

Aus dem Pathologischen Institut

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald

**Retrospektive Analyse zur Bedeutung des 21-Gen-Tests (OncotypeDX®) für die
Indikationsstellung zu einer adjuvanten Chemotherapie bei Hormonrezeptor-positivem,
Her2/neu-negativem Mammakarzinom**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lea Sarah Frey

aus Böblingen

Würzburg, Juli 2017

Referent/Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Hans-Ullrich Völker

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. med. Achim Wöckel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2017

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Lieben

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Mammakarzinom	1
1.2.	Risikofaktoren.....	1
1.2.1.	Familiäres Mammakarzinom	1
1.2.2.	Weitere Risikofaktoren	3
1.3.	Therapieoptionen	4
1.4.	Pathologische Diagnostik	4
1.4.1.	Hormonrezeptor-Status	4
1.4.2.	Her2/neu-Status	6
1.4.3.	Proliferationsindex Ki-67	8
1.5.	Prognostische und prädiktive Faktoren.....	9
1.5.1.	Intrinsische Subtypen.....	10
1.5.2.	21-Gen-Test OncotypeDX®	12
1.5.3.	Weitere Genexpressions-Tests	14
1.5.4.	Biomarker uPA/PAI	16
2.	Patienten und Methoden	18
2.1.	Datenerhebung	18
2.1.1.	Immunhistochemische Untersuchungen	20
2.1.2.	OncotypeDX®-Testung	21
2.1.3.	uPA/PAI-Testung.....	22
2.2.	Statistik	23
2.3.	Ziel der Arbeit.....	23
3.	Ergebnisse.....	24
3.1.	Charakteristika des Gesamtkollektivs.....	24
3.1.1.	Altersstruktur.....	24
3.1.2.	Operative Therapie	25

3.1.3.	Histologische Subtypen und Carcinoma in situ	25
3.1.4.	Tumorstadium.....	26
3.1.5.	Nodalstatus, Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa.....	27
3.1.6.	Histologischer Differenzierungsgrad	28
3.1.7.	Hormonrezeptor-Status	29
3.1.8.	Her2/neu-Status	30
3.1.9.	Proliferationsindex Ki-67	31
3.2.	Ergebnisse der OncotypeDX®-Testung	32
3.2.1.	Alter und Recurrence-Score	34
3.2.2.	Tumorgröße und Recurrence-Score	35
3.2.3.	Tumorgrading und Recurrence-Score	36
3.2.4.	Häm- und Lymphangiosis carcinomatosa und Recurrence-Score	38
3.3.	Tumorbiologische Daten und Recurrence-Score	38
3.3.1.	Hormonrezeptor-Status und Recurrence-Score	38
3.3.2.	Proliferationsindex Ki-67 und Recurrence-Score	40
3.4.	Hormonrezeptor-Status: Vergleich von Immunhistochemie und qRT-PCR ...	42
3.5.	Der Einfluss von OncotypeDX® auf die Therapieentscheidung.....	46
3.6.	Charakteristika des uPA/PAI-Kollektivs	50
3.6.1.	Ergebnisse der uPA/PAI-Testung.....	52
3.6.2.	uPA/PAI-Ergebnis und Recurrence-Score	54
4.	Diskussion	56
4.1.	Charakteristika des Gesamtkollektivs.....	57
4.2.	Verteilung der Risikogruppen.....	58
4.3.	Vergleich verschiedener Tumormerkmale mit dem Recurrence-Score.....	59
4.4.	Vergleich der Hormonrezeptor-Scores/Ki-67 Index mit dem Recurrence-Score	62
4.5.	Hormonrezeptor-Status: Vergleich von Immunhistochemie und qRT-PCR ...	65

4.6.	Der Einfluss von OncotypeDX® auf die Therapieentscheidung.....	68
4.7.	Vergleich der uPA/PAI Ergebnisse mit dem Recurrence-Score	70
5.	Zusammenfassung	71
6.	Anhang	73
6.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	73
6.2.	Tabellenverzeichnis	74
6.3.	Abbildungsverzeichnis.....	75
7.	Literaturverzeichnis	77
8.	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist das häufigste Malignom der Frau in Deutschland und auch weltweit. Für das Jahr 2013 wurden nach Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland ca. 69.000 Neuerkrankungen registriert (1). Mit einem Anteil von 29 % aller malignen Neuerkrankungen tritt das Mammakarzinom mehr als doppelt so häufig auf wie Krebserkrankungen anderer Organe (2). Das Lebenszeitrisiko einer Frau an Brustkrebs zu erkranken beträgt etwa 12 %, wobei das mittlere Erkrankungsalter ungefähr bei 64 Jahren liegt. Laut des statistischen Bundesamtes starben im Jahre 2014 deutschlandweit ca. 18.000 Frauen infolge eines Mammakarzinoms, so dass Brustkrebs bei der weiblichen Bevölkerung nach wie vor die häufigste krebsbedingte Todesursache, vor kolorektalen Karzinomen und Bronchialkarzinomen, darstellt (3). Insgesamt ist ein leichter Anstieg der Lebenserwartung zu verzeichnen. Dies ist zum einen im Zusammenhang mit flächendeckenden Früherkennungsmaßnahmen (Sekundärprävention) wie dem Mammographie-Screening zu sehen, bei dem die Erkrankung in einem frühen Stadium mit guter Prognose erkannt werden kann. Zum anderen tragen weiterentwickelte interdisziplinäre und individualisierte Therapieansätze dazu bei.

1.2. Risikofaktoren

1.2.1. Familiäres Mammakarzinom

Hinweis für eine genetische Ursache kann eine familiäre Häufung von Brustkrebserkrankungen sein, wie sie bei ungefähr 20 - 25 % aller Frauen mit diagnostiziertem Mammakarzinom zu finden ist (3-5). Ferner sind mit BRCA1- und BRCA2-Gen (BReast CAncer gene 1 bzw. 2) prädisponierende Hochrisikogene identifiziert worden. Eine genetische Disposition mit entsprechender Keimbahnmutation in einem der beiden Gene liegt etwa bei 5 – 10 % der Erkrankten vor (6, 7). Es handelt sich um einen autosomal-dominanten Erbgang, welcher bei den

Genträgerinnen zu einem Lebenszeitrisiko von 50 - 80 % an Brustkrebs, von 60 % an einem kontralateralen Mammakarzinom und von 10 – 40 % an einem Ovarial-Karzinoms zu erkranken führt (8, 9). Zudem zeigen die betroffenen Frauen ein deutlich früheres Erkrankungsalter als Patientinnen ohne genetische Disposition und sind bei Diagnosestellung im Vergleich rund 20 Jahre jünger (10, 11). Bei negativer Familienanamnese und einer Erkrankung im höheren Alter besteht eher die Wahrscheinlichkeit eines sporadischen Krebsleidens. Es wurden Einschlusskriterien definiert, bei welchen eine multidisziplinäre Beratung und eine genetische Testung empfohlen werden. Zu diesen Kriterien gehören unter anderem die Anzahl der Tumorerkrankungen in einer Familie, die Art der Karzinome und das Erkrankungsalter (12). Bei Erfüllung der Einschlusskriterien sollte eine weitere Abklärung in einem der deutschlandweit 15 eigens dafür eingerichteten interdisziplinären und spezialisierten Zentren erfolgen.

Bei diagnostizierter BRCA-Mutation müssen aufgrund des vergleichsweise jungen Erkrankungsalters die Maßnahmen zur Früherkennung angepasst werden. So sollte das Mammographie-Screening, welches für die Allgemeinbevölkerung ab dem 50. Lebensjahr vorgesehen ist, zu einem früheren Zeitpunkt beginnen und um weitere Untersuchungsmethoden wie eine Kernspinuntersuchung der Brust und eine Mamma-Sonographie ergänzt werden. Besonders bei hoher Dichte des Brustdrüsengewebes jüngerer Frauen zeigt das MRT die höchste Sensitivität. Ein weiterer Vorteil ist die fehlende Strahlenbelastung dieser Untersuchungsmodalität (13, 14).

Im Gegensatz zu Mammakarzinomen mit BRCA2-Assoziation, die ähnliche Eigenschaften wie sporadische Karzinome aufweisen, findet sich bei BRCA1-Trägerinnen oft ein charakteristischer histomorphologischer und immunhistochemischer Phänotyp (15). Es zeigen sich Merkmale eines medullären Karzinoms mit syncytialer Architektur, relativ scharfer Begrenzung und einem eher verdrängenden Wachstumsverhalten, fehlender tubulärer Differenzierung sowie einem diffusen lymphoplasmazellulären Stromainfiltrat (16). Ferner lassen sich pleomorphe und hochgradig atypische Zellkerne sowie deutlich vermehrt Mitosen und auch Tumornekrosen erkennen (17). In den immunhistochemischen Untersuchungen wird bei diesen Patientinnen häufig ein triple-negatives Karzinom diagnostiziert, welches sich durch eine fehlende Expression des Östrogen- und Progesteronrezeptors sowie einem

negativen Her2/neu-Überexpressions-Status gekennzeichnet ist (18-20). Des Weiteren kann in den meisten Fällen eine deutlich gesteigerte Proliferationsaktivität mittels des proliferationsassoziierten Markers Ki-67 nachgewiesen werden (21). Die Behandlung der BRCA-assoziierten Mammakarzinome richtet sich derzeit nach der Leitlinienempfehlung für das sporadische Mammakarzinom (22).

Im Zuge primärer präventiver Maßnahmen kann eine beidseitige prophylaktische Mastektomie erwogen werden, welche die brustkrebsspezifische Letalität um 90 % senken kann (23). Eine Reduktion der Gesamtmortalität um 75 % konnte für eine prophylaktische beidseitige Salpingo-Oophorektomie (PBSO) gezeigt werden, die in der Regel um das 40. Lebensjahr empfohlen wird (24). Es liegen jedoch auch neuere Studien vor, in denen der Nutzen einer prophylaktischen beidseitigen Salpingo-Oophorektomie kontrovers diskutiert wird (23, 25).

1.2.2. Weitere Risikofaktoren

Die Inzidenz einer Brustkrebserkrankung steigt, wie die der meisten epithelialen Tumoren, mit dem Alter, so dass zunehmendes Alter einen wichtigen Risikofaktor darstellt (2). Darüber hinaus gibt es neben Lebensalter und genetischer Disposition weitere bedeutende Risiko- und Prädispositionsfaktoren. Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko wird bei früher Menarche, später Menopause, Kinderlosigkeit oder einer geringen Anzahl von Kindern sowie einem höheren Alter bei der ersten Geburt beobachtet (26, 27). Das Stillen wird im Allgemeinen als protektiver Faktor angesehen, wenngleich nicht in dem starken Ausmaß wie bislang angenommen. Außerdem scheint die protektive Wirkung auf eine lange Stillzeit bezogen zu sein (28). Während in der Vergangenheit angenommen wurde, dass die Einnahme oraler Kontrazeptiva ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Manifestation einer Brustkrebserkrankung darstellt, gehen neuere Studien von einer nur sehr geringen Risikosteigerung aus (29, 30). Eine postmenopausale Hormonersatztherapie soll ebenfalls mit einem gesteigerten Risiko für Mammakarzinome einhergehen. In diesem Zusammenhang ist die Dauer der Substitution entscheidend und ob eine alleinige Therapie mit Östrogen oder eine Kombinationstherapie mit Östrogen und Progesteron erfolgte (31-33).

Zu den modifizierbaren Risikofaktoren gehört der Einfluss von Übergewicht auf das Brustkrebsrisiko, welcher vom Menopausenstatus abhängig zu sein scheint. In einer

Studie konnte gezeigt werden, dass ein Gewichtsverlust nach der Menopause mit einer Reduktion des Mammakarzinom-Risikos einhergeht (34).

Ansonsten sind körperliche Aktivität, eine mediterran orientierte Ernährung mit wenig Fleisch und Verzicht bzw. Reduktion von Alkohol- und Nikotinkonsum als förderlich im Hinblick auf eine Risikoreduktion anzusehen (35-37).

1.3. Therapieoptionen

Es stehen unterschiedliche Therapiemöglichkeiten zur Behandlung eines Mammakarzinoms zu Verfügung. Für jeden betroffenen Patienten kann im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz ein individualisiertes Therapiekonzept entwickelt werden, welches sich nach dem Ausmaß der Erkrankung und nach dem Risikoprofil richtet. Grundsätzlich kommen operative, chemotherapeutische und strahlentherapeutische Behandlungsansätze in Frage, welche einzeln oder in kombinierter Form angewendet werden. Eine medikamentöse endokrine Therapie kommt bei Hormonrezeptor-positiven Karzinomen zum Einsatz. Außerdem stehen bei positivem Her2/neu-Status Anti-Her2/neu-Antikörper zur Verfügung. Bei metastasiertem Mammakarzinom können Tyrosinkinasase-Inhibitoren oder Angiogenese-Inhibitoren angeboten werden (12).

1.4. Pathologische Diagnostik

1.4.1. Hormonrezeptor-Status

Zur Frage, ob eine endokrine Therapie wirksam ist, muss vor Therapiebeginn bei jedem invasiven Mammakarzinom die Bestimmung des Hormonrezeptor-Status für den Östrogenrezeptor (ER) und den Progesteronrezeptor (PR) eingeleitet werden (38). Die Untersuchungen sollten bereits am stanzbiopsischen Material erfolgen (12). Auf molekularer Ebene unterscheidet man derzeit zwei Formen des ER, den ER-alpha und den ER-beta, von welchen der ER-alpha deutlich besser charakterisiert wurde und bei der routinemäßigen ER-Bestimmung nachgewiesen wird (39). ER-alpha und ER-beta formieren nach Ligandenbildung unter Mitwirkung zahlreicher koregulatorischer Proteine ein aktives Signaltransduktionsmolekül. Dieses ist für die Regulation einer

Reihe von Genen verantwortlich, welche sowohl für Wachstum und Differenzierung des Brustdrüsenepithels als auch für die Tumorgenese von Bedeutung sind (40). Die immunhistochemische Bestimmung des Hormonrezeptor-Status ist heute Standardmethode und wird am Paraffinschnitt mit Hilfe mono- oder polyklonaler Antikörper durchgeführt. Drei robuste und klinisch validierte Antikörper sind SP1, 1D5 und 6F11 (41).

Eine nukleäre Färbereaktion der Tumorzellen wird als positive Reaktion gewertet; eine zytoplasmatische Reaktion gilt als unspezifisch. In die Auswertung fließt der prozentuale Anteil positiver Tumorzellen sowie die kerngebundene Färbeintensität ein. Zur semiquantitativen Bewertung existieren unterschiedliche Scoring-Systeme wie der international anerkannte neunstufige Allred-Score (nach Havery et al.) und das in Deutschland zumeist angewandte siebenstufige Scoring-System nach Remmele und Stenger (Remmele-Score).

Beim Allred-Score ergibt sich der Gesamtscore aus der Summe der beiden erhobenen Einzelscores mit einem maximalen Score von 8 (vgl. Tab. 1). Gesamtscores von 0 – 2 sind als negativ, 3 – 4 als schwach positiv, 5 – 6 als mäßig positiv und 7 – 8 als stark positiv zu bewerten.

Der Gesamtscore des Remmele/Stegner Scoring-Systems ergibt sich aus dem Produkt der Färbeintensität und des prozentualen Anteils positiver Tumorzellen und zeigt einen Maximalwert von 12. Ein Score von 0 gilt als negativer, 1 – 3 als schwach positiver, 4 – 6 als mäßig positiver und 8 – 12 als stark positiver Immunreaktiver Score (IRS). Eine Übersicht gibt Tab. 2., bzw. Abb. 2 und 3.

Punkte	Färbeintensität	Anteil positiver Tumorkerne (%)
0	keine Färbung	Keine Färbung
1	schwache Färbung	< 1
2	mäßige Färbung	1 – 10
3	starke Färbung	11 – 33
4	–	34 – 66
5	–	67 – 100

Tab. 1: Allred-Score (Immunreaktiver Score für den Östrogen- und Progesteronrezeptor)

Punkte	Färbeintensität	Anteil der positiven Kernfärbungen (%)
0	keine Färbung	keine positiven Kerne
1	schwache Färbung	1 – 9
2	mäßige Färbung	10 – 50
3	starke Färbung	50 – 80
4	-	> 80

Tab. 2: Score nach Remmele/Stegner (Immunreaktiver Score für den Östrogen- und Progesteronrezeptor)

1.4.2. Her2/neu-Status

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (Her2/neu oder auch ErbB2 genannt) stellt einen weiteren Angriffspunkt in der medikamentösen Therapie des Mammakarzinoms dar. Von einer Anti-Her2-Therapie profitieren nur Patienten mit einem Karzinom, welche eine Amplifikation dieses Gens oder eine Überexpression des entsprechenden Rezeptors aufweisen. Somit nimmt die Bestimmung des Her2/neu-Rezeptor-Status eine zentrale Stellung ein. Auf molekularer Ebene gehört Her2/neu zur Familie der humanen epidermalen Wachstumsfaktoren, die insgesamt vier Rezeptoren umfasst. Her2/neu stellt einen wichtigen Faktor bei der intrazellulären Signaltransduktion dar. Diese wird durch eine dimerisierungsbedingte Phosphorylierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgelöst und hat je nach Dimerisierungspartner verschiedene Auswirkungen auf Vorgänge wie Angiogenese, Zellmigration, Apoptose und Wachstum (42).

Zur Bestimmung des Her2/-Status haben sich unterschiedliche Testverfahren etabliert. Dazu zählen der immunhistochemische Nachweis des Rezeptors und der Nachweis der Genamplifikation mittels Chromogen-in-situ-Hybridisierung (CISH) oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Welches Verfahren für die primäre Diagnostik gewählt wird, ist fakultativ. Bei unklarem oder grenzwertigem Befund sollte jedoch die jeweils andere Methode als Kontrolle eingesetzt werden, um zu einem eindeutigen Testergebnis zu gelangen (43). Bei der immunhistochemischen Untersuchung werden standardisierte Testkits zur Sicherung von Reproduzierbarkeit und Validität empfohlen. Das anerkannte immunhistochemische Scoring-System umfasst Ergebnisse von 0, 1+, 2+

und 3+. Für einen positiven Score von 3+ müssen über 10% der Tumorzellen eine kräftige, zirkuläre membrangebundene Färbereaktion aufweisen (39, 44).

Die negativen Scorewerte von 0 bzw. 1+ unterscheiden sich darin, ob < 10% oder > 10% der Tumorzellen eine inkomplette Membranfärbung zeigen. Der Score 2+ stellt ein grenzwertiges bzw. unklares Resultat dar und bedarf einer weiteren Überprüfung mittels FISH oder CISH (45). Erforderlich für die Feststellung einer Her2/-Genamplifikation ist ein Her2/CEP17-Quotient von vormals > 2,2 oder mehr als sechs Gensignale pro Tumorzelle. Aktuell liegt die Grenze bei einem Quotienten von 2,0. Auch bei diesen Methoden wurde eine Borderline-Kategorie definiert, welche bei einem Her2/CEP17-Quotient von 1,8 – 2,2 oder bei durchschnittlich vier bis sechs Gensignalen pro Zellkern vorliegt. In diesen Fällen sind weiterführende Untersuchungen zur endgültigen Ermittlung des Her2/neu-Status indiziert. Hierbei kann es sich um eine Wiederholung des Testes oder z.B. um eine zusätzliche Auszählung weiterer Tumorzellen handeln (46, 47).

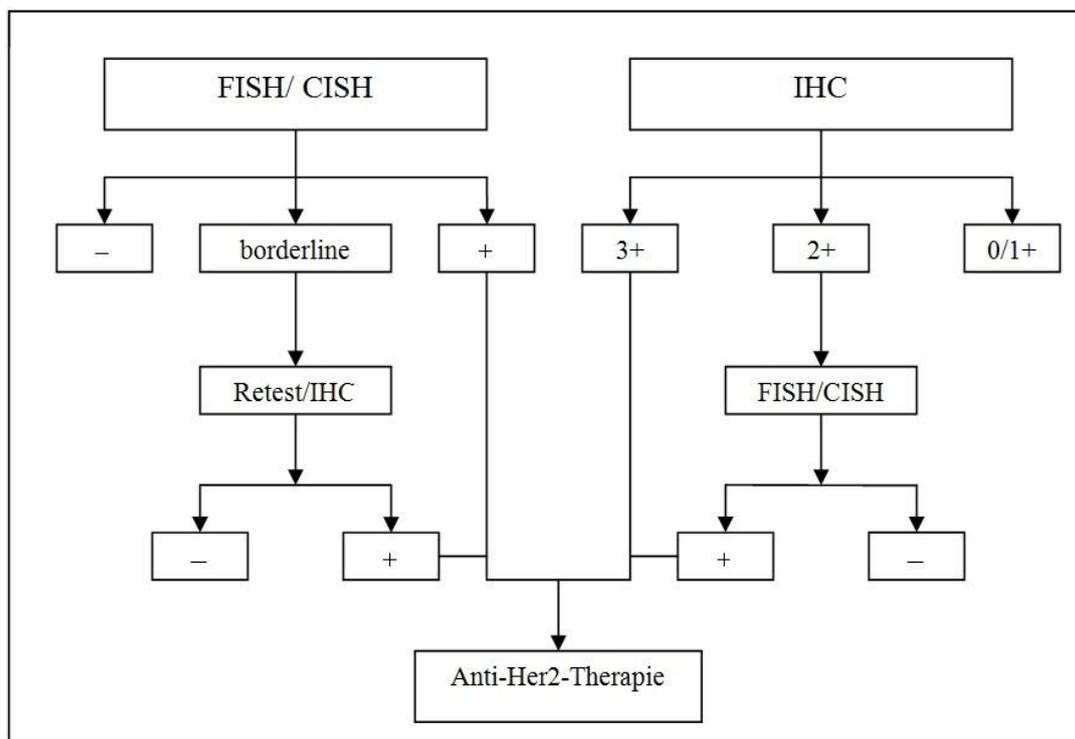


Abb. 1: Testalgorithmus für die Bestimmung des Her2-Status

1.4.3. Proliferationsindex Ki-67

Das Ki-67-Antigen ist ein Protein, welches regulär im Zellkern von Körperzellen und auch in Tumorzellen in den aktiven Phasen des Zellzyklus, einschließlich der Mitosephase, exprimiert wird. In der G0-Phase jedoch ist keine nukleäre Expression erkennbar (48). Am Paraffingewebe können Zellen, welche sich in aktiven Zellzyklusphasen befinden, mit dem paraffingängigen Antikörper MIB1 durch eine positive kerngebundene Färbereaktion sichtbar gemacht werden (49, 50). Der Prozentsatz der Tumorzellen mit immunhistochemischem Nachweis einer MIB1-Protein-Expression wird als Ki-67-Proliferationsindex angegeben (51). Zu einer verbesserten Standardisierung dieser Untersuchungen existieren Empfehlungen der Breast Cancer Working Group (52). Voraussetzung für die Untersuchung ist eine optimale Gewebefixierung. Als positiv zu werten ist ausschließlich eine nukleäre Färbereaktion, unabhängig von der Färbeintensität.

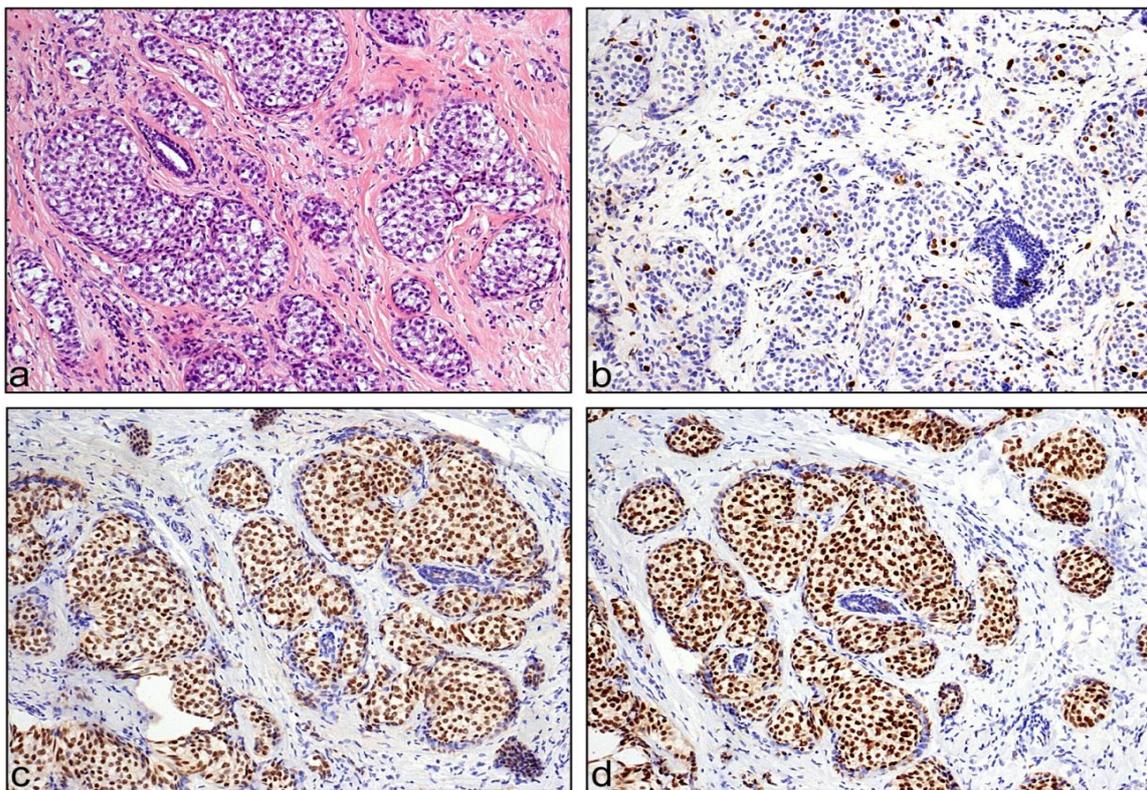


Abb. 2: Luminal A Subtyp. 2a: Mammakarzinom of no special Type (NST) HE-Färbung. 2b: Immunhistochemie Ki-67-Index (<14%). 2c: Immunhistochemie Östrogenrezeptor (ER) IRS 12. 2d: Immunhistochemie Progesteronrezeptor (PR) IRS 12. Alle Aufnahmen 1:100

Zu den quantitativen Anforderungen gehört die Auszählung von mindestens 500 (oder besser 1000) Tumorzellen in mindestens drei high power fields (HPF) bei 40-facher Vergrößerung. In der Übersichtsvergrößerung sollten die HPF so ausgewählt werden, dass sich das gesamte Expressionsspektrum des Tumors darstellt. Auch Areale mit besonders hoher Expression (sog. hot spots) sollten in den Gesamtscore einbezogen werden. Vergleich hierzu auch die Abb. 2 und 3.

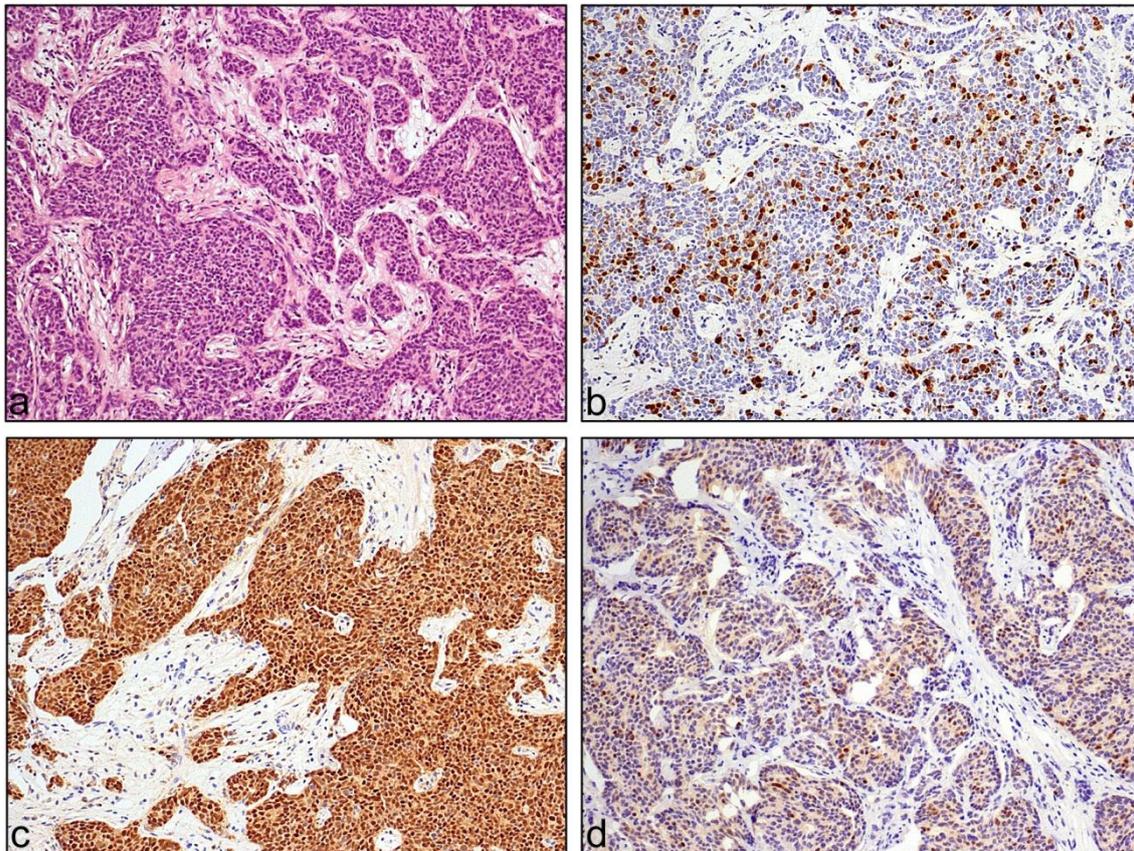


Abb. 3: Luminal-B Subtyp. 3a: Mammakarzinom of no special Type (NST) HE-Färbung. 3b: Immunhistochemie Ki-67-Index (>14%). 3c: Immunhistochemie Östrogenrezeptor (ER) IRS 12. 3d: Immunhistochemie Progesteronrezeptor (PR) IRS 2. Alle Aufnahmen 1:100

1.5. Prognostische und prädiktive Faktoren

Prognostische Faktoren schätzen den Krankheitsverlauf ohne spezielle Therapie ab und korrelieren mit dem natürlichen Verlauf einer Erkrankung.

