
- 23 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020, AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (Stand 24.07.2020; 12.11 Uhr)
- 24 Goldhirsch A et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009 *ann Oncol* 2009;20 pp. 1319-1329
- 25 Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5993 breast cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(1):21-7.
- 26 Harris LN et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women with Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol.* 2016;34(10): p. 1134-50.
- 27 Brierley JD (Editor), Gospodarowicz MK (Editor), Wittekind C (Editor). *TNM Classification of Malignant Tumours.* 8th Edition Oxford:Wiley-Blackwell; 2016 ISBN: 978-1-119-26357-9
- 28 Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/operation.php> (Stand 21.03.21; 2.40 Uhr)
- 29 't Veer LJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415(6871):530-6.
- 30 Goldhirsch A et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol,* 2011; 22(8): p. 1736-47.
- 31 Koppelmans, V et al. Neuropsychological performance in survivors of breast cancer more than 20 years after adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2012; 30(10): p. 1080-6.
- 32 Lange M et al. Decline in Cognitive Function in Older Adults with Early-Stage Breast Cancer After Adjuvant Treatment. *Oncologist.* 2016 Nov; 21(11): 1337–1348.
- 33 Shapiro CL, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med,* 2001; 344(26): p. 1997-2008.
- 34 Tao JJ, Visvanathan K, Wolff AC. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast,* 2015; 24 Suppl 2: p. 149-53.

- 35 Mayer EL. Early and late long-term effects of adjuvant chemotherapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013;9-14. doi: 10.14694/EdBook_AM.2013.33.9.
- 36 Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft
<https://www.krebsinformationsdienst.de/aktuelles/2020/news004-brustkrebstest-ontotype-dx-erstattung-krankenkasse.php> (Stand 21.03.21, 13.35 Uhr)
- 37 Gemeinsamer Bundesausschuss. Beschluss vom 20.06.2019 des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Richtlinie Methoden vertragsärztliche Versorgung: Biomarkerbasierte Tests zur Entscheidung für oder gegen eine adjuvante systemische Chemotherapie beim primären Mammakarzinom.
<https://www.g-ba.de/beschluesse/3809/> (Stand 21.03.2021, 13.47 Uhr)
- 38 Gemeinsamer Bundesausschuss. Beschluss vom 15.10.2020 des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Richtlinie Methoden vertragsärztliche Versorgung: Biomarkerbasierte Tests zur Entscheidung für oder gegen eine adjuvante systemische Chemotherapie beim primären Mammakarzinom.
<https://www.g-ba.de/beschluesse/4524> (Stand 21.03.2021, 13.50 Uhr)
- 39 Oncotype IQ®: www.oncotypeiq.com (Stand 21.03.2021, 16.35 Uhr)
- 40 Cronin M et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem*. 2007;53(6):1084-91
- 41 Sparano J. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Jul 12;379(2):111-121. doi: 10.1056/NEJMoa1804710.
- 42 Harbeck N, Gluz O, Nitz U. Predictive gene signatures. *Forum*. 2015;30(2):134-138
- 43 Paik S et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(23):3726-34
- 44 Nitz U. Reducing chemotherapy use in clinically high-risk, genomically low-risk pN0 and pN1 early breast cancer patients: five-year data from the prospective, randomised phase 3 West German Study Group (WSG) PlanB trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Oct;165(3):573-583. doi: 10.1007/s10549-017-4358-6.
- 45 Sparano J et al.: TAILORx. Clinical Outcomes in Early Breast Cancer With a High 21-Gene Recurrence Score of 26 to 100 Assigned to Adjuvant Chemotherapy Plus Endocrine Therapy A Secondary Analysis of the TAILORx Randomized Clinic *JAMA Oncol*. 2020 Mar 1;6(3):367-374. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.4794.
- 46 Dowsett M et al. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node- 82 positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1829-34.
- 47 Fehrenbacher L et al. NSABP B-47/NRG Oncology Phase III Randomized Trial Comparing Adjuvant Chemotherapy with or Without Trastuzumab in High-Risk Invasive Breast Cancer Negative for HER2 by FISH and With IHC 1+ or 2. *J Clin Oncol*. 2020 Feb 10; 38(5): 444–453. doi: 10.1200/JCO.19.01455
- 48 Goldstein LJ et al. Prognostic utility of the 21-gene assay in hormone receptor-positive operable breast cancer compared with classical clinicopathologic features. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4063-71. doi: 10.1200/JCO.2007.14.4501

- 49 Stemmer SM. Clinical outcomes in ER+ HER2 -node-positive breast cancer patients who were treated according to the Recurrence Score results: evidence from a large prospectively designed registry. *NPJ Breast Cancer*. 2017 Sep 8;3:33. doi: 10.1038/s41523-017-0034-6.
- 50 Frey LS. Retrospektive Analyse zur Bedeutung des 21-Gen-Tests (OncotypeDX®) für die Indikationsstellung zu einer adjuvanten Chemotherapie bei Hormonrezeptor-positivem, Her2/neu-negativem Mammakarzinom. (Dissertation, Medizin, Universität Würzburg) 2017; urn:nbn:de:bvb:20-opus-156908 <https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/frontdoor/index/index/docId/15690> (Stand 15.09.2021, 12.49 Uhr)
- 51 Cardoso F et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019 Aug 1;30(8):1194-1220. doi: 10.1093/annonc/mdz173
- 52 NCCN:https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf (Stand 21.03.2021, 18.00 Uhr)
- 53 IQWiG:<https://www.iqwig.de/en/press/press-releases/biomarker-tests-in-breast-cancer-new-study-data-indicate-advantage-for-certain-patients.10059.html> (Stand 21.03.2021, 18.05 Uhr)
- 54 Albain KS et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(1):55-65. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70314-6
- 55 Paik S et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26 doi: 10.1056/NEJMoa041588
- 56 Roberts MC, Miller DP, Shak S, Petkov V. Breast cancer-specific survival in patients with lymph node-positive hormone receptor-positive invasive breast cancer and Oncotype DX Recurrence Score results in the SEER database. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Jun;163(2):303-310. doi: 10.1007/s10549-017-4162-3
- 57 Mamounas EP et al. Association between the 21-gene recurrence score assay and risk of locoregional recurrence in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1677-83. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7610
- 58 Ethik-Kommission der Universität Würzburg, Vorsitzende Frau Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker, unterzeichnet Dr. med. Reinhard Wölfel Geschäftsführer der Ethik-Kommission. Unbedenklichkeitsbescheinigung – Projekt: Immunhisochemisches Markerprofil – Alternative zum OncotypeDX®-Test. Schreiben vom 17.04.2018 – Aktenzeichen 20180413 01.
- 59 Weiß C. Basiswissen Medizinische Statistik, 6. Auflage. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag;2013
- 60 Kollek R, Trojan, A. Prädiktive Medizin und individualisierte Medizin. Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (Stand: 4.11.2020, 17.28 Uhr) doi:10.17623/BZGA:224-i089-1.0
- 61 Strengers PFW, van Aken WG et al. Blut: Von der Magie zur Wissenschaft. Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag; 1996
- 62 Golder W. Hippokrates und das Corpus Hippocraticum - Eine Einführung für Philologen und Mediziner. Würzburg. Verlag Königshausen & Neumann; 2007

