

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Evaluation eines Risikoscores als Prognoseindikator für das Auftreten eines
Fernrezidivs in hormonrezeptorpositiven frühen Mammakarzinompatientinnen
anhand der Ergebnisse des *in-vitro* diagnostischen Tests MammaTyper®, in
Kombination mit klinisch-pathologischen Faktoren**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Donata Herold
aus Schopfheim

Mainz, 2025

Namensnennung (CC-BY-4.0)

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Marcus Schmidt

2. Gutachter: PD Dr. med. habil. Daniel-Christoph Wagner

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Zielsetzung und Forschungsfrage	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Epidemiologie	3
2.2 Risikofaktoren und Pathogenese	4
2.3 Klassifikationen	5
2.3.1 TNM-Klassifikation	5
2.3.2 Molekulare Subtypen und ihre Surrogat-Klassifikation nach St. Gallen 2013 ..	7
2.4 Biomarker	8
2.4.1 Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor)	8
2.4.2 Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2	9
2.4.3 Ki-67	10
2.5 Gegenwärtige Prognoseabschätzung mittels Immunhistochemie anhand des IHC4-Scores und Genexpressionsanalysen	12
2.5.1 IHC4-Score	12
2.5.2 Genexpressionstests	13
2.6 Risikoquantifizierung mittels RT-qPCR am Beispiel von MammaTyper®	14
2.6.1 Reverse Transkription - quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)	14
2.6.2 Quantitativer Nachweis des mRNA-Expressionsstatus der Gene <i>ESR1</i> , <i>PGR</i> , <i>ERBB2</i> und <i>MKI67</i> mittels MammaTyper® (BioNTech Diagnostics GmbH) ..	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Zielsetzung und Forschungsfrage	17
3.1.1 Primäres Studienziel	17
3.1.2 Sekundäre Studienziele	17
3.2 Patientenkollektiv	18
3.2.1 Consort-Flussdiagramm	21
3.3 Statistische Methoden	22
3.4 Methodik	23
3.4.1 RNXtract®	23
3.4.2 MammaTyper®	26
4 Ergebnisse	30
4.1 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs	30
4.1.1 Klinisch-pathologische Variablen des Gesamtkollektivs	31
4.1.2 Verteilung der MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse	33
4.1.3 MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse in Abhängigkeit des Auftetens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens	34

4.2	Analyse der Überlebenszeiten mittels Kaplan-Meier Schätzung	37
4.2.1	<i>ESR1</i> -Status	37
4.2.2	<i>PGR</i> -Status	39
4.2.3	<i>ERBB2</i> -Status	41
4.2.4	<i>MKI67</i> -Status	43
4.2.5	pN-Stadium	45
4.2.6	pT-Stadium	47
4.2.7	Alter	49
4.2.8	Subtyp	51
4.2.9	Grading	53
4.3	Cox-Regressionsanalyse	55
4.3.1	Univariate Cox-Regressionsanalyse des fernmetastasenfreien Überlebens (DDFS)	55
4.3.2	Univariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens (OS)	56
4.3.3	Multivariate Cox-Regressionsanalyse des fernmetastasenfreien Überlebens (DDFS)	56
4.3.4	Multivariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens (OS)	58
5	Diskussion	59
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis	67
8	Danksagung	72
9	Lebenslauf	73

Abkürzungsverzeichnis

<i>ER</i>	<i>Estrogen receptor 1 protein/ Östrogen Rezeptor 1-Protein</i>
<i>ESR1</i>	<i>Estrogen receptor 1 gene / Östrogenrezeptor 1-Gen</i>
<i>HER2</i>	<i>Human epidermal growth factor receptor 2 protein/ Humaner epidemaler Wachstumsfaktorrezeptor 2</i>
<i>ERBB2</i>	<i>Erb-b2 tyrosine kinase 2/ Erb-b2 Tyrosinkinase 2</i>
<i>KI67</i>	<i>Marker of proliferation Ki-67 protein/ Proliferationsmarker Ki-67 Protein</i>
<i>MKI67</i>	<i>Marker of proliferation Ki-67 gene / Proliferationsmarker Ki-67 Gen</i>
<i>IHC</i>	<i>Immunhistochemie</i>
<i>ISH</i>	<i>In-situ-Hybridisierung</i>
<i>DDFS</i>	<i>Distant disease-free survival/ Fernmetastasenfreies Überleben</i>
<i>OS</i>	<i>Overall survival/ Gesamtüberleben</i>
<i>FFPE</i>	<i>Formalin fixed and paraffin-embedded/ Formalinfixiert und in Paraffin eingebettet</i>
<i>mRNA</i>	<i>Messenger ribonucleic acid/ Boten-Ribonukleinsäure</i>
<i>RT-qPCR</i>	<i>Reverse transcription-quantitative real time polymerase chain reaction/ Reverse Transkription-quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion</i>
<i>Cq</i>	<i>Quantification cycle/ Quantifizierungszyklus</i>
<i>ERE</i>	<i>Estrogen response elements</i>
<i>B2M</i>	<i>Beta-2-Mikroglobulin</i>
<i>CALM2</i>	<i>Calmodulin 2</i>
<i>IRS</i>	<i>Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner</i>
<i>ER α</i>	<i>Östrogenrezeptor alpha</i>
<i>ER β</i>	<i>Östrogenrezeptor beta</i>
<i>NR3A1</i>	<i>Nukleärer Rezeptor Subgruppe 3, Gruppe A, Nummer 1</i>
<i>NR3A2</i>	<i>Nukleärer Rezeptor Subgruppe 3, Gruppe A, Nummer 2</i>
<i>HE-Färbung</i>	<i>Hämatoxylin- und Eosin-Färbung</i>
<i>Rpm</i>	<i>Revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute</i>
<i>KI</i>	<i>Konfidenzintervall</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Consort-Flussdiagramm.....	21
Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der RNA-Extraktion mittels RNXtract®	24
Abbildung 3 Validitätskriterien LightCycler® 480 Instrument II (Roche), Gebrauchsinformation MammaTyper®-Kit, Ref 160301-90020-DE Rev 3.1	28
Abbildung 4 Gerätespezifischer Schwellenwert zur Dichotomisierung der MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse für den LightCycler® 480 Instrument II (Roche), Gebrauchsinformation MammaTyper®-Kit Ref 160301-90020-DE Rev 3.1	29
Abbildung 5 Verteilung der MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse	33
Abbildung 6 Verteilung der <i>ESR1</i> -Werte in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens	34
Abbildung 7 Verteilung der <i>PGR</i> -Werte in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens	35
Abbildung 8 Verteilung der <i>ERBB2</i> -Werte in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens	35
Abbildung 9 Verteilung der <i>MKI67</i> -Werte in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens	36
Abbildung 10 Einfluss des <i>ESR1</i> -Status auf das DDFS	37
Abbildung 11 Einfluss des <i>ESR1</i> -Status auf das OS	38
Abbildung 12 Einfluss des <i>PGR</i> -Status auf das DDFS	39
Abbildung 13 Einfluss des <i>PGR</i> -Status auf das OS	40
Abbildung 14 Einfluss des <i>ERBB2</i> -Status auf das DDFS	41
Abbildung 15 Einfluss des <i>ERBB2</i> -Status auf das OS	42
Abbildung 16 Einfluss des <i>MKI67</i> -Status auf das DDFS	43
Abbildung 17 Einfluss des <i>MKI67</i> -Status auf das OS	44
Abbildung 18 Einfluss des pN-Stadiums auf das DDFS	45
Abbildung 19 Einfluss des pN-Stadiums auf das OS	46
Abbildung 20 Einfluss des pT-Stadiums auf das DDFS	47
Abbildung 21 Einfluss des pT-Stadiums auf das OS	48
Abbildung 22 Einfluss des Alters auf das DDFS	49
Abbildung 23 Einfluss des Alters auf das OS	50
Abbildung 24 Einfluss der Subtypen auf das DDFS	51
Abbildung 25 Einfluss der Subtypen auf das OS	52
Abbildung 26 Einfluss des Grading auf das DDFS	53
Abbildung 27 Einfluss des Grading auf das OS	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Epidemiologie des Mammakarzinoms der Frau im Jahr 2022, in Anlehnung an (1)	4
Tabelle 2 Vereinfachte TNM-Klassifikation, in Anlehnung an Performance Evaluation Protocol Version 1.0, BioNTech Diagnostics GmbH	6
Tabelle 3 Molekulare Subtypen und ihre klinisch-pathologischen Surrogat-Klassifikationen nach St. Gallen (4)	7
Tabelle 4 Markerverteilung gemäß St.-Gallen Klassifikation (4).....	7
Tabelle 5 Detaillierte Auflistung der Ein- und Ausschlusskriterien.....	19
Tabelle 6 Auftreten einer Fernmetastasierung/ Tod	30
Tabelle 7 Mediane Zeit und Mittelwert bis zum Auftreten einer Fernmetastasierung oder Tod	30
Tabelle 8 Auftreten einer Fernmetastasierung/ Tod innerhalb der ersten 5 Jahre.....	31
Tabelle 9 Klinisch-pathologische Variablen des untersuchten Kollektivs	32
Tabelle 10 Univariate Cox-Regressionsanalyse des DDFS	55
Tabelle 11 Univariate Cox-Regressionsanalyse des OS.....	56
Tabelle 12 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des DDFS für Einzelmarker und klinisch-pathologische Faktoren	57
Tabelle 13 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des DDFS für Subtypen und klinisch-pathologische Faktoren	57
Tabelle 14 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des OS für Einzelmarker und klinisch-pathologische Faktoren	58
Tabelle 15 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des OS für Subtypen und klinisch-pathologische Faktoren	58

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1 Hintergrund

Brustkrebs ist der häufigste bösartige Tumor der Frau.(1) Die Zahl der Neuerkrankungen lag laut Robert-Koch-Institut im Jahr 2022 bei rund 74.500, während die Zahl der Sterbefälle aufgrund der Krebserkrankung im selben Jahr bei rund 18.500 Fällen lag. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 88%.(1)

Inzwischen ist bekannt, dass es sich bei Brustkrebs um heterogene Erkrankungen handelt, die sich durch unterschiedliche klinische und molekularpathologische Eigenschaften auszeichnen.(2) Die Basis für eine erfolgreiche Behandlung der Krebserkrankung liegt hierbei in einer genauen Bestimmung und Subtypisierung des Tumorgewebes um darauf abgestimmt eine individuelle Therapie zu ermöglichen.