Prädiktive Faktoren dienen zur Einschätzung der Effektivität einer spezifischen Therapie und sind somit Parameter für ein Therapieansprechen.

Zu den klassischen Prognosefaktoren zählen beim Mammakarzinom neben dem Patientenalter die Tumorgröße, der Nodalstatus und eine Fernmetastasierung (pTNM) sowie der Resektionsstatus und die Sicherheitsabstände (53). Ebenfalls prognostische Bedeutung haben histologischer Differenzierungsgrad (Grading), histologischer Subtyp und Tumoreinbruch in Blut- oder Lymphgefäße (Hämangiosis bzw. Lymphangiosis carcinomatosa) (54-56). Klassische prädiktive Faktoren für eine zielgerichtete adjuvante Therapie sind der Hormonrezeptor-Status für den Östrogen- und den Progesteronrezeptor, der Her2/neu-Status sowie der Menopausenstatus, welcher für den Einsatz einer antiöstrogenen Therapie ausschlaggebend ist (53). Tab. 3 fasst die empfohlenen klassischen prognostischen und prädiktiven Faktoren für eine adjuvante Therapie zusammen.

Prognostische Faktoren
pTNM (Tumorgröße, Nodalstatus, Fernmetastasierung) R-Status (Resektionsrandstatus und Sicherheitsabstände) Histologische Tumordifferenzierung (Grading) Histologischer Subtyp Lymphgefäß- und Blutgefäßeinbruch (Lx, Vx) Alter
Prädiktive Faktoren
Hormonrezeptor-Status (Östrogen- und Progesteronrezeptor) Her2/neu-Status Menopausenstatus

Tab. 3: Die klassischen prognostischen und prädiktive Faktoren für Mammakarzinome

1.5.1. Intrinsische Subtypen

Die molekulare Heterogenität der Mammakarzinome konnte durch Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays nachgewiesen werden. Auf molekularer Ebene konnten so intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms definiert werden, welche deutliche Unterschiede in Krankheitsverlauf und Therapieansprechen aufweisen. Beim Mammakarzinom finden sich zumindest fünf verschiedene molekulare

Subtypen. Tumorbiologisch wird zwischen *luminal A*, *luminal B*, *Her2-positiv* und *basal-like* differenziert (57, 58).

Ferner zählt auch der *normal breast-like* Subtyp dazu (59, 60). Da die Genexpressionsanalysen in der Routinediagnostik nicht praktikabel sind, werden zur Subtypisierung die immunhistochemischen Surrogatparameter ER, PR, Her2/neu und Ki-67 herangezogen (61, 62).

	ER	PR	Ki-67	Her2
<i>luminal A</i>	+	±	niedrig (<14%)	-
<i>luminal B</i> <i>Her2-negativ</i>	+	±	hoch (≥14%)	-
<i>luminal B</i> <i>Her2-positiv</i>	+	±	jeder Wert	+
<i>Her2-positiv</i>	-	-	jeder Wert	+
<i>basal-like</i>	-	-	jeder Wert	-

Tab. 4: Die intrinsischen Subtypen (ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor)

Nach dem St.-Gallen-Konsensus von 2011 folgte die Therapieempfehlung den intrinsischen Subtypen. Bei triple-negativen und Her2-positiven (non-luminalen) Mammakarzinomen ist grundsätzlich eine Chemotherapie induziert, bei positivem Her2/neu-Status zusätzlich eine zielgerichtete Anti-Her2-Therapie (63). Anzumerken ist, dass der die schlechteste Prognose aufweisende *basal-like* Subtyp nicht mit einem triple-negativen Phänotyp gleichgesetzt werden kann. Es besteht zwar eine Überschneidung in 80-90 % der Fälle, dennoch zeichnet sich die Gruppe der Karzinome mit *basal-like* Subtyp durch eine große Heterogenität aus und kann bislang nicht sicher immunhistochemisch identifiziert werden (64). Bei den luminalen Karzinomen wird für den *luminal A* Subtyp eine alleinige endokrine Therapie als ausreichend betrachtet (65). Da die Unterscheidung zwischen *luminal A* und *luminal B* auf der Bestimmung des Ki-67-Proliferationsindex beruht, ist die Indikationsstellung für eine adjuvante Chemotherapie letztendlich von diesem immunhistochemischen Marker abhängig. Jedoch bestehen derzeit keine Standardisierung oder ausreichende Reproduzierbarkeit in

der technischen Durchführung und der Auswertung des Ki-67-Proliferationsindex (52, 66). Ebenfalls problematisch ist, dass kein allgemein akzeptierter Grenzwert für Ki-67 etabliert ist. Folglich sind in der Literatur unterschiedliche Cut-off-Werte zu finden. Dem in St. Gallen 2011 empfohlenen Schwellenwert von 14 % liegt eine einzige retrospektive Studie zugrunde, so dass dieser nicht ausreichend validiert ist (61). Ferner ist bei der Bestimmung des Ki-67-Index eine hohe Intra- und Interobserver-Varianz zu beobachten (67). Gemäß den aktuellen S3-Leitlinien soll der Marker Ki-67 nicht als alleinige Entscheidungsgrundlage für eine systemische Therapie bei Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen angewendet werden (12).

1.5.2. 21-Gen-Test OncotypeDX®

Bei Mammakarzinomen, die anhand ihres intrinsischen Subtyps der luminalen Kategorie zugeordnet werden (Her2-negativ, Hormonrezeptor-positiv), ist die Selektion der Patientinnen, welche neben der indizierten endokrinen Therapie zusätzlich eine adjuvante zytotoxische Therapie benötigen, auf alleiniger Grundlage der erhobenen klinisch-pathologischen Faktoren häufig nicht möglich. Eine Übertherapie ohne belegbaren Nutzen, bei der die teils gravierenden Nebenwirkungen einer Chemotherapie dominieren, sollte dringend vermieden werden. Andererseits muss sichergestellt werden, dass von einer Chemotherapie profitierende Patientinnen einer solchen auch zugeführt werden. Vor diesem Hintergrund wurde vor etwas mehr als zehn Jahren damit begonnen, Multigen-Tests zu entwickeln und zu etablieren, welche in der Lage sind, das individuelle Rezidivrisiko der einzelnen Patientin genauer abzuschätzen als dies mit den klassischen klinisch-pathologischen Parametern erreicht werden kann (68, 69). Zu den in Deutschland verfügbaren Multigen-Tests zählt OncotypeDX® neben den drei weiteren kommerziell erhältlichen Tests Mammaprint®, EndoPredict® und Prosigna®-Assay.

Bei OncotypeDX® handelt es sich um einen 2004 in den USA entwickelten 21-Gen-Assay, welcher seit 2009 in Europa verfügbar ist und zum aktuellen Zeitpunkt eine umfassende Datenlage aufweist (70, 71). Die Untersuchung erfolgt an nach Formalinfixierung in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe, wie es im Rahmen der Routinediagnostik vorliegt. Somit sind weder ein erneuter operativer Eingriff noch besondere logistische Maßnahmen wie bei der Verwendung von frischem oder

schockgefrorenem Gewebe notwendig (72). Das Paraffingewebe wird über ein nationales Verbindungszentrum in Frankfurt am Main in ein zentrales Labor in den USA versandt, in welchem die standardisierte und qualitätskontrollierte Analyse durchgeführt wird. Mittels quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wird die Expression eines Panels von 21 Genen im Tumorgewebe untersucht. Dabei handelt es sich um 16 Krebs-assoziierte Gene, welche unter anderem die Regulation von Proliferation, Invasion sowie den Östrogenrezeptor und den Her2/neu-Signalweg beeinflussen, daneben werden fünf weitere Referenzgene mit diesem Test erfasst. (73, 74)

Gruppe	Gene
Proliferation	Ki-67, STK15, Survivin, Cyclin B1, MYBL2
Invasion	Stromelysin 3, Cathepsin L2
Her2	GRB7, HER-2
Östrogen	ER, PR, Bcl2, SCUBE2
andere	GSTM1, BAG1, CD68
Referenzgene	β-Actin, GAPDH, RPLPO, GUS, TFRC

Tab. 5: Übersicht der 21 untersuchten Gene des OncotypeDX®-Tests

Die relativen Expressionswerte der Tumor-assoziierten Gene zu den Referenzgenen werden zu einem Expressionsmuster zusammengefasst, auf dessen Grundlage der numerische Recurrence-Score mittels eines empirisch ermittelten Algorithmus berechnet werden kann. Der Recurrence-Score kann Werte zwischen 1 und 100 annehmen. Jeder Punktwert steht für ein definiertes Rezidivrisiko innerhalb von 10 Jahren ab Zeitpunkt der Erstdiagnose. Es erfolgt eine Einteilung in drei Risikogruppen, welche für die klinische Validierung festgelegt wurden: „low risk“ (RS < 18), „intermediate risk“ (RS 18 - 30) und „high risk“ (RS ≥ 31). Das mittlere 10-Jahres-Rezidivrisiko wurde für die „niedrig“-Risikogruppe mit 6,8 %, für die „mittlere“-Risikogruppe mit 14,3 % und für die „hoch“-Risikogruppe mit 30,5 % angegeben (75). Ein deutlicher Nutzen für eine adjuvante Chemotherapie konnte für Patientinnen der „hoch“-Risikogruppe gezeigt werden, wohingegen Patientinnen mit mittlerem oder niedrigem Recurrence-Score nur kaum oder gar nicht von einem zytotoxischen Therapieschema profitierten (76). Die klinische Validierung erfolgte retrospektiv, zumeist an Patientenkollektiven aus prospektiven randomisierten Studien

(77). Die prognostische Bedeutung des Tests durch Abschätzung des Rezidivrisikos konnte in mehreren Studien belegt werden.

So konnte in der NSABP-B14-Studie gezeigt werden, dass anhand des Recurrence-Scores eine verlässliche Aussage über das Rückfall-Risiko 10 Jahre nach Erstdiagnose in einem mit Tamoxifen behandelten Patientenkollektiv mit Östrogenrezeptor-positivem, nodal-negativem Mammakarzinom möglich ist (75). Die ATAC-Studie konnte die prognostische Aussagekraft des Tests bei postmenopausalen, sowohl nodal-positiven als auch nodal-negativen Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiver Erkrankung belegen, welche eine adjuvante endokrine Therapie mit Tamoxifen oder Anastrozol erhielten (78). Durch die Daten weiterer Studien konnte der Recurrence-Score als unabhängiger prognostischer Marker bestätigt werden (79, 80). Neben der prognostischen Bedeutung konnte auch die prädiktive Bedeutung des Tests hinsichtlich des Nutzens einer adjuvanten Chemotherapie durch die Studienlage untermauert werden. In der SWOG-S8814-Studie konnte ein Zusammenhang zwischen dem Recurrence-Score-Ergebnis und dem Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie bei postmenopausalen, nodal-positiven Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom gezeigt werden (81). Auch die NSABP-B20-Studie konnte diesen Zusammenhang darstellen, wobei hier ein nodal-negatives Patientenkollektiv vorlag (76). Durch vier große, derzeit parallel laufende prospektive Studien (TailorX, RxPONDER, ADAPT und WSG-PlanB) sollen gezielte klinische Fragen wie die Wertigkeit einer adjuvanten Therapie bei Patientinnen der mittleren Risikogruppe beantwortet werden (77).

In den deutschen AGO-Leitlinien wird der Einsatz des Testes bei Her2/neu-negativen, Hormonrezeptor-positiven Patienten mit nodal-negativer Erkrankung oder bis zu drei befallenen Lymphknoten in sogenannten Grenzfällen empfohlen, wenn anhand der üblichen klinisch-pathologischen Risikostratifizierung eine eindeutige Therapieentscheidung nicht möglich ist (82).

1.5.3. Weitere Genexpressions-Tests

Neben OncotypeDX® sind in Deutschland drei weitere Genexpressions-Tests kommerziell erhältlich. Mammaprint®, der erste dieser Gentests, ist eine generierte Genexpressionssignatur von 70 Genen auf der Basis von DNA-Microarrays, welcher

zunächst für tiefgefrorenes Tumorfrischgewebe entwickelt wurde (68). Erst später folgte eine methodische Validierung für den Einsatz an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe (83, 84). Hinsichtlich des Rezidivrisikos werden zwei Risikogruppen unterschieden (hoch vs. niedrig). Knauer et al. konnten in einer Studie die prädiktive Bedeutung des Tests für eine adjuvante Chemotherapie zeigen (85). Zugelassen ist der Test für nodal-negative oder niedrig nodal-positive (bis zu drei befallene Lymphknoten), Hormonrezeptor-negative oder -positive Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und einer Tumorgröße unter 5 cm (86). Der Blueprint®, ein die molekularen Subtypen definierender 80-Gen-Test, stellt eine Weiterentwicklung des Mammaprint® dar (87).

Mittels qRT-PCR werden beim 11-Gen-Test EndoPredict® acht Tumor- und drei Referenzgene an Paraffingewebe abgedeckt. Die Testung kann aufgrund des robusten Testsystems dezentral erfolgen (88-90). Anhand des EPclin-Score, welcher die klinischen Parameter Tumorgröße und Nodalstatus mit berücksichtigt, wird eine „hoch“- und eine „niedrig“-Risikogruppe definiert. Zunächst erfolgte eine Validierung dieses prognostischen Tests an einem Patientenkollektiv, welches mit einer reinen endokrinen Therapie behandelt wurde (91, 92). Danach wurde eine Evaluierung chemotherapeutisch behandelter Patientinnen in der GEICAM9906-Studie angeschlossen (93). Neben der Vorhersage einer Rezidiv-Wahrscheinlichkeit innerhalb der ersten fünf Jahre konnte auch eine Erfassung von Spätrezidiven bzw. späten Metastasen registriert werden (94).

Der Prosigna®-Test umfasst 50 Gene (PAM50), anhand derer mittels qRT-PCR die intrinsischen Subtypen (*luminal A*, *luminal B*, *Her2 positiv*, *basal-like*) klassifiziert werden können. Der Test erlaubt eine dezentrale Durchführung an Paraffingewebe (95, 96). Der resultierende Risk of Recurrence-Score (ROR-Score), welcher mit der 10 Jahres-Rezidiv-Wahrscheinlichkeit einhergeht, integriert neben dem Genexpressionsmuster auch klinische Parameter (u.a. die Tumorgröße) und nimmt Werte zwischen 0 und 100 an. Es werden drei Risikogruppen (niedrig, mittel, hoch) definiert, wobei die „niedrig“-Risikogruppe ein Rezidivrisiko von 2,4 % nach fünfjähriger Hormontherapie zeigte (90). Die Kollektive der TransATAC- und der ABCSG8-Studie, welche insgesamt 2292 rein endokrin therapierte Patientinnen

umfasste, wurden für eine prospektiv-retrospektive Validierung des Tests herangezogen (97). Es handelt sich somit bislang um einen prognostischen Test.

Die vier beschriebenen Gensignaturen sowie die proteinbasierte Messung von uPA/PAI ermöglichen eine differenziertere Risikoabschätzung des Krankheitsverlaufs des einzelnen Patienten und sind allesamt kommerziell in Deutschland verfügbar. Allerdings verfügen die Multigen-Tests über unterschiedliche Evidenzgrundlagen. Die Entscheidung über das zum Einsatz kommende Testverfahren kann auf Grundlage der Evidenz der klinischen und methodischen Validierung erfolgen. Trotz der beschriebenen Konkordanz zwischen den verschiedenen Assays besteht keine exakte Korrelation der Testergebnisse, so dass die simultane Anwendung mehrerer Testverfahren eine unterschiedliche Beurteilung des Rezidivrisikos ergeben kann (98-100). Mehrfachtestungen sollten daher kritisch abgewogen werden.

1.5.4. Biomarker uPA/PAI

Die Serinprotease Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1 (PAI-1) gehören als Bestandteil des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Systems (uPAS) zum fibrinolytischen System (101). Das Zymogen Plasminogen wird durch uPA in seine aktive Form (Plasmin) überführt, welche ihrerseits andere Proteine aktivieren kann und proteolytisch wirksam ist (102). Der spezifische Inhibitor PAI-1 spielt eine Rolle bei der Regulation der proteolytischen Aktivität von uPA (103). PAI-1 wirkt aber nicht nur als Inhibitor, sondern ist an zahlreichen weiteren Prozessen wie Zelladhäsion und -migration, Angiogenese, Signaltransduktion sowie Apoptose beteiligt (104, 105). Die beiden Faktoren uPA und PAI spielen über eine Interaktion mit Bestandteilen der Basalmembran, der extrazellulären Matrix und durch lokale Proteolyse eine wichtige Rolle bei der Tumorinvasion und der Metastasierung (106-109).

Für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von uPA und PAI im Tumorgewebe mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und einem erhöhten Rückfallrisiko einhergehen (110). Im Vergleich zu Brustkrebspatientinnen mit niedrigen Konzentrationen von uPA und PAI zeigten solche mit erhöhten Werten für einen oder beide Faktoren ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko und damit einhergehend

auch insgesamt schlechtere Überlebensraten (111). In mehreren Studien konnte eine von klinisch-pathologischen Kriterien unabhängige prognostische Bedeutung für die Marker uPA/PAI dargelegt werden (112-114). Die uPA/PAI-Testung erreichte das höchste Evidenzlevel (Level of evidence 1) und wurde in die S3-Leitlinien und die AGO Empfehlungen aufgenommen. Die Untersuchung wird bei nodal- und Her2/neu-negativem Mammakarzinom mit histologischem Differenzierungsgrad G2 empfohlen. Patientinnen, deren Testergebnis für ein niedriges Rezidivrisiko spricht, kann so eine adjuvante Chemotherapie erspart werden, da deren Nutzen die eventuell auftretenden, teils schweren Nebenwirkungen einer zytotoxischen Therapie nicht überwiegt. Patienten mit hohen Werten von uPA und/oder PAI profitieren hingegen von einer adjuvanten Chemotherapie (111).

Für die Untersuchung ist nur frisches oder tiefgefrorenes Tumorgewebe geeignet. Mittels ELISA-Tests (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wird die Konzentration der beiden Faktoren gemessen und bezogen auf die Protein- Gesamtmenge angegeben. Der Schwellenwert zur Einteilung in die Gruppen mit niedrigem oder hohem Risiko beträgt für uPA 3 ng/mg und für PAI 14 ng/mg Gesamtprotein (115, 116).

Bislang ist nur die Bestimmung mittels ELISA validiert, es bestehen aber auch Bestrebungen, immunhistochemische Assays für formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe zu entwickeln. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die mittels immunhistochemischer Untersuchungen bestimmten uPA/PAI-Werte signifikant mit den Werten eines validierten ELISA korrelierten (117).

Die vier beschriebenen Gensignaturen sowie die proteinbasierte Messung von uPA/PAI ermöglichen eine differenziertere Risikoabschätzung des Krankheitsverlaufs des einzelnen Patienten und sind allesamt kommerziell in Deutschland verfügbar. Allerdings verfügen die Multigen-Tests über unterschiedliche Evidenzgrundlagen. Die Entscheidung über das zum Einsatz kommende Testverfahren kann auf Grundlage der Evidenz der klinischen und methodischen Validierung erfolgen. Trotz der beschriebenen Konkordanz zwischen den verschiedenen Assays besteht keine exakte Korrelation der Testergebnisse, so dass die simultane Anwendung mehrerer Testverfahren eine unterschiedliche Beurteilung des Rezidivrisikos ergeben kann (118-120). Mehrfachtestungen sollten daher auch in Hinsicht auf die Kosten kritisch abgewogen werden.

2. Patienten und Methoden

Es wurden 50 Fälle eines neu diagnostizierten Mammakarzinoms untersucht, bei denen auf Grundlage der klinischen und pathologisch erhobenen tumorbiologischen Daten unklar war, ob die betroffenen Patientinnen von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren würden. Dabei handelte es sich um Hormonrezeptor-positive, Her2/neu-negative Karzinome der Brust, welche zum Diagnosezeitpunkt entweder keine Lymphknotenmetastasen zeigten oder einen niedrigen Nodalstatus aufwiesen, speziell einen pathologischen Nodalstatus von pN1a, welcher einen bis maximal drei befallene axilläre Lymphknoten einschließt.

Diese 50 retrospektiv in die Studie eingeschlossenen Fälle wurden im Zeitraum 2013 bis 2016 im Brustzentrum der Frauenklinik des Leopoldina Krankenhauses in Schweinfurt behandelt, welches ein von der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Senologie zertifiziertes und empfohlenes Behandlungszentrum für Patientinnen mit Erkrankungen der Brust ist. Das Qualitätsmanagement wurde nach DIN ISO 9001:2000 durch den TÜV geprüft. In allen Fällen erfolgte im Rahmen der Behandlung eine OncotypeDX®-Testung.

2.1. Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte anhand der Krankenakten, der Tumorkonferenzprotokolle und der pathologischen Befunde, einschließlich der Ergebnisse der durchgeführten OncotypeDX®-Untersuchung und einer gegebenenfalls ergänzend eingeleiteten uPA/PAI-Bestimmung.

Diese Arbeit erfolgte nach den Richtlinien der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg. Ein Votum der Kommission war für die vorliegende Analyse nicht erforderlich, da die Daten retrospektiv ausgewertet und in anonymisierter Form dargestellt wurden, so dass aus den Ergebnissen keine Rückschlüsse auf die einzelnen Patientinnen mehr möglich sind (95).

Die folgenden Daten wurden erhoben:

- Alter bei Diagnosestellung
- Zeitpunkte der Tumorkonferenzen
- Dauer der intraoperativen Schnellschnittuntersuchung
- Dauer des endgültigen pathologischen Befundes
- Art und Zeitpunkt der operativen Therapie
- Schnellschnittuntersuchung ja/nein
- Sentinel-Node-Biopsie ja/nein
- Betroffene Brust links/rechts
- Tumorgroße in cm
- Tumor-Subtyp
- Tumor-Differenzierung
- pTNM-Klassifikation
- Anzahl der entfernten und befallenen Sentinel-Lymphknoten
- Anzahl der insgesamt entfernten und befallenen axillären Lymphknoten mit abschließendem Nodalstatus
- Resektionsstatus
- Begleitende in situ-Läsion
 - histologischer Subtyp (DCIS/LCIS)
 - Differenzierung
 - Ausbreitungsmuster
- Immunhistochemische Bestimmung des Hormonrezeptor-Status für den Östrogen- und den Progesteronrezeptor

- Immunhistochemische Bestimmung des Her2/neu-Status sowie bei unklarem Befund das Ergebnis der angeschlossenen FISH-Analyse.
- Immunhistochemische Bestimmung des proliferationsassoziierten Ki-67-Index
- Ergebnisse der OncotypeDX®-Testung
- Ggf. Ergebnisse der uPA/PAI-Testung

2.1.1. Immunhistochemische Untersuchungen

Die Bestimmung des Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status sowie des proliferationsassoziierten Index Ki-67 erfolgten durch immunhistochemische Untersuchungen am Tumorstückpräparat mit den entsprechenden Antikörpern am Institut für Pathologie des Leopoldina Krankenhauses Schweinfurt. Die Qualitätssicherung wurde über eine erfolgreiche Teilnahme an jährlich durchgeführten Ringversuchen zur Hormonrezeptor- und Her2/neu-Bestimmung unter dem Dach der deutschen Gesellschaft für Pathologie und dem Berufsverband Deutscher Pathologen gewährleistet. Die Färbungen erfolgten für den Östrogenrezeptor mittels des Antikörpers 1D5 und für den Progesteronrezeptor mittels PgR363 (beide DAKO). Zur Ermittlung des Hormonrezeptor-Status wurde der immunreaktive Score nach Remmele verwendet, welcher sich aus dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellen und der Färbeintensität berechnet. Bei immunhistochemisch nicht eindeutigen Ergebnissen der Her2/neu-Analyse wurde, wie in diesen Fällen üblich, eine ergänzende FISH-Analyse eingeleitet, welche im Pathologischen Institut der Universität Würzburg durchgeführt wurde. Der proliferationsassoziierte Marker Ki-67 wurde mithilfe des entsprechenden Antikörpers MIB-1 ebenfalls immunhistochemisch untersucht und ergab sich aus dem prozentualen Anteil der positiven nukleären Färbereaktion der Tumorzellen. Es erfolgte eine standardisierte Färbung im Bondmax-Vollautomat (Leica) mit 4 % gepuffertem Formalin, wobei das Gewebe gemäß der Herstellerempfehlung mindestens sechs Stunden fixiert wurde.

2.1.2. OncotypeDX®-Testung

Voraussetzung für die OncotypeDX®-Bestimmung ist ein Hormonrezeptor-positives, Her2/neu-negatives, nodal-negatives bzw. limitiert nodal-positives Mammakarzinom. Diese Bedingungen wurden von allen in die Beobachtung einbezogenen Tumoren erfüllt. Weiterhin erforderlich war eine schriftliche Einwilligung der Patientin. Im Rahmen einer wöchentlich abgehaltenen interdisziplinären Tumorkonferenz wurde die OncotypeDX®-Testung beschlossen und anschließend durch den Pathologen veranlasst. Hierzu wurden 15 ungefärbte Paraffin-Schnittpräparate des Tumorgewebes auf nicht beschichteten Objektträgern oder wahlweise ein Paraffinblock des Tumors zur zentralen Untersuchung im Genomic Health Laboratory versandt. Das Ergebnis lag im Schnitt nach zehn Tagen in Form eines einheitlichen schriftlichen Befundes vor, welcher den ermittelten Recurrence-Score beinhaltet. Anhand des Recurrence-Scores erfolgte die Einteilung in Erkrankungen mit niedrigem, mittlerem oder hohem Rezidivrisiko. An einem Schaubild konnte das daraus resultierende 10-Jahres-Rezidivrisiko bzw. die Mortalität bei gleichzeitig durchgeführter endokriner Therapie abgelesen werden (vgl. Abb. 4)

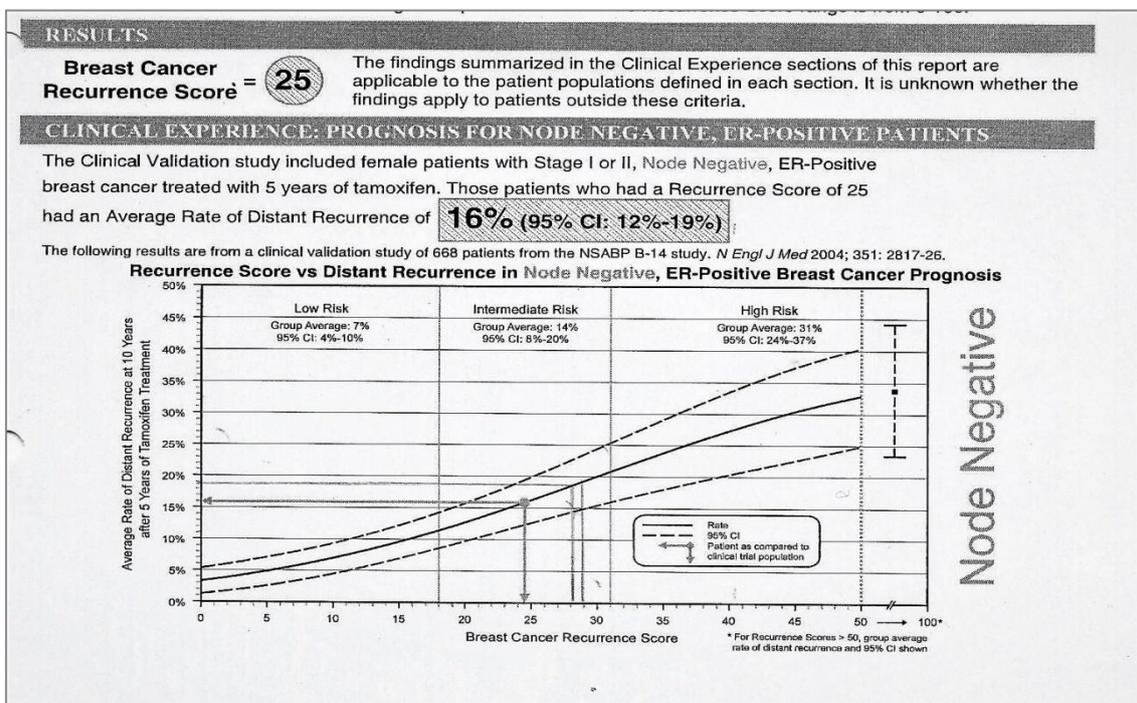


Abb. 4: Beispiel für ein OncotypeDX®-Test-Ergebnis (Recurrence-Score RS = 25, entsprechend einem „intermediate risk“)

Ferner wurden die mittels qRT-PCR-Verfahren ermittelten Ergebnisse für den Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status angegeben, welche ebenfalls in den Recurrence-Score mit einfließen.