- 63 Kassenärztliche Bundesvereinigung. Kassen übernehmen Kosten für biomarkerbasierten Test bei Brustkrebs. https://www.kbv.de/html/1150_43614.php (Stand: 12.05.2021, 22.54 Uhr)
- 64 Simpkins SB et al. MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers *Hum Mol Genet.* 1999 Apr;8(4):661-6. doi: 10.1093/hmg/8.4.661
- 65 Steinke V. Erblischer Darmkrebs ohne Polyposis. *Dtsch Arztebl Int.* 2013; 110(3): 32-8; DOI: 10.3238/arztebl.2013.0032
- 66 Harkness EF et al. Lynch syndrome caused by MLH1 mutations is associated with an increased risk of breast cancer: a cohort study. *J Med Genet.* 2015 Aug;52(8):553-6. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103216
- 67 Roberts ME et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med.* 2018 Oct;20(10):1167-1174. doi: 10.1038/gim.2017.254
- 68 Milanovic R., et al. Expression of genes responsible for the repair of mispaired bases of the DNA (MLH1) in invasive ductal breast carcinoma. 2013 *Coll Antropol* 37(3): 929-935.
- 69 Santarpia L et al. DNA Repair Gene Patterns as Prognostic and Predictive Factors in Molecular Breast Cancer Subtypes. *Oncologist.* 2013 Oct; 18(10): 1063–1073
- 70 Malik SS et al. Expressional analysis of MLH1 and MSH2 in breast cancer. *Current Problems in Cancer* 2018;43(2) doi:10.1016/j.currproblcancer.2018.08.001
- 71 Malik SS et al. Correlation of MLH1 polymorphisms, survival statistics, in silico assessment and gene downregulation with clinical outcomes among breast cancer cases *Mol Biol Rep.* 2020; 47(1):683-692. doi:10.1007/s11033-019-05175-x
- 72 Horimoto Y et al. Microsatellite instability and mismatch repair protein expressions in lymphocyte-predominant breast cancer. *Cancer Sci.* 2020;111(7): 2647-2654. doi.org/10.1111/cas.14500
- 73 Gujam FJA et al. Immunohistochemical detection improves the prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in primary ductal breast cancer. *BMC Cancer.* 2014 Sep 18;14:676. doi: 10.1186/1471-2407-14-676
- 74 He KW et al. Prognostic significance of lymphatic vessel invasion diagnosed by D2-40 in Chinese invasive breast cancers *Medicine (Baltimore).* 2017 Nov;96(44):e8490. doi: 10.1097/MD.00000000000008490.
- 75 Wahal SP et al. Lymphatic vessel assessment by podoplanin (D2-40) immunohistochemistry in breast cancer. *J Cancer Res Ther.* Oct-Dec 2015;11(4):798-804. doi: 10.4103/0973-1482.146123
- 76 Yang C et al. high skp2/low p57Kip2 expression is associated with Poor Prognosis in human Breast Carcinoma. *Breast Cancer (Auckl).* 2015; 9(Suppl 1): 13–21 doi: 10.4137/BCBCR.S30101
- 77 Qiu Z et al. Downregulated CDKN1C/p57(kip2) drives tumorigenesis and associates with poor overall survival in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;497(1): 187-193. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.052
- 78 Xu XY et al. Clinical implications of p57 KIP2 expression in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(10): 5033-5036. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.10.5033
- 79 Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002 Aug;2(2):103-12. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00102-2

- 80 Ertel, A et al. RB-pathway disruption in breast cancer: differential association with disease subtypes, disease-specific prognosis and therapeutic response. *Cell Cycle*. 2010 Oct 15;9(20):4153-63. doi: 10.4161/cc.9.20.13454
- 81 Witkiewicz AK et al. RB-pathway disruption is associated with improved response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer *Clin Cancer Res*. 2012 Sep 15;18(18):5110-22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0903
- 82 Witkiewicz, AK, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Res*. 2014 May 7;16(3):207. doi: 10.1186/bcr3652
- 83 Shin E et al. Expression of p16 and pRB in invasive breast cancer." *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jul 1;8(7):8209-17
- 84 Witkiewicz AK et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase protein expression is associated with the degree of differentiation in breast cancer using quantitative image analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Jun;14(6):1418-23. doi: 10.1158/1055-9965
- 85 Proteinatlas. AMACR. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000242110-AMACR/tissue> (Stand: 13.05.2021, 01.14 Uhr)
- 86 Nassar A et al. Utility of alpha-methylacyl coenzyme A racemase (p504s antibody) as a diagnostic immunohistochemical marker for cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Sep;13(3):252-5. doi: 10.1097/00129039-200509000-00007
- 87 Dawson SJ et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer*. 2010 Aug 24;103(5):668-75. doi: 10.1038/sj.bjc.660573
- 88 Drago JZ et al. Targeting Apoptosis: A New Paradigm for the Treatment of Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *Cancer Discov*. 2019 Mar;9(3):323-325. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0050
- 89 ONCOTYPEIQ. Über den Oncotype DX Breast Recurrence Score® Test. <https://www.oncotypeiq.com/de-DE/brustkrebs/patienten/stage-i-iii-invasive/uber-den-test> (Stand 13.9.2020 12.55)
- 90 Hwang KT et al. BCL2 Regulation according to Molecular Subtype of Breast Cancer by Analysis of The Cancer Genome Atlas Database. *Cancer Res Treat*. 2018 Jul;50(3):658-669. doi: 10.4143/crt.2017.134
- 91 Peurala E et al. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013; 15(1): R5. doi: 10.1186/bcr3376
- 92 Mohammed AA, Rashied H, Elsayed FM. CDK4/6 inhibitors in advanced breast cancer, what is beyond? *Oncol Rev*. 2019 Jul 22; 13(2): 416. doi: 10.4081/oncol.2019.416
- 93 Dai M et al. CDK4 regulates cancer stemness and is a novel therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Sci Rep*. 2016;6: 35383.
- 94 Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30. doi: 10.1016/0092-8674(95)90385-2
- 95 Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):298-306. doi: 10.1038/nature03094
- 96 Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1672-7. doi: 10.1126/science.274.5293.1672
- 97 Buckley MF et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*. 1993 Aug;8(8):2127-33

- 98 Salimi M et al. Expression pattern of ATM and cyclin D1 in ductal carcinoma, normal adjacent and normal breast tissues of Iranian breast cancer patients. *Med Oncol.* 2012 Sep;29(3):1502-9. doi: 10.1007/s12032-011-0043-5
- 99 The Human Protein Atlas. Expression of CDK4 in breast cancer. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135446-CDK4/pathology/breast+cancer#imid_20182338 (Stand 13.05.2021, 20.08 Uhr)
- 100 Santamaria D et al Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.* 2007 Aug 16;448(7155):811-5. doi: 10.1038/nature06046
- 101 Murphy CG, Dickler MN. The Role of CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2019 May 18;20(6):52. doi: 10.1007/s11864-019-0651-4
- 102 Zhang K et al.CDK4/6 inhibitor palbociclib enhances the effect of pyrotinib in HER2-positive breast cancer. *Cancer Lett.* 2019 Apr 10;447:130-140. doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.005
- 103 An HX, Beckmann MW, Reifemberger G, Bender HG, Niederacher D. Gene amplification and overexpression of Cdk4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *Am J Pathol.* 1999 Jan;154(1):113-8. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65257-1
- 104 Oh S et al. Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple-negative breast cancer cells. *BMB Rep.* 2017 Mar;50(3):132-137. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.3.189
- 105 HusseinYR et al. Glut-1 Expression Correlates with Basal-like Breast Cancer. *Transl Oncol.* 2011 Dec;4(6):321-7. doi: 10.1593/tlo.11256
- 106 Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956 Feb 24;123(3191):309-14. doi: 10.1126/science.123.3191.309
- 107 Kang SS et al. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2002 Oct;93(10):1123-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2002.tb01214.x
- 108 Stackhouse BL et al. Measurement of glut-1 expression using tissue microarrays to determine a race specific prognostic marker for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Oct;93(3):247-53. doi: 10.1007/s10549-005-5158-y
- 109 Yu M et al. The prognostic value of GLUT1 in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 Jun 27;8(26):43356-43367. doi: 10.18632/oncotarget.17445
- 110 Jang SM et al. The Glycolytic Phenotype is Correlated with Aggressiveness and Poor Prognosis in Invasive Ductal Carcinomas. *J Breast Cancer.* 2012 Jun; 15(2): 172–180. doi: 10.4048/jbc.2012.15.2.172
- 111 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):49-53. doi: 10.1126/science.1905840
- 112 Geng QQ et al. Induction of p53 expression and apoptosis by a recombinant dual-target MDM2/MDMX inhibitory protein in wild-type p53 breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2013 Dec;43(6):1935-42. doi: 10.3892/ijo.2013.2138
- 113 Loo LWM et al. MDM2, MDM2-C, and mutant p53 expression influence breast cancer survival in a multiethnic population. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Feb;174(1):257-269. doi: 10.1007/s10549-018-5065-7
- 114 Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412