1.2 Zielsetzung und Forschungsfrage

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation eines Risikoscores zur Prognoseabschätzung hinsichtlich des Auftretens eines Fernrezidivs in Patientinnen mit frühen hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen Mammakarzinomen.

Der Score basiert auf der quantitativen Analyse der 4 Marker des *in vitro* diagnostischen Tests MammaTyper® *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*, und *MKI67* in Kombination mit klinisch-pathologischen Faktoren, wie Zahl der befallenen Lymphknoten und Tumorgroße.

Eingeschlossen wurden nur Proben von Patientinnen, die neben der operativen Therapie (Mastektomie oder brusterhaltende Therapie) adjuvant ausschließlich endokrin behandelt wurden.

Der zugrunde liegende und von dem biotechnologischen Unternehmen BioNTech Diagnostics GmbH entwickelte Test MammaTyper® ist ein *in-vitro* diagnostischer Test zur quantitativen Analyse des mRNA-Expressionsstatus der Gene *ERBB2*, *ESR1*, *PGR* und *MKI67* mittels Reverser Transkription und quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).(3) Der Test ermöglicht so die Subtypisierung des Tumors gemäß der St. Gallen-Klassifikation von 2013 in Luminal A-like, Luminal B-like (HER2 negativ), Luminal B-like (HER2 positiv), HER2-positiv (nicht-luminal) und Triple negativ (ductal), die mit jeweils spezifischen Therapieempfehlungen einhergehen.(3, 4)

Bisher erfolgte die Beurteilung des Tumorgewebes in erster Linie mittels semi-quantitativer immunhistochemischer Verfahren. Aufgrund methodischer Einschränkungen der Immunhistochemie unterliegt dieses Verfahren zur Beurteilung der Expression der Biomarker auf Proteinebene einer großen Variabilität innerhalb aber auch zwischen unterschiedlichen Laboren und Untersuchern.(5) Durch die Verwendung eines quantitativen Verfahrens wie der

RT-qPCR ermöglicht MammaTyper® eine zuverlässige und reproduzierbare Bestimmung der Expressionsstärke der vier Biomarker und könnte somit auch die molekulare Subtypisierung optimieren.(6, 7)

2 Literaturdiskussion

2.1 Epidemiologie

Gemäß Robert Koch-Institut handelt es sich mit einer Inzidenz von 74.500 im Jahr 2022 beim Mamma-Karzinom um die häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland.(1) Dies entspricht einem Lebenszeitrisiko von circa 14 % an Brustkrebs zu erkranken. Damit ist das Mammakarzinom vor dem kolorektalen- und Lungenkarzinom die häufigste Tumorerkrankung der Frau.(1) Durch die flächendeckende Einführung der Screeningprogramme sind die Inzidenzen in den jeweiligen Regionen bzw. Bundesländern in Deutschland ab 2005 initial deutlich angestiegen, da deutlich mehr Tumore in früheren Stadien diagnostiziert werden konnten, sind seit dem Jahr 2009 allerdings wieder rückläufig und liegen aktuell nur leicht über den Inzidenzen vor Einführung des flächendeckenden Screenings.(8) Gemäß Katalanic et al. erkranken in den Jahrgängen ab 2005 inzwischen ca. 25 % weniger Frauen an fortgeschrittenem Brustkrebs als vor Einführung des Screenings.(8)

Dies wirkt sich ebenfalls auf die Brustkrebssterblichkeit aus, die sich in den Screening-Gruppen seit 2008 rückläufig zeigt.(8) Zum Screening eingeladen werden in Deutschland alle Frauen im Alter von 50 - 69 Jahren. Die Annahme in der Bevölkerung ist hingegen nur mäßig mit einer Teilnahmequote von durchschnittlich, seit der vollständigen Umsetzung im Jahr 2009, nur 50%.(9)

Die Reduktion der Brustkrebssterblichkeit, sowie die Zunahme des relativen Überlebens ist neben der verbesserten und somit häufig früheren Diagnostik, bedingt durch das beispielsweise seit 2005 eingeführte flächendeckende Screeningprogramm, außerdem auf verbesserte therapeutische Möglichkeiten zurückzuführen.(8)

Die Prognose wird neben klinisch-pathologischen Faktoren maßgeblich durch das Stadium bei Diagnose und der biologischen Eigenschaften des Tumors bestimmt. Inzwischen ist hinreichend bekannt, dass es sich bei Brustkrebs um heterogene Erkrankungen handelt, die sich sowohl hinsichtlich ihrer Biologie und somit Behandlungsoptionen, als auch ihrer Prognose deutlich unterscheiden.(2)

2022	
	Frauen
Neuerkrankungen	74.500
Sterbefälle	18.527
5-Jahres-Prävalenz	315.000
relative 5-Jahres-Überlebensrate	88 %

Tabelle 1 Epidemiologie des Mammakarzinoms der Frau im Jahr 2022, in Anlehnung an (1)

2.2 Risikofaktoren und Pathogenese

Wie bei vielen anderen Krebsarten ist auch die Ätiologie von Brustkrebs multifaktoriell.(10) Die Entstehung eines Mammakarzinoms wird sowohl durch intrinsische als auch extrinsische Faktoren beeinflusst.(10) Neben genetischen Risikofaktoren spielen auch hormonelle Einwirkungen und Lebensstil eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung. Neben dem Geschlecht stellt der wohl wichtigste und nicht beeinflussbare Risikofaktor das Alter dar.(11) Die Brustkrebsinzidenz nimmt mit steigendem Alter stetig zu und verdoppelt sich bis zur Menopause nahezu alle 10 Jahre.(12) Außerdem gibt es deutliche geographische Unterschiede bezüglich der Inzidenz von Brustkrebserkrankungen. Die Inzidenzen in westlichen Ländern liegen teilweise um das Fünffache über den Inzidenzen in fernöstlichen Ländern.(12) Studien an Einwanderern, die aus Ländern mit niedrigeren, in Länder mit hohen Inzidenzen migrieren und nach ein bis zwei Generationen ein vergleichbares Lebenszeitrisko für das Auftreten eines Mammakarzinoms aufweisen wie die einheimische Bevölkerung, sind ein Hinweis, dass Umweltfaktoren offenbar eine größere Bedeutung zukommen.(13)

Neben der exogenen Zufuhr von Hormonen, besonders in der Postmenopause, mittels Hormonersatztherapie spielen auch nicht beeinflussbare hormonelle Faktoren, wie frühe Menarche oder späte Menopause, sowie die Anzahl und Zeitpunkte der Graviditäten eine bedeutende Rolle.(12)

Auch Adipositas und ein erhöhter Körperfettanteil stellen einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten von Brustkrebs dar.(14) Eine mögliche Erklärung hierfür ist die endogene Produktion von Östrogenen durch das Enzym Aromatase, das zu einem hohen Anteil im Körperfettgewebe vorkommt.(15) Allerdings ist gemäß Yang et al. Übergewicht auch ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung von triple-negativen Mammakarzinomen. Somit könnten auch andere Mechanismen für die beobachtete Risikoerhöhung mit verantwortlich sein.(16) Hierbei spielen unter anderem Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle, wobei unter anderem vermehrt entzündungsfördernde Botenstoffe wie TNF α und IL-6 ausgeschüttet werden.(15)

In ihrer Übersichtsarbeit zeigten Shaikh et al., dass auch Lebensstileinflüsse wie beispielsweise die Ernährung und hier im speziellen die Einhaltung einer mediterranen Diät zur Risikoreduktion der Entwicklung eines Mammakarzinoms beziehungsweise auch der Bildung eines Rezidivs beitragen können.(17)

Gemäß Mahdavi et al. gehen nur circa 5-10% der Mammakarzinome auf genetische Faktoren zurück.(18) Zu den wichtigsten genetischen Mutationen zählen Keimbahnmutationen in den *BRCA1* und *BRCA2* -Genen.(18) Weitere Mutationen, die ebenfalls mit einem erhöhten Risiko einhergehen umfassen unter anderem Mutationen in *TP53*, *CHEK2* oder *ATM*.(19)

2.3 Klassifikationen

2.3.1 TNM-Klassifikation

Die Klassifikation der Mammakarzinome erfolgt typischerweise anhand der TNM-Klassifikation unter Berücksichtigung der Tumorgroße, des Nodalstatus und dem Vorhandensein von Metastasen.(20)

Zur später leichteren Einbeziehung klinisch-pathologischer Faktoren in den Prognosealgorithmus wurde eine modifizierte vereinfachte Version der TNM-Klassifikation erstellt.