In der Tumorkonferenz erfolgte nach Entscheidung für eine OncotypeDX®-Testung und vor Kenntnis des Testergebnisses eine Abstimmung, ob bei den jeweiligen Fällen aufgrund des klinisch-pathologischen Risikoprofils eine adjuvante Chemotherapie angeschlossen werden sollte. Diese vorläufige Entscheidung wurde unter Angabe des Abstimmungsergebnisses im Tumorkonferenz-Protokoll schriftlich festgehalten. Nach Vorliegen des Ergebnisses des OncotypeDX®-Tests wurde diese Therapieempfehlung bestätigt oder revidiert, so dass ein Vergleich des Votums vor und nach OncotypeDX®-Analyse erfolgen konnte.

2.1.3. uPA/PAI-Testung

In der Hälfte der Fälle (n=25) wurde ergänzend die Bestimmung der Konzentrationen des Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und des Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) durchgeführt. Voraussetzungen für diese Untersuchung sind Mammakarzinome mit einem mäßigen Differenzierungsgrad (G2) und ein negativer Lymphknoten-Status. Da die Testung an formalinfixiertem Paraffingewebe nicht möglich ist, wurde im Zuge der Schnellschnittuntersuchung Tumorfrischgewebe entnommen, kryoasserviert und zeitnah versandt. Das Verfahren setzt somit eine gewisse Tumorgöße (i.d.R. etwa 1,5 cm) voraus, so dass trotz Entnahme von Tumorgewebe die weiterführende pathologische Diagnostik gewährleistet bleibt. Das Ergebnis lag im Schnitt nach 5 Tagen in Form eines schriftlichen Befundes vor. Der Cut-off Wert für uPA-Konzentrationen, welche mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergehen, liegt bei ≥ 3 ng/mg Gesamtprotein, der für seinen Inhibitor PAI bei ≥ 14 ng/mg Gesamtprotein.

2.2. Statistik

Die oben aufgeführten Daten wurden für das Gesamtkollektiv erhoben, wobei für stetige Merkmale das arithmetische Mittel, definiert als Summe aller beobachteten Werte, dividiert durch die Gesamtzahl der Beobachtungen und als Streumaß die Standardabweichung angegeben wurde. Bei nicht stetigen Daten erfolgte die Angabe in Prozent (%). Ferner wurden der minimale und der maximale gemessene Wert ermittelt.

2.3. Ziel der Arbeit

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

- Ergibt sich bei der OncotypeDX®-Bestimmung eine gleichmäßige Verteilung der Recurrence-Score?
- Lässt sich anhand der Faktoren Alter, Tumorgröße, histologischer Differenzierungsgrad, Lymph- und Blutgefäßinvasion eine Vorhersage des Recurrence-Score erzielen?
- Lässt sich anhand der tumorbiologischen Daten (Hormonrezeptor-Status, Ki-67-Index) eine Vorhersage des Recurrence-Score erzielen?
- Zeigen sich immunhistochemisch und in der RNA-Expressions-Analyse im Zuge der OncotypeDX®-Testung vergleichbare Werte für die Östrogen- und den Progesteronrezeptor (ER, PR)?
- Ergibt sich aufgrund des OncotypeDX®-Ergebnisses eine Änderung in der Entscheidung über eine adjuvante Chemotherapie?
- Zeigen sich bei der Bestimmung von uPA/PAI und der OncotypeDX®-Testung (Recurrence-Score) ähnliche Ergebnisse?

3. Ergebnisse

3.1. Charakteristika des Gesamtkollektivs

3.1.1. Altersstruktur

Das vorliegende Kollektiv ($n = 50$) bestand ausschließlich aus Frauen, welche bei Diagnosestellung im Mittel $53,6 \pm 11$ Jahre alt waren (Median 63 Jahre). Die jüngste untersuchte Patientin war 28-jährig, die älteste 73 Jahre alt.

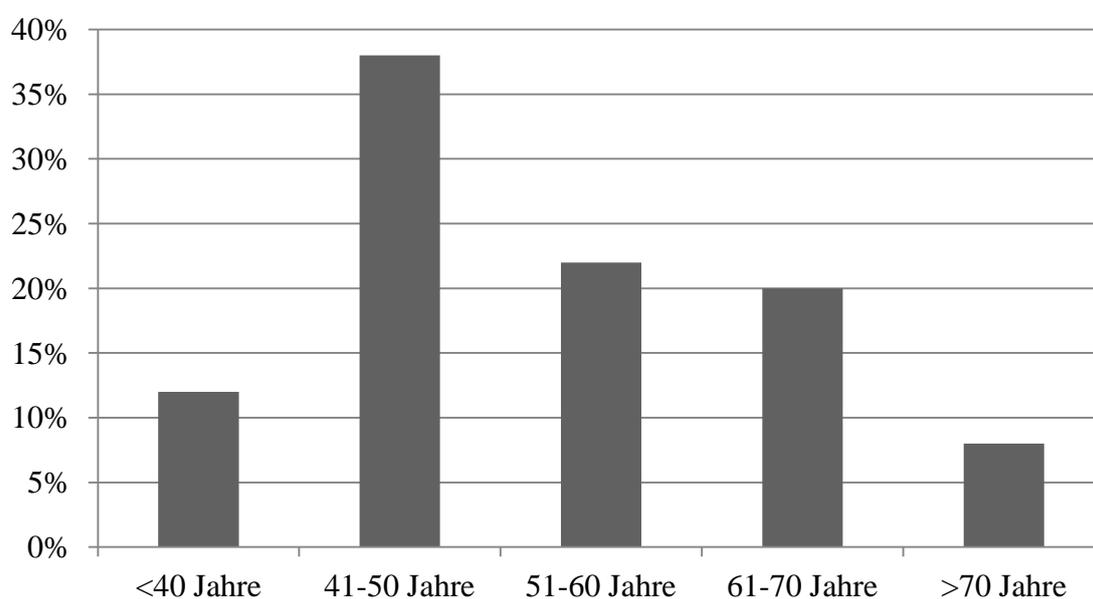


Abb. 5: Altersverteilung des Gesamtkollektivs

Wie in Abb. 5 zu erkennen ist, bilden die 41 - 59-jährigen Patientinnen mit 38 % ($n = 19$) die größte untersuchte Gruppe, gefolgt von den 51 - 49 Jahre alten Patientinnen ($n = 11$, 22 %). Zehn Patientinnen (20 %) waren bei Diagnosestellung zwischen 61 und 70 Jahre alt. In 12 % der Fälle waren die Patientinnen jünger als 40 Jahre ($n = 6$). Die kleinste Gruppe bildet mit 8 % der Fälle ($n = 4$) das Kollektiv der ältesten Patientinnen, welche zum Diagnosezeitpunkt älter als 70 Jahre alt waren.

3.1.2. Operative Therapie

Es erfolgte eine S3-Leitlinien-gerechte Therapie in einem zertifizierten Brustzentrum, welche die Vorstellung und interdisziplinäre Therapieentscheidung in einer wöchentlich abgehaltenen Tumorkonferenz miteinschloss.

Alle Patientinnen erhielten eine primär kurative operative Therapie, wobei überwiegend (in 74 % der Fälle, n = 37), eine brusterhaltende Operation (BET) durchgeführt wurde.

Operation	Anzahl der Patienten (n)	Prozent (%)
BET	37	74
Subkutane Mastektomie	6	12
Mastektomie	7	14

Tab. 6: Operative Therapie

In 12% der Fälle (n = 6) erfolgte eine subkutane Mastektomie. Sieben Patientinnen (14 %) erhielten eine Mastektomie. Fast durchgehend (98 %) erfolgte eine histologische Schnellschnittuntersuchung der Operationspräparate zur Frage des Resektionsstatus. Im Mittel betrug die Schnellschnittdauer vom Eingang des Operationspräparates bis zur telefonischen Ergebnisübermittlung 24,6 Minuten und umfasste eine minimale Zeitspanne von 14 Minuten bis maximal 45 Minuten. Anschließend erfolgte die pathologische Untersuchung des formalinfixierten Gewebes der Mammasegment-Resektate oder Mastektomiepräparate und der ebenfalls eingegangenen erweiterten axillären Lymphknotendissektate bei positivem Lymphknotenbefall im Schnellschnitt. Der endgültige pathologische Befund erging in der Regel nach einem bis drei Tagen, im Mittel nach 1,3 Tagen.

3.1.3. Histologische Subtypen und Carcinoma in situ

Im pathologischen Befund wurde leitliniengerecht eine Subklassifizierung anhand der Tumormorphologie vorgenommen. Im vorliegenden Kollektiv fand sich erwartungsgemäß am häufigsten (n = 44, 88 %) ein invasives Mammakarzinom of no special Type (NST). In 10 % der Fälle (n = 5) wurde ein invasiv-lobuläres Mammakarzinom diagnostiziert. Ein tubulo-lobulärer Subtyp kam in einem Fall vor.

Eine tabellarische Darstellung findet sich im Folgenden (Tab. 7). In knapp über der Hälfte der Fälle (58 %) war die linke Brust betroffen.

Histologischer Subtyp	Anzahl der Patienten (n)	Prozent (%)
Mammakarzinom NST	44	88
invasiv lobulär	5	10
tubulo-lobulär	1	2

Tab. 7: Histologische Subtypen

Eine begleitende In-situ-Komponente fand sich in knapp über der Hälfte der Fälle (56 %), wobei es sich mehrheitlich um ein duktales Carcinoma in situ (DCIS) handelte (n = 25). Deutlich seltener (10,7 %) wurde ein koexistentes lobuläres Carcinoma in situ (CLIS) diagnostiziert. Die Differenzierungsgrade und Ausbreitungsmuster der Vorläuferläsionen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 8).

	Anzahl der Patienten (n)	Prozent (%)
Carcinoma in situ	28	56,0
DCIS	25	89,3
LCIS	3	10,7
G1	10	35,7
G2	10	35,7
G3	8	28,6
peritumoröse Ausbreitung	17	60,7
Extensive Disease	6	21,4

Tab. 8: Charakteristika der In situ Komponente

3.1.4. Tumorstadium

Das pathologische Tumorstadium der pTNM-Klassifikation ist von der Tumorgöße abhängig. Im vorliegenden Gesamtkollektiv fand sich eine mittlere Tumorgöße von $2 \pm 0,9$ cm. Der kleinste untersuchte Karzinomherd hatte eine Größe von 0,6 cm, der größte zeigte eine Ausdehnung von 5,5 cm. Bei einer multizentrischen oder multifokalen Erkrankung wurde die Größe aller vorhandenen Tumorherde angegeben oder zumindest die maximale Ausdehnung des größten Herdes. Im hier untersuchten

Patientengut fand sich in elf Fällen (22 %) ein multizentrisches Karzinom. In der pathologischen T-Klassifikation weist ein pT(m)-Stadium auf eine multizentrische oder multifokale Erkrankung hin. Eine Übersicht der erhobenen Tumorstadien zeigt Tab. 9.

Tumorstadium	Anzahl der Patienten (n)		Prozent (%)	
pT1b	2		4	
pN1c	19	25	38	50
pT1c(m)	6		12	
pT2	17	22	34	44
pT2(m)	5		10	
pT3	1		2	

Tab. 9: Tumorstadien

3.1.5. Nodalstatus, Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa

Zur Bestimmung des Nodalstatus als weiterem Bestandteil der pTNM-Klassifikation erfolgte bei alle Patientinnen eine Sentinel-Node-Biopsie mit intraoperativer Schnellschnittuntersuchung. Im Falle einer Lymphknotenmanifestation durch das Mammakarzinom wurde die axilläre Lymphknotendissektion der betroffenen Seite angeschlossen. In der Mehrzahl der untersuchten Fälle (n = 33) lagen zum Zeitpunkt der Operation keine Lymphknotenmetastasen vor (66 %). Tumorinfiltrate in axillären Lymphknoten zeigten sich demzufolge bei 17 Patientinnen, wobei es sich in 30 % der Fälle um Lymphknotenmetastasen im eigentlichen Sinne mit einer Größe von > 2 mm handelte. In jeweils 2 % der Untersuchungen zeigten sich eine Mikrometastase (< 2 mm) oder isolierte Tumorzellen in einem Lymphknoten (< 0,02 mm oder weniger als 200 Tumorzellen), welche als pN1(mi) bzw. als pN0(i+) klassifiziert werden.

Wie eingangs beschrieben, wurden nur Patientinnen mit nodal-negativem bzw. niedrig nodal-positivem Mammakarzinom in die Untersuchung eingeschlossen, so dass der höchste vergebene Nodal-Status pN1a darstellte. Hierin sind eine bis maximal drei Lymphknotenmetastasen eingeschlossen.

Nodalstatus	Anzahl der Patienten (n)	Prozent (%)
Nodal positiv	17	34,0
pN1a(1/x)	10	58,9
pN1a(2/x)	6	35,3
pN1a(3/x)	1	1,8

Tab. 10: Nodalstatus

In 35,3 % der Fälle zeigten sich zwei befallene Lymphknoten, in einem Fall wurden drei Lymphknotenmetastasen gesichert. Durchschnittlich wurden vier Sentinel-Lymphknoten operativ entfernt, maximal 13. Insgesamt lag der Mittelwert der insgesamt entfernten Lymphknoten bei sechs mit einem Maximalwert von 28 entfernten Lymphknoten. Ein kapselüberschreitendes Wachstum der Lymphknotenmetastasen in das perinodale Fettgewebe wurde in 9,8 % der Fälle gesehen. Im Bezug auf die nodal positiven Patientinnen ergibt sich hier ein Anteil von 33,3 %.

Eine Lymphangiosis carcinomatosa (L1) wurde in 44 % der Fälle (n = 22), eine Angioinvasion (V1) in 4 % der Fälle (n = 2) diagnostiziert. Eine Infiltration in Perineuralscheiden (Pn1) war nur in einem Fall (2 %) festzustellen.

3.1.6. Histologischer Differenzierungsgrad

Der Differenzierungsgrad von Karzinomen beschreibt die Ähnlichkeit des Tumorgewebes mit dem Ursprungsgewebe, von dem der Tumor ausgeht. Gut differenzierte Karzinome (G1) besitzen demnach noch erkennbare Übereinstimmungen mit dem Ausgangsgewebe, während gering differenzierte (G3) und undifferenzierte (G4) nur noch geringe oder keine Ähnlichkeit mit dem Ursprungsgewebe aufweisen. Die Bestimmung des Differenzierungsgrades der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mammakarzinome wurde standardgemäß entsprechend dem modifizierten Grading nach Scarff-Bloom & Richardson vorgenommen. Dieses beinhaltet den prozentualen Anteil tubulär differenzierter Tumorabschnitte, die Morphologie der Tumorzellkerne und die Anzahl der Mitosen. Wie in Tab. 11 ersichtlich, lag in 82 % der Fälle (n = 41) ein mäßig differenziertes Mammakarzinom (G2) vor, gefolgt von wesentlich weniger gering differenzierten Karzinomen (G3), welche einen Anteil von 10 % der Fälle (n = 5) ausmachten. Am seltensten wurden Karzinome mit einem guten

Differenzierungsgrad (G1) gefunden und zeigten sich bei vier der untersuchten Patientinnen (8 %).

Grading	Anzahl der Patienten (n)	Prozent (%)
G1	4	8
G2	41	82
G3	5	10

Tab. 11: Histologischer Differenzierungsgrad der untersuchten Mammakarzinome

3.1.7. Hormonrezeptor-Status

Die Bestimmung des Hormonrezeptor-Status erfolgte mithilfe immunhistochemischer Untersuchungen. Zur Auswertung wurde der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele verwendet, welcher sich aus dem prozentualen Anteil positiver Tumorzellkerne und der Färbeintensität berechnet.

Für den Östrogenrezeptor, im Folgenden mit ER abgekürzt, ergab sich für das Gesamtkollektiv ein Mittelwert von $11,1 \pm 2,2$. Für den Progesteronrezeptor (PR) zeigte sich ein etwas geringerer Mittelwert von $9,8 \pm 3,8$ (vgl. Abb. 6).

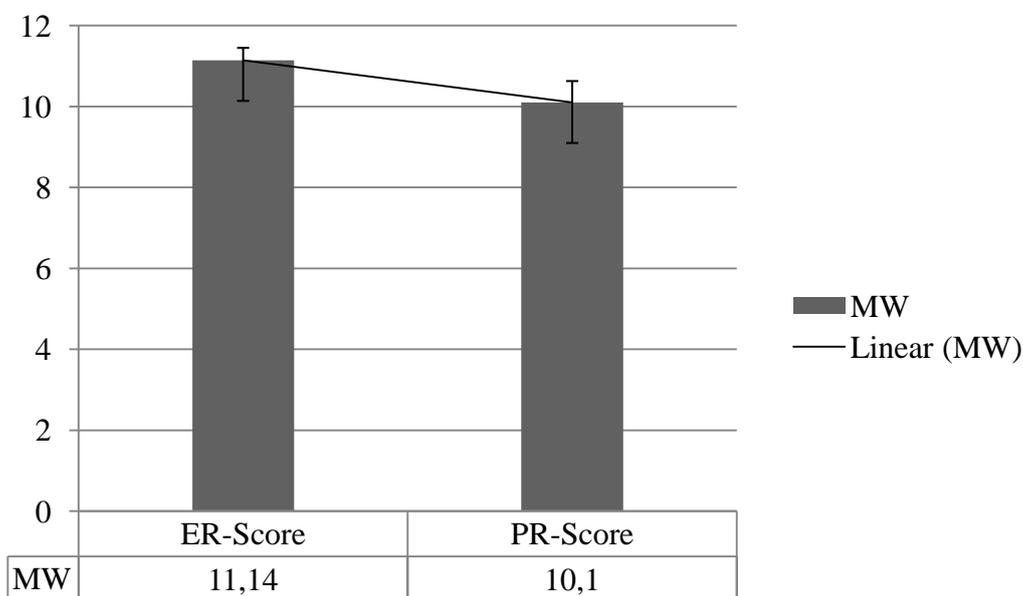


Abb. 6: Mittelwert (MW) und SEM (Standard Error of the Mean) für den Östrogen (ER)- und Progesteron (PR)-Score des Gesamtkollektivs

Für den ER lag im Gesamtkollektiv ausschließlich ein positiver immunreaktiver Score entsprechend einem positiven ER-Status vor. 90 % der Fälle zeigten stark positive Werte zwischen 8 und 12. Der maximal zu erreichende Score von 12 wurde in 84 % (n = 42) erreicht. Auch für den PR fanden sich überwiegend hoch positive Werte in 80 % der Fälle und somit etwas seltener als für den ER. Dementsprechend fiel auch der Anteil des Maximalscores von 12 mit 38 Patientinnen (74 %) geringer aus. Im Gegensatz zum ER-Status ergab sich für den PR in zwei Fällen ein negativer Hormonrezeptor-Status (4 %). Zur Verteilung der schwach und mäßig positiven Scorewerte vergleiche Abb. 7.

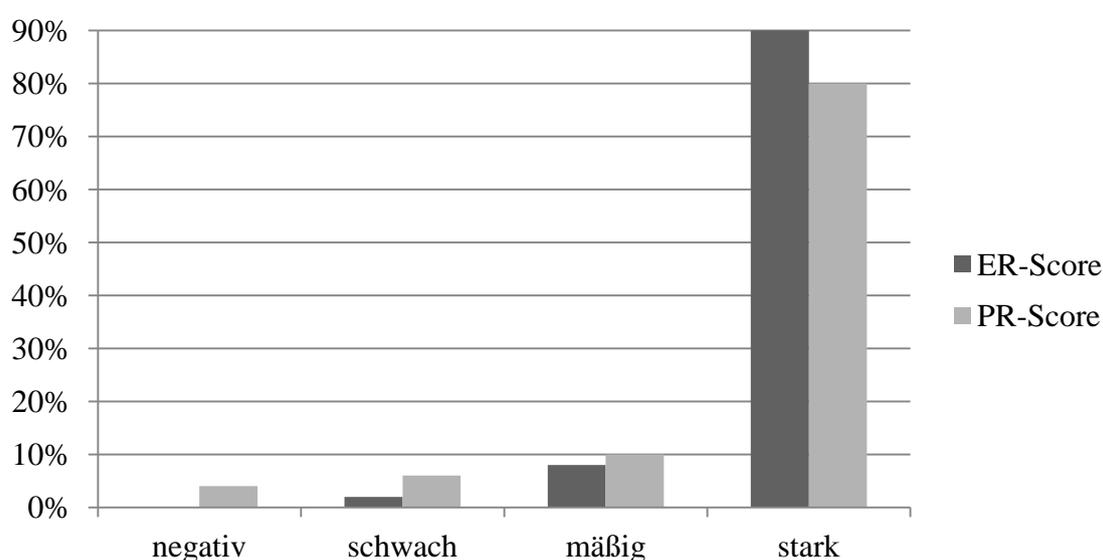


Abb. 7: Verteilung der Östrogen- (ER) und Progesteron-(PR)-Score-Werte des Gesamtkollektivs

3.1.8. Her2/neu-Status

Zur Bestimmung des Her2/neu-Überexpressions-Status erfolgte die entsprechende immunhistochemische Analyse mit dem Antikörper SP6 (DAKO).

Ein klar negativer Her2/neu-Status mit einem Score von 0 wurde in 34 % der untersuchten Fälle (n = 17) beobachtet. Dieser ist durch eine fehlende Färbereaktion der Tumorzellen gekennzeichnet. Ungefähr zwei Drittel der Fälle (64 %) zeigten eine unspezifische Färbereaktion, welche als Score 1+ und damit ebenfalls als negativ gewertet wurde. In einem Fall lag immunhistochemisch ein unklarer Befund vor (Score 2+). Hier zeigte sich eine über eine unspezifische Hintergrundreaktion hinausgehende, teils zirkuläre, membrangebundene Färbereaktion, welche aber die

Kriterien für einen positiven Befund (Score 3+) aufgrund einer zu geringen Anzahl kräftig gefärbter zirkulärer Areale nicht erfüllt. Wie bei diesem Befund erforderlich, wurde eine FISH-Analyse angeschlossen, die negativ ausfiel (vgl. Abb. 8). Letztendlich fand sich somit bei allen in die Untersuchung eingeschlossenen Patientinnen ein negativer Her2/neu-Status.

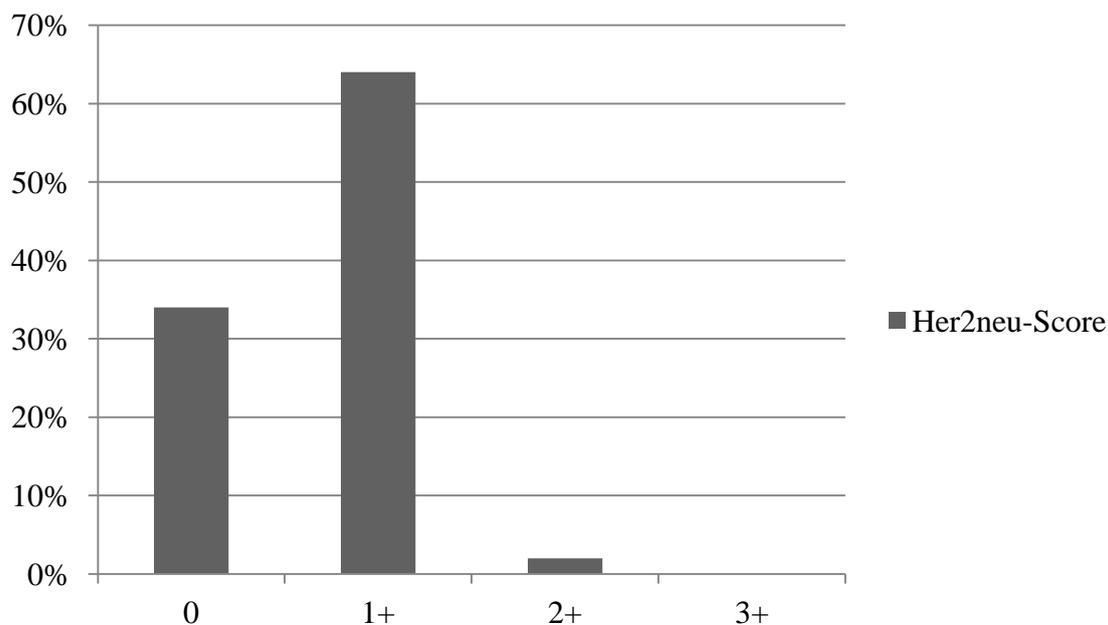


Abb. 8: Verteilung des immunhistochemisch erhobenen Her2/neu-Status des Gesamtkollektivs

3.1.9. Proliferationsindex Ki-67

Die Bestimmung des proliferationsassoziierten Index Ki-67 erfolgte ebenfalls immunhistochemisch und wurde als prozentualer Anteil der positiv gefärbten Tumorzellkerne angegeben. Im Mittel ergab sich ein proliferationsassoziiertes Ki-67-Index von $13,0 \pm 10,1$ %. Der geringste beobachtete Wert betrug 5 %, der Maximalwert lag bei 50 %. In 56 % der Fälle ($n = 28$) zeigte sich ein Wert ≤ 14 %, entsprechend einem Luminal-A-Subtyp. Folglich wurde bei 22 Patientinnen (44 %) ein Luminal-B-Karzinom diagnostiziert mit einem Ki-67-Proliferationsindex von > 14 %. Davon wiesen 14 Patientinnen (63,3 %) Werte ≥ 20 % auf, was 28 % bezogen auf das Gesamtkollektiv ausmacht (vgl. Abb. 9)

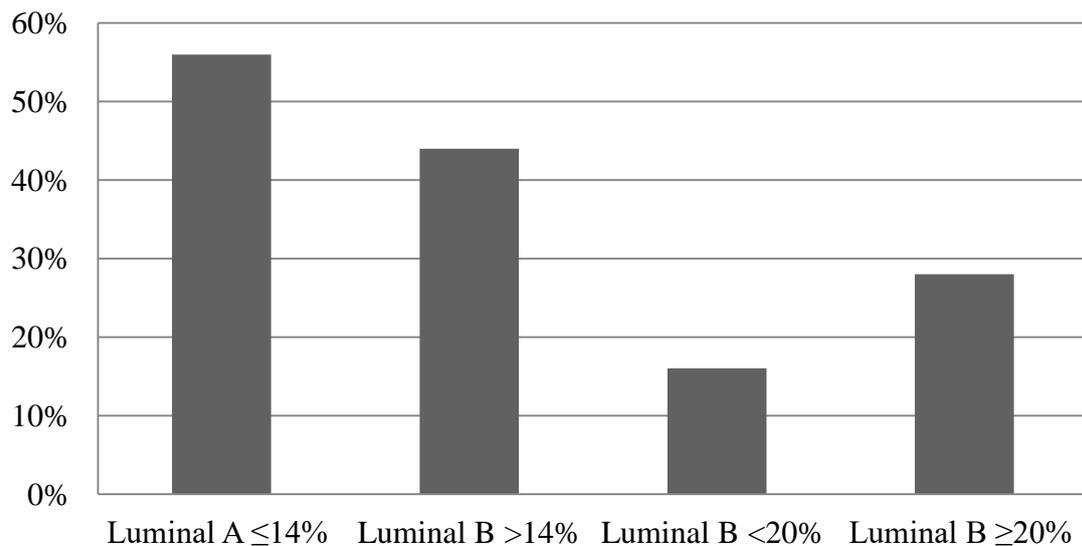


Abb. 9: Intrinsische Subtypen des Gesamtkollektivs infolge des immunhistochemisch erhobenen Ki-67-Index

3.2. Ergebnisse der OncotypeDX®-Testung

Zur Bestimmung des OncotypeDX®-Recurrence-Score wurden von den 50 untersuchten Patientinnen 15 ungefärbte Paraffin-Schnittpräparate des Tumors oder ein Paraffinblock des Tumorgewebes zur zentralen Untersuchung in die USA versandt. Das Ergebnis lag im Mittel nach zehn Tagen in Form eines einheitlichen schriftlichen Befundes vor.

Der mittlere erreichte Recurrence-Score-Wert des Gesamtkollektivs betrug $26,7 \pm 8,5$. Der kleinste beobachtete Score-Wert lag bei 5, der Maximalwert bei 37.