- 115 Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997 May 15;387(6630):299-303. doi: 10.1038/387299a0
- 116 Kussie PH et al. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 1996 Nov 8;274(5289):948-53. doi: 10.1126/science.274.5289.948
- 117 Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992 Jun 26;69(7):1237-45. doi: 10.1016/0092-8674(92)90644-r
- 118 Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*. 2003 Dec 12;302(5652):1972-5. doi: 10.1126/science.1091362
- 119 Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer*. 1993 Dec 15;72(12):3641-7. doi: 10.1002/1097-0142(19931215)72:12<3641::aid-cnrc2820721215>3.0.co;2-8
- 120 Ostrowski JL et al. p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol*. 1991 May;164(1):75-81. doi: 10.1002/path.1711640113
- 121 Thor AD et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1992 Jun 3;84(11):845-55. doi: 10.1093/jnci/84.11.845
- 122 Qamar S et al. Association of p53 Overexpression with Hormone Receptor Status and Triple Negative Breast Carcinoma. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2019 Feb;29(2):164-167. doi: 10.29271/jcpsp.2019.02.164
- 123 Petitjean A et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007 Jun;28(6):622-9. doi: 10.1002/humu.20495
- 124 Dressler AC et al. Tuberin and p27 expression in breast cancer patients with or without BRCA germline mutations, *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Aug;139(8):1349-55. doi: 10.1007/s00432-013-1443-z
- 125 Rosner M, Freilinger A, Hengstschläger M. The tuberous sclerosis genes and regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 *Mutat Res*. 2006 Sep;613(1):10-6. doi: 10.1016/j.mrrev.2006.03.001
- 126 Williamson EA, Dadmanesh F, Koeffler HP. BRCA1 transactivates the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Oncogene*. 2002 May 9;21(20):3199-206. doi: 10.1038/sj.onc.1205461
- 127 Lau R, Grimson R, Sansome C, Tornos C, Moll UM. Low levels of cell cycle inhibitor p27kip1 combined with high levels of Ki-67 predict shortened disease-free survival in T1 and T2 invasive breast carcinomas. *Int J Oncol*. 2001 Jan;18(1):17-23. doi: 10.3892/ijo.18.1.17
- 128 Catzavelos C et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27KIP1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med*. 1997 Feb;3(2):227-30. doi: 10.1038/nm0297-227
- 129 Lloyd RV et al. p27KIP1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol*. 1999 Feb;154(2):313-23. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65277-7
- 130 Esposito V et al. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1997 Aug 15;57(16):3381-5

- 131 Alasiri G et al. Regulation of PERK expression by FOXO3: a vulnerability of drugresistant cancer cells. *Oncogene*. 2019 Sep;38(36):6382-6398. doi: 10.1038/s41388-019-0890-7
- 132 Ojha R, Amaravadi RK. Targeting the unfolded protein response in cancer. *Pharmacol Res*. 2017 Jun;120:258-266. doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.003
- 133 Salaroglio IC et al. PERK induces resistance to cell death elicited by endoplasmic reticulum stress and chemotherapy. *Mol Cancer*. 2017 May 12;16(1):91. doi: 10.1186/s12943-017-0657-0
- 134 Mujtaba T, Dou QP. Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discov Med*. 2011 Dec;12(67):471-80
- 135 Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal*. 2009 Apr 21;2(67):pe24. doi: 10.1126/scisignal.267pe24
- 136 Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Dec;7(12):1013-30. doi: 10.1038/nrd2755
- 137 Wu Z et al. Predictive and prognostic value of PDL1 protein expression in breast cancer patients in neoadjuvant setting *Cancer Biol Ther*. 2019;20(6):941-947. doi: 10.1080/15384047.2019.1583533
- 138 Said EA et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):452-9. doi: 10.1038/nm.2106
- 139 Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011 Sep;28(3):682-8. doi: 10.1007/s12032-010-9515-2
- 140 Thompson RH et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3381-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4303
- 141 Massi D et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Ann Oncol*. 2014 Dec;25(12):2433-2442. doi: 10.1093/annonc/mdu452
- 142 Hino R et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1757-66. doi: 10.1002/cncr.24899
- 143 Gao Q et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 1;15(3):971-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1608
- 144 Hamanishi J et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3360-5. doi: 10.1073/pnas.0611533104
- 145 Mozaffarian N, Wiedeman AE, Stevens AM. Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Sep;47(9):1335-41. doi: 10.1093/rheumatology/ken256 doi:10.1093/rheumatology/ken256. PMID 18650228. PMC 2722808
- 146 Muenst S, Soysal SD, Gao F, Obermann EC, Oertli D, Gillanders WE. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is

- associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jun;139(3):667-76. doi: 10.1007/s10549-013-2581-3
- 147 Baptista MZ et al. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol.* 2016 Jan;47(1):78-84. doi: 10.1016/j.humpath.2015.09.006
- 148 Beckers RK et al. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology.* 2016 Jul;69(1):25-34. doi: 10.1111/his.12904
- 149 Li X et al. Stromal PD-L1 Expression Is Associated with Better Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *Am J Clin Pathol.* 2016 Oct;146(4):496-502. doi: 10.1093/ajcp/aqw134
- 150 Ali HR et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Ann Oncol.* 2015 Jul;26(7):1488-93. doi: 10.1093/annonc/mdv192
- 151 Mittendorf EA et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014 Apr;2(4):361-70. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0127
- 152 Sabatier R et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget.* 2015 Mar 10;6(7):5449-64. doi: 10.18632/oncotarget.3216
- 153 Hurwitz AA, Leach DR, van Elsas A, Townsend SE, Allison JP. Manipulation of T cell activation in the anti-tumor immune Response. In: E Mihich, C Croce (eds.): *The Biology of Tumors.* New York. Plenum Press; 1998 , p 2013–2019. ISBN 978-1-4899-1352-4
- 154 Okazaki T, Honjo T: PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007 Jul;19(7):813-24. doi: 10.1093/intimm/dxm057
- 155 Márquez-Rodas I et al. Immune checkpoint inhibitors: therapeutic advances in melanoma. *Ann Transl Med.* 2015 Oct;3(18):267. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.10.27
- 156 Hodi FS et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010 Aug 19;363(8):711-23. doi: 10.1056/NEJMoa1003466
- 157 Garon EB et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015 May 21;372(21):2018-28. doi: 10.1056/NEJMoa1501824
- 158 Motzer RJ et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2015 Nov 5;373(19):1803-13. doi: 10.1056/NEJMoa1510665
- 159 Bayraktar S et al. Immunotherapy in breast cancer. *J Carcinog.* 2019 May 23;18:2. doi: 10.4103/jcar.JCar_2_19. eCollection 2019
- 160 Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? In: *The Journal of experimental medicine.* *J Exp Med.* 2016 Dec 12; 213(13): 2835–2840. doi: 10.1084/jem.20161462
- 161 Sahebjam S et al. Ki 67 is a major, but not the sole determinant of Oncotype Dx recurrence score. *Br J Cancer.* 2011 Oct 25;105(9):1342-5. doi: 10.1038/bjc.2011.402
- 162 Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1996 Mar;2(3):585-92
- 163 Petrelli F et al. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Oct;153(3):477-91. doi: 10.1007/s10549-015-3559-0