<i>pT</i>	
<i>pT0</i>	Kein Anhalt für Primärtumor
<i>pTis (DCIS)</i>	Ductales Carcinoma in situ
<i>pT1</i>	Tumor ≤20 mm
<i>pT1mi</i>	Tumor ≤1 mm
<i>pT1a</i>	Tumor >1 mm bis ≤5 mm
<i>pT1b</i>	Tumor >5 mm bis ≤10 mm
<i>pT1c</i>	Tumor >10 mm bis ≤20 mm
<i>pT2</i>	Tumor >20 mm bis ≤50 mm
<i>pT3</i>	Tumor >50 mm
<i>pT4</i>	Jede Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand und/ oder Haut
<i>pT4a</i>	Ausdehnung auf die Brustwand, ausschließlich Anhaftung/Invasion des Brustmuskels
<i>pT4b</i>	Ulzerationen und/oder ipsilaterale Satellitenknötchen und/oder Hautödem
<i>pT4c</i>	Kriterien 4a und 4b
<i>pT4d</i>	Inflammatorisches Karzinom das ein Drittel oder mehr der Haut der Brust betrifft

<i>pN</i>	
<i>pNx</i>	Nicht beurteilbar
<i>pN0</i>	Histologisch keine regionalen Lymphknotenmetastasen. Lymphknoten die nur Tumorzellcluster enthalten werden von der Gesamtzahl der positiven Lymphknoten ausgeschlossen, werden aber in die Gesamtzahl der bewerteten Lymphknoten einbezogen.
<i>pN0 (i-)</i>	Histologisch keine regionalen Lymphknotenmetastasen (IHC-negativ)
<i>pN0 (i+)</i>	Maligne Zellen in regionalen Lymphknoten $\leq 0,2$ mm und ≤ 200 Zellen (HE-Färbung oder IHC-positiv)
<i>pN1mi</i>	Mikrometastasen > 0.2 mm bis ≤ 2.0 mm und/oder > 200 Zellen
<i>pN1a</i>	Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten
<i>pN2a</i>	Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten
<i>pN3a</i>	Metastasen in ≥ 10 axillären Lymphknoten
<i>pM</i>	
<i>Mx</i>	Nicht beurteilbar
<i>pM0</i>	Keine Metastasen
<i>pM1</i>	Fernmetastasierung, bestimmt durch klassische klinische und radiologische Methoden und/oder histologisch nachgewiesen $>0,2$ mm

Tabelle 2 Vereinfachte TNM-Klassifikation, in Anlehnung an Performance Evaluation Protocol Version 1.0, BioNTech Diagnostics GmbH

2.3.2 Molekulare Subtypen und ihre Surrogat-Klassifikation nach St. Gallen 2013

Inzwischen ist bekannt, dass es sich bei Brustkrebs um heterogene Erkrankungen handelt, die sich durch unterschiedliche klinische und molekulopathologische Eigenschaften auszeichnen.(21)

Anhand charakteristischer Genexpressionsmuster lässt sich Brustkrebs auf Basis der Arbeiten von Sørlie et al. außerdem in vier molekulare Subtypen einteilen, die mit unterschiedlichem Risiko für das Auftreten eines Rezidivs, Überlebensraten und Therapieempfehlungen einhergehen.(21, 22)

Molekulare Subtypen	Klinisch-pathologische Surrogat-Definition
Luminal A	<i>Luminal A-like</i>
Luminal B	<i>Luminal B-like (HER2 negativ)</i>
	<i>Luminal B-like (HER2 positiv)</i>
HER2/ERBB2 überexprimiert	<i>HER2 positiv (nicht-luminal)</i>
Basal-like	<i>Triple negativ (ductal)</i>

Tabelle 3 Molekulare Subtypen und ihre klinisch-pathologischen Surrogat-Klassifikationen nach St. Gallen (4)

Anstelle der Durchführung komplexer Genexpressionsanalysen lassen sich die vier molekularen Subtypen anhand der klinisch-pathologischen Surrogat-Klassifikation nach St-Gallen 2013 auf Basis der Expression von ER, PR, HER2 und Ki-67 unterscheiden.(4)

Surrogat-Klassifikation nach St. Gallen	ER	PR	HER2	Ki-67
<i>Luminal A-like</i>	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
<i>Luminal B-like (Her2 neg.)</i>	<i>positiv</i>	<i>positiv/ negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv/ negativ</i>
<i>Luminal B-like (Her2 pos.)</i>	<i>positiv</i>	<i>positiv/ negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>positiv/ negativ</i>
<i>HER2 positiv (nicht-luminal)</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>positiv/negativ</i>
<i>Triple negativ (ductal)</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv/negativ</i>

Tabelle 4 Markerverteilung gemäß St.-Gallen Klassifikation (4)

Da mit den einzelnen Subtypen auch spezifische Behandlungsempfehlungen einhergehen kommt ihrer zuverlässigen Bestimmung eine essentielle Bedeutung zu.

Gegenwärtig erfolgt die Bestimmung der Marker in der klinischen Routine in der Regel noch semiquantitativ mittels Immunhistochemie und gegebenenfalls In-situ-Hybridisierung, kann aber auch mittels quantitativer Verfahren wie der RT-qPCR erfolgen.(4, 23)

2.4 Biomarker

2.4.1 Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor)

Östrogen- und Progesteronrezeptoren gehören zur Gruppe der Steroidrezeptoren. Hierbei handelt es sich um nukleäre Rezeptoren und somit ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren.(24) Durch Bindung eines Liganden wird die Aktivität der Rezeptoren reguliert und somit die Transkription gehemmt oder aktiviert. Nach Bindung ihres jeweiligen Liganden wandern sie in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren.(25) Jensen et al. gelang in den 1960er Jahren erstmals die Identifikation des Östrogenrezeptors.(26) Die Östrogenrezeptoren können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Der wichtigste Vertreter ist der Östrogenrezeptor α , beziehungsweise NR3A1 (Nukleärer Rezeptor Subgruppe 3, Gruppe A, Nummer 1) und wird durch das Gen *ESR1* kodiert. Östrogenrezeptor β (NR3A2, Nukleärer Rezeptor Subgruppe 3, Gruppe A, Nummer 2) wird durch das Gen *ESR2* codiert. ER α wurde erstmals durch Greene et al. 1986 kloniert (27), ER β folgte erst 10 Jahre später, im Jahre 1996 durch Kuiper et al.(28) Östrogenrezeptoren besitzen als Vertreter der Steroidrezeptoren sechs Domänen (A-F). Am N-terminalen Ende befindet sich die A/B Region, die eine ligandenunabhängige Transaktivierungsfunktion (AF1) enthält. Die C-Region enthält die DNA-Bindungsdomäne mit zwei Zinkfingerdomänen. Durch den Einbau des Zinkatoms und die dadurch entstehende schleifenförmige Struktur wird die spezifische Bindung an sogenannte estrogen response elements (ERE) der DNA ermöglicht.(29) Durch diese Interaktion und Bindung des Östrogenrezeptors an die ERE wird die Transkription aktiviert oder gehemmt, und somit die Genexpression reguliert. Hierbei können auch andere Cofaktoren interagieren. Inzwischen sind auch zahlreiche weitere östrogenvermittelte Effekte bekannt, die nicht über die Aktivierung und Hemmung der Transkription über nukleäre Rezeptoren vermittelt werden, sondern beispielsweise über second messenger Signalwege.(29) Die Fähigkeit der Östrogenrezeptoren Liganden zu binden macht sie außerdem zu pharmakologischen Targets. (30)

Die Expression des Östrogenrezeptors α stellt einen wichtigen prädiktiven Faktor für das Ansprechen auf eine adjuvante endokrine Therapie dar.(31) Aus diesem Grund ist die Bestimmung der Hormonrezeptorexpression im Operationsgewebe obligat. Therapierichtlinien zum Einsatz einer endokrinen Therapie empfehlen den Östrogenrezeptorstatus als positiv zu

bewerten, wenn sich in mindestens 1% der Tumorzellen eine positive Kernfärbung mittels Immunhistochemie nachweisen lässt und diesen Patientinnen eine endokrine Therapie anzubieten.(32) Zur weiterführenden Beurteilung wird außerdem die Anwendung von immunhistochemischen Scores empfohlen, die neben dem Prozentsatz positiver Zellkerne auch die Färbeintensität berücksichtigen. Zu den am häufigsten verwendeten Scores zählen beispielsweise der Allred-Score oder der immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (IRS).(33)

2.4.2 Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2

HER2/neu oder HER2 gehört zur Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und wird durch das Gen *ERBB2* auf Chromosom 17q12 kodiert und besteht aus 1255 Aminosäuren.(34) In ca. 20-30 % der Mammakarzinome lässt sich eine HER2-Überexpression nachweisen (35), normalerweise in Verbindung mit einer DNA-Amplifikation des Erb-B2-Locus.(2) HER2 ist ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor und besteht aus 3 unterschiedlichen Domänen. Einerseits einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle, einem Transmembransegment, sowie einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität.(36) Homo- oder Heterodimerisierung führt zur Auto- und Transphosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der intrazellulären Domäne.(34) Dadurch werden verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden aktiviert, die unter anderem die MAP-, PI3- und Proteinkinase C umfassen. Diese Signalwege beeinflussen unter anderem die Transkription verschiedener Gene und fördern Zellwachstum, Proliferation und beeinflussen außerdem die Zelldifferenzierung und Angiogenese.(36)

Der primäre Mechanismus der HER2-Aktivierung bei Brustkrebs ist die Genamplifikation auf dem langen Arm von Chromosom 17.(37) Dies führt folglich zur Überexpression des HER2-Rezeptors.