In fast zwei Drittel der Fälle ergab sich ein RS-Score von < 18 und somit eine Zuordnung in die „niedrig“-Risikogruppe. Es lässt sich also feststellen, dass der Großteil des Kollektivs nach Oncotype DX®-Untersuchung ein nur geringes Rezidivrisiko aufweist. Recurrence-Score-Werte > 18 waren in 19 Fällen (38 %) auszumachen. Erwartungsgemäß zeigte die „hoch“-Risikogruppe die geringste Gruppenstärke. Nur 6 % der untersuchten Fälle ($n = 3$) wiesen Score-Werte > 30 entsprechend einer Zuteilung in die Gruppe mit hohem Risiko für eine rezidivierende Erkrankung auf. In 32 % der Fälle wurden RS-Werte zwischen 18 - 29 ermittelt, so dass insgesamt 16 Patientinnen in die „mittlere“-Risikogruppe fielen (vgl. Abb. 10)

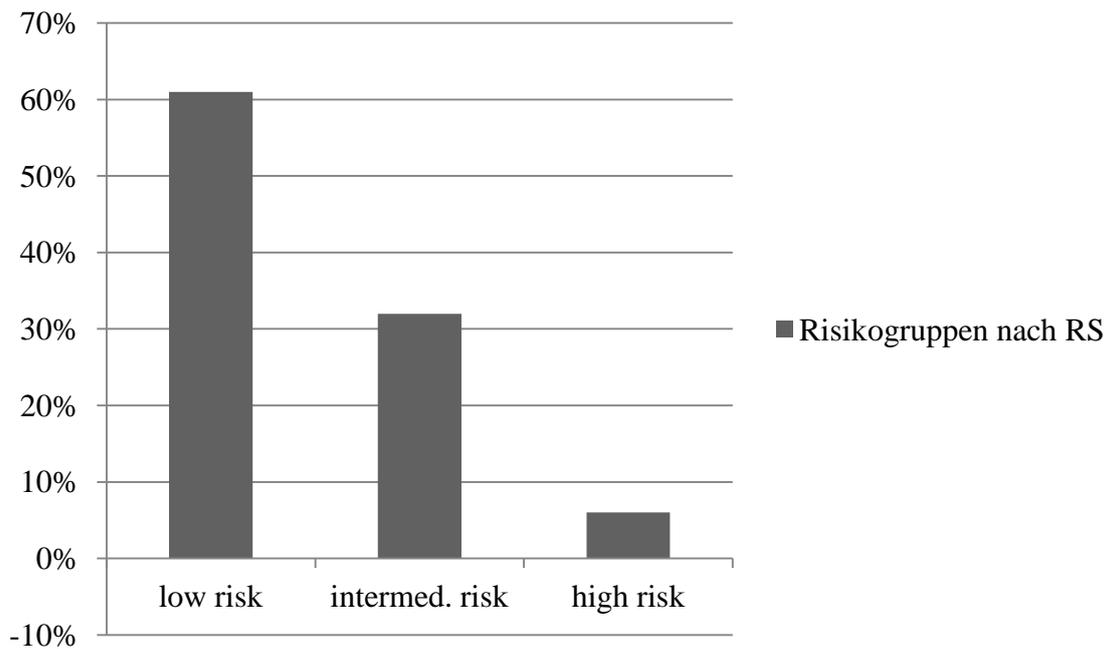


Abb. 10: Prozentualer Anteil der drei Risikogruppen nach Recurrence-Score (RS) der OncotypeDX®-Testung

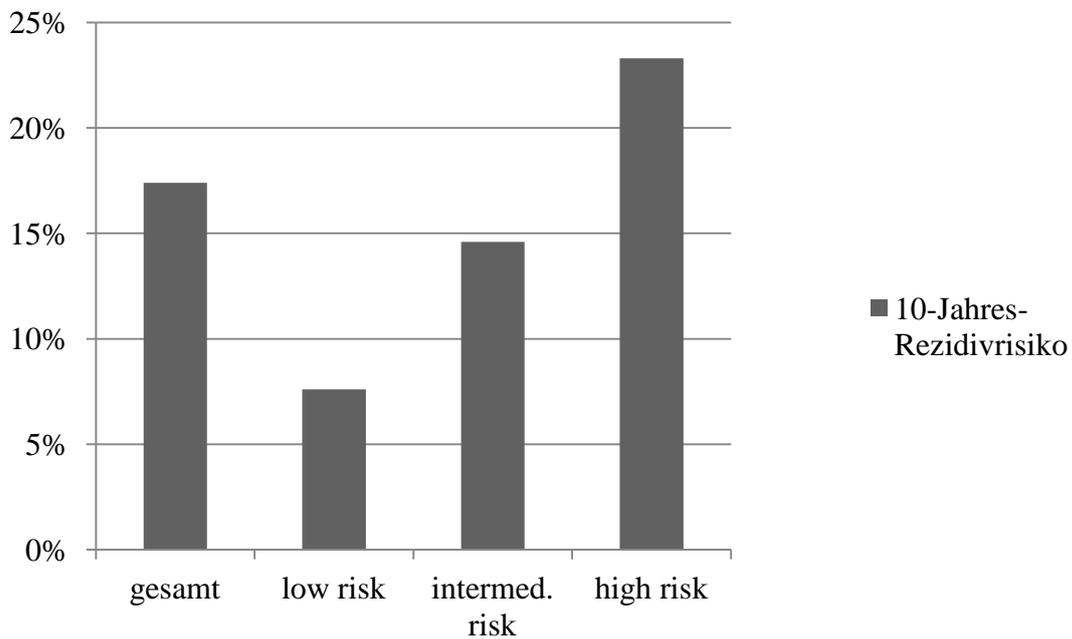


Abb. 11: Die prozentuale Verteilung des mittleren 10-Jahres-Rezidivrisiko des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen (low risk, intermediate risk, high risk)

Für die „low risk“-Gruppe wurde für den Recurrence-Score ein arithmetischer Mittelwert von $10,6 \pm 4,1$ erhoben. Ein mittlere RS-Wert von $22,9 \pm 4$ zeigte sich in der „intermediate risk“-Gruppe. Ein Anteil von 62,5 % dieser Gruppe lag im unteren Score-Bereich mit Werten zwischen 18 - 24. Bei der „high risk“-Gruppe wurde ein mittlerer RS-Score von $34,3 \pm 3,1$ gefunden, was im Mittel einem Risiko von $23,3 \pm 2,1$ % für ein 10-Jahres-Rezidiv entspricht. Das mittlere 10-Jahres-Rezidivrisiko für die „niedrig“-Risikogruppe lag bei $7,6 \pm 2$ % das der „mittlere“-Risikogruppe bei $14,6 \pm 3,1$ % (vgl. Abb.11).

3.2.1. Alter und Recurrence-Score

Auch für die „low risk“-, „intermediate risk“- und „high risk“-Gruppe wurden alle eingangs beschriebenen Parameter erhoben. Bei der Betrachtung der Altersstruktur der drei Gruppen zeigte sich, dass die „niedrig“-Risikogruppe im Mittel die jüngsten und die „hoch“-Risikogruppe im Mittel die ältesten Patientinnen enthielt (vgl. Abb. 12).

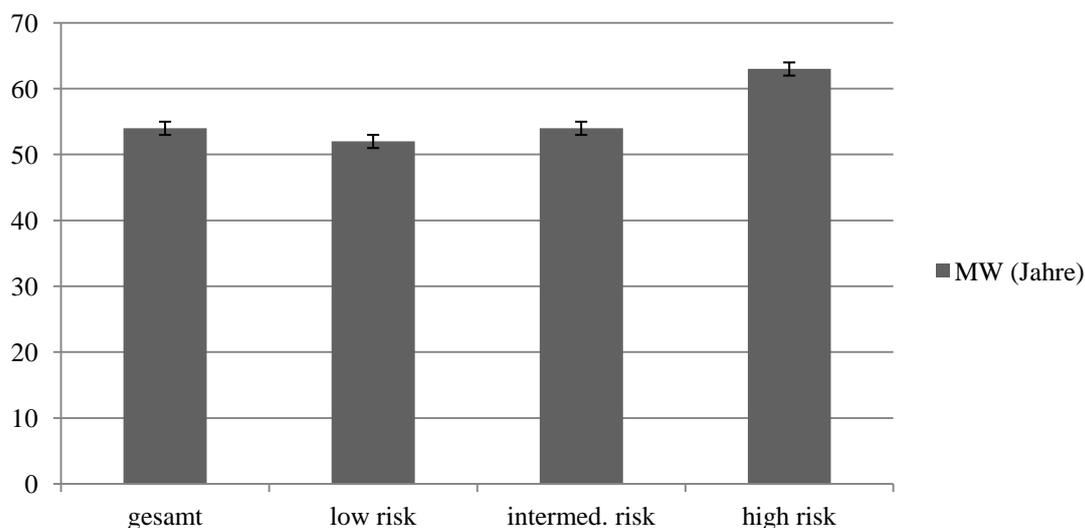


Abb. 12: Altersstruktur des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen (Mittelwert (MW) und Standard Error of the Mean (SEM))

Das mittlere Alter der „mittlere“-Risikogruppe lag mit 54 ± 11 Jahren dazwischen und zeigte einen Median von 50 Jahren. Das mittlere Alter der „low risk“-Gruppe betrug 52 ± 10 Jahre (Median 56), das der „hoch“-Risikogruppe 64 ± 6 Jahre (Median 64). Die

jüngste beobachtete Patientin mit 28 Jahren wurde der Gruppe mit niedrigem Risiko zugeteilt, die mit 73 Jahren älteste Patientin in die Gruppe mittleren Risikos.

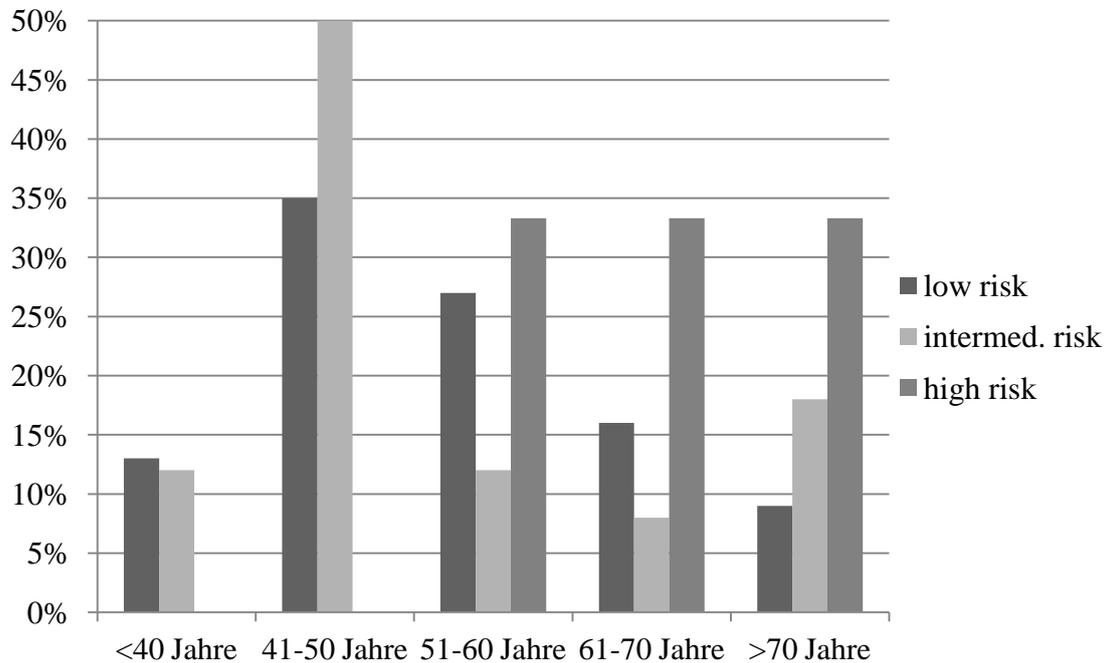


Abb. 13: Detaillierte Altersstruktur der drei Risikogruppen

Die Abb. 13 zeigt, dass im untersuchten Kollektiv Patientinnen < 40 Jahre anhand des Recurrence-Score in Gruppen mit niedrigem und mittlerem Rezidivrisiko eingeteilt wurden. Für die Patientinnen zwischen 41 und 59 Jahren ergab sich ein Trend von der niedrigen zur mittleren Risikogruppe, wobei diese Altersgruppe auch insgesamt den größten Anteil stellte. Für ein Alter > 50 Jahre ergab sich ein Trend zur hoch-Risikogruppe.

3.2.2. Tumorgröße und Recurrence-Score

Auffällig bei der Betrachtung der Tumorgröße war, dass die „low risk“-Gruppe im Mittel die größten Karzinomherde aufwies ($2,1 \pm 0,9$ cm). Auch der größte Tumorherd mit 5,5 cm war in dieser Gruppe zu finden. Gering kleiner stellte sich die mittlere Tumorgröße in der „intermediate risk“-Gruppe mit $2 \pm 0,8$ cm dar. Die im Mittel

kleinsten Tumorherde ($1,6 \pm 0,6$ cm) waren im vorliegenden Kollektiv in der „high risk“-Gruppe auszumachen.

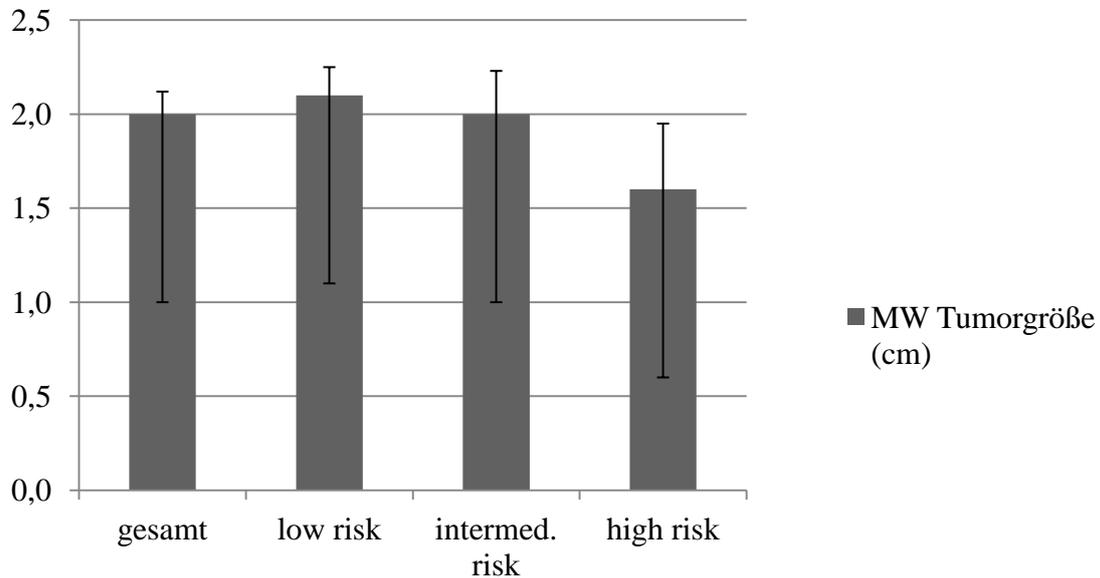


Abb. 14: Tumorgröße (Mittelwert in cm, SEM) des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen

3.2.3. Tumorgrading und Recurrence-Score

Gut differenzierte Mammakarzinome (G1) fanden sich ausschließlich in der „low risk“-Gruppe. Den Großteil dieser Gruppe machten mäßig differenzierte Karzinome aus ($n = 27$, 87,1 %). Wenig differenzierte Karzinome fanden sich hingegen in dieser Kategorie nicht. In der „intermediate risk“-Gruppe und „high risk“-Gruppe waren keine gut differenzierten Tumore auszumachen. Der Großteil der Karzinome ($n = 13$, 81,2 %) der „mittlere“-Risikogruppe zeigte einen mäßigen Differenzierungsgrad, in 3 Fällen (18,8 %) lag ein wenig differenziertes Karzinom (G3) vor. In der „high risk“-Gruppe zeigte sich ein anderes Bild. Hier lagen in etwas mehr als zwei Drittel der Fälle ($n = 2$, 66,7 %) Tumore mit geringem Differenzierungsgrad vor. Im verbleibenden Fall dieser Risiko-Gruppe war ein mäßig differenziertes Karzinom diagnostiziert worden.

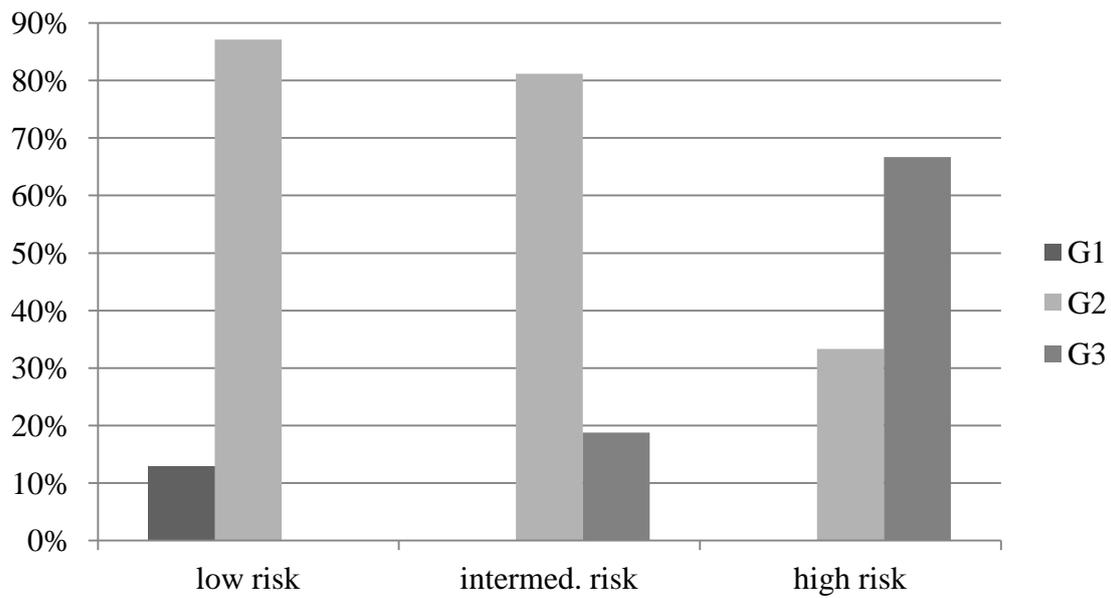


Abb. 15: Prozentualer Anteil der histologischen Differenzierungsgrade der Tumore in den drei Risikogruppen (gut differenziert = G1, mäßig differenziert = G2, wenig differenziert = G3)

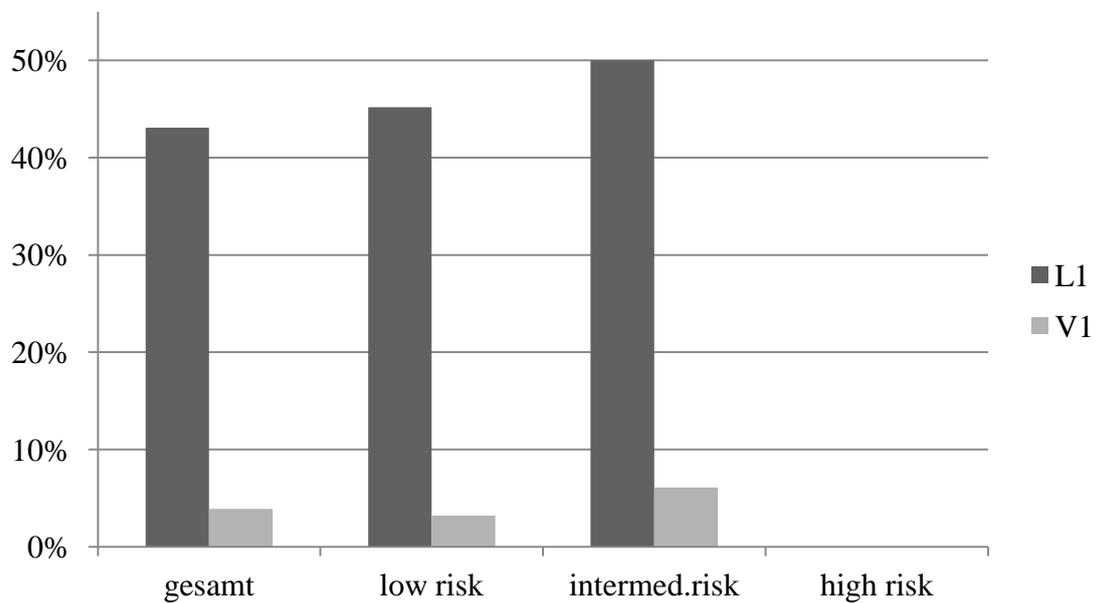


Abb. 16: Prozentualer Anteil einer Lymphangiosis (L1) und Hämangiosis carcinomatosa (V1) im Gesamtkollektiv und den drei Risikogruppen

3.2.4. Häm- und Lymphangiosis carcinomatosa und Recurrence-Score

Im vorliegenden Gesamtkollektiv zeigte sich insgesamt in 43 % der Fälle eine Lymphangiosis carcinomatosa (L1) und in 3,9 % der Fälle eine Hämangiosis carcinomatosa (V1). In 45,2 % der „low risk“-Gruppe (n = 14) war eine Lymphgefäßinvasion, in 3,2 % der Fälle eine Angioinvasion zu sehen. In der „intermediate risk“-Gruppe zeigte die Hälfte der Patientinnen (n = 8) eine Invasion in Lymphgefäße und in einem Fall (6,3 %) eine V1. In der „high risk“-Gruppe fand sich weder eine Lymphgefäß- noch eine Blutgefäßinvasion (vgl. Abb. 16).

3.3. Tumorbiologische Daten und Recurrence-Score

3.3.1. Hormonrezeptor-Status und Recurrence-Score

Mittelwert und Standardabweichung für die Hormonrezeptor-Status-Werte wurden auch für die drei anhand des OncotypeDX®-Recurrence-Score gebildeten Risikogruppen ermittelt.

Auffällig hierbei ist, dass sowohl für den mittleren ER-Rezeptor- als auch für den PR-Rezeptor-Score in der „low risk“-Gruppe jeweils die höchsten und in der „high risk“-Gruppe die niedrigsten Werte beobachtet wurden. Besonders deutlich sinken die Werte im Gruppenvergleich beim Progesteronrezeptor ab: in der „niedrig“-Risikogruppe ergab sich ein Mittelwert von $11 \pm 2,7$ in der „mittlere“-Risikogruppe ein Mittelwert von $9 \pm 4,1$ und in der „hoch“-Risikogruppe noch ein mittlerer Wert von $4 \pm 6,9$, so dass der Mittelwert der Gruppe des geringsten Rezidivrisikos fast dreimal so hoch ist wie der für die des höchsten Risikos. Der ER-Score zeigte in dieser Betrachtungsreihenfolge ebenfalls einen Abfall, jedoch einen deutlich geringeren. Einen Überblick gibt Abb. 17. Bei weiterer Betrachtung zeigten alle drei Gruppen in mehr als der Hälfte der Fälle einen stark positiven ER-Score mit Werten von 8 - 12. Am deutlichsten war dies in der „niedrig“-Risikogruppe mit 93,6 % der Fälle (n = 29) erkennbar. In der „hoch“-Risikogruppe waren es noch 66,7 % der Fälle (n = 2). In den restlichen 33,3 % der Fälle zeigte sich in dieser Gruppe ein schwach positives Ergebnis (vgl. Abb.17).

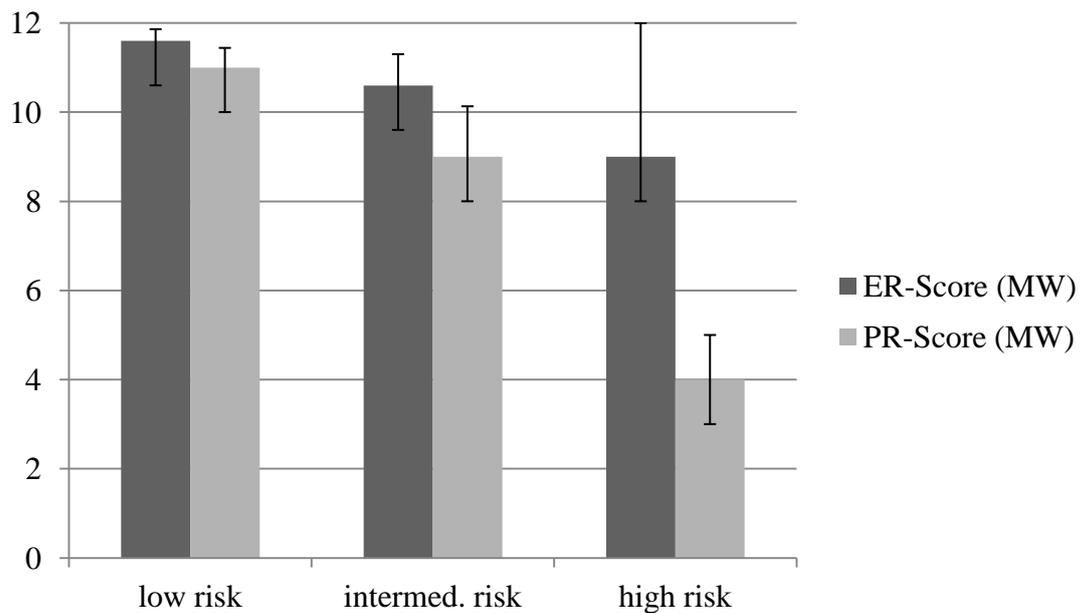


Abb. 17: Mittelwerte und Standard Error of the Mean (MW, SEM) des Hormonrezeptor-Score für den Östrogen- (ER-) und des Progesteron-Rezeptor (PR) der drei Risikogruppen

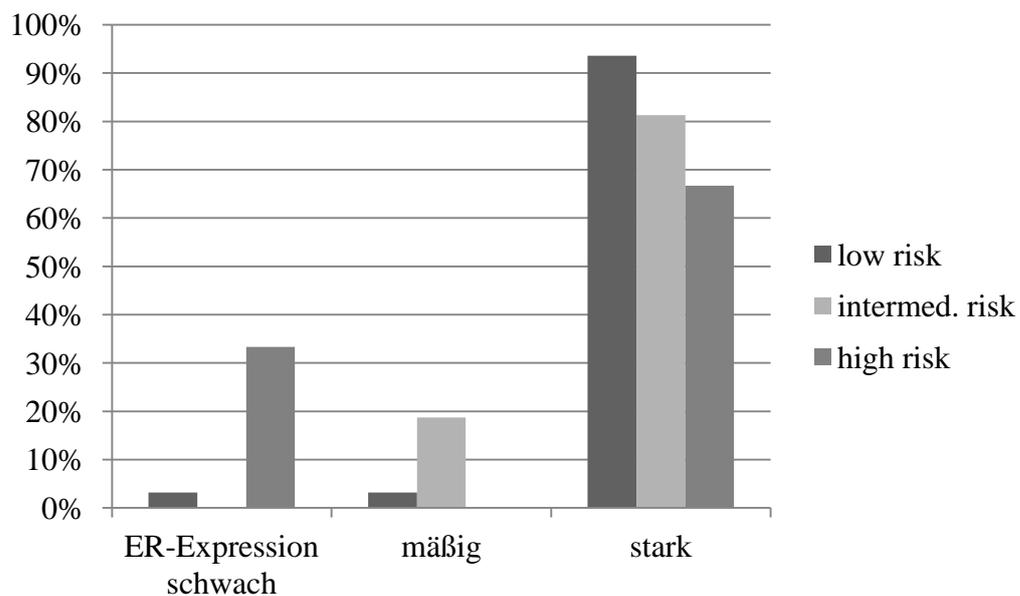


Abb. 18: Prozentualer Anteil der Östrogenrezeptor-Expression (ER) in den drei Risikogruppen (schwach = IRS < 5, mäßig = IRS 6 – 11, stark = IRS = 12)

Ein ähnliches Bild stellte sich bei Beobachtung der stark positiven PR-Score-Werte in der „low risk“-Gruppe dar. Auch hier zeigten die zugehörigen Patientinnen in der großen Mehrzahl der Fälle (n = 28, 90,3 %) einen stark positiven Status für den Progesteronrezeptor.

In der „mittlere“-Risikogruppe waren es mit einem prozentualen Anteil von 68,8 % (n = 11) im Vergleich dazu deutlich weniger. In der der Gruppe mit dem höchsten Rezidivrisiko lag ein stark positiver Wert nur in einem Fall (33,1 %) vor. In den übrigen beiden Fällen (66,7 %) wurde in dieser Gruppe ein negativer PR-Status ermittelt.