- 164 Gwin K et al. Complementary value of the Ki-67 proliferation index to the oncotype DX recurrence score. *Int J Surg Pathol*. 2009 Aug;17(4):303-10. doi: 10.1177/1066896909340274
- 165 Williams DJ et al. Proliferation (Ki-67 and phosphohistone H3) and oncotype DX recurrence score in estrogen receptor-positive breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011 Oct;19(5):431-6. doi: 10.1097/PAI.0b013e318206d23d
- 166 Allison KH, Kandalaf PL, Sitlani CM, Dintzis SM, Gown AM. Routine pathologic parameters can predict Oncotype DX(TM) recurrence scores in subsets of ER positive patients: who does not always need testing? *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jan;131(2):413-24. doi: 10.1007/s10549-011-1416-3
- 167 Cuzick et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health Recurrence Score in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 10;29(32):4273-8. doi: 10.1200/JCO.2010.31.283
- 168 Swain SM et al. Quantitative Gene Expression by Recurrence Score in ER-Positive Breast Cancer, by Age. *Adv Ther*. 2015 Dec;32(12):1222-36. doi: 10.1007/s12325-015-0268-3
- 169 Sughayer M A et al. Comparison of Estrogen receptors, Progesterone receptors and HER2-neu immunohistochemistry results in breast cancer with those of Oncotype Dx. *Ann Diagn Pathol*. 2020 Aug;47:151556. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151556

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

Anmerkung: Im Text werden Kürzel welche im allgemeinen wissenschaftlichen Sprachgebrauch als Namensäquivalent geführt werden nicht gesondert eingeführt, sie sind der Vollständigkeit wegen nachfolgend jedoch mit aufgeführt. Bsp. WHO (World Health Organization)

Abkürzung	Bezeichnung
ADAPT	Adjuvanter dynamischer Marker - Angepasste personalisierte Therapie
ADH1C	Alcohol Dehydrogenase 1C (Class I) (Gen)
AMACR	A-Methylacyl-CoA racemase (Gen)
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATF6α	activating transcription factor 6 α (Gen)
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated (Gen)
Bcl 2	B-cell lymphoma 2 (Gen)
BRCA1/2	BReast CAncer 1/2 (Gen)
CDK 4	Cyclin dependant kinase 4 (Gen)
CISH	Chromogen-in-situ-Hybridisierung
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
EGFR	Epidermalen Growth Factor Receptor
ER	Östrogenrezeptor
ERCC4/XPF	ERCC Excision Repair 4 (Gen)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
Her2/neu	epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 oder ErbB2 (Gen)
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HR	Hormonrezeptor
HSP A5 / 70	Heat Shock protein A5 / 70
IDC	Invasive duktale Karzinom
IHC	Immunhistochemie
ILC	Invasiven lobulären Karzinome
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
Mamma-Ca	Mammakarzinom
MDM2	Murine double minute 2 (Gen)
MLH1	MutL homolog 1 (Gen)
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeability
MSH2	MutS Homolog 2 (Gen)
MSH6	mutS Homolog 6 (Gen)

MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
NBS1	Nibrin (Gen)
NST	No Special Type (Mammakarzinom)
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1
PD-1	Programmed death-cell protein 1 (Gen)
PDL 1	Programmed death-ligand-1 (Gen)
pERK	protein kinase R -like endoplasmic reticulum kinase (Gen)
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2 (Gen)
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog (Gen)
qRTPCR	Quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RB	Retinoblastom (Gen)
R-Gruppen	Reccurrence-Score®-Gruppen / Recurrence-Gruppen
RS	Recurrence-Score
RxPONDER	Rx for Positive Node, Endocrine Responsive Breast Cancer (Studie)
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results (Register)
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2 (Gen)
SWOG	Southwest Oncology Group
TMA	Tissue-Micro-Arrays
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha (Gen)
TNM	Tumor (T), Nodes (N), Metastasen (M)
ATAC	Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (Studie)
TSC1/TSC2	Tuberous sclerosis 1/2 (Gen)
UICC	Union for International Cancer Control
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinase Typ
UPR	unfolded protein response
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
WSG	Westdeutsche Studiengruppe GmbH
XRCC 1/3	X-Ray Repair Cross Complementing 1/3

II Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
1	Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von AMACR im Bezug auf den Recurrence-Score©. a Boxplot. b Histogramm.	19
2	Häufigkeiten in den vier R-Gruppen und AMACR-Ausprägung für das Gesamtkollektiv sowie nach Alter.	20
3	Die Häufigkeiten in den klassischen R-Gruppen und AMACR.	20
4	Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von Bel 2 im Bezug auf den Recurrence-Score©. a Boxplot. b Histogramm.	21
5	Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von CDK 4 im Bezug auf den Recurrence-Score©. a Boxplot. b Histogramm.	22
6	Die Fallanzahl in den zwei R-Gruppen und CDK 4.	23
7	Graphische Darstellung von Cyclin D1 in Bezug auf den Recurrence-Score©. a Boxplot. b Histogramm.	23
8	Häufigkeiten in den klassischen R-Gruppen und die Cyclin D1 - Ausprägung.	24
9	Cyclin D1 in der dichotomen Variante für vier R-Gruppen und die klassischen R-Gruppen bezogen auf das Gesamtkollektiv und Patientinnen > 50 Jahre.	25
10	Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von Glut 1 in Bezug auf den Recurrence-Score©. a Boxplot. b Histogramm.	26
11	Die Fallanzahl in den klassischen R-Gruppen Gruppen und Glut 1 (positiv, negativ).	27
12	Graphische Darstellung von MDM2 in Bezug auf den Recurrence-Score©. a Boxplot. b Histogramm.	27
13	Häufigkeiten in den vier R-Gruppen und die Ausprägung von MDM2.	28
14	Häufigkeiten in den vier R-Gruppen und die Ausprägung von MDM2 bei Patientinnen >50 Jahre.	28
15	Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von pERK (positiv, negativ) in Bezug auf den Recurrence-Score©. a Boxplot. b Histogramm.	29
16	Graphische Darstellung des Markers pERK (differenziert) in Bezug auf den Recurrence-Score©	30
17	Graphische Darstellung der Datenverteilung des Gesamtkollektivs von PDL 1 in Bezug auf den	31
18	Häufigkeiten in den vier R-Gruppen und die PDL-1-Ausprägung.	31
19	Häufigkeiten in den drei R-Gruppen und die PDL-1-Ausprägung.	32
20	Häufigkeiten in den vier R-Gruppen und die PDL-1-Ausprägung (dichotom) bei Patientinnen > 50 Jahre.	32
21	Graphische Darstellung von p53 in Bezug auf den Recurrence-Score©. a Boxplot. b Histogramm.	33
22	Häufigkeiten in der Ausprägung von p 53 und a vier R-Gruppen und b Häufigkeiten in der Ausprägung von p 53 und den zwei R-Gruppen.	34