Es hat sich gezeigt, dass eine Amplifikation des *ERBB2*-Gens beziehungsweise eine HER2-Überexpression mit einer signifikant schlechteren Prognose und einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Metastasen einhergeht. Gleichzeitig stellt der HER2-Rezeptor eine Zielstruktur für eine zielgerichtete Anti-HER2-Therapie beispielsweise mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab oder einem Tyrosinkinaseinhibitor wie Lapatinib dar.(38) Inzwischen hat sich die Immunhistochemie als Standard-Screening-Verfahren zur Bestimmung von HER2 etabliert.(23)

Der HER2-Status wird entweder als positiv (3+ oder 2+ und CISH- oder FISH-positiv) oder negativ (0/1+ oder 2+ und CISH- oder FISH-negativ) beurteilt.(39)

Dass bei einem Mammakarzinom von einer HER2-Positivität gesprochen werden darf, ist eine immunhistochemisch nachgewiesene Proteinüberexpression Voraussetzung. Dies entspricht einem Score von 3+, was einer gleichmäßigen intensiven Membranreaktion in >10% der

invasiven Tumorzellen entspricht. Ein Score von 1+ ist als negativ zu werten und geht mit einer unvollständigen schwachen Membranfärbung in mehr als 10 % der invasiven Tumorzellen einher. Ein Wert von 0 beziehungsweise 1+ ist als negativ zu werten und geht nicht mit einer Therapieempfehlung mit einem HER2-Antikörper einher. Bei einem Score von 2+, handelt es sich entweder um eine unvollständige und/ oder eine schwache Membranfärbung innerhalb von mehr als 10% der invasiven Tumorzellen oder eine vollständige intensive umlaufenden Membranfärbung von $\leq 10\%$ der invasiven Tumorzellen.(37)

Ergibt sich in der Immunhistochemie ein unklarer Fall für HER2, z.B. HER2-IHC 2+, kann mittels In-situ-Hybridisierung eine mögliche Genamplifikation nachgewiesen werden. Hierbei kommt häufig die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Chromogen-in-situ-Hybridisierung (CISH) zur Anwendung.(37)

Gemäß der aktualisierten ASCO/CAP-Leitlinie von 2018 ist bei Verwendung eines Dual-Sonden-In-situ-Hybridisierungs-Assays ein HER2 / CEP17-Verhältnis $\geq 2,0$ und eine durchschnittliche HER2-Kopienzahl $\geq 4,0$ als positiv zu werten. Ein HER2 /CEP17-Verhältnis $< 2,0$ mit durchschnittlicher HER2-Kopienzahl $< 4,0$ gilt hingegen als negativ.(40)

Bei Vorliegen eines HER2- /CEP17 Verhältnisses $\geq 2,0$ und durchschnittlicher HER2-Kopienzahl von $< 4,0$ oder mittlerer HER2-Kopienzahl $\geq 4,0$ und $< 6,0$ sowie einer Ratio $< 2,0$ ist das Ergebnis ebenfalls negativ, es sei denn es liegt gleichzeitig eine mittels Immunhistochemie nachgewiesene Überexpression vor (IHC 3+). Auch eine durchschnittliche HER2-Kopienzahl von $\geq 6,0$ und eine Ratio $< 2,0$ wird in der 2018 aktualisierten Empfehlung als negativ bewertet, allerdings auch hier nur bei nicht gleichzeitig vorliegendem IHC 2+ - oder 3+ - Status. Insgesamt wurde durch die Empfehlungen von 2018 eine Verbesserung der Beurteilung insbesondere der 2007 und 2013 noch uneindeutigen Fälle erreicht.(40)

2.4.3 Ki-67

Beim nukleären Antigen Ki-67 handelt es sich um einen Proliferationsmarker zur Bestimmung der Zellteilungsaktivität. Die Bestimmung der Ki-67 Proteinexpression erfolgt in der klinischen Routine typischerweise mittels Immunhistochemie. Hierbei wird das Protein mittels monoklonalem Antikörper in der aktiven Phase des Zellzyklus nachgewiesen. Da Ki-67 in ruhenden Zellen nicht nachgewiesen werden kann, hat sich der Biomarker als Proliferationsmarker für die Zellteilungsaktivität etabliert.(41) Damit ist er zusätzlich ein prognostischer Marker.(42)

Klinische Entscheidungsfindung bezüglich Behandlungsempfehlungen beruhen zum Teil maßgeblich auf der Bewertung der Ki-67 Expression, wie beispielsweise der Differenzierung zwischen Luminal A und Luminal B.(5)

Als Proliferationsmarker bieten sich für Ki-67 neben der Unterscheidung zwischen Luminal A und B weitere potentielle Anwendungen an, wie beispielsweise die Abschätzungen der

Prognose nach vorangegangenen systemischen Therapien aber auch zur Therapieüberwachung.(5)

Doch gerade Ki-67 und besonders dessen Bestimmung mittels Immunhistochemie steht immer wieder in der Kritik als etablierter Biomarker. Zum einen fehlt es noch immer an klar definierten Grenzwerten für die Dichotomisierung in positiv und negativ, außerdem bestehen besonders im Rahmen der immunhistochemischen Bestimmung methodische Limitationen, die mit einer eingeschränkten Reproduzierbarkeit und Validität dieses Biomarkers einhergehen.(5)

Die Ki-67-Expression wird mithilfe des Ki-67-Labeling-Index als Prozentsatz der Ki-67-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Zellen angegeben.(43)

Während in der 12. internationalen Brustkrebs Konferenz in St. Gallen im Jahr 2011 noch ein Grenzwert von 14 % zur immunhistochemischen Unterscheidung zwischen einer hohen und einer niedrigen Ki-67 Proteinexpression und somit auch den molekularen Subtypen Luminal A und Luminal B empfohlen wurde, ging die Empfehlung von 2013 zur Verwendung eines Cut-offs von 20%, während in der Literatur weiterhin divergierende Grenzwerte für Ki-67 beschrieben sind.(37) Fehlende Standardisierung der Immunhistochemie und besonders der Beurteilung des Biomarkers Ki-67 resultieren weiterhin in einer hohen interlaboratorischen Variabilität und unzureichender Reproduzierbarkeit dieses Biomarkers.(44) Dies umfasst häufig nicht standardisierte Färbemethoden, aber auch große Divergenzen und Heterogenität bei der Bewertung und Auszählung der gefärbten Objektträger. Besonders ausgeprägt war die Heterogenität in den Ki-67 Expressionsbereichen zwischen 15-30%, der Bereich in dem die meisten Grenzwerte definiert sind.(45)

Der häufigste für IHC-Färbungen verwendete Antikörper ist MIB-1, während allerdings bei lokalen Färbeprotokollen Verfahrensschritte, wie beispielsweise die Antikörperversdünnung, die Herstellung der Substanzen oder auch die HE-Färbungszeit häufig variieren können.(5)

Mittels Training und standardisierten Bewertungsmethoden konnte die Reproduzierbarkeit der Immunhistochemie verbessert werden.(46) Allerdings blieben Inkonsistenzraten von bis zu 20 % für die Bestimmung der Proteinexpression von ER, PR, HER2 und Ki-67 bestehen, während sich Ki-67 als kritischster Parameter zeigte.(47-49)

Einer zuverlässigen und reproduzierbaren Bestimmung dieses Biomarkes kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

2.5 Gegenwärtige Prognoseabschätzung mittels Immunhistochemie anhand des IHC4-Scores und Genexpressionsanalysen

Neben der Bestimmung der charakteristischen Biomarker ER, PR, HER2 und Ki-67, bei denen es sich um therapeutisch adressierbare Zielstrukturen handelt, tragen typischerweise klinisch-pathologische Faktoren maßgeblich zur Prognoseabschätzung und Behandlungsempfehlungen bei.(50)

Anhand der Expressionshöhe der vier Biomarker ER, PR, HER2 und Ki-67 lassen sich die vier molekularen Subtypen mithilfe der klinisch-pathologischen Surrogat-Klassifikation nach St. Gallen unterscheiden.(4) Dazu zählen Luminal A-like, Luminal B-like (HER2 negativ), Luminal B-like (HER2 positiv), HER2-positiv (nicht-luminal) und Triple negativ. Die einzelnen Subtypen unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Prognose und ihres Risikos zur Fernmetastasierung als auch hinsichtlich des Ansprechens auf eine spezifische Therapie und gehen mit unterschiedlichen Behandlungsempfehlung einher.(51) Somit kommt der genauen Typisierung des Tumors eine essentielle Bedeutung zu.