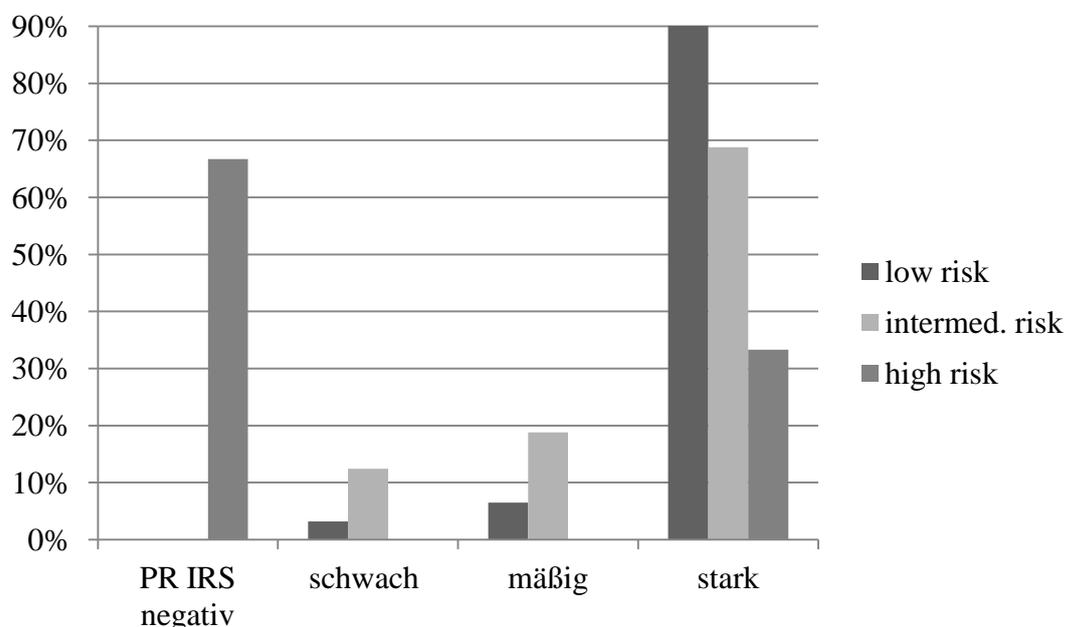


Abb. 19: Progesteronrezeptor-Score der Risikogruppen

3.3.2. Proliferationsindex Ki-67 und Recurrence-Score

Das Gesamtkollektiv zeigte einen mittleren proliferationsassoziierten Ki-67-Index von $13,0 \pm 10,1$ %. Bei Betrachtung der drei Gruppen nach steigendem Risiko fand sich ein begleitender Anstieg des Ki-67-Index. In der „niedrig“-Risikogruppe betrug dieser im Mittel $9,3 \pm 6,0$ %, in der „mittlere“-Risikogruppe zeigte sich ein gering über dem Mittelwert des Kollektivs liegender mittlerer Wert von $17,5 \pm 6,0$ %. Wie Abb. 20 illustriert, war in der „hoch“-Risikogruppe ein deutlicher Anstieg des Index auf durchschnittlich $41,7 \pm 8,3$ zu erkennen. Auch der höchste ermittelte Wert von 50 % fand sich bei einer Patientin der „hoch“-Risikogruppe.

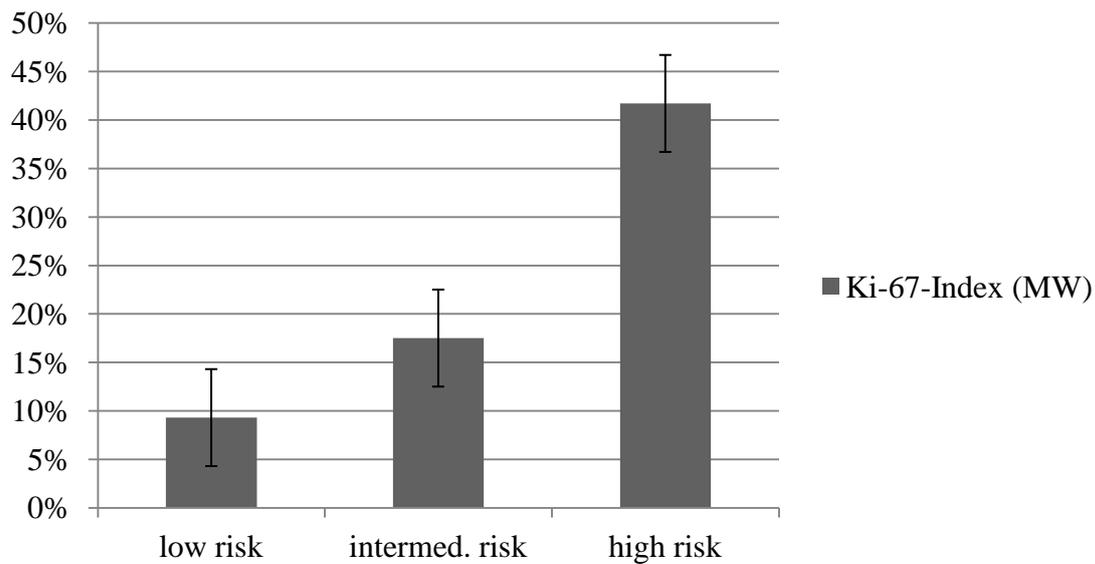


Abb. 20: Proliferationsindex Ki-67 bezogen auf die Gruppeneinteilung (RS-Score)

Die „low risk“-Gruppe zeigte sich in knapp zwei Drittel der Fälle ($n = 20$, 64,5 %) Ki-67-Werte $< 14\%$, somit lag ein Luminal-B-Subtyp mit Werten $> 14\%$ in 11 Fällen (35,5 %) vor. In 12,9 % der Fälle ($n = 4$) zeigten sich Werte $> 20\%$. Bei Betrachtung dieser Verteilung war in der „intermediate risk“-Gruppe eine fast ausgewogene Verteilung mit leichtem Überwiegen von mittleren Ki-67-Werten $> 14\%$ (56,3 % der Fälle) gegeben. In knapp der Hälfte dieser Fälle (55,6 %) lagen Werte $> 20\%$ vor. In der „hoch“-Risikogruppe fand sich zu 100 % ein proliferationsassoziierter Ki-67-Index von $> 14\%$, entsprechend einem Luminal-B-Karzinom. In jedem Fall wurde die Schwelle von $> 20\%$ überschritten.

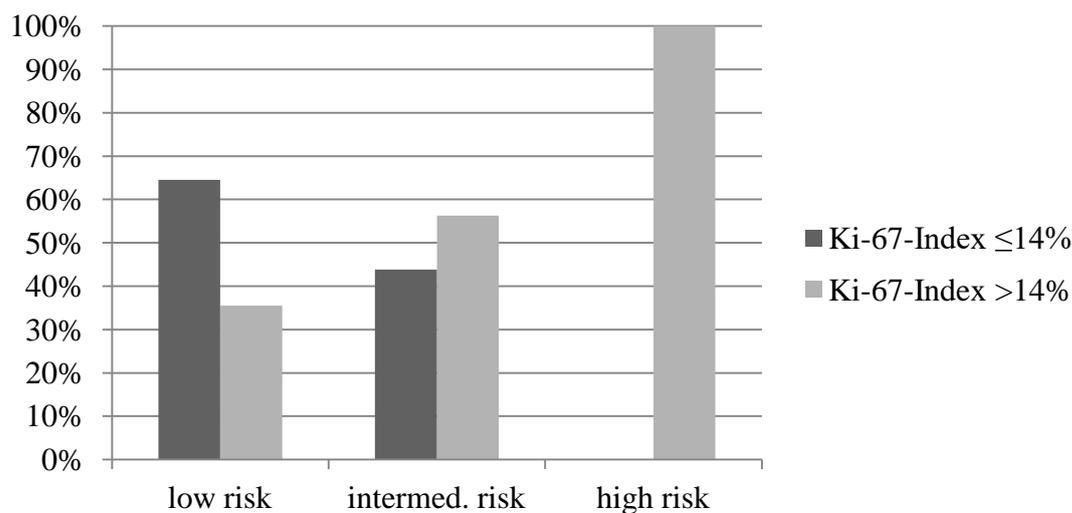


Abb. 21: Ki67-Index bezogen auf die Risikogruppen

3.4. Hormonrezeptor-Status: Vergleich von Immunhistochemie und qRT-PCR

Im Zuge der OncotypeDX®-Testung wurde mittels qRT-PCR Verfahren die RNA-Expression des Östrogen- und des Progesteronrezeptors ermittelt, deren Ergebnisse auch in den Recurrence-Score mit einfließen. Der auf diese Weise untersuchte ER-Score ergab durchschnittlich einen Wert von $9,3 \pm 1,2$, wobei der Cut-off-Wert des Verfahrens bei 6,5 liegt. Insgesamt zeigten alle untersuchten Proben, genau wie in der immunhistochemischen Untersuchung, einen positiven ER-Status. Auch bei einem Vergleich der Mittelwerte der drei Risikogruppen wurde in der „low risk“-Gruppe der höchste Durchschnittswert von $10,3 \pm 1,2$ und in der „high risk“-Gruppe der niedrigste Mittelwert von $9,3 \pm 1,8$ gesehen, was mit der Werte-Entwicklung der mittels immunhistochemischer Färbungen erhobenen Ergebnisse übereinstimmte (vgl. Abb. 22).

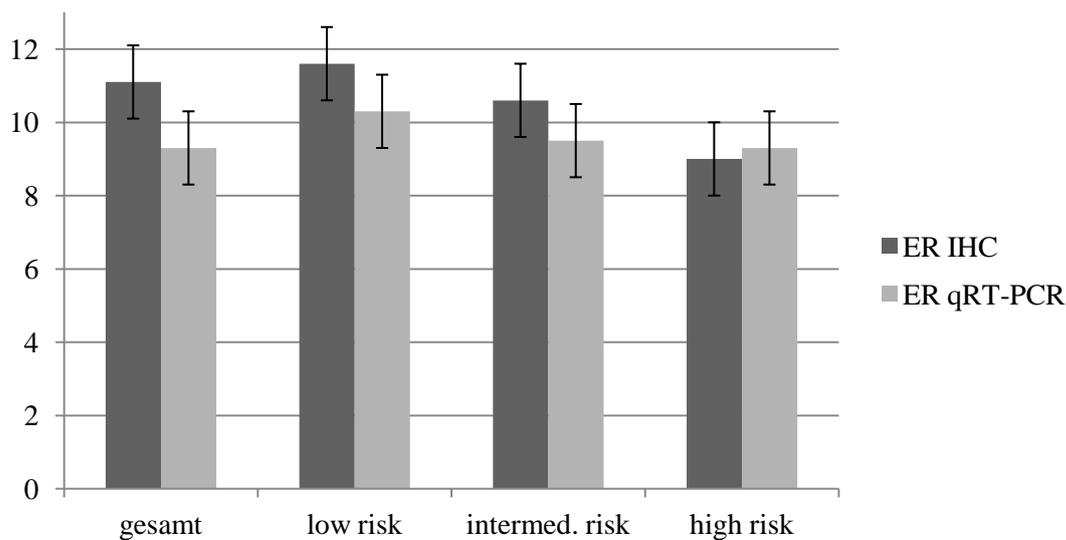


Abb. 22: Vergleich der ER-Score-Werte (Östrogenrezeptor) Immunhistochemie (IHC) vs. qRT-PCR

Es folgte eine Gegenüberstellung der mittels immunhistochemischer Untersuchungen und qRT-PCR Verfahren ermittelten Werte mit Einteilung nach den immunhistochemischen Score-Werten in schwach, mäßig und stark positiv. Der niedrigste erhobene IRS-Wert von drei ging bei diesem Vergleich mit dem niedrigsten ER-Score-Wert der OncotypeDX®-Bestimmung von 7,2 einher. Bei einem mäßig positiven IRS-Score mit Werten zwischen 4 - 6, welcher in 8 % der Fälle gesehen wurde, zeigten die dazugehörigen Werte eine Spanne von 7,9 bis 9 und waren im unteren bis mittleren positiven Bereich angesiedelt.

Bei den mehrheitlich stark positiven IRS-Scores (8 - 12) fanden sich begleitend Werte im mittleren bis hohen positiven Bereich. Der Mittelwert der immunhistochemisch untersuchten Werte lag hier bei $11,8 \pm 0,8$. Die Ergebnisse der PCR-Messung ergaben einen mittleren Wert von $10 \pm 1,1$. Bemerkenswert ist, dass der maximal zu erreichende immunhistochemische Score von 12 mit Werten, die eine Spanne von 8 bis 12,3 aufweisen, einherging.

Für den mittels qRT-PCR ermittelten Progesteronrezeptor-Status ergab sich insgesamt ein durchschnittlicher Wert von $6,7 \pm 1,4$. Der Cut-off-Wert bei dieser Untersuchungsmethode liegt bei 5,5.

Auffällig im Vergleich der Mittelwerte der drei Risikogruppen war, dass sich die Werte der „mittlere“-Risikogruppe und der „hoch“-Risikogruppe kaum unterschieden. Wie bei

den immunhistochemisch ermittelten Ergebnissen fand sich auch hier in der „niedrig“-Risikogruppe der höchste Mittelwert von $8,6 \pm 1,2$. Eine vergleichende Übersicht bietet Abb. 23.

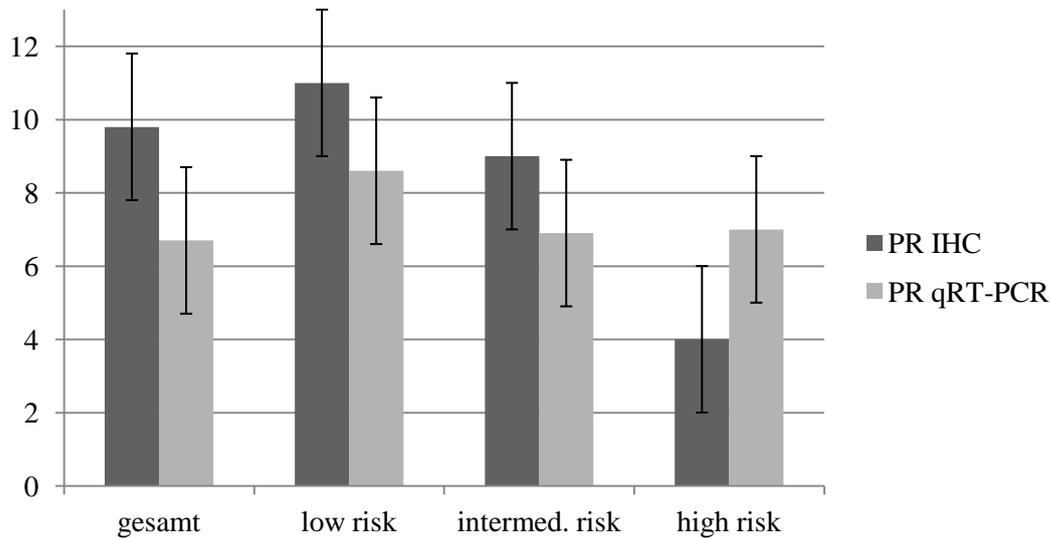


Abb. 23: Vergleich der PR-Score-Werte (Progesteronrezeptor) Immunhistochemie (IHC) vs. qRT-PCR

Es folgte eine Gegenüberstellung der Werte beider Messungsmethoden, wobei eine Einteilung nach negativem bzw. schwach, mäßig und stark positivem IRS-Score vorgenommen wurde. Hierbei wurde auch mittels der PCR-Methode in zwei Fällen ein negativer Progesteron-Status erhoben. Jedoch handelte es sich hierbei nicht um dieselben Patientinnen, welche immunhistochemisch einen negativen PR-Score zeigten. Wie Tab. 12 und Tab. 13 erkennen lassen, gingen die immunhistochemisch negativ gewerteten PR-Scores mit positiven Ergebnissen in der PCR-Methode einher. Die beiden negativen Progesteron-Scores in der PCR-Messung zeigten immunhistochemisch IRS-Scores von 1 und damit einen niedrig positiven immunreaktiven Score.

In den beiden anderen verglichenen Gruppen der immunhistochemisch mäßig bzw. stark positiven PR-Scores zeigten sich im Gegensatz dazu ähnliche Ergebnisse. In der Gruppe der immunhistochemisch mäßig positiven IRS-Scores fanden sich begleitend niedrige bis mittlere Werte des PR-Scores. In der Gruppe stark positiver immunhistochemischer Ergebnisse für den Progesteronrezeptor wurden PCR technisch

bestimmt mittlere bis hohe Werte erhoben. Für den immunhistochemisch erhobenen Maximal-Score von 12 reichte die Spanne der Parallelwerte von 6,7 bis 9,9.

	Progesteron IRS-Score	Progesteron-Score qRT-PCR	Recurrence-Score
Probe 1	0	5,9	35
Probe 2	0	6,6	37
Bewertung	negativ	positiv	high risk

Tab. 12: Übersicht der Proben mit negativem immunreaktivem Score (IRS) und gleichzeitig positiver qRT-PCR für den Progesteron-Rezeptor (PR)

	Progesteron IRS-Score	Progesteron-Score qRT-PCR	Recurrence-Score
Probe 3	1	4,1	13
Probe 4	1	4,4	29
Bewertung	schwach positiv	negativ	low/ intermed. risk

Tab. 13: Übersicht der Proben mit positivem immunreaktivem Score (IRS) und gleichzeitig negativer qRT-PCR für den Progesteron-Rezeptor (PR)

3.5. Der Einfluss von OncotypeDX® auf die Therapieentscheidung

Vor Bekanntwerden des OncotypeDX®-Ergebnisses sollte nach interdisziplinärem Tumorkonferenzbeschluss bei 12 Patientinnen (24 %) aufgrund des klinisch-pathologischen Risikoprofils eine adjuvante Chemotherapie angeschlossen werden. In Kenntnis des RS-Ergebnisses sollte eine solche noch in 10 Fällen (20 %) durchgeführt werden. Eine Änderung der Entscheidung im Hinblick auf das Therapieregime war in 16 % der Fälle (n = 8) zu beobachten. Eine Entscheidung gegen eine adjuvante Chemotherapie fand sich in einer Mehrzahl der Fälle (62,5 %). Eine Entscheidungsänderung im Sinne einer Befürwortung einer adjuvant durchgeführten Chemotherapie unter Berücksichtigung des Recurrence-Score war in drei Fällen (37,5 %) zu beobachten. Davon wiesen zwei Patientinnen einen hohen RS auf.

In der „low risk“-Gruppe sollten vor der Oncotype DX® Testung vier (12,9 %) der Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Nach Bekanntwerden des Testergebnisses sollte eine solche noch bei 9,7 % der Gruppenangehörigen (n = 3) durchgeführt werden (vgl. Abb. 24). Eine Änderung der Entscheidung konnte in drei Fällen (9,7 %) gesehen werden. Zumeist stimmten die Teilnehmer der interdisziplinären Tumorkonferenz in Kenntnis des RS-Scores gegen eine Chemotherapie (n = 2, 66,7 %) und für eine alleinige endokrine Therapie. Interessanterweise wurde in einem Fall trotz eines nach OncotypeDX®-Testung geringen Rezidivrisikos für die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie entschieden. Hierbei handelte es sich um eine 49 Jahre alte Patientin mit multizentrischem Mammakarzinom (NST, G2) mit positivem Nodalstatus, begleitendem high-grade DCIS (extensive disease) und einem Ki-67-Index von 15 %.

Den Patientinnen der „mittlere“-Risikogruppe wurde eine adjuvante Chemotherapie in sieben Fällen (43,8 %) vor der Oncotype DX® Testung und in vier Fällen (25 %) nach der Testung empfohlen (vgl. Abb. 24). Eine Änderung in der Therapieentscheidung konnte bei drei Patientinnen (18,8 %) gesehen werden. Hierbei handelte es sich in allen Fällen (100 %) um die Ablehnung einer postoperativen Chemotherapie.

Eine Patientin (33,1 %) der „hoch“-Risikogruppe sollte anhand des klinisch-pathologischen Risikoprofils eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Erwartungsgemäß wurde allen Patientinnen dieser Gruppe nach Bekanntwerden des hohen Rezidivrisikos

eine Chemotherapie empfohlen, was einer Entscheidungsänderung in 66,7 % (n = 2) der Fälle entspricht.

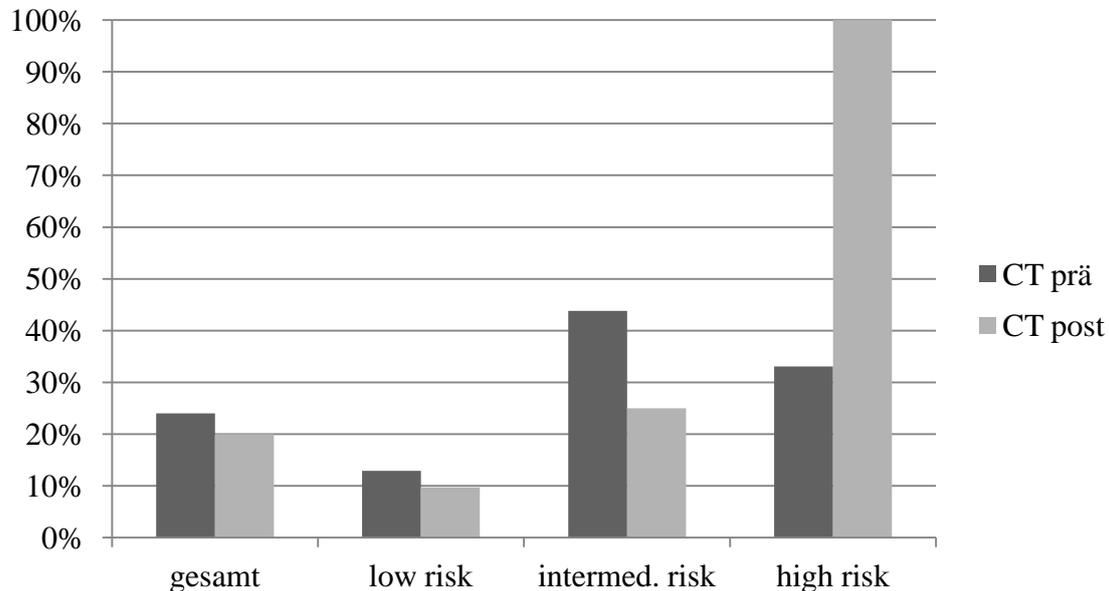


Abb. 24: Empfehlung einer adjuvanten Chemotherapie (CT) in der interdisziplinären Tumorkonferenz vor und nach Kenntnis des Ergebnis der OncotypeDX®-Testung

In den insgesamt acht Fällen, bei denen es zu einer Änderung der Therapieentscheidung von initialer Empfehlung einer adjuvanten Chemotherapie zu einer Empfehlung einer alleinigen Hormontherapie kam, zeigten drei der betroffenen Patientinnen (60,0 %) einen mittleren RS und zwei (40 %) einen niedrigen RS (vgl. Tab. 14). In den drei Fällen, bei denen zur anfänglich empfohlenen endokrinen Therapie eine Chemotherapie ergänzt werden sollte, zeigten zwei Patientinnen (66,7 %) einen hohen RS und eine Patientin (33,3 %) einen niedrigen RS.

In insgesamt 42 Fällen (84,0 %) hatte das OncotypeDX®-Ergebnis keinen Einfluss auf die therapeutische Entscheidung. Eine vor Kenntnis des RS ausgesprochene Chemotherapie-Empfehlung wurde in sieben Fällen (14,0 %) beibehalten. Davon hatten vier Patientinnen (57,2 %) einen mittleren, zwei Patientinnen (28,6 %) einen niedrigen und eine Patientin (14,3 %) einen hohen Recurrence-Score. Von den 35 Patientinnen (70,0 %), bei denen es auch nach der OncotypeDX®-Testung bei einer alleinigen

endokrinen Therapie bleiben sollte, war in 26 Fällen (74,3 %) ein niedriger RS und in neun Fällen (25,7 %) ein mittlerer RS auszumachen (vgl. Tab. 14).

Therapie-Empfehlung	low risk n (%)	intermed. risk n (%)	high risk n (%)	Total	
				n	%
	31 (62)	16 (32)	3 (6)		
Therapieänderung					
CT->HT	2 (40,0)	3 (60,0)	0 (0)	5	10
HT->CT	1 (33,3)	0 (0)	2 (66,7)	3	6
Total	3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25,0)	8	16
keine Therapieänderung					
CT->CT	2 (28,6)	4 (57,1)	1 (14,3)	7	14
HT->HT	26 (74,3)	9 (25,7)	0 (0)	35	70
Total	28 (66,7)	13 (30,9)	1 (2,4)	42	84

Tab. 14: Therapieempfehlung vor und nach Kenntnis des RS-Ergebnisses der OncotypeDX®-Testung (CT = adjuvante Chemotherapie, HT = Hormontherapie)

Hinsichtlich einer Reduktion der Empfehlung einer Chemotherapie war eine Gesamtänderung von 4 % auszumachen, was einer relativen Reduktion von 16,7 % entspricht. Besonders deutlich konnte dies in der „mittlere“-Risikogruppe gesehen werden mit einer relativen Reduktion von 42,9 % (vgl. Tab. 15). Bei Patientinnen mit einem niedrigen RS konnte eine relative Reduktion von 25,0 % beobachtet werden.

Patienten	Chemo- therapie	prä OncotypeDX	post OncotypeDX	Änderung der Empfehlung einer Chemotherapie		
		n (%)	n (%)	n	Gesamt- änderung (%)	relative Änderung (%)
Gesamt n = 50	CT	12 (24,0)	10 (20,0)	-2	4,0	16,7
	keine CT	38 (76,0)	40 (80,0)			
low risk n =31	CT	4 (12,9)	3 (9,7)	-1	3,2	25,0
	keine CT	27 (87,1)	28 (90,3)			
intermed. risk n = 16	CT	7 (43,8)	4 (25,0)	-3	18,8	42,9
	keine CT	9 (56,2)	12 (75,0)			
high risk n = 3	CT	1 (33,3)	3 (100)	+2	66,6	100
	keine CT	2 (66,7)	0 (0)			

Tab. 15: Änderung der Therapieempfehlung vor und nach Kenntnis des Recurrence-Score (RS) (CT = adjuvante Chemotherapie)

Eine Verminderung der Anzahl von Chemotherapie-Empfehlungen konnte ebenfalls in der Gruppe der nodal-positiver Patientinnen gesehen werden. Initial waren 31,5 % dieser Patientinnen (n = 5) für eine adjuvante chemotherapeutische Behandlung qualifiziert. Wie in Tab. 16 dargestellt, waren es nach Vorliegen des OncotypeDX®-Ergebnisses noch zwei Patientinnen (12,5 %). Hier zeigte sich eine absolute Änderung von 18,8 %, entsprechend einer relativen Änderung von 60 %. In der größeren Gruppe der nodal-negativen Patientinnen wurde zwar eine Veränderung der Therapieentscheidung in vier Fällen (8 %) gesehen, diese hatten jedoch keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl der empfohlenen chemotherapeutischen Maßnahmen (vor und nach OncotypeDX®-Testung jeweils n = 8, entsprechend 11,8 %).

Patienten	CT	prä OncotypeDX	post OncotypeDX	Änderung der Empfehlung einer Chemotherapie		
				n	Gesamt- änderung (%)	relative Änderung (%)
nodal positiv n = 16	CT	5 (31,3)	2 (12,5)	-3	18,8	60,0
	keine CT	11 (68,7)	14 (87,5)			
nodal negativ n = 32	CT	8 (23,5)	8 (23,5)	-	-	-
	keine CT	26 (76,5)	26 (76,5)			

Tab. 16: Änderung im Hinblick auf die Therapie-Empfehlung vor und nach Kenntnis des Recurrence-Score (RS) unter Berücksichtigung des Nodalstatus (CT = adjuvante Chemotherapie)

3.6. Charakteristika des uPA/PAI-Kollektivs

Neben der Erhebung des OncotypeDX®-Recurrence-Scores wurde in der Hälfte der untersuchten Fälle (n = 25) ergänzend eine Bestimmung des Gehalts der Proteolysefaktoren Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp (uPA) und dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI - 1) durchgeführt, welche eine wichtige Rolle bei der Invasion und der Metastasierung von Mammakarzinomen spielen.

Die allgemein und tumorspezifisch erhobenen Daten sind in den folgenden Übersichtstabellen aufgeführt (vgl. Tab. 17 - Tab. 19).

	Gesamtgruppe n (%)	uPA/PAI-Gruppe n (%)
Alter MW±Stabw (Jahre)	53,6 ± 11	52,0 ± 12,7
OP		
- BET	37 (74)	22 (78)
- Subkutane Mastektomie	6 (12)	-
- Mastektomie	7 (14)	3 (12)
Schnellschnittdauer (Min.)	24,6	23,8
Befunddauer (d)	1,3	1,2
Histologischer Subtyp		
- NST	44 (88)	20 (80)
- Invasiv lobulär	5 (10)	5 (20)
- sonstiges	1 (2)	-
Betroffene Brust		
- links	29 (58)	12 (48)
- rechts	21 (42)	13 (52)
Tu-Größe MW±Stabw (cm)	2,0 ± 0,9	2,1 ± 1,2
Min/Max (cm)	0,6 / 5,5	1,1 / 5,5

Tab. 17: Alter, OP, Schnellschnittdauer (in Minuten), Befunddauer (in Tagen), Histologischer Subtyp, Betroffene Brust (links, rechts), Tumorgöße (Mittelwert und Standardabweichung in cm; minimale und maximale Größe in cm) im Gesamtkollektiv und uPA/PAI-Kollektiv

	Gesamtgruppe n (%)		uPA/PAI-Gruppe n (%)	
T-Stadium				
pT1b	2 (4)		–	
pT1c	19 (28)	25 (50)	11 (44)	12 (48)
pT1c(m)	6 (12)		1 (4)	
pT2	17 (34)	22 (44)	10 (40)	12 (48)
pT2(m)	5 (10)		2 (8)	
pT3	1 (2)		1 (4)	
Grading				
G1	4 (8)		–	
G2	41 (88)		25 (100)	
G3	5 (10)		–	
Nodal negativ	23 (66)		25 (100)	
Nodal positiv	17 (34)		–	
Lymphgefäßinvasion	22 (43)		10 (40)	
In situ Komponente	28 (56)		11 (44)	

Tab. 18: Tumorstadium, Grading, Nodalstatus, L1 und In-Situ-Komponente im Gesamtkollektiv und uPA/PAI-Kollektiv

	Gesamtgruppe n (%)		uPA/PAI-Gruppe n (%)	
IRS Score ER				
0 negativ	–		–	
1 – 3 schwach	1 (2)		1 (4)	
4 – 6 mäßig	1 (2)		–	
8 – 12 stark	45 (90)		24 (96)	
IRS Score PR				
0 negativ	2 (4)		1 (4)	
1 – 3 schwach	3 (6)		–	
4 – 6 mäßig	5 (10)		1 (4)	
8 – 12 stark	40 (80)		23 (92)	
Ki-67 MW±Stabw.	13±10,1		12,2±10,4	
<14%	28 (56)		16 (64)	
>14%	22 (44)		9 (46)	

Tab. 19: IRS Score und Ki-67-Index Gesamt-Kollektiv und uPA/PAI-Kollektiv

3.6.1. Ergebnisse der uPA/PAI-Testung

Der Cut-off-Wert für uPA-Konzentrationen, welche mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergehen, liegt bei ≥ 3 ng/mg Gesamtprotein, der für seinen Inhibitor PAI bei ≥ 14 ng/mg Gesamtprotein.