23	Graphische Darstellung von p 27 in Bezug auf den Recurrence-Score [®] . a Boxplot. b Histogramm.	35
24	Häufigkeiten in der Ausprägung von p 27. a in den zwei R-Gruppen im Gesamtkollektiv, sowie bei den über 50-jährigen Patientinnen. b In vier R-Gruppen.	35
25	Histogramm zum Recurrence-Scores [®] der Stichprobe der Paaranalyse.	37
26	Häufigkeiten der signifikanten Marker-Paare der Muster-analyse zwischen CDK4 und p 53 mit dichotomisierten Daten	38
27	Häufigkeiten in den signifikanten Proben der Musteranalyse zwischen den einzelnen Markern. a AMACR und Bcl2. b AMACR und MDM2. c AMACR und Glut1. d CDK4 und PDL-1. e CDK 4 und p 53. f PDL-1 und Glut 1.	39
28	Graphische Darstellung von Ki67% in Bezug auf den Recurrence-Score [®] . a Boxplot . b Histogramm.	40
29	Häufigkeiten in den vier R-Gruppen für das Gesamtkollektiv von Ki67% sowie für Patientinnen > 50 Jahre.	41
30	Häufigkeiten für das Gesamtkollektiv von Ki67% in den klassischen R-Gruppen.	42
31	Häufigkeiten in den zwei R-Gruppen für das Gesamtkollektiv von Ki67%, sowie für Patientinnen > 50 Jahre.	42
32	Histogramm zum Recurrence-Score [®] der Stichprobe der Musteranalyse mit Ki67%.	43
33	Häufigkeiten für CDK 4 (differenziert und dichotom) für die gesamte Stichprobe Ki 67%.	44
34	Häufigkeiten für pERK (differenziert und dichotom) für die gesamte Stichprobe Ki 67%.	44
35	Häufigkeiten für PDL-1 für die gesamte Stichprobe Ki 67%	44
36	Streudiagramm zu Ki67% und dem Recurrence-Score [®] .	45
37	Streudiagramm zum Alter bei Diagnosestellung und dem Recurrence-Score [®] .	46
38	Streudiagramm zum Alter bei Diagnosestellung und Ki 67%.	46
39	Positive immunhistochemische Färbungen von AMACR und Positivkontrolle der Immunhistochemischen Färbung.	51
40	Immunhistochemische Färbungen von Bcl 2.	53
41	Regulation des Übergangs von G1/S im Zellzyklus durch Cyclin D1, CDK4 und p16. (nach Peurala et al. 2013 (93)).	54
42	Immunhistochemische Färbungen von Cyclin D1.	55
43	Positive immunhistochemische Färbungen von CDK 4 und ihre zugehörigen Gruppen.	56
44	MDM2 positive Färbung in der Immunhistochemie.	61
45	Immunhistochemische Färbungen von p27. Positiv und negativ.	62
46	Beispiele für positive immunhistochemische Färbungen von pERK.	63
47	Immunhistochemische Färbung von pERK. Differenzierung zwischen a pERK < 10% und b pERK negativ.	64
48	Immunhistochemische Färbung von pERK. Differenzierung zwischen a pERK > 50% und b pERK < 50%.	64
49	Immunhistochemische Färbungen von PDL-1. Differenzierung zwischen negativem Status und normaler Expression.	66

50	Beispiele für starke positive immunhistochemische Färbungen von PDL-1.	67
----	--	----

III Tabellenverzeichnis

Tab.	Titel	Seite
1	Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms nach dem St.Gallen-Konsensus von 2009 (23)	3
2	Gen-Panel des Oncotype DX® (nach Cronin et al., 2007 (40) und www.oncotypeiq.com, 2021 (39)).	10
3	Für die Immunhistochemische Färbung verwendete Antikörper mit Verdünnung.	13
4	Auswertungsschema der Marker nach Ausprägung.	14
5	Auswertungsschema der immunhistochemischen Marker gegen die Recurrence-Score®-Gruppen.	16
6	Marker mit derselben Ausprägung in der Mehrheit der Fälle und ihre Stichprobengröße.	36
7	Marker-Kombinationen der Paaranalyse für die gesamte Stichprobe für welche nachweislich ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht mit Kennzeichnung hochsignifikanter Korrelationen.	38
8	Marker-Kombinationen der Paaranalyse für das Gesamtkollektiv für welche das 10%-Niveau, nicht jedoch Signifikanz (5%) erreicht wird.	38
9	p-Values und Korrelationsmaße für den Zusammenhang von Ki67% und dem Recurrence-Score©.	41
10	Ki 67 % und die signifikanten Marker der Musteranalyse für die Stichprobe im Gesamten.	43
11	Häufigkeits-Verteilung der Risikogruppen nach Alterskollektiv	71
12	Marker mit statistisch relevantem Zusammenhang dichotom und mehrkategorial.	75
A1	Fallübersicht zu den immunhistochemische Färbungen der Marker.	s. IV
A2	Fallübersicht mit Alter bei Diagnosestellung, Recurrence-Score-Wert und Tumortyp.	s. IV
A3	Übersicht Statistische Auswertung Analyse 1	s. IV
A4	Übersicht Statistische Auswertung Analyse 2.1	s. IV
A5	Übersicht Statistische Auswertung Analyse 2.2	s. IV
A 6	Übersicht Statistische Auswertung Analyse 3	s. IV
A 7	Übersicht Statistische Auswertung Analyse 4	s. IV
A 8	Übersicht Statistische Auswertung Analyse 5.1	s. IV
A 9	Übersicht Statistische Auswertung Analyse 5.2	s. IV
A 10	Übersicht Statistische Auswertung zur Paaranalyse relevanter Marker.	s. IV
A 11	Übersicht Statistische Auswertung zur Paaranalyse mit dichotomisierten Markern.	s. IV
A 12	Übersicht Statistische Auswertung zur Paaranalyse relevanter Marker mit Ki 67%.	s. IV

IV Ergänzende Tabellen

Tabelle A1 Fallübersicht zu den immunhistochemischen Färbungen der Marker. X = nicht auswertbar, 0 = negativ, 1 = positiv, 2 = stark positiv, + = starke Färbung im Vergleich zu den anderen Fällen derselben Ausprägungsgruppe.

Fall	AMACR	Bcl2	CD56	CDK4	Cyclin D1	D20-40	GLUT 1	MDM2	MLH1	MSH2	MSH6	p27	p53	p57	PDL-1	pERK	PMS2	RB
1	0	2	0	x	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	0	2	0	x	1	0	0	0	0	x	0	1	0	0	0	1	0	0
3	x	x	0	x	x	0	x	x	x	0	x	x	x	0	x	x	x	x
4	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	x
5	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6	0	2	0	1	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1+	1	0	0
7	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	1	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
9	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	x	1	0	0
10	x	x	0	x	x	0	x	x	x	x	x	x	x	0	x	1	x	x
11	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	x	0	0
12	0	2	0	1	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
13	0	2	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
14	0	2	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
15	x	x	0	x	1	0	0	x	x	0	x	1	x	0	0	x	0	x
16	x	1	0	x	1	0	1	0	0	0	0	1	x	0	0	1	0	x
17	0	2	0	0	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
18	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
19	0	2	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
20	1	2	0	1	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
21	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
22	0	2	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
23	0	2	0	x	1	0	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	0	0
24	0	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
25	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
26	0	2	0	1	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
27	0	2	0	0	2	0	2	0	0	x	0	1	0	0	0	0	0	0
28	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
29	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
30	0	2	0	2	2	0	2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
31	0	2	0	x	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
32	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	x	1	0	0	0	0	0	0
33	0	2	0	0	1	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
34	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
35	0	2	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
36	0	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
37	0	2	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
38	0	2	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	x	0	0