Die Bestimmung der Expression der vier Biomarker ER, PR, HER2 und Ki-67 erfolgt gegenwärtig üblicherweise semiquantitativ mittels Immunhistochemie durch die Bestimmung der entsprechenden Proteinexpression.(4, 23) Dies liegt vor allem an der breiten Verfügbarkeit und den geringen Kosten.(52)

Hierbei werden die Proteine mittels monoklonaler Antikörper oder Antikörperfragmenten, die mit einem Marker gekoppelt sind detektiert und anschließend semiquantitativ gezählt und anhand des Anteils und der Intensität der Färbereaktion beurteilt. Wie bereits oben ausgeführt unterliegt dieses Verfahren aufgrund der genannten methodischen Einschränkungen besonders hinsichtlich subtiler Unterschiede im Bereich vordefinierter Cut-offs, beziehungsweise sehr niedriger oder sehr hoher Expression, Limitationen.(53)

2.5.1 IHC4-Score

Mit dem IHC4-Score konnte bereits ein Score etabliert werden, der allein auf der Kombination der immunhistochemisch bestimmten Marker ER, PR, HER2 und Ki-67 beruht und prognostische Informationen für östrogenrezeptorpositive frühe Mammakarzinome liefert die über die typischen klinisch-pathologischen Faktoren hinausgehen.(54) Cutzick et al. konnten zeigen, dass das Modell noch optimiert werden kann, wenn klassische klinisch-pathologische Parameter wie Nodalstatus oder Tumorgröße integriert werden.(55, 56) Der IHC4 kann somit im Gegensatz zu alternativen Multigen-Expressionsassays kostengünstig und dezentral an jedem lokalen Pathologielabor angewendet werden.(54)

Obwohl der Score in einer unabhängigen Kohorte etabliert wurde und einen vergleichbaren prognostischen Wert wie beispielsweise der auf komplexeren Analysen beruhende 21-Gen-Recurrence-Score (Oncotype DX®, Genomic Health) liefert, wurde er bisher trotz vieler

Vorteile nicht in die klinische Routine integriert, was unter anderem auf die methodischen Limitationen der Immunhistochemie zurückzuführen ist.(46, 56)

Die Grenzen der aktuell etablierten Methode, der Bestimmung auf Proteinebene mittels IHC verdeutlicht die Notwendigkeit alternative Verfahren zu etablieren, die in Reproduzierbarkeit, Zuverlässigkeit und Präzision insbesondere hinsichtlich der Ki-67 Bestimmung den gängigen Verfahren überlegen, und des Weiteren unabhängig von subjektiven Bewertungseinflüssen sind.

2.5.2 Genexpressionstests

Mit der Entwicklung verschiedener Multigen-Assays wie beispielsweise Oncotype DX® (Genomic Health, Redwood City, CA, USA), MammaPrint® (Agendia, Irvine, CA, USA) oder EndoPredict® (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA), wurde eine Möglichkeit geschaffen die methodischen Limitationen der Immunhistochemie, insbesondere die Einschränkungen der subjektiven Bewertung zu umgehen. Sie liefern Rezidivscores die prognostische Information für hormonrezeptorpositive frühe Mammakarzinome bereitstellen.

Während alle vier Tests prognostische Informationen ermöglichen, ist bisher nur der 21-Gen-Recurrence-Score (Oncotype DX®, Genomic Health) als prädiktiver Test für die Vorhersage eines Chemotherapienutzens validiert.(57-59)

Ein Nachteil dieser kommerziell verfügbaren Assays sind neben den relativ hohen Kosten, die in vielen Fällen notwendige Durchführung an zentralen Diagnostiklaboren.(7) Dies schränkt die Anwendung dieser Tests besonders in Ländern oder Regionen mit weniger monetären und strukturellen Möglichkeiten weiterhin ein.

2.6 Risikoquantifizierung mittels RT-qPCR am Beispiel von MammaTyper®

2.6.1 Reverse Transkription - quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)

Im Gegensatz zur semiquantitativen Bestimmung der Proteinexpression mittels Immunhistochemie, ermöglicht die quantitative Real-time PCR eine quantitative Analyse der mRNA-Expression und somit eine genaue, reproduzierbare und objektive Bestimmung der Genexpressionslevel der 4 Biomarker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67*.(3, 7)

Die quantitative Real-time PCR beschreibt ein modifiziertes Verfahren der vielfach angewendeten Polymerase-Kettenreaktion. Während bei der klassischen PCR die Analyse am Ende der Reaktion erfolgt, kann mittels quantitativer Real-time PCR die Menge an DNA nach jedem PCR-Zyklus in Echtzeit detektiert werden.(60) Zur Quantifizierung der Genexpressionsstärke der genannten Biomarker *ERBB2*, *ESR1*, *PGR* und *MKI67* auf mRNA-Ebene muss zunächst die vorliegende messenger-Ribonukleinsäure mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben werden. Die hinzugegebene RNase baut die vorhandene mRNA anschließend ab und die DNA-Polymerase dupliziert den vorliegenden DNA-Strang, sodass doppelsträngige DNA vorliegt. Die entstandene markerspezifische komplementäre DNA wird anschließend mittels des Enzyms DNA-Polymerase amplifiziert. Die Amplifikation während der Polymerase-Kettenreaktion wird in Echtzeit beispielsweise mittels Hydrolysesonden detektiert. Bei der hier verwendeten sondenbasierten Real-time PCR wird die Fluoreszenz einer mit Fluorophor markierten sequenzspezifischen Sonde gemessen.(61). Die Verwendung spezifischer Fluorophore ermöglicht die simultane Quantifizierung und Bestimmung mehrerer Gene in einer Probe. Die entsprechenden Hydrolysesonden sind 5' mit dem Fluorophor und 3' mit einem Quencher aufgebaut und sind komplementär zur Zielsequenz. Die gewählten Sonden und Primer sind spezifisch zur Detektion des Zielgens ausgewählt. Solange die Sonde intakt ist verhindert der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer die Emission des Fluorophors indem der Quencher, in direkter Nachbarschaft, die Fluoreszenz des Farbstoffs absorbiert.(62) Bedingt durch die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase wird die gebundene Sonde abgebaut. Durch die Trennung von Fluorophor und Quencher kann die Emission nicht mehr durch den Quencher absorbiert werden und kann als Fluoreszenz mittels Spectrofluorometer gemessen werden. Je mehr Zielsequenzen nach jedem Zyklus vorliegen desto mehr Sonden können binden und werden nach jedem Zyklus abgebaut und umso mehr Fluoreszenz kann mittels Spectrofluorometer gemessen werden.(62)

Als Quantifizierungszyklus (Cq) wird der PCR-Zyklus bezeichnet bei dem erstmals ein Signal über dem Hintergrundsignal detektiert werden kann. Die Anzahl der Zyklen die hierfür nötig ist dient als Maß für die Menge an initial vorhandener mRNA.(63)

2.6.2 Quantitativer Nachweis des mRNA-Expressionsstatus der Gene *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* mittels MammaTyper® (BioNTech Diagnostics GmbH)

Der *in-vitro* diagnostische Test MammaTyper® ermöglicht die quantitative Analyse der mRNA-Expressionsstärke der Gene *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* auf mRNA-Ebene mittels reverser Transkription und quantitativer Real-time PCR (RT-qPCR).(3)

Im Gegensatz zur Bestimmung mittels Immunhistochemie zeigte sich bei der Analyse mittels MammaTyper® für alle vier Biomarker eine hohe Reproduzierbarkeit und eine sehr niedrige Variabilität innerhalb und zwischen unterschiedlichen Untersuchern.(7)

Somit ermöglicht MammaTyper® eine zuverlässige Subtypisierung des Tumors gemäß der St. Gallen-Klassifikation von 2013 in Luminal A-like, Luminal B-like (HER2 negativ), Luminal B-like (HER2 positiv), HER2 positiv (nicht-luminal) und Triple negativ (ductal), die mit jeweils spezifischen Behandlungsempfehlungen einhergehen.(52)

In der klinischen Routine wird Tumormaterial für nachfolgende pathologische Untersuchungen in der Regel in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben asserviert. Zur weiteren Diagnostik, beispielsweise mittels Immunhistochemie oder In-situ-Hybridisierung, können jeweils einzelne Schnitte eines solchen Blockes zur weiteren Diagnostik abgetragen werden. Für bestimmte genetische aber auch molekulare Analysen wie der RT-qPCR ist hingegen als erster Schritt die Extraktion der Gesamt-RNA aus den FFPE-Proben nötig. Hierfür stellt BioNTech Diagnostics GmbH das RNXtract®-Extraktionskit mit zur Verfügung. Die Elution der RNA ist aber auch über andere gängige Wege der RNA-Extraktion möglich.

Natürlicherweise können extrahierte Tumorböcke auch zu einem nicht unwesentlichen Teil aus nicht-invasivem Tumor, beispielsweise umgebendem Stromagewebe oder nicht invasiven Tumoranteilen (z.B. Ductalem carcinoma in situ) bestehen.(3)

Gemäß Hartmann et al. geht man davon aus, dass tumorfremde RNA RT-qPCR kaum beeinflusst, während die RNA eines parallel bestehenden in-situ-Karzinoms aufgrund charakteristischer abweichender Genexpressionssignaturen die Ergebnisse hingegen deutlich beeinflussen können. Dieser Problematik begegnet man in der Praxis in der Regel mittel Verwendung eines Grenzwertes für den invasiven Tumorzellgehalt, der zur Ermittlung valider Ergebnisse nicht unterschritten werden sollte.(64)

Für die sichere und valide Durchführbarkeit des MammaTyper®, ebenso wie zuvor beschrieben für das RNA-Extraktions-Kit RNXtract® wurde ein invasiver Tumorzellanteil von mindestens 20 % vorausgesetzt.(3)

Neben den Assays für *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* enthält das MammaTyper®-Kit außerdem Assays für die beiden Referenzgene *B2M* und *CALM2*. Diese dienen der Kontrolle ob ausreichend RNA zur Quantifizierung vorliegt.

MammaTyper® beinhaltet 3 Assay-Mixe, in denen jeweils zwei Assays duplexiert sind.

- Assay-Mix 1 enthält die Assays für *ERBB2* und *ESR1*
- Assay-Mix 2 enthält die Assays für *MKI67* und *B2M*
- Assay-Mix 3 enthält die Assays für *PGR* und *CALM2*

Vor jeder Analyse wird die Validität von Lauf und Probe verifiziert. Zur Überprüfung der Validität des einzelnen Laufes dient eine im MammaTyper®-Kit enthaltene Kontroll-RNA als Positivkontrolle, sowie Wasser als Negativkontrolle.

Neben der Angabe als kontinuierliche Variable ist anhand validierter Cut-offs für jeden Biomarker auch eine binäre Einteilung in positiv und negativ möglich. Die Cut-offs sind gerätespezifisch.