Der mittlere erhobene Wert des beobachteten Gesamtkollektivs lag bei $3,44 \pm 2,37$ ng/mg und somit knapp über dem Cut-off-Wert. Insgesamt lag bei 48 % der Patientinnen ($n = 12$) ein Wert < 3 ng/mg vor. Ein erhöhtes Risikoprofil zeigte sich somit in 52 % der Fälle ($n = 13$), wobei der minimal erhöhte Wert bei 3,1 und ein maximale Wert bei 11 ng/mg zu beobachten war.

Für PAI lag der beobachtete Mittelwert bei $19,3$ ng/mg $\pm 11,1$ Protein. Es zeigten sich in ungefähr zwei Drittel der Fälle (64 %) ein Wert von ≥ 14 ng/mg. In 36 % der Untersuchungen ($n = 9$) wurde der cut-off für PAI nicht erreicht; die Ergebnisse lagen zwischen minimal 5,6 und maximal 12 ng/mg.

Für ein positives Testergebnis ist die erhöhte Proteinkonzentration eines der beiden untersuchten Marker ausreichend. In 32 % der vorliegenden Fälle ($n = 8$) konnte eine synchrone Erhöhung beider Werte gesehen werden.

Von den insgesamt 25 Patientinnen ergab sich bei 16 (64 %) ein niedriger RS, bei sieben (28 %) ein mittlerer und bei zweien (8 %) ein hoher RS.

In der „low risk“-Gruppe zeigte sich eine mittlere uPA-Konzentration von $3,9 \pm 1,5$ ng/mg und damit der insgesamt kleinste erhobene Mittelwert der drei Risikogruppen. In der „mittlere“-Risikogruppe wurde ein Mittelwert von $4,6 \pm 1,7$, in der „hoch“-Risikogruppe einer von $6,3 \pm 6,6$ ng/mg gesehen. Für die mittleren Werte von PAI zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Werte zeigen einen Anstieg von der „niedrig“-Risikogruppe zur „hoch“-Risikogruppe. Der Mittelwert der „low risk“-Gruppe lag bei $11 \pm 10,4$, der der „intermediate risk“-Gruppe bei $21,3 \pm 9,6$ und der der „high risk“-Gruppe bei $32,5 \pm 17,7$ (vgl. Abb. 25). In 75 % der Fälle ($n = 8$) zeigten sich in der „low risk“-Gruppe uPA-Werte < 3 ng/mg, passend zur Einteilung in diese Risikogruppe mittels OncotypeDX®. Dementsprechend fanden sich in dieser Gruppe aber auch in 25 % der Fälle ($n = 4$) erhöhte Werte für uPA. In der „intermediate risk“-Gruppe zeigten sich zum größten Teil ($n = 6$, 85,7 %) erhöhte uPA-Werte > 3 ng/mg. In der „high risk“-Gruppe war ein unklares Ergebnis mit jeweils zur Hälfte normalen und

erhöhten uPA-Werten zu beobachten. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 26.

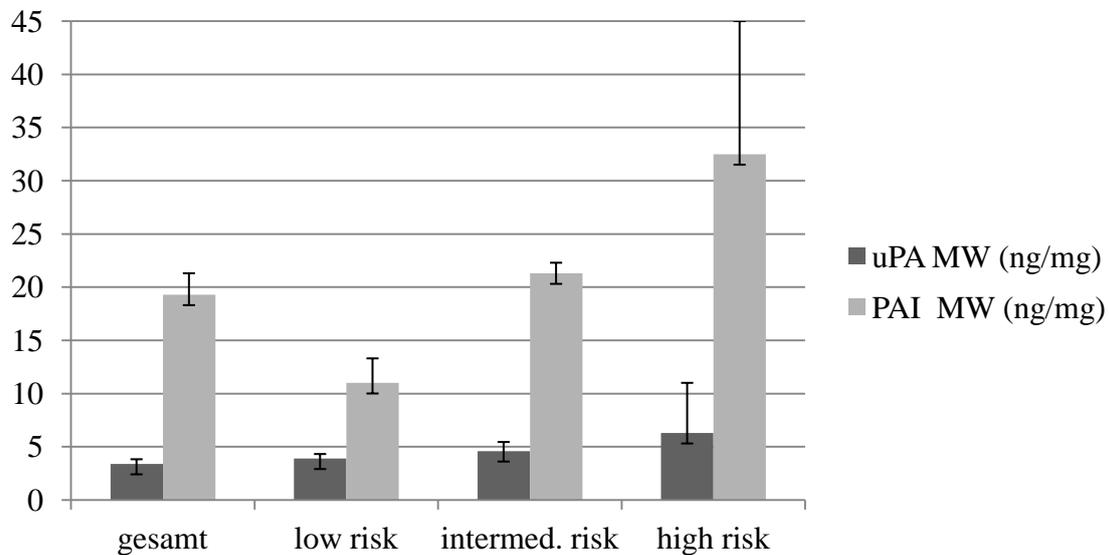


Abb. 25: uPA/PAI-Werte (uPA = Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, PAI = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1) des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen (MW = Mittelwert \pm Standard Error of the Mean, SEM)

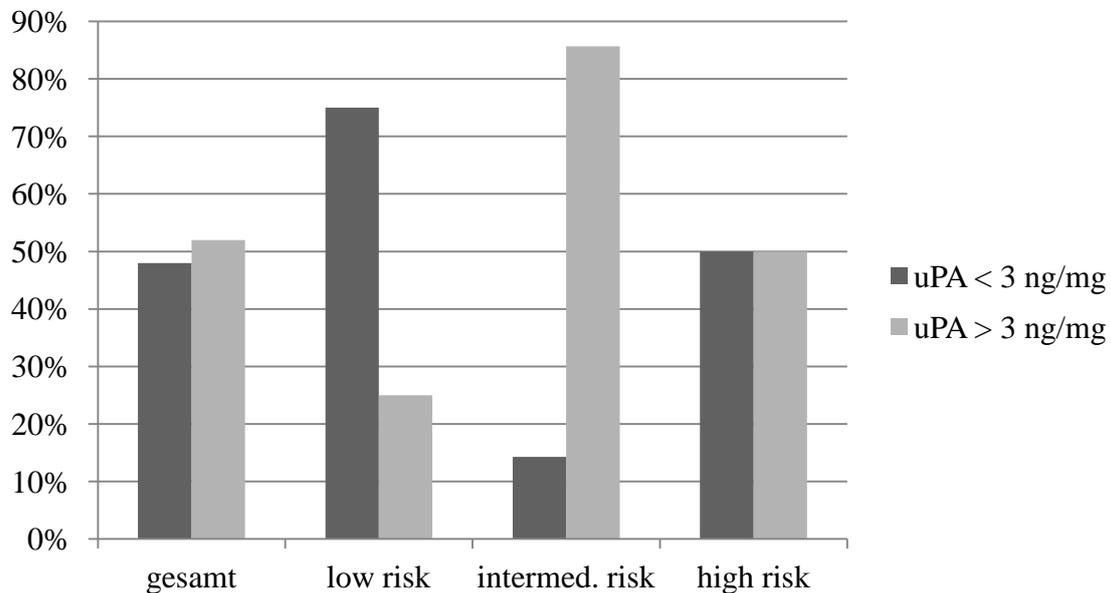


Abb. 26: uPA-Werte des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen

Für PAI zeigte das low-risk-Kollektiv, wie die Abb. 27 illustriert, in je der Hälfte der Fälle ($n = 8$) normale und erhöhte Werte. In der „high risk“-Gruppe lag in allen Fällen gleichsam eine Erhöhung der PAI-Konzentration > 14 ng/mg vor. In der „intermediate

risk“-Gruppe zeigte sich in sechs Fällen (85,7 %) eine erhöhte Konzentrationen des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI).

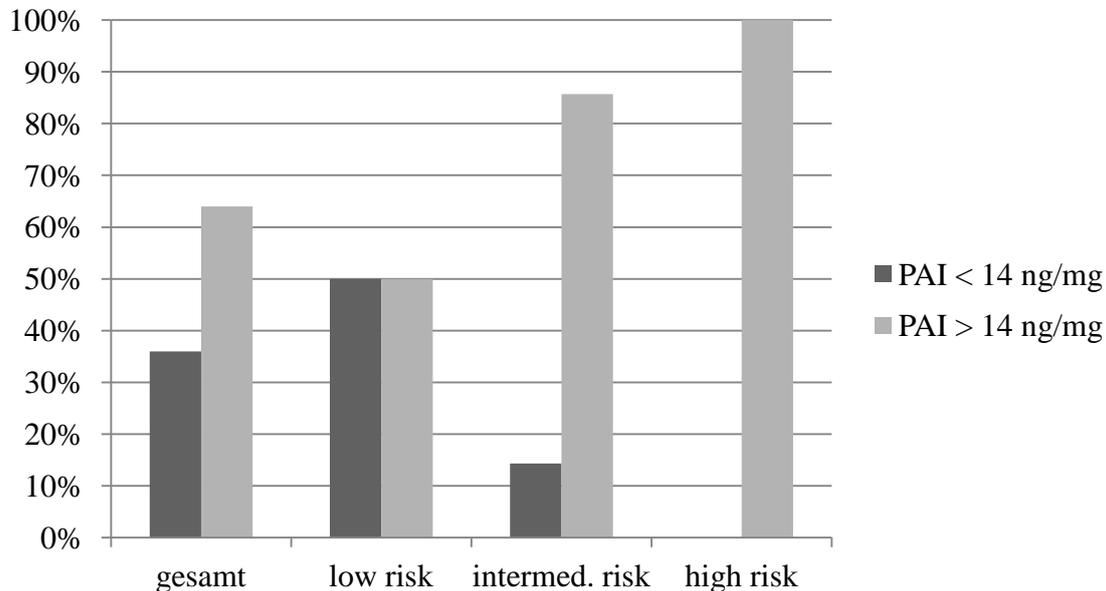


Abb. 27: PAI-Werte des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen

3.6.2. uPA/PAI-Ergebnis und Recurrence-Score

In den 25 untersuchten Proben, bei denen eine zusätzliche uPA/PAI-Testung erfolgte, zeigte sich in 18 Fällen (72 %) eine erhöhte Proteinkonzentration bei zumindest einem der beiden Parameter und somit ein erhöhtes Rezidivrisiko. In 28 % der Fälle (n = 7) lagen beide Marker im Normbereich, entsprechend einem negativen Testergebnis. Diese Fälle waren auch in der OncotypeDX®-Testung in die Gruppe mit niedrigem Rezidivrisiko eingestuft worden, so dass hier von einer guten Übereinstimmung ausgegangen werden kann.

Dennoch zeigte sich in mehr als der Hälfte (56,3 %) der „low risk“-Gruppe nach OncotypeDX® ein erhöhtes Risiko in der uPA/PAI-Analyse (vgl. Abb. 28). Die „mittlere“-Risikogruppe und „hoch“-Risikogruppe ließen begleitend in allen Fällen ein erhöhtes Rezidivrisiko in der uPA/PAI-Testung erkennen. Es konnte somit eine Übereinstimmung in der „hoch“-Risikogruppe zwischen den Ergebnissen der OncotypeDX®- und uPA/PAI-Untersuchung am vorliegenden Patientenkollektiv gefunden werden.

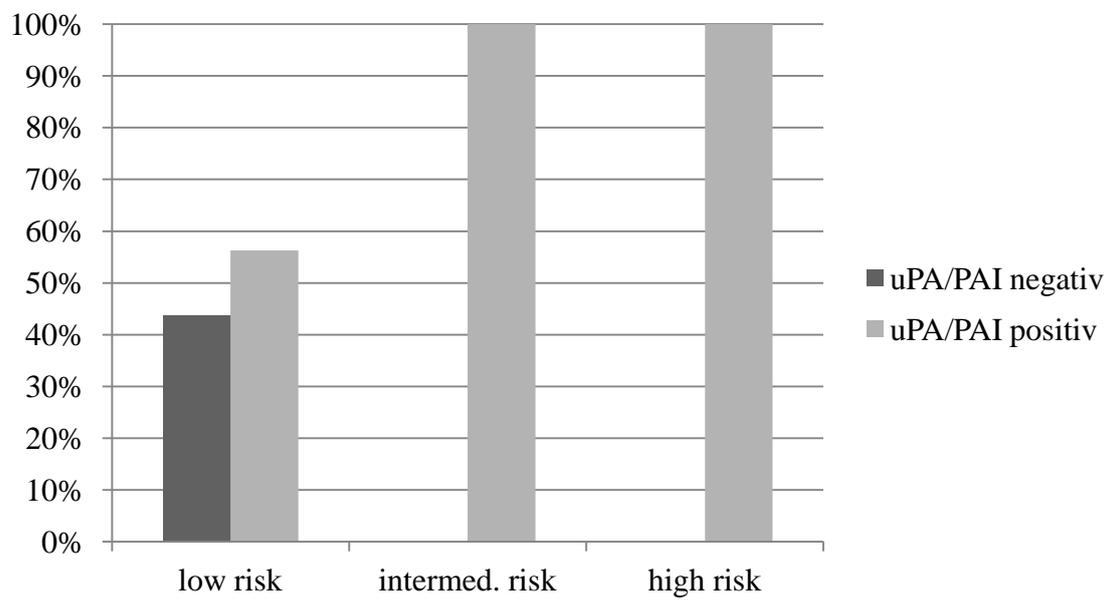


Abb. 28: Vergleich von uPA/PAI und Recurrence-Score der drei Risikogruppen

4. Diskussion

Das Mammakarzinom ist sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau und stellt nach wie vor die führende krebsbedingte Todesursache der weiblichen Bevölkerung dar (1, 3).

Durch ein besseres Verständnis der Heterogenität von Krebserkrankungen im Allgemeinen, insbesondere der des Mammakarzinoms, orientiert sich die Therapie an individuellen Eigenschaften des Tumors der jeweiligen Patientin.

Eine entscheidende Rolle spielt neben einer antihormonellen Therapie der Einsatz einer Chemotherapie. Hierbei kann zwischen einem neoadjuvanten und einem adjuvanten Therapieansatz differenziert werden. Ferner existieren verschiedenste zytostatische Schemata, welche sich in Wirkstoffkombination, Dosis, Applikationsform und -intervall unterscheiden.

In diesem Zusammenhang steht die Ermittlung prädiktiver Faktoren, welchen bezüglich des Ansprechens auf eine therapeutische Maßnahme ein Vorhersagewert zugesprochen wird. Zu den erhobenen Kriterien zählt neben dem Her2-Status und dem Hormonrezeptor-Status auch der Ki-67-Proliferationsindex. Diese Faktoren können als immunhistochemische Surrogatparameter zur Unterteilung in die verschiedenen intrinsischen Subtypen genutzt werden, um als Entscheidungsgrundlage für eine weiterführende Therapie dienen zu können. Bei luminalen Mammakarzinomen (Her2-negativ, Hormonrezeptor-positiv) ist anhand der klassischen klinisch-pathologischen Faktoren nicht immer sicher zu entscheiden, welche Patientin neben der indizierten endokrinen Therapie von einer adjuvanten Chemotherapie profitiert. Vor diesem Hintergrund erfolgte die Entwicklung von Multigen-Tests wie dem OncotypeDX® und die proteinbasierte Analyse der Biomarker uPA/PAI, um das individuelle Rezidivrisiko der einzelnen Patientin besser abschätzen zu können. Eine standardisierte Testung in unklaren Fällen existiert derzeit noch nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Patientenkollektiv untersucht, bei dem aufgrund eines unklaren Nutzens einer adjuvanten Chemotherapie eine OncotypeDX®-Testung durchgeführt wurde. Anhand definierter Parameter wurde versucht, Besonderheiten des vorliegenden Kollektivs herauszuarbeiten. Von besonderem Interesse war die Anzahl der Patientinnen in den drei Risikogruppen. Ferner stellte sich die Frage, ob an ausgewählten Faktoren wie Patientenalter, Tumorgröße, histologischem Grading,

Lymphgefäß- und Blutgefäßeinbruch eine Vorhersage des Recurrence-Score möglich ist. Besonderes Interesse galt der Frage, ob anhand des Hormonrezeptor-Scores und der Höhe des Ki-67-Proliferationsindex der zu erwartende Recurrence-Score abgeleitet werden kann. Da im Zuge der OncotypeDX®-Testung die qRT-PCR-basierte Untersuchung und separate Mitteilung des Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status erfolgte, stellte sich die Frage, inwieweit diese mit den bereits immunhistochemisch erhobenen Werten für die Hormonrezeptoren in Einklang stehen. Demnach wurde ein Vergleich in den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden ermittelten Werte vorgenommen. Ferner war von Interesse, wie die Recurrence-Score-Ergebnisse die Entscheidung über die folgenden therapeutischen Maßnahmen beeinflussten.

Im Vordergrund stand dabei, ob und in welchen Fällen eine Änderung der Empfehlung für oder gegen eine Chemotherapie resultierte. Unabhängig davon wurde bei der Hälfte des vorliegenden Gesamtkollektivs, welches die Anforderungen der proteinbasierten Testung von uPA/PAI erfüllten, dieser Test durchgeführt. In diesen Fällen war somit eine vergleichende Betrachtung der beiden Testergebnisse möglich.

4.1. Charakteristika des Gesamtkollektivs

In der Altersstruktur des Kollektivs zeigte sich ein mittleres Alter von $53,6 \pm 11,0$ Jahre mit einer Spanne von 28 bis 73 Jahren. In der Altersverteilung zeigten sich keine Auffälligkeiten (vgl. Abb. 5). Die größte beobachtete Altersgruppe stellten die 41-50-jährigen mit 28 % der Fälle dar. Erwartungsgemäß waren Patientinnen > 70 Jahre am seltensten (n=4, 8 %). Dies kann damit begründet werden, dass bei älteren Patienten aufgrund der begleitenden Komorbidität die Indikation für eine zytotoxische Therapie seltener gestellt wird. Zudem legt eine Übersicht randomisierter Studien nahe, dass junge Patientinnen eher von einer Chemotherapie profitieren als ältere (121, 122).

Bei Betrachtung der Verteilung der histologischen Subtypen fand sich, wie erwartet, in einer großen Mehrheit (n=44, 88,0 %) ein invasives Mammakarzinom of no special Type (NST), gefolgt von einem invasiv-lobulären Subtyp (n=5, 10,0 %). In nur einem Fall konnte ein tubulo-lobuläres Karzinom gefunden werden (vgl. Tab. 2). Dies deckt sich mit der für gewöhnlich zu beobachtenden Häufigkeitsverteilung der verschiedenen histologischen Subtypen (2). Auffällig war, dass die linke Brust etwas häufiger betroffen war (n=29, 58,0 %). Bei Betrachtung der Häufigkeit der vergebenen

histologischen Differenzierungsgrade zeigte sich besonders häufig ein mäßiger Differenzierungsgrad (G2), welcher bei 41 Patientinnen (82,0 %) des Gesamtkollektivs zu finden war. Da zu den Voraussetzungen für die OncotypeDX®-Testung ein positiver Hormonrezeptor-Status und ein negativer Her2-Status zählen, konnten bei diesen Merkmalen folglich keine Unterschiede ausgemacht werden. Es konnte aber festgestellt werden, dass in einer deutlichen Mehrzahl der Fälle stark positive immunreaktive Scores vor allem für den Östrogen- aber auch für den Progesteronrezeptor gesehen wurden (n=45, 90,0 % bzw. n=40, 80,0 %).

4.2. Verteilung der Risikogruppen

Im vorliegenden Kollektiv stellte sich die Verteilung auf die drei Risikogruppen, welche anhand des Recurrence-Scores ermittelt wurden, wie folgend dar: 31 Patientinnen (62 %) waren in der „low risk“-Gruppe, 16 Patientinnen (32 %) in der „intermediate risk“-Gruppe und drei Patientinnen (6 %) in der „high risk“-Gruppe. In etwas weniger als zwei Dritteln der Fälle war somit von einem niedrigen Rezidivrisiko auszugehen, in etwa einem Drittel der Fälle von einem mittleren Rezidivrisiko. Die „high risk“-Gruppe war in der vorliegenden Untersuchung klein und umfasste nur drei Patientinnen, was zu einem Teil der insgesamt geringen Anzahl der untersuchten Fälle geschuldet sein dürfte. Im Vergleich zu den Patientenkollektiven randomisierter Studien konnte bei der ATAC-Studie eine ähnliche Verteilung auf die Risikogruppen gesehen werden. Von den 872 nodal-negativen der insgesamt 1178 eingeschlossenen Patientinnen waren 513 (59 %) in der „low risk“-Gruppe, 229 (26 %) in der „intermediate risk“-Gruppe und 130 (15 %) in der „high risk“-Gruppe. Von den insgesamt 306 nodal-positiven Patientinnen waren 160 (52 %) in der „niedrig“-Risikogruppe, 94 (31 %) in der „mittlere“-Risikogruppe und 52 (17 %) in der „hoch“-Risikogruppe zu finden. Auch hier hat die Gruppe mit dem niedrigsten Risiko die größte Gruppenstärke, gefolgt von der Gruppe mit mittlerem Risiko (78). Im Vergleich dazu zeigt sich bei der NSABP-B14 - und der SWOG-Studie ein anderes Bild. In der erstgenannten wurden insgesamt 651 Patienten untersucht, wovon 353 (54,2 %) in der „niedrig“-Risikogruppe 134 (20,6 %) in der „intermediate risk“-Gruppe und 164 (25,2 %) in der „hoch“-Risikogruppe waren (76). Von dem 367 Patienten starken SWOG-Kollektiv fanden sich 146 (39,8 %) in der „low risk“-Gruppe, 103 (28,1 %) in der „intermediate risk“-Gruppe und 118 (32,2 %) in der „high risk“-

Gruppe (81). Auch in diesen beiden letztgenannten Studien stellte die „niedrig“-Risikogruppe jeweils den größten Anteil, wobei die „high risk“-Gruppe die zweitgrößte Gruppenstärke aufwies.

4.3. Vergleich verschiedener Tumormerkmale mit dem Recurrence-Score

Im Vergleich des mittleren Alters bei Diagnosestellung der drei Risikogruppen konnte beobachtet werden, dass die Patientinnen der „low risk“-Gruppe im Mittel das geringste Erkrankungsalter (52 ± 10 Jahre, Median 56) und die der „hoch“-Risikogruppe im Mittel das höchste Erkrankungsalter (64 ± 6 Jahre, Median 64) aufweisen. Der errechnete Mittelwert für die „intermediate risk“-Gruppe lag bei 54 ± 11 Jahren (vgl. Abb. 12.) So gehörte auch die jüngste in die Untersuchung eingeschlossene Patientin mit 28 Jahren anhand ihres Recurrence-Scores in die „low risk“-Gruppe. Die älteste Patientin des Kollektivs war 73 Jahre alt und wurde der Gruppe mittleren Risikos zugeteilt. Anhand des Alters alleine lässt sich natürlich keine Aussage bezüglich des zu erwartenden Recurrence-Score treffen. Dennoch kann an den beschriebenen Ergebnissen zumindest eine Tendenz angedeutet werden. Es folgte eine differenzierte Betrachtung nach Einteilung in Altersgruppen. Hier konnte gesehen werden, dass Patientinnen < 40 Jahre ein geringes oder mittleres Rezidivrisiko aufwiesen.

Für die Patientinnen zwischen 41 und 59 Jahren zeigt sich ein Trend von der niedrigen zur mittleren Risikogruppe, wobei diese Altersgruppe auch insgesamt den größten Anteil stellte. Für ein Alter > 50 Jahre zeigte sich eine Tendenz zur „hoch“-Risikogruppe. Einschränkend ist die doch sehr geringe Gruppenstärke der „hoch“-Risikogruppe zu erwähnen. Da die Korrelation des Alters mit dem Recurrence-Score gegenwärtig kein Gegenstand von Studien ist, stellt sich ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit der Literatur schwierig dar. In einer Studie mit 74.334 Patienten wurde unter anderem die Altersstruktur im Zusammenhang mit dem Recurrence-Score untersucht (123). Die Einteilung der Altersgruppen entsprach der hier vorliegenden: < 40 Jahre, 41 - 50 Jahre, 51 - 60 Jahre, 60 - 70 Jahre und > 70 Jahre. Die Studie konnte zeigen, dass der Prozentsatz der Brustkrebs-Patientinnen pro Altersgruppe ähnlich für den low-, intermediate- und high-risk Score bei Patientinnen zwischen 41 und 70 Jahren war. Hingegen konnte bei Patientinnen, welche jünger als 40 und älter als 70 Jahre alt

waren, ein Trend zum „high-risk“ Score gefunden werden. Diese Beobachtung war laut der Autoren für die jüngeren Patientinnen zu erwarten. Die Trendentwicklung der ältesten Patientinnen hingegen sei überraschend. Ein Vergleich mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen ist nur begrenzt möglich, da die Einteilung der Risikogruppen in der beschriebenen Studie anhand der Cut-off-Werte, wie sie im Rahmen der laufenden TailorX-Studie Anwendung finden, vorgenommen wurde. Diese definiert die „niedrig“-Risikogruppe mit einem Score von 0 - 10, die „mittlere“-Risikogruppe mit einem Score von 11 - 25 und die „hoch“-Risikogruppe mit einem Score von 26 - 100. Infolgedessen vergrößert sich vor allem die Anzahl von Patientinnen mit „intermediate-risk“-, aber auch mit „high-risk“-Score (124).

Auffällig bei der Betrachtung der Tumorgröße war, dass die „low risk“-Gruppe im Mittel die größten Karzinomherde aufwies ($2,1 \pm 0,9$ cm, Median 2,1). Auch der insgesamt größte Tumorherd mit 5,5 cm war bei einer Patientin mit niedrigem RS zu finden. Gering kleiner stellte sich die mittlere Tumorgröße in der „intermediate risk“-Gruppe mit $2,0 \pm 0,8$ cm dar (Median 1,8). Die im Mittel kleinsten Tumorherde ($1,6 \pm 0,6$ cm, Median 1,3) waren im vorliegenden Kollektiv in der „high risk“-Gruppe auszumachen. Diese Ergebnisse sind erstaunlich, da zu erwarten war, dass große Tumoren tendenziell eher mit einem hohen Risiko-Score und kleine Karzinome vielmehr mit einem geringeren Risiko-Score einhergehen. In einer Studie von 2010 untersuchten Auerbach et al. den Zusammenhang zwischen in der pathologischen Diagnostik erhobenen Routineparametern und dem Recurrence-Score mit der Frage, welche pathologischen Marker eine Vorhersage des Recurrence-Scores ermöglichen. Dafür wurden 138 Fälle eines invasiven, nodal-negativen und Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms untersucht. In 133 Fällen betrug die Tumorgröße zwischen 0,4 und 3,0 cm. In vier Fällen lagen Tumoren mit einer Größe von $> 3,0$ cm vor. Drei davon zeigten parallel einen hohen Recurrence-Score-Wert. In einem Fall wurde ein niedriger Recurrence-Score von 5 gesehen. Hier handelte es sich um ein muzinöses Mammakarzinom. Insgesamt konnte eine geringe, aber statistisch signifikante Korrelation zwischen Tumorgröße und Recurrence-Score gefunden werden (Spearman's Rangkorrelationskoeffizient 0,18; $p = 0,04$) (125). Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Tumorgröße allein keinen ausreichenden Aufschluss auf einen zu erwartenden Recurrence-Score-Wert zu lässt.