Fortsetzung Tabelle A1

Fall	AMACR	Bcl2	CD56	CDK4	Cyclin D1	D20-40	GLUT 1	MDM2	MLH1	MSH2	MSH6	p27	p53	p57	PDL-1	pERK	PMS2	RB
40	x	2	0	x	x	0	1	x	0	1	0	1	0	0	0	0	x	0
41	0	x	0	x	0	0	x	x	x	x	0	1	0	0	0	x	x	x
42	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
43	0	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
44	1	1	0	1	2	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
45	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
46	1	1	0	0	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
47	x	2	0	0	0	0	0	x	0	0	0	1	0	0	0	1	x	0
48	0	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
49	0	2	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
50	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	x	0	x	1	0	0
51	x	x	0	x	x	0	x	x	x	x	x	x	x	0	0	x	x	x
52	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
53	0	x	0	0	1	0	x	x	x	x	x	1	0	0	x	x	x	0
54	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
55	1	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	x	1	0	0
56	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
57	1	2	2	0	1	0	2+	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	x	0	x	0	0	0	x	0	0	0	x	1	0	1	0	0	x
59	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
60	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
61	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
62	0	2	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
63	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
64	0	1	0	1	2	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
65	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
66	0	x	0	0	x	0	0	x	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
67	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
68	0	2	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
69	0	2	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
70	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
71	0	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	x	0	x	x	0	x	x	x	x	x	1	x	0	0	x	0	x
73	1	2	0	2	1	0	2	1	0	0	0	x	0	0	0	0	x	0
74	1	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
75	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
76	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
77	0	x	0	x	x	0	x	0	x	x	0	1	x	0	0	x	0	0
78	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0

Tabelle A2 Fallübersicht mit Alter bei Diagnosestellung, Recurrece-Score-Wert und Tumortyp.
 1 = NST; 2 = invasives lobuläres Carcinom; 3 = Sonstiges.
 Ergänzung: 3* invasiv ductales Carcinom; 3** invasives tubulo-lobuläres Carcinom;
 3*** papilläres Mamma Carcinom mit neuroendokriner Differenzierung;
 3**** muzinöses Carcinom

Fall	Alter	Recurrence	Tumortyp	Fall	Alter	Recurrence	Tumortyp
1	47	10	1	40	50	19	1
2	56	3	1	41	50	12	1
3	50	10	2	42	46	6	1
4	60	9	1	43	49	10	1
5	64	7	1	44	57	11	1
6	51	6	3*	45	58	7	1
7	49	6	1	46	50	13	1
8	57	9	1	47	45	4	1
9	62	8	1	48	41	8	1
10	41	16	1	49	52	13	1
11	70	5	1	50	54	17	1
12	51	6	1	51	51	22	1
13	46	5	1	52	37	5	1
14	39	16	1	53	67	11	1
15	71	7	2	54	42	8	1
16	68	7	2	55	50	13	1
17	41	8	1	56	49	13	1
18	49	6	2	57	50	12	3***
19	70	11	2	58	52	37	1
20	71	13	1	59	45	17	1
21	62	10	1	60	64	23	1,2
22	46	19	1	61	55	28	1
23	56	16	2	62	58	23	1
24	71	13	1	63	65	15	2
25	69	21	1	64	57	24	1
26	28	10	1	65	68	10	1
27	38	19	1	66	69	26	1,2
28	39	7	1	67	63	13	1
29	39	7	1	68	46	10	1
30	64	25	1	69	43	12	3****
31	60	8	1	70	52	12	1
32	68	9	1	71	70	18	2
33	50	11	1	72	74	14	2
34	51	9	1	73	57	18	1
35	51	7	3**	74	66	20	1
36	73	19	1	75	48	23	1
37	49	11	1	76	50	12	1
38	46	5	1	77	76	20	2
39	57	24	1	78	63	22	1

Tabelle A3 Übersicht Statistische Auswertung Analyse 1

Analyse 1							
Marker	X ² -Test			Phi-Koeff.	Kontingenz-Koeffizient	CramerV	Fisher p
	F	X ²	p				
AMACR	3	10.185	0.01706	-	0.1575	0.1595	0.004445
Bcl 2	6	7.1929	0.3034	-	0.3520	0.3761	0.2632
Cyclin D1	6	18.064	0.006075	-	0.3073	0.2283	0.1177
CDK4	6	6.9043	0.3298	-	0.4478	0.3542	0.2036
Glut 1	6	5.2169	0.5163	-	0.2599	0.1903	0.5309
MDM2	3	10.015	0.01844	-	0.3606	0.3866	0.01432
P27	3	5.7868	0.1225	-	0.2693	0.2796	0,1472
pERK	9	6.6747	0.6709	-	0.2950	0.1783	0,6059
PDL-1	6	16.854	0.009833	-	0.4307	0.3375	0,02392
p53	3	7.8438	0.04935	-	0.3154	0.3324	0,03812
Dichotomisierte Marker							
Cyclin D1	3	17.254	0.0006265	-	0.4397	0.4895	0.02115
CDK4	3	4.4356	0.2181	-	0.2527	0.2612	0.1847
Glut 1	3	4.6609	0.1984	-	0.2466	0.2544	0.1824
pERK	3	3.0294	0.3871	-	0.2037	0.2080	0.4277
PDL-1	3	15.683	0.001317	-	0.4182	0.4604	0.007244

Tabelle A4 Übersicht Statistische Auswertung Analyse 2.1

Analyse 2.1							
Marker	X ² -Test			Phi-Koeff.	Kontingenz-Koeffizient	CramerV	Fisher p
	F	X ²	p				
AMACR	3	3.229	0.199	-	0.3165	0.3337	0.2265
Bcl 2	6	7.4359	0.02428	-	0.4518	0.5064	0.02573
Cyclin D1	6	2.5446	0.2802	-	0.2796	0.2912	0.2092
CDK4	6	2.7687	0.5972	-	0.2907	0.2148	0.6399
Glut 1	6	2.125	0.7128	-	0.2572	0.1882	0.7213
MDM2	3	2.81	0.2454	-	0.3020	0.3168	0.253
P27	3	1.2802	0.5272	-	0.1991	0.2032	0.5106
pERK	9	7.1042	0.3113	-	0.4318	0.3385	0.4336
PDL-1	6	4.7676	0.312	-	0.3703	0.2819	0.165
p53	3	5.0968	0.07821	-	-	-	-
Dichotomisierte Marker							
Cyclin D1	3	2.7687	0.7235	-	-	-	1
CDK4	3	2.7687	0.5972	-	0.2907	0.2148	0.6399
Glut 1	3	1.7812	0.4104	-	0.2367	0.2437	0.5271
pERK	3	1.6812	0.4314	-	0.2304	0.2367	0.5021
PDL-1	3	0.8615	0.65	-	0.1644	0.1667	0.7179

Tabelle A5 Übersicht Statistische Auswertung Analyse 2.2

Analyse 2.2							
Marker	X ² -Test			Phi-Koeff.	Kontingenz-Koeffizient	CramerV	Fisher p
	F	X ²	p				
AMACR	3	0.34924	0.9505	-	0.0898	0.0901	0.09879
Bcl 2	6	4.8047	0.1867	-	0.3170	0.3343	0.5949
Cyclin D1	6	4.518	0.6069	-	0.3222	0.2407	0.09298
CDK4	6	15.567	0.01628	-	0.5200	0.4305	0.6221
Glut 1	6	3.5406	0.7386	-	0.2788	0.2053	0.807
MDM2	3	7.9878	0.04626	-	0.4123	0.4526	0.04096
P27	3	6.8919	0.07542	-	0.3717	0.4003	0.09335
pERK	9	5.3651	0.8014	-	0.3478	0.2141	0.7405
PDL-1	6	12.546	0.05083	-	0.4710	0.3776	0.05841
p53	3	4.8	0.187	-	0.3273	0.3464	0.1599
Dichotomisierte Marker							
Cyclin D1	3	14.285	0.002542	-	0.5038	0.5832	0.0124
CDK4	3	1.9862	0.5753	-	0.2257	0.2317	0.6166
Glut 1	3	2.9475	0.3998	-	0.2561	0.2649	0.4054
pERK	3	3.054	0.3834	-	0.2695	0.2798	0.4322
PDL-1	3	11.522	0.009212	-	0.4555	0.5117	0.02686