Der MammaTyper® Test gibt die Einzelmarkerergebnisse sowohl auf einer kontinuierlichen Skala als $\Delta\Delta Cq$ -Werte, als auch anhand gerätespezifischer Grenzwerte in positiv und negativ dichotomisiert an.(3)

Anhand der binären Einzelmarkerergebnisse der 4 Biomarker lassen sich die Proben den vier klinisch-pathologischen Surrogat-Subtypen gemäß der St.-Gallen-Klassifikation zuteilen.(4)

3 Material und Methoden

3.1 Zielsetzung und Forschungsfrage

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation eines Risiko-Scores (MT (MammaTyper®) - Score) als Prognoseindikator für das Rezidivrisiko von weiblichen Brustkrebspatientinnen mit frühen hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen Mammakarzinomen, die nach operativer Therapie (Mastektomie oder brusterhaltender Therapie) ausschließlich endokrin behandelt wurden.

Der Score basiert auf der quantitativen Analyse der mRNA-Expressionsstärke der 4 Biomarker des *in-vitro* diagnostischen Tests MammaTyper® *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* in Kombination mit klinisch-pathologischen Faktoren, wie Zahl der befallenen Lymphknoten und Tumorgroße.

3.1.1 Primäres Studienziel

Die algorithmische Kombination der quantitativen MammaTyper®-Ergebnisse der vier Marker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* liefert unabhängige prognostische Informationen hinsichtlich des Auftretens von Fernrezidiven bzw. des krankheitsfreien Langzeitüberlebens in hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen Brustkrebspatientinnen, die adjuvant ausschließlich endokrin behandelt wurden.

3.1.2 Sekundäre Studienziele

Als sekundäres Studienziel sollte untersucht werden, ob die algorithmische Kombination der quantitativen MammaTyper® Ergebnisse unabhängige prognostische Informationen bezüglich des Auftretens von Rezidiven, zusätzlich zu etablierten klinisch-pathologischen Risikofaktoren, wie beispielsweise der Anzahl pathologischer Lymphknoten oder Tumorgroße in weiblichen hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen Brustkrebspatienten die adjuvant ausschließlich endokrin behandelt wurden, ermöglicht.

Als primärer Endpunkt wurde das fernmetastasenfreie Überleben (distant disease-free survival, DDFS) definiert. Dieses entspricht dem zeitlichen Intervall zwischen Operation und Fernmetastasierung oder krankheitsspezifischem Versterben.

Als sekundärer Endpunkt wurde das Gesamtüberleben (overall survival, OS) definiert. Dies entspricht der Zeit zwischen Operation und Versterben (aufgrund jeglicher Ursache).

3.2 Patientenkollektiv

Zur Analyse der mRNA-Expressionslevel der vier Biomarker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* wurden archivierte Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE-) Gewebeblöcke von hormonrezeptorpositiven, HER2-negativen weiblichen Brustkrebspatientinnen untersucht, die zwischen 1990 und 2006 primär mit invasivem Brustkrebs diagnostiziert worden sind und für die mindestens für fünf Jahre Follow-up Daten vorlagen. Das Patientenkollektiv stammte aus der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit (Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz, Deutschland). Mittels Fragebogen wurde das Langzeit-Follow-up erhoben. Eingeschlossen wurden weibliche volljährige Brustkrebspatientinnen, die nach operativer Therapie adjuvant ausschließlich endokrin behandelt wurden und bei denen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose keine Fernmetastasierung bestand. Zu den operativen Therapien zählten entweder Mastektomie oder eine brusterhaltende Operation (BET). Das Vorliegen eines Zweitmalignoms stellte ebenfalls ein Ausschlusskriterium dar. Nachfolgend findet sich eine genaue Auflistung der Ein- und Ausschlusskriterien.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
- weiblich, volljährig - Patientinnen mit diagnostiziertem invasivem Brustkrebs - zum Zeitpunkt der Diagnose keine Fernmetastasen (M0) - ER positiv und HER2 negativ (zum Zeitpunkt der Diagnose mittels Immunhistochemie/ In-situ-Hybridisierung bestimmt) - Z.n. BET (Brusterhaltende Therapie) oder Mastektomie, R0-Resektion - nach Operation ausschließlich adjuvant endokrin behandelt - FFPE-Gewebe verfügbar (Biopsat/ Resektat) - Informationen zum DDFS (distant disease-free survival) verfügbar (Follow- up Informationen über mindestens 5 Jahre verfügbar)	- männliche Brustkrebspatienten - Zweitmalignom - Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose (primäre Metastasierung) - nicht ausreichendes FFPE-Gewebe - nicht ausreichender Tumorzellgehalt im Gewebe (mindestens 20 % invasiver Tumorzellgehalt) - nicht ausreichende RNA Gewinnung zur Durchführung der MammaTyper[®] Analysen (ungültiges MammaTyper[®] Testergebnis)

- Informationen zum Gesamtüberleben (overall survival, OS) verfügbar (Follow-up Informationen über mindestens 5 Jahre verfügbar) - Von Patientin unterschriebene Informierte Einwilligung (Informed consent) - Verfügbare Daten bezüglich histologischem Grading und Immunhistochemie/ In-situ-Hybridisierung von ER, PR, HER2 und Ki-67	
--	--

Tabelle 5 Detaillierte Auflistung der Ein- und Ausschlusskriterien

Die klinisch-pathologischen Daten zu den entsprechenden FFPE-Proben stammten einerseits aus einer bereits bestehenden Datenbank für die Jahre 1990 – 2000, während die klinischen Datensätze zu den Proben ab 2000-2006 aus archivierten Tumorboardaufzeichnungen und histologischen archivierten Befunden der entsprechenden Jahre gewonnen und in der entsprechenden Datenbank ergänzt wurden. Um Aussagen über einen längeren Nachbeobachtungszeitraum zu generieren wurde das Gesamtüberleben mittels Abfrage über das Krebsregister Rheinland-Pfalz 2024 noch einmal aktualisiert. Die Datenbank wurde mittels Microsoft Excel® Version 2402 erstellt. Verwendet wurden in erster Linie FFPE-Blöcke von Resektaten aber auch von Schnellschnitten. Waren für eine Patientin sowohl Blöcke für Schnellschnitt als auch Hauptresektat vorhanden, wurde der Block mit dem höheren Tumorzellgehalt verwendet, was in allen der hier eingeschlossenen Fälle das Hauptresektat darstellte, sodass jeder Patientin genau ein FFPE-Block zugeordnet werden konnte. Aufgrund des Alters der FFPE-Blöcke und der dadurch möglicherweise eingeschränkten Qualität und Probenintegrität wurden Proben die vor 1990 gewonnen wurden grundsätzlich von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Anschließend wurde überprüft, welche Blöcke zur weiteren Analyse in Frage kommen. Hierbei wurde einerseits überprüft, ob überhaupt noch erhaltene Blöcke vorhanden waren, andererseits ob durch gegebenenfalls schon früher durchgeführte Untersuchungen noch ausreichend Material auf den jeweiligen Blöcken für die geplante Analyse vorhanden war, bzw. die Qualität der Blöcke grundsätzlich gegeben war und keine grobe Beschädigung der Probenintegrität festzustellen war.

Vor Beginn der RNA-Extraktion, sowie der MammaTyper® RT-qPCR-Läufen wurden die einzelnen Tumorböcke auf ausreichend invasiven Tumorzellgehalt histologisch untersucht.

Die histologische Untersuchung hierfür erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen der BioNTech Diagnostics GmbH. Proben bei denen zu wenig Gewebe auf den Blöcken vorhanden war wurden ebenso wie Blöcke mit zu geringem invasivem Tumorzellgehalt von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Als Grenzwert hierfür wurde gemäß Gebrauchsinformation Ref 160301-90020-DE Rev 3.1 des MammaTyper®-Kit ein invasiver Tumorzellgehalt von mindestens 20% als Einschlusskriterium definiert.

3.2.1 Consort-Flussdiagramm

Von den ursprünglich 304 Patientenproben mit vorhandenem klinischen Datensatz der Jahre 1990-2006 konnte für 265 Proben ein valides MammaTyper®-Ergebnis generiert werden. 39 Proben mussten aufgrund fehlender Blöcke oder invalider MammaTyper®-Ergebnisse aufgrund von zu geringem Tumorzellgehalt ausgeschlossen werden. Von den 265 Proben für die ein valides MammaTyper®-Ergebnis generiert werden konnte wurden 49 Proben ausgeschlossen, da sie gegen Einschlusskriterien verstießen: 7 Probe mussten aufgrund fehlender Follow-up Daten ausgeschlossen werden, 41 Proben waren nicht ESR+/ HER2- gemäß IHC/ ISH und eine weitere Probe erfüllte beide Einschlusskriterien nicht. Abschließend erfüllten N= 216 Proben alle erforderlichen Einschlusskriterien und dienten als Basis für die weiteren Untersuchungen.