Flanagan et al. untersuchten 42 Fälle nodal-negativer, Östrogenrezeptor-positiver, invasiver Mammakarzinome und konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Recurrence-Score und dem Tumorgrading (Nottingham Grading), dem immunhistochemisch bestimmten Hormonrezeptor-Status und Her2/neu-Status zeigen (126). Sie kamen zum Schluss, dass eine OncotypeDX®-Testung bei G1 und G3 Tumoren nicht erforderlich ist, da in diesen Fällen eine Korrelation zwischen Tumordifferenzierung und Recurrence-Score bestünde. In ihrer Studie fanden sie kein G3-Karzinom mit niedrigem Recurrence-Score und auch kein G1-Karzinom mit einem hohen Recurrence-Score. Einschränkend ist zu erwähnen, dass in dieser Studie insgesamt nur eine geringe Fallzahl (n = 42) untersucht wurde. Auch in der hier vorliegenden Arbeit waren die vier Fälle mit gut differenzierten Tumoren (G1) ausschließlich in der „low risk“-Gruppe und alle diagnostizierten wenig differenzierten Karzinome (G3) in der „high risk“-Gruppe zu finden. Den größten Anteil machen jedoch die mäßig differenzierten (G2) Mammakarzinome mit einem Anteil von 82,0 % aus (n = 41). Diese waren in 27 Fällen (65,9 %) in der „niedrig“-Risikogruppe, in 13 Fällen (31,7 %) in der „mittlere“-Risikogruppe und in einem Fall (2,4 %) in der „hoch“-Risikogruppe zu finden. In Zusammenschau konnte festgestellt werden, dass aufgrund des histologischen Differenzierungsgrades eine eingeschränkte Vorhersage des Recurrence-Scores möglich ist, dieser aber nicht als alleiniger Faktor herangezogen werden kann. Ein prädiktiver Wert konnte auch nur für gut oder wenig differenzierte Karzinomen gezeigt werden. Für die große Gruppe der mäßig differenzierten Karzinome ließ sich auf alleiniger Basis der Tumordifferenzierung keine Vorhersage des zu erwartenden Recurrence-Scores treffen.

Im vorliegenden Gesamtkollektiv zeigte sich insgesamt in 22 Fällen (43,1 %) eine Lymphangiosis carcinomatosa (L1) und in 4,0 % der Fälle (n = 2) eine Hämangiosis carcinomatosa (V1). In 45,2 % der „low risk“-Gruppe (n = 14) war eine Lymphgefäßinvasion, in einem Fall (3,2 %) eine Hämangiainvasion zu sehen. In der „intermediate risk“-Gruppe zeigte die Hälfte der Patientinnen (n = 8) eine Invasion in Lymphgefäße und in 6,3 % der Fälle eine Blutgefäßinvasion (n = 1). In der „high risk“-Gruppe fanden sich weder eine Lymphgefäß- noch eine Blutgefäßinvasion. Für eine L1-Situation bedeutet dies insgesamt, dass eine solche 14-mal in der „low risk“-Gruppe (63,6 %) und in acht Fällen in der „intermediate risk“-Gruppe (36,4 %) ausgemacht

werden konnte. Die beiden Fälle mit einem Blutgefäßeinbruch verteilen sich auf den niedrigen und mittleren Recurrence-Score. Etwas überraschend ist, dass sich in der „high risk“-Gruppe weder eine L1- noch eine V1-Situation zeigen, obwohl für beide Parameter eine prognostische Bedeutung nachgewiesen werden konnte (55, 56). Eine Erklärung hierfür liegt in der geringen Gruppenstärke der vorliegenden „hoch“-Risikogruppe. Allison et al. konnten in einer Studie mit 173 Fällen Östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome keine signifikante Korrelation zwischen einer Lymphgefäßinvasion und den Recurrence-Score-Gruppen finden ($p = 0,438$) (127). Die Lymphangiosis carcinomatosa wurde in der beschriebenen Arbeit sowohl HE-morphologisch, als auch immunhistochemisch mit der Färbung gegen D2-40 untersucht. HE-morphologisch war in 12 Fällen eine L1 zu identifizieren; vier davon zeigten einen low-risk-Score, vier einen intermediate-risk-Score und ebenfalls vier einen high-risk-Score. In der Immunhistochemie mit dem Marker D2-40 konnte eine Lymphinvasion in neun Fällen gesehen werden; zwei davon waren mit einem low-risk-Score, sechs mit einem intermediate-risk-Score und einer mit einem high-risk-Score assoziiert (127).

4.4. Vergleich der Hormonrezeptor-Scores/Ki-67 Index mit dem Recurrence-Score

Bei der Betrachtung der mittleren Scorewerte für die Hormonrezeptor-Scores fällt auf, dass sowohl für den ER-Rezeptor als auch für den PR-Rezeptor die höchsten Werte in der „niedrig“-Risikogruppe und die niedrigsten Werte in der „hoch“-Risikogruppe beobachtet wurden. Besonders deutlich sanken die Werte im aufsteigenden Gruppenvergleich von der „low risk“-Gruppe zur „high risk“-Gruppe ab. Der Mittelwert der Gruppe des geringsten Rezidivrisikos war fast dreimal so hoch wie der des höchsten Rezidivrisikos (vgl. Abb. 18, Abb. 19). In gleicher Reihenfolge dieser Betrachtung ließ auch der ER-Score einen Abfall erkennen, welcher jedoch vergleichsweise deutlich geringer ausfiel. In allen drei Gruppen war in mehr als der Hälfte der Fälle ein stark positiver ER-Score (8 – 12) zu erkennen. Der höchste Anteil stark positiver Werte fand sich bei niedrigem Recurrence-Score. Auch hier nahm der prozentuale Anteil der stark positiven Werte von der „low risk“-Gruppe zur „high risk“-Gruppe ab. Deutlich stärker stellte sich das Absinken des prozentualen Anteils stark positiver Werte bei Betrachtung des PR-Scores von der „niedrig“-Risikogruppe zu „hoch“-Risikogruppe dar. In der

Gruppe mit den höchsten Recurrence-Scores zeigte sich nur in 33,3 % der Fälle ein stark positiver PR-Score. In der Mehrzahl der Fälle lag ein negatives Ergebnis vor. In den beiden anderen Gruppen mit niedrigem oder mittlerem Risiko war kein negativer PR-Status zu identifizieren. Somit lässt sich vermuten, dass zwischen der Höhe des Hormonrezeptor-Scores und dem Recurrence-Score ein Zusammenhang besteht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass vor allem der Progesteronrezeptor-Score mit dem Recurrence-Score in Beziehung steht. Allison et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass das Niveau der Progesteronrezeptor-Expression einen größeren prädiktiven Stellenwert für die Vorhersage des Recurrence-Score besitzt als das des Östrogenrezeptors (127). Auch die von Tang et al. publizierten Daten deuten auf eine starke Korrelation zwischen hohen Recurrence-Score-Werten und niedrigen PR-Scores hin (128). Dies deckt sich gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei der die Mehrzahl der Patientinnen mit hohem Risiko-Score einen negativen Progesteron-Status zeigten. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass bei Hormonrezeptor-positiven Karzinomen der PR-Score eine bessere Vorhersagekraft bezüglich der Wirksamkeit einer Tamoxifen-Therapie hat als der Östrogenrezeptor-Score und eine Therapie mit Tamoxifen bei fehlender Progesteron-Expression unwirksam ist (129, 130). Nach Datenlage ist außerdem zu vermuten, dass innerhalb der Hormonrezeptor-positiven Gruppe der Mammakarzinome der Wert des Progesteronrezeptor-Status auch im Hinblick auf das krankheitsspezifische Überleben eine stärkere prognostische Aussagekraft besitzt als der Wert des Östrogenrezeptor-Status. Insgesamt sollen hohe PR-Score-Werte mit einem besseren brustkrebsspezifischen Überleben korrelieren (131).

In vorliegender Arbeit konnte bei Betrachtung des Ki-67-Proliferationsindex der drei Gruppen nach steigendem Risiko ein begleitender Anstieg des Ki-67-Wertes beobachtet werden. In der „hoch“-Risikogruppe zeigte sich durchschnittlich ein Ki-67-Index von 41,7 %. In der Mehrzahl der Fälle zeigte sich in der „low risk“-Gruppe ein Ki-67-Index < 14%. In der „intermediate risk“-Gruppe konnte ein leichtes Überwiegen der mittleren Ki-67-Werte von > 14 % gesehen werden. Die „hoch“-Risikogruppe zeigte ausschließlich einen Ki-67-Proliferationsindex > 14 %, welcher zugleich auch in allen Fällen > 20 % betrug. Somit lässt sich feststellen, dass in der „hoch“-Risikogruppe nur hohe Ki-67-Proliferationsindices gesehen wurden. Ein signifikanter Zusammenhang

konnte in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt werden, da aufgrund der geringen Gruppenstärke der „high risk“-Gruppe ein aussagekräftiges und verwertbares Ergebnis nicht zu erwarten war. Der Umkehrschluss, dass ein hoher Ki-67-Wert mit einem hohen Recurrence-Score Ergebnis einhergeht, kann nicht gezogen werden. Auch in der „niedrig“-Risikogruppe waren in elf Fällen (35,5 %) Ki-67-Indices $> 14\%$ zu finden, welche in immerhin 12,9 % der Fälle Werte $> 20\%$ darstellten. In der Gruppe mit mittleren Recurrence-Scores konnte eine, wenn auch nur geringe, Tendenz zu Ki-67-Indices von $> 14\%$ gesehen werden. Außerdem muss in diesem Zusammenhang auf Schwierigkeiten in der Bestimmung des Proliferationsindex Ki-67 hingewiesen werden. Derzeit existiert keine international anerkannte und standardisierte Untersuchungsmethode. Auch existieren keine einheitlichen Schwellenwerte, welche definieren, ab wann von einem „niedrigen“ oder „hohen“ Ki-67-Index gesprochen werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Schwellenwerte leiten sich aus dem St. Gallen Konsensus von 2011 ab. In diesem werden Cut-off-Werte von $< 14\%$ und $\geq 14\%$ für Ki-67 zur Unterscheidung des intrinsischen *luminal A* vom *luminal-B* Subtyp, welche jedoch nur auf den Ergebnissen einer einzigen Studie beruhen, propagiert (61). Kennzeichnend für diese Unsicherheit ist, dass sich im aktuellen St. Gallen Konsensus von 2015 eine Mehrheit des Gremiums dafür aussprach, Ki-67-Werte von 20 – 29 % einzusetzen, um einen *luminal-B* Subtyp zu diagnostizieren (132).

Eine Studie, welche zum Ziel hatte, routine-pathologische Parameter zu identifizieren, anhand derer in einem ER-positiven Kollektiv der OncotypeDX® Recurrence-Score vorhergesagt werden kann, konnte Ki-67 als einzigen der untersuchten Proliferations- bzw. Zellzyklus-Marker (Ki-67, CyclinD1 und Bcl2) mit signifikanter Verbindung zu den Recurrence-Score Gruppen ausmachen ($P = 0,007$) (127). Der Ki-67-Wert wurde in der beschriebenen Studie in niedrig ($\leq 10\%$) und hoch ($> 10\%$) eingeteilt. Es konnte gezeigt werden, dass Ki-67-Werte $> 10\%$ in den meisten Fällen mit einem hohen Recurrence-Score assoziiert und Ki-67-Werte $\leq 10\%$ vor allem in der niedrigen Risikokategorie zu finden waren. Diese als niedrig definierten Ki-67-Werte waren jedoch auch häufig in der Kategorie mittleren Risikos auszumachen. Durch die weiteren in die Untersuchung einbezogenen Parameter kamen Allison et al. zum Schluss, dass eine Kombination von pathologisch ermittelten Parametern in der Vorhersage des

Recurrence-Score genutzt werden kann. So zeigten gut differenzierte Karzinome mit hohem Progesteron-Level (Allred Score ≥ 5) und einem Ki-67-Index $\leq 10\%$ eine sichere Zuordnung zur „low risk“-Gruppe. Umgekehrt konnten wenig differenzierte Karzinome mit niedrigem Progesteron-Level (Allred Score < 5) und einem Ki-67-Index von $> 10\%$ sicher in die „high risk“-Gruppe eingeteilt werden. Für die Gruppe der mäßig differenzierten Karzinome (G2) und für die G1-Karzinome mit niedrigem PR-Level sowie für die G3-Karzinome mit hohem PR-Level wurde die Testung mit OncotypeDX® empfohlen. Auch in einer weiteren Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Proliferationsindex Ki-67 in Verbindung mit der Tumordifferenzierung, Tumorgroße und dem histologischen Subtyp beschrieben werden (133). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass das einzelne pathologische Marker zwar einen Zusammenhang mit dem zu erwartenden Recurrence-Score Ergebnis erkennen lassen, bei fehlender Möglichkeit oder Einsparung eines OncotypeDX®-Tests jedoch eine definierte Kombination verschiedener Marker zu Rate gezogen werden muss.

4.5. Hormonrezeptor-Status: Vergleich von Immunhistochemie und qRT-PCR

Sowohl in der immunhistochemischen Untersuchung als auch unter Verwendung der qRT-PCR-Analyse im Zuge der OncotypeDX®-Testung fand sich in allen Proben ein positiver Östrogenrezeptor-Status (ER-Status). Somit konnte in hier vorliegender Untersuchung eine Übereinstimmung in 100 % der Fälle gezeigt werden. Auch beim Vergleich der errechneten Mittelwerte beider Messergebnisse konnte eine entsprechende Werteverteilung bei Betrachtung der einzelnen Risikogruppen gesehen werden (vgl. Abb. 22). Die „low risk“-Gruppe zeigte die höchsten, die „high risk“-Gruppe die niedrigsten und die „intermediate risk“-Gruppe dazwischen befindliche Mittelwerte für den Östrogenrezeptor-Score (ER-Score). Dieses Resultat ergab sich unabhängig von den Untersuchungsmethoden. Bei einer differenzierteren Betrachtung gingen immunhistochemisch mäßig positive ER-Scores (IRS 4 - 6) mit qRT-PCR-Ergebnissen des unteren bis mittleren positiven Bereichs (7,7 - 9) einher. Stark positive ER-Scores (IRS 8 - 12) zeigten begleitend qRT-PCR-Werte im mittleren bis hohen positiven Bereich (8,0 - 12,1). Interessanterweise fanden sich bei immunhistochemisch

erhobenem Maximalwert von 12 in der parallelen qRT-PCR-Analyse Werte, welche eine Spanne von 8 – 12,3 umfassten (Max. $\geq 12,5$)

Auffällig im Vergleich der Mittelwerte der drei Risikogruppen war für den Progesteronrezeptor, dass sich die qRT-PCR-Werte der mittleren- und „hoch“-Risikogruppe im Gegensatz zu den immunhistochemisch erhobenen Werten kaum unterschieden. In der „niedrig“-Risikogruppe fanden sich mit beiden Testmethoden die höchsten Mittelwerte für den Progesteronrezeptor. Sowohl immunhistochemisch als auch bei der qRT-PCR-Untersuchung wurde in zwei Fällen ein negativer PR-Status erhoben. Dabei handelte es sich jedoch nicht um dieselben Proben. Die immunhistochemisch mit einem Score von 0 und damit negativ gewerteten Proben zeigten in der OncotypeDX®-Testung PR-Scores von 5,9 bzw. 6,6, welche gemäß des Cut-off-Wertes (5,5) der qRT-PCR-Methode als positiv gewertet werden. Die Testresultate dieser beiden Patientinnen wurden entsprechend der Recurrence-Score-Werte von 35 bzw. 37 der „hoch“-Risikogruppe zugerechnet. Die beiden nach PCR-Methode negativen Fälle zeigten begleitend einen PR - IRS von 1 und somit ein schwach positives Ergebnis in der Immunhistochemie. Die Patientin mit dem niedrigeren der beiden Werte (4,1) hatte einen Recurrence-Score von 29 und wurde der „intermediate risk“-Gruppe zugeteilt. Die andere Patientin zeigte einen qRT-PCR-Wert von 4,4 und resultierend ein niedriges Rezidivrisiko (RS 13). Trotz der Diskrepanz zwischen den beschriebenen vier Fällen lässt sich erkennen, dass die qRT-PCR-positiven und Immunhistochemie-negativen Proben mit qRT-PCR-Werten von 5,9 bzw. 6,6 im unteren positiven Bereich angesiedelt sind. Ebenso zeigten die Immunhistochemie-positiven und qRT-PCR-negativen Proben immunhistochemisch einen nur schwach positiven IRS-Score von 1.

In den beiden anderen verglichenen Gruppen der immunhistochemisch mäßig bzw. stark positiven PR-Scores zeigten sich im Gegensatz zu den eben beschriebenen niedrig positiven Werten ähnliche Ergebnisse in beiden Untersuchungsmethoden. In der Gruppe der immunhistochemisch mäßig positiven IRS-Scores (IRS 4 - 6) zeigten sich begleitend niedrig bis mittlere Werte des PR-Scores in der qRT-PCR-Analyse (5,5 - 8,29). In der Gruppe stark positiver immunhistochemischer Ergebnisse (IRS 8 - 12) für den Progesteronrezeptor fanden sich PCR technisch bestimmte mittlere bis hohe Werte

(7,1 - 10,4). Wie schon beim ER-Rezeptor vorbeschrieben, zeigte sich bei einem PR-IRS von 12 eine weite Spanne (7,5 - 10,4) der dazugehörigen PCR - ermittelten Werte. In der vorliegenden Arbeit konnte somit für den Progesteronrezeptor gezeigt werden, dass sich bei immunhistochemisch mäßig und stark positiven Score-Werten eine gute Übereinstimmung mit den mittels qRT-PCR erhobenen Scores zeigt. In den beiden Fällen, die einen negativen oder schwach positiven IRS zeigten, konnte hingegen keine Übereinstimmung gefunden werden.

In mehreren Studien wurde eine klare Korrelation der mittels der beiden verschiedenen Untersuchungsmethoden erzielten Ergebnisse für die Hormonrezeptoren gezeigt, obwohl es sich bei der Immunhistochemie um einen Nachweis der Proteinexpression handelt und bei der qRT-PCR-Methode das mRNA-Transkriptions-Level gemessen wird (72, 134-136). Wie in der vorliegenden Arbeit wurde für den Östrogenrezeptor eine bessere Übereinstimmung zwischen der Immunhistochemie und der qRT-PCR-Methode gesehen als für den Progesteronrezeptor (135-137). In einer von Genomic Health geförderten Studie verglichen Badve et al. die beiden Untersuchungsmethoden in 776 Fällen. Bei insgesamt guter Übereinstimmung der Ergebnisse, insbesondere für den Östrogenrezeptor, fanden sich innerhalb der diskrepanten Fälle eine höhere Anzahl Immunhistochemie-negativer und zugleich qRT-PCR-positiver Fälle als umgekehrt (136). Abweichend davon fanden Kraus et al. in einer Arbeit mit 464 untersuchten Brustkrebsfällen sowohl für den Östrogen- als auch für den Progesteronrezeptor mehr immunhistochemisch positive und qRT-PCR-negative als immunhistochemisch negative und qRT-PCR-positive Fälle. Für die immunhistochemische Analyse wurde in der vorgestellten Studie der H-Score (0 - 300) angewendet. Die Autoren kamen zum Schluss, dass die immunhistologische Untersuchung eine höhere Sensitivität als die qRT-PCR-Methode aufweist, insbesondere bei Fällen, welche immunhistochemisch eine insgesamt geringe Färbereaktion und ein heterogenes Expressionsmuster aufweisen (135). Ein Vorteil der immunhistochemischen Analyse besteht darin, dass die Tumormorphologie berücksichtigt wird, wohingegen es sich bei der PCR um eine molekulare Untersuchungsmethode handelt (137). Gewebe einer Biopsiehöhle, nicht-neoplastisches Gewebe oder Anteile einer begleitenden In-situ-Läsion können zu einer Verunreinigung der Tumor-mRNA führen. Dies kann eine mögliche Erklärung für differente Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden darstellen. Ferner wurde in

der Literatur beschrieben, dass Zellen einer tumor-assoziierten Entzündungsreaktion, ein zelluläres Stroma und umgebendes Gewebe einer Vor-Biopsiestelle das OncotypeDX®-Ergebnis beeinflussen (138).

4.6. Der Einfluss von OncotypeDX® auf die Therapieentscheidung

Von besonderem klinischen Interesse war, inwieweit das Recurrence-Score-Ergebnis die Therapieentscheidung bezüglich einer adjuvanten Chemotherapie beeinflusst. Vor Bekanntwerden des OncotypeDX®-Ergebnisses sollten 12 (24 %) der insgesamt 50 Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Nach Vorliegen der Untersuchungsergebnisse waren es noch 10 Patientinnen (20 %), denen eine solche Therapie empfohlen wurde. Dies entspricht einer absoluten Reduktion von 4 % und einer relativen Reduktion von 16,7 % (n = 3). Eiermann et al. untersuchten in einer Studie mit 366 Patientinnen den Einfluss des Recurrence-Score (RS) auf das adjuvante Therapieregime bei ER-positivem, nodal-negativem und nodal-positivem Mammakarzinom. Vor Kenntnis des OncotypeDX®-Resultats sollten 57 % (n = 209) der in diese Studie eingeschlossenen Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Nach Bekanntwerden des RS wurde eine solche in 168 Fällen (46,0 %) empfohlen (139). In anderen prospektiven Arbeiten wurde eine Chemotherapie vor OncotypeDX®-Testung in 47 % bzw. in 36 % (n = 42 bzw. n = 39), danach in 25,8 % bzw. 27 % der Fälle (n = 23 bzw. n = 29) befürwortet (140, 141). Eine Änderung der Therapieentscheidung konnte in vorliegender Arbeit insgesamt in acht Fällen (16 %) beobachtet werden. Im Vergleich mit der Literatur handelt es sich um eine relativ niedrige Änderungsrate. Ähnliche Studien zeigten unter Berücksichtigung der RS-Ergebnisse Änderungsraten zwischen 24,9 % und 32 % (140-142). Dies liegt darin begründet, dass in den genannten Studien initial deutlich häufiger zu einer adjuvanten Chemotherapie geraten wurde als in vorliegender Arbeit (n = 16, 26 %) und hängt damit direkt vom jeweiligen Vorgehen im lokalen Behandlungszentrum ab. Bei Änderung der Therapieentscheidung handelte es sich zumeist um die Entscheidung gegen eine adjuvante Chemotherapie (n = 5, 62,5 %) und für eine alleinige endokrine Therapie. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein (143, 144). Umgekehrt war in 37,5 % der Fälle (n = 3) eine Änderung von alleiniger Hormontherapie zu einer kombinierten chemo-endokrinologischen Therapie zu

beobachten, wobei diese zumeist auf einem hohen Recurrence-Score beruhte. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die Therapieentscheidung auf Grundlage der klassischen klinisch-pathologischen Faktoren in den meisten Fällen durch das OncotypeDX®-Ergebnis bestätigt wurde. In der „low risk“-Gruppe sollten vor Kenntnis des RS-Score vier Patientinnen (12,9 %) und danach drei Patientinnen (9,7 %) eine Chemotherapie bekommen. Eine Änderung der Therapieplanung wurde in drei Fällen (9,7 %) gesehen. Dabei handelte es sich in zwei Fällen (66,7 %) um die Entscheidung gegen eine adjuvante Chemotherapie, was einer absoluten Reduktion der chemotherapeutischen Empfehlungen von 3,2 % sowie einer relativen Reduktion von 25 % entspricht (vgl. Tab. 15). In einem Fall wurde trotz eines niedrigen RS in der OncotypeDX®-Testung eine Änderung des Therapieregimes von alleiniger endokriner Therapie hin zu einer kombinierten chemoendokrinen Therapie gesehen. Hierbei handelte es sich um eine 49-jährige Patientin mit multizentrischem, mäßig differenziertem Mammakarzinom of no special type (NST, G2) mit peritumorösem high-grade DCIS und einem Nodalstatus von pN1a (1/6), welches knapp in sano reseziert wurde und einen Ki-67-Index von 15 % zeigte. Bei einer anderen Patientin wurde trotz niedrigem RS an einer initial empfohlenen Chemotherapie festgehalten, da die Patientin zum Diagnosezeitpunkt 28 Jahre alt war. Die meisten Abweichungen traten in Fällen mit mittlerem RS auf. In der „intermediate risk“-Gruppe wurde vor Bekanntwerden des OncotypeDX®-Ergebnisses in sieben Fällen (43,8 %) eine zytostatische Therapie empfohlen, danach in vier Fällen (25 %). So wurde in dieser Gruppe in insgesamt drei Fällen (18,8 %) eine Änderung der Therapieempfehlung gesehen. In allen Fällen handelte es sich dabei um die Ablehnung einer Chemotherapie durch die Teilnehmer der Tumorkonferenz, was einer relativen Reduktion von 42,9 % entspricht. Unter Berücksichtigung des klinisch-pathologischen Risikoprofils sollte in der „high risk“-Gruppe nur einer Patientin (33,3 %) eine adjuvante Chemotherapie empfohlen werden. Nachdem der Recurrence-Score bekannt wurde, sollten alle drei Patientinnen (100 %) der Gruppe chemotherapeutisch behandelt werden. Hier konnte in zwei Fällen (66,7 %) eine Änderung der Therapieentscheidung gesehen werden. In jedem Fall handelte es sich dabei um die Befürwortung einer Chemotherapie. Dieses Ergebnis deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen (145).

Im Unterschied zu ähnlichen Studien muss einschränkend erwähnt werden, dass in der vorliegenden Arbeit die jeweilige Empfehlung zum therapeutischen Vorgehen im Rahmen der interdisziplinären Tumorkonferenz verglichen wurde, nicht aber die tatsächlich ergriffenen therapeutischen Maßnahmen.

4.7. Vergleich der uPA/PAI Ergebnisse mit dem Recurrence-Score

In der Hälfte der vorliegenden Fälle ($n = 25$) wurde neben der OncotypeDX®-Testung die proteinbasierte Bestimmung uPA/PAI durchgeführt. Hierbei handelte es sich um Patientinnen mit der Diagnose eines mäßig differenziertes (G2) Karzinom ohne Lymphknotenmetastasen diagnostiziert worden war. Mehrheitlich wurde eine erhöhte Proteinkonzentration von zumindest einem der beiden Marker gefunden. ($n = 18, 72\%$). Die verbleibenden sieben Fällen, denen nach dieser Methode ein niedriges Rezidivrisiko beigegeben wurde, zeigten auch in der OncotypeDX®-Testung einen niedrigen Recurrence-Score. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass kein nach uPA/PAI-Testung negatives Ergebnis mit einem mittleren oder hohen Recurrence-Score in der OncotypeDX®-Testung einherging.

Dennoch zeigte sich in mehr als der Hälfte der Fälle ($56,3\%$) mit niedrigem RS ein erhöhtes Rezidivrisiko in der uPA/PAI-Analyse. Die „mittlere“-Risikogruppe und „hoch“-Risikogruppe ließen begleitend in allen Fällen ein erhöhtes Rezidivrisiko in der uPA/PAI-Testung erkennen. Es lässt sich also feststellen, dass alle Patientinnen mit mittlerem und hohem Recurrence-Score auch gleichzeitig ein erhöhtes Metastasierungs-Risiko in der uPA/PAI-Analyse aufwiesen (vgl. Abb. 28). Insgesamt kann somit für einen hohen RS eine gute Korrelation mit der uPA/PAI-Testung gesehen werden, wohin gegen bei niedrigem RS eine deutliche Diskrepanz zu der proteinbasierten Risikoabschätzung gefunden wurde. Allgemein lassen sich uneinheitliche Ergebnisse auf die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zurückführen, da es sich bei der uPA/PAI-Testung um eine Messung von Proteinkonzentrationen und der OncotypeDX®-Testung um eine molekulare Untersuchungsmethode handelt. Warum gerade bei der „low risk“-Gruppe vermehrt Fälle mit erhöhten Konzentrationen von uPA oder PAI gefunden wurden, bleibt unklar. In der Literatur konnten kein derartiger Vergleich der beiden Messmethoden ausgemacht werden, so dass eine vergleichende Diskussion nicht möglich ist. Ein möglicher Grund für fehlende Daten ist, dass die

uPA/PAI-Bestimmung außerhalb Deutschlands nicht derart umfangreich eingesetzt wird (146, 147).

5. Zusammenfassung

Die Notwendigkeit einer adjuvanten Chemotherapie bei Mammakarzinomen ist von der Prognose abhängig. Eine verlässliche individuelle Risikostratifizierung ist somit unabdingbar. Neben den klassischen klinisch-pathologischen Prognosefaktoren nehmen Genexpressionstests und Biomarker wie uPA/PAI eine zunehmend wichtige Stellung ein. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Patientenkollektiv untersucht, bei dem eine 21-Gene-Analyse (OncotypeDX®) durchgeführt wurde.

Die Frage, ob bei der OncotypeDX®-Bestimmung in der Mehrzahl der Fälle ein niedriger Recurrence-Score (< 18) zu beobachten sein wird, kann bejaht werden. In 62 % der Fälle ($n = 31$) wurde ein niedriger RS gesehen, welcher einem mittleren 10-Jahres-Rezidivrisiko von 6,8 % entspricht. Erwartungsgemäß fand sich nur selten ein hohes Risikoprofil.