Tabelle A6 Übersicht Statistische Auswertung Analyse 3

Analyse 3							
Marker	X ² -Test			Phi-Koeff.	Kontingenz-Koeffizient	CramerV	Fisher p
	F	X ²	p				
AMACR	2	1.7878	0.409	-	0.3256	0.3444	0.006381
Bcl 2	4	8.54	0.01398	-	0.2704	0.1986	0.1997
Cyclin D1	4	5.442	0.2449	-	0.4402	0.3466	0.0395
CDK4	4	17.301	0.001689	-	0.2143	0.1552	0.4626
Glut 1	4	4.9161	0.296	-	0.296	0.1848	0.278
MDM2	3	6.1938	0.04519	-	0.04519	0.3040	0.03381
P27	2	2.2016	0.3326	-	0.1700	0.1725	0.4275
pERK	6	6.3726	0.3828	-	0.2889	0.2134	0.2653
PDL-1	4	16.05	0.002953	-	0.4222	0.3293	0.01087
p53	2	3.9216	0.1407	-	0.2288	0.2350	0.1745
Dichotomisierte Marker							
Cyclin D1	2	17.254	0.0001792	-	0.4397	0.4895	0.008093
CDK4	2	0.75091	0.687	-	0.1075	0.1075	0.6408
Glut 1	2	4.3892	0.1114	-	0.2397	0.2469	0.08681
pERK	2	2.8628	0.239	-	0.1982	0.2022	0.2791
PDL-1	2	15.564	0.0004172	-	0.4169	0.4586	0.003914

Tabelle A7 Übersicht Statistische Auswertung Analyse 4

Analyse 4							
Marker	X ² -Test			Phi-Koeff. dichotom	Kontingenz- Koeffizient	CramerV	Fisher p
	F	X ²	p				
AMACR	1	0.10811	0.7423	0.0629	0.0821	0.0823	0.5957
Bcl 2	1	3.0035	0.2227	0.0823	0.2042	0.2086	0.4818
Cyclin D1	2	0.763	0.6828	-	0.1024	0.1029	0.2172
CDK4	2	4.987	0.08262	-	0.2669	0.2770	0.5844
Glut 1	2	1.1109	0.5738	-	0.1233	0.1242	0.5844
MDM2	1	2.9279e-30	1	0.0168	0.0168	0.0168	0.06246
P27	1	2.9719	0.08472	0.2425	0.2357	0.2425	0.06488
pERK	3	0.87279	0.832	-	0.1110	0.1117	0.8246
PDL-1	2	3.8898	0.143	-	0.2235	0.2293	0.1382
p53	1	4.2195	0.03996	0.3041	0.2909	0.3041	0.02455
Dichotomisierte Marker							
Cyclin D1	1	0.054087	0.8161	-	-	-	0.6768
CDK4	1	3.1289	0.07691	0.2551	0.2472	0.2551	0.04891
Glut 1	1	0.59194	0.4417	0.1221	0.1212	0.1221	0.4253
pERK	1	0.0091525	0.9238	0.0422	0.0422	0.0422	0.7998
PDL-1	1	2.6351	0.1045	0.2271	0.2214	0.2271	0.09483

Tabelle A8 Übersicht Statistische Auswertung Analyse 5.1

Analyse 5.1							
Marker	X ² -Test			Phi-Koeff. dichotom	Kontingenz- Koeffizient	CramerV	Fisher p
	F	X ²	p				
AMACR	1	0.00077457	0.9778	0.0530	0.0529	0.0530	1
Bcl 2	1	0.033482	0.8548	-	0.1532	0.1550	0.3655
Cyclin D1	2	0.66	0.7189	-	0.1965	0.2004	1
CDK4	1	0.26561	0.6063	-	0.1467	0.1483	0.2855
Glut 1	2	1.25	0.5353	-	0.2000	0.2041	0.8465
MDM2	1	1.689e-31	1	0.0068	0.0068	0.0068	1
P27	1	0.1519	0.1519	0.6967	0.1733	0.1708	0.6328
pERK	3	5.6403	5.6403	-	0.1733	0.3923	1
PDL-1	2	0.59295	0.59295	-	0.4265	0.1392	0.5015
p53	1	11.645	11.645	0.0006437	0.1406	0.0006437	-
Dichotomisierte Marker							
Cyclin D1	1	1	4.9854e-30	1	-	-	1
CDK4	1	0.26561	0.6063	0.1483	0.1467	0.1483	0.2855
Glut 1	1	1	0.23438	0.1768	0.1741	0.1768	0.6328
pERK	1	1	1.1281e-31	0.0598	0.0597	0.0598	1
PDL-1	1	4.7957e-30	1	0.1111	0.1104	0.1111	0.5015

Tabelle A9 Übersicht Statistik Analyse 5.2

Analyse 5.2							
Marker	X ² -Test			Phi-Koeff. dichotom	Kontingenz- Koeffizient	CramerV	Fisher p
	F	X ²	p				
AMACR	1	0.38306	0.536	0.1588	0.1568	0.1588	0.4069
Bcl 2	2	1.8386	0.3988	-	0.2122	0.2171	0.549
Cyclin D1	2	1.6359	0.4413	-	0.1936	0.1974	0.4759
CDK4	2	2.2089	0.3314	-	0.2374	0.2443	0.3564
Glut 1	2	0.7992	0.6706	-	0.1367	0.1379	0.6684
MDM2	1	0	1	0.0061	0.0061	0.0061	1
P27	1	3.0716	0.07967	0.3434	0.3248	0.3434	0.04282
pERK	3	1.4981	0.6827	-	0.1923	0.1960	0.8292
PDL-1	2	2.7704	0.2503	-	0.2434	0.2509	0.3122
p53	1	2.5752	0.1085	0.3318	0.3149	0.3318	0.05642
Dichotomisierte Marker							
Cyclin D1	1	0.10802	0.7424	0.2189	0.2138	0.2189	0.6487
CDK4	1	0.97885	0.3225	0.1106	0.1099	0.1106	0.3051
Glut 1	1	0.15169	0.6969	0.0976	0.0971	0.0976	0.5299
pERK	1	0.078026	0.78	0.2379	0.2315	0.2379	0.7424
PDL-1	1	1.4616	0.2267	0.2379	0.2315	0.2379	0.1497

Tabelle A10 Übersicht Statistische Auswertung zur Paaranalyse relevanter Marker, Phi-Koeffizient nur bei Gültigkeit, sowie Kontingenz und CramerV nur bei Signifikanz ermittelt.

Paaranalyse								
Marker 1	Marker 2	X ² -Test			Phi-Koeff. dichotom	Kontingenz- Koeffizient	CramerV	Fisher p
		F	X ²	p				
AMACR	Bcl 2	1	7.9239	0.004879	0.4404	0.4030	0.4404	0.004948
	Cyclin D1	2	1.2056	0.5473	-	-	-	0.421
	CDK4	2	0.36842	0.8318	-	-	-	1
	Glut 1	2	7.1815	0.02758	0.3581	0.3371	0.3581	0.02113
	MDM2	1	8.4292	0.003692	0.4412	0.4037	0.4412	0.002053
	P27	1	1.1784e-30	1	-	-	-	1
	pERK	3	2.0319	0.5658	-	-	-	0.7698
	PDL-1	2	0.77054	0.6803	-	-	-	0.7731
Bcl 2	p53	1	0.011218	0.9156	-	-	-	1
	Cyclin D1	2	4.9149	0.08565	0.2963	0.2841	0.2963	0.09198
	CDK4	2	0.51564	0.7727	-	-	-	1
	Glut 1	2	1.2696	0.53	-	-	-	0.5894
	MDM2	1	1.2168	0.27	-	-	-	0.1738
	P27	1	0.060176	0.8062	-	-	-	0.6706