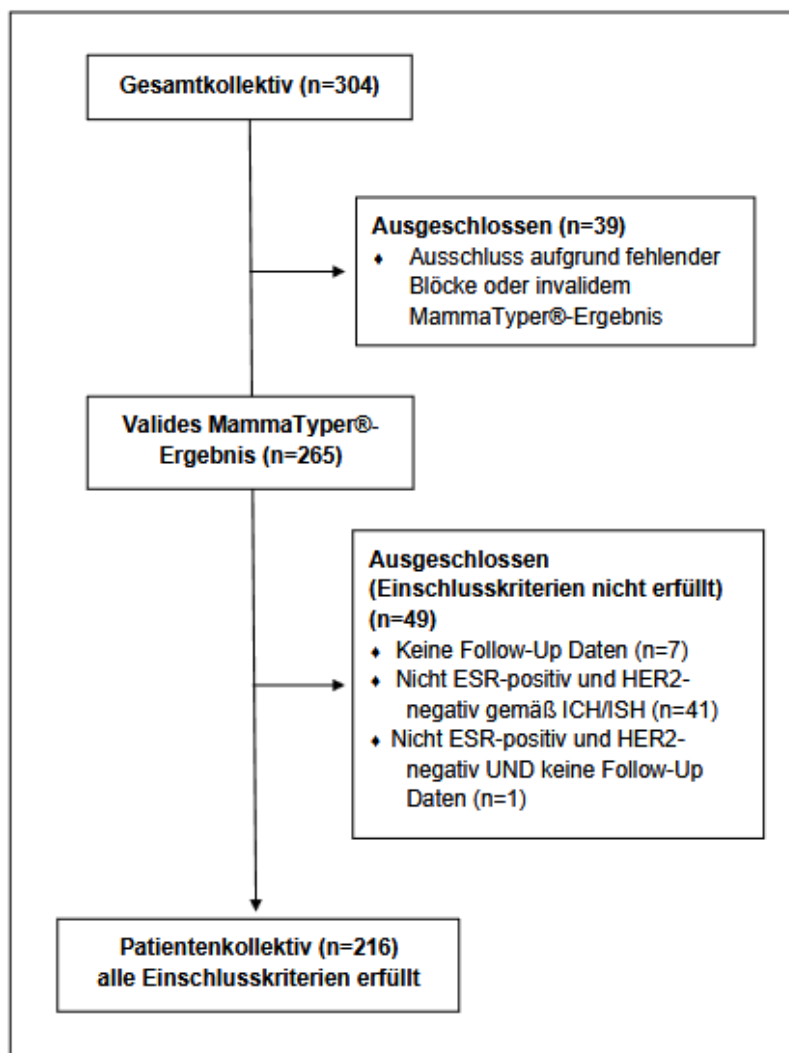


Abbildung 1 Consort-Flussdiagramm

3.3 Statistische Methoden

Die statistischen Analysen erfolgten mittels SPSS Version 11.5 für Microsoft Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Die deskriptive Statistik erfolgte mittels tabellarischer Darstellung der absoluten und relativen Häufigkeiten sowie Mittelwert und Median der Zeit bis zum Auftreten einer Fernmetastasierung oder Versterben. Tabellarisch erfolgte auch die Darstellung derselben Variablen (DDFS event occurrence, OS event occurrence) innerhalb der ersten 5 Jahre, sowie die Verteilung der klinisch-pathologischen Variablen des untersuchten Kollektivs. Die Darstellung der Verteilung der MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse erfolgte mittels Box-Plots.

Die Analyse der Überlebenszeiten erfolgte mittels Kaplan-Meier-Schätzung, einerseits für das fernmetastasenfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben.

Die Beurteilung der prognostischen Informationen der mittels MammaTyper® bestimmten Einzelmarkerergebnisse *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67*, der anhand derer bestimmten Subtypen sowie der klinisch-pathologischen Variablen Nodalstatus, Tumorstadium, Alter und Grading erfolgte zunächst mittels univariater Cox-Regression und anschließend im multivariaten Modell.

Als primärer Endpunkt wurde das DDFS definiert.

P-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen. Bei den Auswertungen wurde ein 95%-Konfidenzintervall verwendet.

3.4 Methodik

3.4.1 RNXtract®

Extraktion und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Probenmaterial mit Hilfe des RNXtract®-RNA-Extraktionskit (BioNTech Diagnostics GmbH) gemäß Gebrauchsinformation Ref 160301-90040-DE Rev 3.1:

In der klinischen Routine wird Tumormaterial für nachfolgende pathologische Untersuchungen in der Regel in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Proben asserviert. Zur weiteren Diagnostik beispielsweise mittels Immunhistochemie oder In-situ-Hybridisierung können jeweils einzelne Schnitte eines solchen Blockes abgetragen werden und zur weiteren Diagnostik verwendet werden. Die Aufarbeitung bzw. Fixierung des Tumorgewebes in Form von FFPE-Proben ermöglicht außerdem eine Langzeit-Asservierung und -Archivierung. Für bestimmte molekulare Analysen hingegen, wie beispielweise auch die Durchführung der RT-qPCR zur Bestimmung der mRNA-Expressionslevel der vier Markergene mittels MammaTyper® ist als erster Schritt die Extraktion der Gesamt-RNA aus den FFPE-Proben nötig. Hierfür stellt BioNTech Diagnostics GmbH das RNXtract®-Extraktionskit mit zur Verfügung.

Folgende Reagenzien sind im RNXtract®-Kit enthalten und wurden verwendet (gemäß Gebrauchsinformation Ref 160301-90040-DE Rev 3.1):

1. Lysepuffer, 10 ml, gebrauchsfertig, tensidhaltige gepufferte Lösung, enthält 0,09% Natriumazid (NaN₃)
2. Proteinase K-Lösung, 3,2 ml gebrauchsfertig, enthält 0,09% Natriumazid (NaN₃)
3. Bindepuffer, 45 ml, gebrauchsfertig, tensidhaltige gepufferte Guanidiniumhydrochloridlösung
4. Magnestische Beads, 3 ml, gebrauchsfertig, gepufferte Lösung mit germanium-beschichteten magnetischen Partikeln, enthält 0,09 % Natriumazid (NaN₃)
5. Waschpuffer 1,35 ml, gepufferte Guanidiniumhydrochloridlösung, Zugabe von 15 ml Ethanol vor erstmaliger Benutzung
6. Waschpuffer 2,6 ml, gepufferte Lösung, Zugabe von 24 ml Ethanol vor erstmaliger Benutzung
7. Waschpuffer 3,5 ml, gebrauchsfertig, gepufferte Lösung, enthält 0,09% Natriumazid (NaN₃)
8. Elutionspuffer, 8 ml, gebrauchsfertig, gepufferte Lösung, enthält 0,09% Natriumazid (NaN₃)

Die Extraktion der RNA aus FFPE-Gewebe mittels RNXtract® erfolgt in 5 Schritten:

Im ersten Schritt erfolgt zunächst die Beseitigung des zur Fixierung verwendeten Paraffins mittels Lysepuffer. Nach Entfernung des Paraffins erfolgt durch die Zugabe von Proteinkinase K die weitere Lyse des Gewebes mit Freisetzung der Nukleinsäuren. Im Anschluss werden Bindepuffer und sogenannte Beads zugegeben. Bei den verwendeten Beads handelt es sich um magnetische Partikel, die mit Germanium funktionalisiert sind. Nach mehreren Magnetisierungsschritten erfolgt die Aufreinigung der RNA durch mehrere Waschschrte. Anschließend wird die aufgereinigte RNA eluiert.

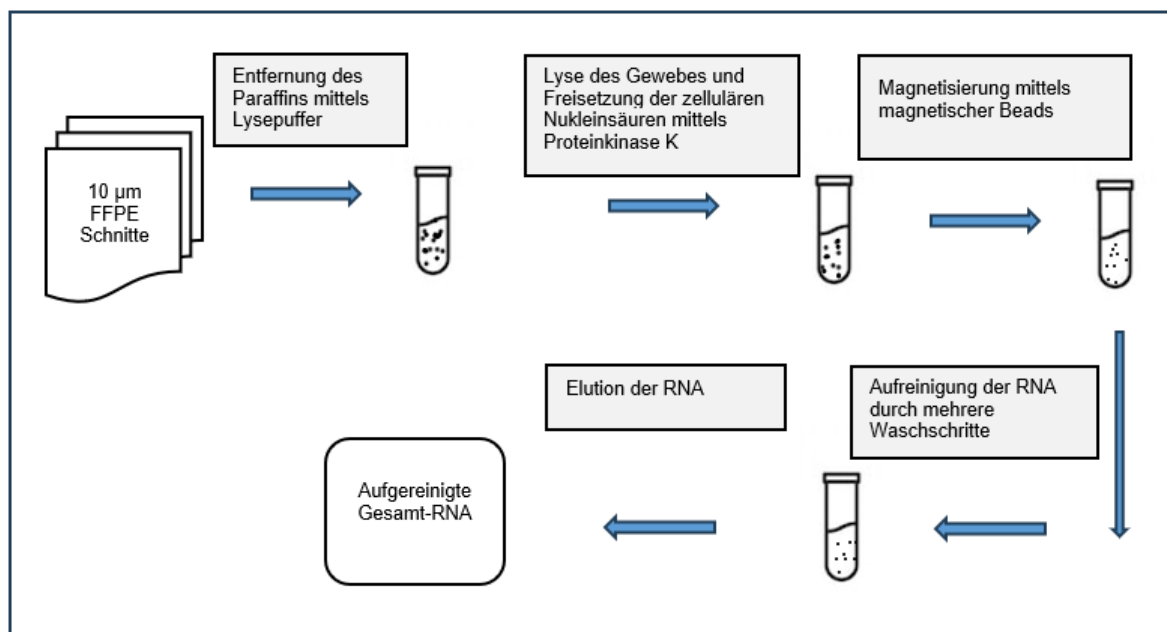


Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der RNA-Extraktion mittels RNXtract®