Ein weiterer Aspekt dieser Dissertation war, ob sich anhand der Faktoren Alter, Tumorgroße, histologischer Differenzierungsgrad sowie Lymph- und Blutgefäßinvasion eine Vorhersage des Recurrence-Score erzielen ließe. Insgesamt muss diese Frage verneint werden. Lediglich für die Tumordifferenzierung konnte eine gewisse Tendenz beobachtet werden: In der „low risk“-Gruppe waren keine wenig differenzierten Karzinome zu finden. Ebenso konnte in der „high risk“-Gruppe kein gut differenzierter Tumor gesehen werden.

Es stellte sich außerdem die Frage, ob anhand der tumorbiologischen Daten eine Vorhersage des Recurrence-Scores zu treffen sei. Ein besonderes Augenmerk wurde hier auf die Höhe des Wertes des Hormonrezeptor-Status und des Ki-67-Index gelegt. Diese Annahme kann bestätigt werden. Vor allem für den Ki-67-Index konnte eine hohe Übereinstimmung mit dem resultierenden Recurrence-Score gesehen werden. So gingen erhöhte Ki-67-Werte mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher. Auch für die Hormonrezeptoren konnte ein Zusammenhang mit dem OncotypeDX®-Ergebnis gefunden werden. Eine stark positive Expression insbesondere des Östrogenrezeptors war primär mit einem niedrigen RS verknüpft.

Ferner wurde die Annahme, dass sich bei der immunhistochemischen Untersuchung und der RNA-Expressionsanalyse im Zuge der OncotypeDX®-Testung gleichartige Werte für den Östrogen- und den Progesteronrezeptor ergeben, einer Prüfung unterzogen. Hierbei ergab sich für die den Östrogenrezeptor betreffenden Ergebnisse eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden unterschiedlichen Messmethoden. Im Hinblick auf die Ergebnisse des Progesteronrezeptors konnten bei insgesamt solider Übereinstimmung auch divergente Fälle gesehen werden.

Ein besonderes Interesse galt der Frage, ob sich in Kenntnis des OncotypeDX®-Ergebnisses eine Änderung in der Entscheidung bezüglich einer adjuvanten Chemotherapie ergab. Diese Vermutung konnte belegt werden. Zwar wurde die initiale Therapieentscheidung mehrheitlich beibehalten, dennoch konnte insgesamt eine Reduktion der Chemotherapie-Empfehlungen gesehen werden. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die initiale Therapieempfehlung in den meisten Fällen durch das Ergebnis der OncotypeDX®-Testung bestätigt wurden. Ein solch positiver bestätigender Effekt kann bei der schwierigen Entscheidungsfindung in solchen Grenzfällen gleichermaßen hilfreich sein.

Da bei einem Teil des untersuchten Kollektivs simultan Ergebnisse der Biomarker-Bestimmung uPA/PAI vorlagen, stellte sich die Frage, ob eine übereinstimmende Risikostratifikation erreicht werden könnte. Diese Frage ist klar mit nein zu beantworten. Insgesamt zeigten 28 % der untersuchten Patientinnen keine erhöhten Werte für uPA/PAI, was mit einem günstigen Krankheitsverlauf gleichzusetzen ist. In der OncotypeDX®-Testung war ein solcher in 64 % der Fälle zu verzeichnen. Dies bedeutet, dass aus der 21-Gen-Testung im Vergleich in mehr als doppelt so vielen Fällen ein niedriges Rezidivrisiko resultierte.

Die Arbeit unterstützt insgesamt die Annahme, dass der 21-Gen-Test (OncotypeDX®) in Grenzfällen als prognostischer und prädiktiver Marker eine sinnvolle Ergänzung zu den etablierten klinisch-pathologischen Parametern sein kann, so dass in Zukunft eine Über- und Untertherapie von Patientinnen vermieden werden und gleichzeitig eine Optimierung der individualisierten Therapie erreicht werden kann.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA 1/2	BReast CAncer gene 1/2
CISH	Chromogen-in-situ-Hybridisierung
CT	Chemotherapie
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Östrogenrezeptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HPF	High Power Field
HR	Hormonrezeptor
HT	Hormontherapie
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
PR	Progesteronrezeptor
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RS	Recurrence-Score
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinase Typ
uPAI	Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1

6.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Allred-Score (Immunreaktiver Score für den Östrogen- und Progesteronrezeptor).....	5
Tab. 2: Score nach Remmele/Stegner (Immunreaktiver Score für den Östrogen- und Progesteronrezeptor).....	6
Tab. 3: Die klassischen prognostischen und prädiktive Faktoren für Mammakarzinome	10
Tab. 4: Die intrinsischen Subtypen (ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor)	11
Tab. 5: Übersicht der 21 untersuchten Gene des OncotypeDX®-Tests.....	13
Tab. 6: Operative Therapie.....	25
Tab. 7: Histologische Subtypen.....	26
Tab. 8: Charakteristika der In situ Komponente.....	26
Tab. 9: Tumorstadien.....	27
Tab. 10: Nodalstatus	28
Tab. 11: Histologischer Differenzierungsgrad der untersuchten Mammakarzinome.....	29
Tab. 12: Übersicht der Proben mit negativem immunreaktivem Score (IRS) und gleichzeitig positiver qRT-PCR für den Progesteron-Rezeptor (PR).....	45
Tab. 13: Übersicht der Proben mit positivem immunreaktivem Score (IRS) und gleichzeitig negativer qRT-PCR für den Progesteron-Rezeptor (PR).....	45
Tab. 14: Therapieempfehlung vor und nach Kenntnis des RS-Ergebnisses der OncotypeDX®-Testung (CT = adjuvante Chemotherapie, HT = Hormontherapie).....	48
Tab. 15: Änderung der Therapieempfehlung vor und nach Kenntnis des Recurrence-Score (RS) (CT = adjuvante Chemotherapie).....	48
Tab. 16: Änderung im Hinblick auf die Therapie-Empfehlung vor und nach Kenntnis des Recurrence-Score (RS) unter Berücksichtigung des Nodalstatus (CT = adjuvante Chemotherapie)	49
Tab. 17: Alter, OP, Schnellschnittdauer (in Minuten), Befunddauer (in Tagen), Histologischer Subtyp, Betroffene Brust (links, rechts), Tumorgröße (Mittelwert und Standardabweichung in cm; minimale und maximale Größe in cm) im Gesamtkollektiv und uPA/PAI-Kollektiv.....	50

Tab. 18: Tumorstadium, Grading, Nodalstatus, L1 und In-Situ-Komponente im Gesamtkollektiv und uPA/PAI-Kollektiv	51
Tab. 19: IRS Score und Ki-67-Index Gesamt-Kollektiv und uPA/PAI-Kollektiv	51

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Testalgorithmus für die Bestimmung des Her2-Status.....	7
Abb. 2: Luminal A Subtyp. 2a: Mammakarzinom of no special Type (NST) HE-Färbung. 2b: Immunhistochemie Ki-67-Index (<14%). 2c: Immunhistochemie Östrogenrezeptor (ER) IRS 12. 2d: Immunhistochemie Progesteronrezeptor (PR) IRS 12. Alle Aufnahmen 1:100	8
Abb. 3: Luminal-B Subtyp. 3a: Mammakarzinom of no special Type (NST) HE-Färbung. 3b: Immunhistochemie Ki-67-Index (>14%). 3c: Immunhistochemie Östrogenrezeptor (ER) IRS 12. 3d: Immunhistochemie Progesteronrezeptor (PR) IRS 2. Alle Aufnahmen 1:100	9
Abb. 4: Beispiel für ein OncotypeDX®-Test-Ergebnis (Recurrence-Score RS = 25, entsprechend einem „intermediate risk“).....	21
Abb. 5: Altersverteilung des Gesamtkollektivs	24
Abb. 6: Mittelwert (MW) und SEM (Standard Error of the Mean) für den Östrogen (ER)- und Progesteron (PR)-Score des Gesamtkollektivs.....	29
Abb. 7: Verteilung der Östrogen- (ER) und Progesteron-(PR)-Score-Werte des Gesamtkollektivs	30
Abb. 8: Verteilung des immunhistochemisch erhobenen Her2/neu-Status des Gesamtkollektivs	31
Abb. 9: Intrinsische Subtypen des Gesamtkollektivs infolge des immunhistochemisch erhobenen Ki-67-Index	32
Abb. 10: Prozentualer Anteil der drei Risikogruppen nach Recurrence-Score (RS) der OncotypeDX®-Testung.....	33
Abb. 11: Die prozentuale Verteilung des mittleren 10-Jahres-Rezidivrisiko des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen (low risk, intermediate risk, high risk).....	33
Abb. 12: Altersstruktur des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen (Mittelwert (MW) und Standard Error of the Mean (SEM))	34

Abb. 13: Detaillierte Altersstruktur der drei Risikogruppen	35
Abb. 14: Tumorgröße (Mittelwert in cm, SEM) des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen.....	36
Abb. 15: Prozentualer Anteil der histologischen Differenzierungsgrade der Tumore in den drei Risikogruppen (gut differenziert = G1, mäßig differenziert = G2, wenig differenziert = G3)	37
Abb. 16: Prozentualer Anteil einer Lymphangiosis (L1) und Hämangiosis carcinomatosa (V1) im Gesamtkollektiv und den drei Risikogruppen.....	37
Abb. 17: Mittelwerte und Standard Error of the Mean (MW, SEM) des Hormonrezeptor-Score für den Östrogen- (ER-) und des Progesteron-Rezeptor (PR) der drei Risikogruppen	39
Abb. 18: Prozentualer Anteil der Östrogenrezeptor-Expression (ER) in den drei Risikogruppen (schwach = IRS < 5, mäßig = IRS 6 – 11, stark = IRS = 12).....	39
Abb. 19: Progesteronrezeptor-Score der Risikogruppen.....	40
Abb. 20: Proliferationsindex Ki-67 bezogen auf die Gruppeneinteilung (RS-Score)....	41
Abb. 21: Ki67-Index bezogen auf die Risikogruppen.....	42
Abb. 22: Vergleich der ER-Score-Werte (Östrogenrezeptor) Immunhistochemie (IHC) vs. qRT-PCR.....	43
Abb. 23: Vergleich der PR-Score-Werte (Progesteronrezeptor) Immunhistochemie (IHC) vs. qRT-PCR	44
Abb. 24: Empfehlung einer adjuvanten Chemotherapie (CT) in der interdisziplinären Tumorkonferenz vor und nach Kenntnis des Ergebnis der OncotypeDX®-Testung	47
Abb. 25: uPA/PAI-Werte (uPA = Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, PAI = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1)des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen (MW = Mittelwert ± Standard Error of the Mean, SEM)	53
Abb. 26: uPA-Werte des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen.....	53
Abb. 27: PAI-Werte des Gesamtkollektivs und der drei Risikogruppen	54
Abb. 28: Vergleich von uPA/PAI und Recurrence-Score der drei Risikogruppen	55

7. Literaturverzeichnis

1. GEKID. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V. Atlas der Krankheitsinzidenz- und Mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas) Lübeck 2016 [Available from: <http://www.gekid.de>.
2. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Rijn M. WHO Classification of Tumors of the Breast: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2012.
3. Statistisches Bundesamt Todesursachen in Deutschland. 2014.
4. Houlston RS, Peto J. The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene*. 2004;23(38):6471-6.
5. Chen S, Iversen ES, Friebel T, Finkelstein D, Weber BL, Eisen A, et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(6):863-71.
6. Lacroix M, Leclercq G. The "portrait" of hereditary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2005;89(3):297-304.
7. de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet*. 2002;39(4):225-42.
8. Goldberg JI, Borgen PI. Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6(8):1205-14.
9. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003;72(5):1117-30.
10. Milne RL, Antoniou AC. Modifiers of breast and ovarian cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(10):T69-84.
11. Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(11):943-9.
12. Kreienberg R, Kopp I, Albert US, et al. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. In: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. München: W. Zuckschwerdt; 2008.
13. Warner E, Hill K, Causer P, Plewes D, Jong R, Yaffe M, et al. Prospective study of breast cancer incidence in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation under surveillance with and without magnetic resonance imaging. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(13):1664-9.
14. Lauby-Secretan B, Loomis D, Straif K. Breast-Cancer Screening--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1479.
15. Vargas AC, Da Silva L, Lakhani SR. The contribution of breast cancer pathology to statistical models to predict mutation risk in BRCA carriers. *Fam Cancer*. 2010;9(4):545-53.
16. Iau PT, Marafie M, Ali A, Sng JH, Macmillan RD, Pinder S, et al. Are medullary breast cancers an indication for BRCA1 mutation screening? A mutation analysis of 42 cases of medullary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2004;85(1):81-8.

17. Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes AM, Kruse TA. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer (Auckl)*. 2014;8:145-55.
18. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(9):2310-8.
19. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(1):134-47.
20. Tung N, Wang Y, Collins LC, Kaplan J, Li H, Gelman R, et al. Estrogen receptor positive breast cancers in BRCA1 mutation carriers: clinical risk factors and pathologic features. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(1):R12.
21. van der Groep P, Bouter A, van der Zanden R, Siccama I, Menko FH, Gille JJ, et al. Distinction between hereditary and sporadic breast cancer on the basis of clinicopathological data. *Journal of clinical pathology*. 2006;59(6):611-7.
22. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(26):4282-8.
23. Hartmann LC, Lindor NM. The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2016;374(5):454-68.
24. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *Jama*. 2010;304(9):967-75.
25. Heemskerk-Gerritsen BA, Seynaeve C, van Asperen CJ, Ausems MG, Collee JM, van Doorn HC, et al. Breast cancer risk after salpingo-oophorectomy in healthy BRCA1/2 mutation carriers: revisiting the evidence for risk reduction. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(5).
26. Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Warren Andersen S, et al. Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer. *Cancer*. 2011;117(9):1946-56.
27. Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V. Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. *British journal of cancer*. 2009;100(3):538-44.
28. Loof-Johanson M, Brudin L, Sundquist M, Thorstenson S, Rudebeck CE. Breastfeeding and prognostic markers in breast cancer. *Breast*. 2011;20(2):170-5.
29. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;346(26):2025-32.
30. Silvera SA, Miller AB, Rohan TE. Oral contraceptive use and risk of breast cancer among women with a family history of breast cancer: a prospective cohort study. *Cancer Causes Control*. 2005;16(9):1059-63.
31. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *Jama*. 2002;288(7):872-81.

32. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002;288(3):321-33.
33. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *Jama*. 2003;289(24):3243-53.
34. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *Jama*. 2006;296(2):193-201.
35. Bernstein L, Patel AV, Ursin G, Sullivan-Halley J, Press MF, Deapen D, et al. Lifetime recreational exercise activity and breast cancer risk among black women and white women. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(22):1671-9.
36. Kabat GC, Cross AJ, Park Y, Schatzkin A, Hollenbeck AR, Rohan TE, et al. Meat intake and meat preparation in relation to risk of postmenopausal breast cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Int J Cancer*. 2009;124(10):2430-5.
37. Suzuki R, Orsini N, Mignone L, Saji S, Wolk A. Alcohol intake and risk of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status--a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2008;122(8):1832-41.
38. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):966-78.
39. Lebeau A. Targeted therapy of breast cancer. *Der Gynäkologe*. 2009;42(3):194-200.
40. Remmele W, Bäessler R, Becker W, Dallenbach-Hellweg G, Dietel M. *Pathologie. 4. Weibliches Genitale, Mamma, Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen, Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen, Tumoren des Kindesalters, Endokrine Organe*: Springer Verlag; 2013.
41. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(1):21-7.
42. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*. 2000;19(53):6102-14.
43. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18-43.
44. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC. Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(15):e458.
45. Lebeau A, Kreipe H, Dietel M, Schlake W, Kreienberg R. Breast cancer: current recommendations for pathologists on the basis of the S3 guidelines. *Der Pathologe*. 2013;34(4):293-304.
46. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists

- clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3997-4013.
47. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1323-33.
 48. Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast cancer research : BCR*. 2006;8(6):216.
 49. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2005;16(11):1723-39.
 50. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(33):5287-312.
 51. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology*. 2010;11(2):174-83.
 52. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656-64.
 53. Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2001;27(3):137-42.
 54. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*. 2002;41(3a):151-2, discussion 2-3.
 55. Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer*. 1990;65(9 Suppl):2121-8.
 56. Colleoni M, Rotmensz N, Maisonneuve P, Sonzogni A, Pruneri G, Casadio C, et al. Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2007;18(10):1632-40.
 57. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
 58. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
 59. Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *The Lancet Oncology*. 2010;11(4):339-49.
 60. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *The oncologist*. 2006;11(8):868-77.

61. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50.
62. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2009;27(8):1168-76.
63. Schmidt M, Maass N. Biomarkers and risk assessment in breast cancer. *Der Gynäkologe.* 2015;48(1):65-70.
64. Ross JS, Hatzis C, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *The oncologist.* 2008;13(5):477-93.
65. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.* 2011;22(8):1736-47.
66. Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, Rudiger T, Muller-Hermelink HK, Kreipe H. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol.* 2002;198(3):292-9.
67. Varga Z, Diebold J, Dommann-Scherrer C, Frick H, Kaup D, Noske A, et al. How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLoS one.* 2012;7(5):e37379.
68. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415(6871):530-6.
69. Oakman C, Bessi S, Zafarana E, Galardi F, Biganzoli L, Di Leo A. Recent advances in systemic therapy: new diagnostics and biological predictors of outcome in early breast cancer. *Breast cancer research : BCR.* 2009;11(2):205.
70. Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, 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.
71. Carlson JJ, Roth JA. The impact of the Oncotype Dx breast cancer assay in clinical practice: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment.* 2013;141(1):13-22.
72. Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol.* 2004;164(1):35-42.
73. Esteban JM, Felder B, Ahn C, Simpson JF, Battifora H, Shively JE. Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Cancer.* 1994;74(5):1575-83.
74. Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P, Baker J, Cronin M, Liu ML, et al. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph

- nodes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(24 Pt 1):8623-31.
75. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.
 76. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(23):3726-34.
 77. Harbeck N, Gluz O, Nitz U. Predictive gene signatures. *Forum*. 2015;30(2):134-8.
 78. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Forbes J, Mallon EA, Salter J, et al. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(11):1829-34.
 79. Goldstein LJ, Gray R, Badve S, Childs BH, Yoshizawa C, Rowley S, et al. Prognostic utility of the 21-gene assay in hormone receptor-positive operable breast cancer compared with classical clinicopathologic features. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(25):4063-71.
 80. Mamounas EP, Tang G, Fisher B, Paik S, Shak S, Costantino JP, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1677-83.
 81. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, 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. *The Lancet Oncology*. 2010;11(1):55-65.
 82. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie E. V. Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome 2015 [24.11.2016]. Version 2015.1D.: [Available from: <http://www.ago-online.de>
 83. Mittempergher L, de Ronde JJ, Nieuwland M, Kerkhoven RM, Simon I, Rutgers EJ, et al. Gene expression profiles from formalin fixed paraffin embedded breast cancer tissue are largely comparable to fresh frozen matched tissue. *PloS one*. 2011;6(2):e17163.
 84. Sapino A, Roepman P, Linn SC, Snel MH, Delahaye LJ, van den Akker J, et al. MammaPrint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2014;16(2):190-7.
 85. Knauer M, Mook S, Rutgers EJ, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2010;120(3):655-61.
 86. Schem C, Wengers AS, van Mackelenbergh M, Heilmann T, Mathiak M, Jonat W, et al. Breast cancer prediction. *Der Gynäkologe*. 2013;46(6):377-81.
 87. Krijgsman O, Roepman P, Zwart W, Carroll JS, Tian S, de Snoo FA, et al. A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response. *Breast cancer research and treatment*. 2012;133(1):37-47.

88. Muller BM, Brase JC, Haufe F, Weber KE, Budzies J, Petry C, et al. Comparison of the RNA-based EndoPredict multigene test between core biopsies and corresponding surgical breast cancer sections. *Journal of clinical pathology*. 2012;65(7):660-2.
89. Poremba C, Uhlendorff J, Pfitzner BM, Hennig G, Bohmann K, Bojar H, et al. Preanalytical variables and performance of diagnostic RNA-based gene expression analysis in breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2014;465(4):409-17.
90. Denkert C, Kronenwett R, Schlake W, Bohmann K, Penzel R, Weber KE, et al. Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2012;460(3):251-9.
91. Kronenwett R, Bohmann K, Prinzler J, Sinn BV, Haufe F, Roth C, et al. Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC cancer*. 2012;12:456.
92. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(18):6012-20.
93. Martin M, Brase JC, Calvo L, Krappmann K, Ruiz-Borrego M, Fisch K, et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast cancer research : BCR*. 2014;16(2):R38.
94. Dubsy P, Brase JC, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *British journal of cancer*. 2013;109(12):2959-64.
95. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(21):5222-32.
96. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1160-7.
97. Filipits M, Nielsen TO, Rudas M, Greil R, Stoger H, Jakesz R, et al. The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(5):1298-305.
98. Gnant M, Sestak I, Filipits M, Dowsett M, Balic M, Lopez-Knowles E, et al. Identifying clinically relevant prognostic subgroups of postmenopausal women with node-positive hormone receptor-positive early-stage breast cancer treated with endocrine therapy: a combined analysis of ABCSG-8 and ATAC using the PAM50 risk of recurrence score and intrinsic subtype. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2015;26(8):1685-91.

99. Prat A, Parker JS, Fan C, Cheang MC, Miller LD, Bergh J, et al. Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(11):2866-73.
100. Gyorffy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast cancer research : BCR*. 2015;17:11.
101. Lampelj M, Arko D, Cas-Sikosek N, Kavalar R, Ravnik M, Jezersek-Novakovic B, et al. Urokinase plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in breast cancer - correlation with traditional prognostic factors. *Radiol Oncol*. 2015;49(4):357-64.
102. Binder BR, Mihaly J. The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer. *Immunology Letters*. 2008;118(2):116-24.
103. Hildenbrand R, Schaaf A. The urokinase-system in tumor tissue stroma of the breast and breast cancer cell invasion. *Int J Oncol*. 2009;34(1):15-23.
104. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(1):25-40.
105. Chen Y, Kelm RJ, Jr., Budd RC, Sobel BE, Schneider DJ. Inhibition of apoptosis and caspase-3 in vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type-1. *J Cell Biochem*. 2004;92(1):178-88.
106. Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9(1):32-71.
107. Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12(5):621-8.
108. Rosenberg S. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer and other pathological conditions: introduction and perspective. *Curr Pharm Des*. 2003;9(19):4p following Table of Contents.
109. Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, et al. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol*. 1998;13(5):893-906.
110. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(2):116-28.
111. Janicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, et al. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1993;24(3):195-208.
112. Rabi ZA, Todorovic-Rakovic N, Vujasinovic T, Milovanovic J, Nikolic-Vukosavljevic D. Markers of progression and invasion in short term follow up of untreated breast cancer patients. *Cancer Biomark*. 2015;15(6):745-54.
113. De Cremoux P, Grandin L, Dieras V, Savignoni A, Degeorges A, Salmon R, et al. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor type 1 predict metastases in good prognosis breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2009;29(5):1475-82.
114. Meo S, Dittadi R, Peloso L, Gion M. The prognostic value of vascular endothelial growth factor, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in node-negative breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2004;19(4):282-8.

115. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, et al. Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *British journal of cancer*. 1999;80(3-4):419-26.
116. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(4):1000-7.
117. Lang DS, Heilenkotter U, Schumm W, Behrens O, Simon R, Vollmer E, et al. Optimized immunohistochemistry in combination with image analysis: a reliable alternative to quantitative ELISA determination of uPA and PAI-1 for routine risk group discrimination in breast cancer. *Breast*. 2013;22(5):736-43.
118. Prat A, Parker Js Fau - Fan C, Fan C Fau - Cheang MCU, Cheang Mc Fau - Miller LD, Miller Ld Fau - Bergh J, Bergh J Fau - Chia SKL, et al. Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. (1569-8041 (Electronic)).
119. Gyorffy B Fau - Hatzis C, Hatzis C Fau - Sanft T, Sanft T Fau - Hofstatter E, Hofstatter E Fau - Aktas B, Aktas B Fau - Pusztai L, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. (1465-542X (Electronic)).
120. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(22):2783-90.
121. Fisher B, Jeong JH, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, et al. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet*. 2004;364(9437):858-68.
122. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717.
123. Orucevic A, Heidel RE, Bell JL. Utilization and impact of 21-gene recurrence score assay for breast cancer in clinical practice across the United States: lessons learned from the 2010 to 2012 National Cancer Data Base analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2016;157(3):427-35.
124. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(21):2005-14.
125. Auerbach J, Kim M, Fineberg S. Can features evaluated in the routine pathologic assessment of lymph node-negative estrogen receptor-positive stage I or II invasive breast cancer be used to predict the Oncotype DX recurrence score? *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(11):1697-701.
126. Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod Pathol*. 2008;21(10):1255-61.
127. Allison KH, Kandalafi PL, Sitlani CM, Dintzis SM, Gown AM. Routine pathologic parameters can predict Oncotype DX recurrence scores in subsets of ER positive patients: who does not always need testing? *Breast cancer research and treatment*. 2012;131(2):413-24.

128. Tang P, Wang J, Hicks DG, Wang X, Schiffhauer L, McMahon L, et al. A lower Allred score for progesterone receptor is strongly associated with a higher recurrence score of 21-gene assay in breast cancer. *Cancer Invest.* 2010;28(9):978-82.
129. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(17):1254-61.
130. Stendahl M, Ryden L, Nordenskjold B, Jonsson PE, Landberg G, Jirstrom K. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2006;12(15):4614-8.
131. Liu S, Chia SK, Mehl E, Leung S, Rajput A, Cheang MC, et al. Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment.* 2010;119(1):53-61.
132. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.* 2015;26(8):1533-46.
133. Gwin K, Pinto M, Tavassoli FA. Complementary value of the Ki-67 proliferation index to the oncotype DX recurrence score. *Int J Surg Pathol.* 2009;17(4):303-10.
134. O'Connor SM, Beriwal S, Dabbs DJ, Bhargava R. Concordance between semiquantitative immunohistochemical assay and oncotype DX RT-PCR assay for estrogen and progesterone receptors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18(3):268-72.
135. Kraus JA, Dabbs DJ, Beriwal S, Bhargava R. Semi-quantitative immunohistochemical assay versus oncotype DX((R)) qRT-PCR assay for estrogen and progesterone receptors: an independent quality assurance study. *Mod Pathol.* 2012;25(6):869-76.
136. Badve SS, Baehner FL, Gray RP, Childs BH, Maddala T, Liu ML, et al. Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immunohistochemistry by local and central laboratories and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction by central laboratory. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(15):2473-81.
137. Park MM, Ebel JJ, Zhao W, Zynger DL. ER and PR immunohistochemistry and HER2 FISH versus oncotype DX: implications for breast cancer treatment. *Breast J.* 2014;20(1):37-45.
138. Acs G, Esposito NN, Kiluk J, Loftus L, Laronga C. A mitotically active, cellular tumor stroma and/or inflammatory cells associated with tumor cells may contribute to intermediate or high Oncotype DX Recurrence Scores in low-grade invasive breast carcinomas. *Mod Pathol.* 2012;25(4):556-66.
139. Eiermann W, Rezai M, Kummel S, Kuhn T, Warm M, Friedrichs K, et al. The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for ER-positive, node-negative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted

- change in chemotherapy use. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24(3):618-24.
140. Lo SS, Mumby PB, Norton J, Rychlik K, Smerage J, Kash J, et al. Prospective multicenter study of the impact of the 21-gene recurrence score assay on medical oncologist and patient adjuvant breast cancer treatment selection. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1671-6.
141. Albanell J, Gonzalez A, Ruiz-Borrego M, Alba E, Garcia-Saenz JA, Corominas JM, et al. Prospective transGEICAM study of the impact of the 21-gene Recurrence Score assay and traditional clinicopathological factors on adjuvant clinical decision making in women with estrogen receptor-positive (ER+) node-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(3):625-31.
142. Joh JE, Esposito NN, Kiluk JV, Laronga C, Lee MC, Loftus L, et al. The effect of Oncotype DX recurrence score on treatment recommendations for patients with estrogen receptor-positive early stage breast cancer and correlation with estimation of recurrence risk by breast cancer specialists. *The oncologist*. 2011;16(11):1520-6.
143. de Boer RH, Baker C, Speakman D, Chao CY, Yoshizawa C, Mann GB. The impact of a genomic assay (Oncotype DX) on adjuvant treatment recommendations in early breast cancer. *Med J Aust*. 2013;199(3):205-8.
144. Albanell J, Svedman C, Gligorov J, Holt SD, Bertelli G, Blohmer JU, et al. Pooled analysis of prospective European studies assessing the impact of using the 21-gene Recurrence Score assay on clinical decision making in women with oestrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative early-stage breast cancer. *Eur J Cancer*. 2016;66:104-13.
145. Augustovski F, Soto N, Caporale J, Gonzalez L, Gibbons L, Ciapponi A. Decision-making impact on adjuvant chemotherapy allocation in early node-negative breast cancer with a 21-gene assay: systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2015;152(3):611-25.
146. Kantelhardt EJ, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Augustin D, Hanf V, et al. Prospective evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6xFEC versus 3xFEC/3xDocetaxel. *BMC cancer*. 2011;11:140.
147. Annecke K, Schmitt M, Euler U, Zerm M, Paepke D, Paepke S, et al. uPA and PAI-1 in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Advances in clinical chemistry*. 2008;45:31-45.

8. Lebenslauf