Fortsetzung Tabelle A10							
	pERK	3	5.9771	0.1127	-	-	0.1028
	PDL-1	2	3.667	0.1599	-	-	0.261
	p53	1	1.0896e-30	1	-	-	1
Cyclin D1	CDK4	4	6.4935	0.1652	-	0.3223	0.07865
	Glut 1	4	2.9788	0.5614	-	-	0.4659
	MDM2	2	0.082963	0.9594	-	-	1
	P27	2	2.5389	0.281	-	-	0.1764
	pERK	6	3.097	0.7966	-	-	0.8027
	PDL-1	4	7.2081	0.1253	-	-	0.1085
	p53	2	3.6615	0.1603	-	-	0.2014
CDK 4	Glut 1	4	4.6381	0.3265	-	-	0.2115
	MDM2	2	1.4802	0.4771	-	-	0.6963
	P27	2	0.81523	0.6652	-	-	0.7924
	pERK	6	4.9837	0.5459	-	-	0.4434
	PDL-1	4	12.641	0.01317	-	0.2859	0.2109
	p53	2	10.372	0.005593	-	0.3953	0.4304
	MDM2	2	5.161	0.07574	-	0.2905	0.3036
Glut 1	P27	2	3.651	0.1611	-	-	0.1586
	pERK	6	8.7383	0.1888	-	-	0.2308
	PDL-1	4	10.615	0.03124	-	0.3992	0.3079
	p53	2	0.63419	0.7283	-	-	0.8324
MDM2	P27	1	0.047071	0.8282	-	-	0.7069
	pERK	3	0.6663	0.8811	-	-	0.9295
	PDL-1	2	2.0823	0.3531	-	-	0.4688
	p53	1	2.7589e-30	1	-	-	1
P27	pERK	3	4.1349	0.2473	-	-	0.2091
	PDL-1	2	0.69026	0.7081	-	-	1
	p53	1	0.040735	0.8401	-	-	1
pERK	PDL-1	6	7.3073	0.2934	-	-	0.4409
	p53	3	2.6026	0.457	-	-	0.433
PDL-1	p53	2	3.8736	0.1442	-	-	0.2174

Tabelle A11 Übersicht Statistische Auswertung zur Paaranalyse mit dichotomisierten Markern, Phi-Koeffizient nur bei Gültigkeit, sowie Kontingenz und CramerV nur bei Signifikanz ermittelt.

Paaranalyse mit dichotomisierten Markern								
Marker 1	Marker 2	X ² -Test			Phi-Koeff. dichotom	Kontingenz-Koeffizient	CramerV	Fisher p
		F	X ²	p				
PDL-1	AMACR	1	0.0050725	0.9432	-	-	-	0.6232
	Bcl 2	1	1.819	0.1774	0.2389	0.2324	0.2389	0.09341
	Cyclin D1	1	1.52e-30	1	0.0961	0.0957	0.0961	0.4524
	CDK4	1	0.29217	0.5888	-	-	-	0.476
	Glut 1	1	1.6403	0.2003	-	-	-	0.1426
	MDM2	1	0.0027053	0.9585	-	-	-	1
	P27	1	5.5635e-31	1	-	-	-	0.6556
	pERK	1	0.084281	0.7716	-	-	-	1
	p53	1	0.12174	0.7272	-	-	-	0.7287
Glut-1	AMACR	1	0.55639	0.4557	-	-	-	0.4727
	Bcl 2	1	0.55639	0.4557	-	-	-	0.4086666
	Cyclin D1	1	1.4229e-3	1	0.0061	0.0061	0.0061	1
	CDK4	1	1.7684	0.1836	-	-	-	0.1431
	MDM2	1	1.3263	0.2495	-	-	-	0.2326
	P27	1	1.4513e-31	1	-	-	-	1
	pERK	1	0.73684	0.3907	-	-	-	0.3911
	p53	1	1.2493e-30	1	-	-	-	1
	CDK4	AMACR	1	0	1	-	-	-
Bcl 2		1	0	1	-	-	-	1
Cyclin D1		1	0	1	-	-	-	1
MDM2		1	0	1	-	-	-	0.7815
P27		1	0.0088258	0.9252	-	-	-	0.715
pERK		1	0.30476	0.5809	-	-	-	0.5815
p53		1	4.5949	0.03207	0.3581	0.3371	0.3581	0.0163
Cyclin D1		AMACR	1	0.014675	0.9036	1	0.1295	0.1284
	Bcl 2	1	1.8507	0.1737	-	-	-	0.09524
	MDM2	1	6.4649e-30	1	-	-	-	1
	P27	1	0.0008326	0.977	-	-	-	0.415
	pERK	1	0	1	-	-	-	1
	p53	1	3.343e-32	1	-	-	-	1
	pERK	AMACR	1	0	1	-	-	-
Bcl 2		1	0.45253	0.5011	-	-	-	0.5027
MDM2		1	0.7	0.4028	-	-	-	0.4032
P27		1	0	1	-	-	-	1
p53		1	2.4231	0.1196	-	-	-	0.1115

Tabelle A12 Übersicht Statistische Auswertung zur Paaranalyse relevanter Marker mit Ki 67%, Phi-Koeffizient nur bei Gültigkeit, sowie Kontingenz und CramerV nur bei Signifikanz ermittelt.

Paaranalyse mit Ki 67 %							
Marker	X ² -Test			Phi-Koeff.	Kontingenz-Koeffizient	CramerV	Fisher p
	F	X ²	p				
AMACR	1	0.0045244	0.9464	-	-	-	0.6981
Bcl 2	1	1.2629e-30	1	-	-	-	1
Cyclin D1	2	3.1608	0.2059	-	-	-	0.2466
CDK4	2	6.1889	0.0453	-	0.3547	0.3794	0.04245
Glut 1	2	1.3401	0.5117	-	-	-	0.5515
MDM2	1	0.75794	0.384	-	-	-	0.3319
P27	1	0.0045244	0.9464	-	-	-	0.384
pERK	3	6.8852	0.07565	-	0.3715	0.4002	0.05644
PDL-1	2	5.4645	0.06507	-	0.3358	0.3565	0.0612
p53	1	1.5359	0.2152	-	-	-	0.1078
Dichotomisierte Marker mit Ki 67%							
CDK4	1	4.129	0.04215	0.3587	0.3376	0.3587	0.02675
Cyclin D1	1	2.0871e-3	1	-	-	-	1
Glut 1	1	0.68776	0.4069	-	-	-	0.3475
pERK	1	3.9204	0.0477	0.3485	0.3291	0.3485	0.03365
PDL1	1	1.5597	0.2117	-	-	-	0.1324

V Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Erstbetreuer Herrn Prof. Dr. Hans-Ullrich Völker für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit am Leopoldina-Krankenhaus.

Mein Dank geht auch Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald und Herrn Prof. Dr. Achim Wöckel für die Übernahme der Zweitgutachten.

Herrn Dr. Andreas Cramer vom Klinikum Würzburg Mitte möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung weiterer Falldaten zur Erweiterung des Patientenkollektives danken.

Vielen Dank auch an Theodora Nedeva und den MTAs vom pathologischen Institut der Universität Würzburg für die gute Zusammenarbeit im Labor und die hilfreichen Ratschläge bei den kleinen Tücken des Laboralltages.

Nicht vergessen möchte ich all die Menschen, welche mich durch ihre liebevolle Unterstützung durch diesen Marathon der Dissertation getragen haben. Danke für Zuhören, Aushalten von gelegentlichen Launen, Ratschläge und natürlich für all die vielen Tassen Kaffee, welche manchmal genau im richtigen Moment den Weg zu mir gefunden haben und ohne welche diese Arbeit noch auf ihr Ende warten müsste.