Zur Herstellung geeigneter Proben wurden von den vorliegenden Tumorböcken 10 µm dicke Schnitte („Curls“) jeweils mittels Einweg-Mikrotom-Klinge abgetragen. Bereits im Vorfeld wurden die Böcke auf ihren invasiven Tumorgehalt überprüft und Böcke mit einem Tumorzellgehalt < 20 % von den weiteren Untersuchungen exkludiert. Um Kontaminationen des Arbeitsbereiches mit RNase und damit einhergehende potentielle Qualitätseinschränkungen zu verhindern, erfolgte vor Beginn die Dekontamination des Arbeitsbereiches mit einer RNase-Dekontaminationslösung. Die so angefertigten 10 µm dicken FFPE-Schnitte wurden anschließend jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zunächst wurden diese noch einmal für wenige Sekunden (3-5 sec) zentrifugiert, damit die Schnitte sich am Boden der Gefäße absetzen. Die RNA-Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 150 µl Lysepuffer. Die Proben

wurden anschließend für 30 min bei 80 Grad Celsius und 1200 rpm und anschließend für weitere 10 Minuten bei 65 Grad Celsius, dann ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut für 3-5 Sekunden zentrifugiert. Nachdem das Paraffin geschmolzen war erfolgte durch die Zugabe von 50 µl Proteinase K die weitere Lyse des Gewebes mit Freisetzung der Nukleinsäuren. Die Proben wurden anschließend für weitere 30 Minuten bei 65 Grad Celsius und 1200 rpm inkubiert und wie in den vorangegangenen Schritten abschließend für erneut 3-5 Sekunden zentrifugiert um Probenmaterial am Reaktionsgefäßboden zu sammeln. Abschließend erfolgte die Zugabe von 800 µl Bindepuffer zum Reaktionsgemisch. In die Probe, mit dem für die RNA-Anreicherung optimierten Bindepuffer, wurden jeweils 40 µl magnetischer Partikel (RNXtract® Beads), die mit Germanium angereichert waren zur effizienten Bindung der RNA hinzugefügt. Um sicherzustellen, dass die Beads richtig gelöst und durchmischt sind wurden sie vor jeder Zugabe auf einem Vortex auf höchster Stufe für jeweils 30-60 Sekunden gemischt. Anschließend wurden die Proben erneut für 15 Minuten bei 20 Grad Celsius bei 1200 rpm inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 3-5 Sekunden, nach der sich die Bestandteile am Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzt hatten, wurden die einzelnen Probengefäße auf eine magnetische Vorrichtung (Rack) gestellt, an dem die magnetischen Beads mit der eluierten und gebundenen RNA haften. Der flüssige Überstand wurde jeweils mit einer Pipette abpipettiert und verworfen. Nach Zugabe von zunächst 850 µl Waschpuffer wurde der Magnetisierungsprozess nach erneuter Durchmischung und Zentrifugation wiederholt und anschließend noch einmal mit einem zweiten Waschpuffer mit einem Volumen von 450 µl und anschließend mit einem dritten Puffer mit 850 µl aufgereinigt. Nach diesen drei Schritten zur effizienten Entfernung von Proteinen und PCR-inhibierenden Substanzen wurde zur Lösung der RNA von den magnetischen Beads 100 µl Elutionspuffer in die bestehenden gewaschenen Proben gegeben und im Schüttler für 15 min bei 70 Grad Celsius bei 1200 rpm inkubiert und anschließend für weitere 3-5 Sekunden zentrifugiert. Durch das erneute Einstellen der Reaktionsgefäße auf die magnetische Unterlage wurden die nun durch das Elutionspuffer von der aufgereinigten RNA gelösten magnetischen Beads am Boden gesammelt. Das Eluat in Form von aufgereinigter RNA wurde mittels Pipette abgenommen und in ein separates Gefäß überführt. Anschließend kann die eluierte RNA direkt für die RT-qPCR mittels MammaTyper® verwendet werden.

3.4.2 MammaTyper®

Quantitativer Nachweis des mRNA-Expressionsstatus der Gene ESR1, PGR, ERBB2 und MKI67 mittels MammaTyper®. (BioNTech Diagnostics GmbH) gemäß Gebrauchsinformation Ref 160301-90040-DE Rev 3.1:

3.4.2.1 Vorbereitung des RT-qPCR Laufes

Im ersten Arbeitsschritt erfolgte, wie vor Anwendung des RNXtract®-Kits zunächst erneut die Dekontamination des Arbeitsbereiches mittels RNase-Dekontaminationslösung um Kontaminationen beispielsweise der RNA-Eluate zu vermeiden. Anschließend wurden die Reagenzien des MammaTyper®-Kits auf Eis aufgetaut und jedes Reagens kurz in der Hand gewendet bis sich die Inhalte homogenisiert hatten. Anschließend wurde jedes Reagens kurz zentrifugiert.

Folgende Assays inklusive qPCR-Sonden, sowie Positiv- und Negativkontrolle sind bereits im MammaTyper®-Kit enthalten:

1. Enzym-Mix: Enzym-Mix für RT-qPCR, 260 µl, gebrauchsfertig, gepufferte Lösung, enthält Reverse Transkriptase, DNA-Polymerase, dNTPS
2. Assay-Mix 1: Assay-Mix zur Messung von *ERBB2* und *ESR1*, 90 µl, gebrauchsfertig, enthält DNA Oligonukleotide und qPCR-Sonden
3. Assay-Mix 2: Assay-Mix zur Messung von *MKI67* und *B2M*, 90 µl, gebrauchsfertig, enthält DNA Oligonukleotide und qPCR-Sonden
4. Assay-Mix 3: Assay-Mix zur Messung von *PGR* und *CALM2*, 90 µl, gebrauchsfertig, enthält DNA Oligonukleotide und qPCR-Sonden
5. Positivkontrolle: 60 µl, gebrauchsfertig, gepufferte Lösung, enthält spezifische Kontroll-RNA
6. RNase-freies Wasser: 350 µl, gebrauchsfertig

Alle Arbeiten erfolgten vor starker Lichteinstrahlung geschützt, da es besonders bei den in der RT-qPCR verwendeten fluoreszenzmarkierten Sonden hierdurch zu einer Aktivitätseinschränkung kommen kann.

In einem Analyselauf wurde mindestens eine Patientenprobe gemeinsam mit einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle, in diesem Fall RNase-freies Wasser, bestimmt. Wie oben bereits beschrieben wurde die RNA der verwendeten Tumorproben zuvor mittels RNXtract® eluiert.

3.4.2.2 Ansetzten des Mastermixes für PCR

Vor Durchführung des RT-qPCR-Laufes muss ein Mastermix pro Assay-Mix hergestellt werden. Hierzu wurde gemäß Gebrauchsinformation jeweils ein 1,5 ml - Gefäß verwendet.

Die erforderliche Menge der Reagenzien für die Erstellung des Mastermixes wurde nach folgender Formel berechnet:

$$7,5 \mu\text{l} \times \text{Anzahl der Proben} \times 1,15 \text{ (15 \% Pipettiermarge)}$$

Pro Analyselauf können 1-8 Patientenproben bestimmt werden. 2 Proben dienen jeweils der Positiv- und Negativkontrolle, die in jedem Lauf zur Überprüfung der Validität mitbestimmt werden. Somit ist das Minimum der Proben pro RT-qPCR-Lauf 3 bis maximal 10 Proben. Nach dieser Anzahl wird das anzusetzende Volumen des Mastermixes bestimmt.

3.4.2.3 Ansetzen der PCR Reaktionen

Analyse von drei Proben:

Nach Herstellung der Assay-spezifischen Mastermixe wurde zum Ansetzen der PCR hiervon 7,5 µl mit einer elektronischen Dispenserpipette in eine Kavitäten der hier verwendeten gerätespezifischen 96 Wells PCR-Platte (LightCycler® 480 Multiwell plate 96 white with sealing foil, Artikel-Nº: 04729692001, Roche®) gegeben. Zur dauerhaften Kühlung auf 0 Grad Celsius während des Ansetzens der PCR-Reaktionen wurde ein PCR-Kühlrack verwendet. Anschließend wurde entweder 2,5 µl RNA-Eluat der zu untersuchenden Tumorprobe, 2,5 µl der Positivkontrolle oder 2,5 µl Negativkontrolle (Wasser) mit einer separaten elektronischen Dispenserpipette in die entsprechende Kavität pipettiert. Vor Start des RT-qPCR-Laufs wurde die Wells Platte für 10 Sekunden auf höchster Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die RT-qPCR erfolgte mittels LightCycler® 480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA)

3.4.2.4 Validität des Laufes

Vor jeder Analyse wird die Validität von Lauf und Probe verifiziert.

Zur Überprüfung der Validität des einzelnen Laufes dienen die sechs medianen Cq-Werte der Positiv- und Negativkontrolle. Hierbei müssen die medianen Cq-Werte der Positiv- und Negativkontrolle im jeweils vorgegebenen gerätespezifischen Bereich liegen. Die gerätespezifischen Referenzbereiche sind hierbei vorgegeben.

			Negativ- kontrolle	Positiv- Kontrolle
Assay Mix	Channel	Assay	Median Cq	Median Cq
1	FAM	<i>ERBB2</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>ESR1</i>	40,00	19,75-22,75
2	FAM	<i>MKI67</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>B2M</i>	40,00	19,75-22,75
3	FAM	<i>PGR</i>	40,00	19,75-22,75
	HEX	<i>CALM2</i>	40,00	18,25-21,25

Abbildung 3 Validitätskriterien LightCycler® 480 Instrument II (Roche), Gebrauchsinformation MammaTyper®-Kit, Ref 160301-90020-DE Rev 3.1

Zur Überprüfung ob ausreichend RNA zur Quantifizierung vorliegt, und somit die Probe valide ist, wird über die medianen Cq-Werte der beiden Referenzgene *B2M* und *CALM2* korrigiert mit der kombinierten Referenz der Positivkontrolle bestimmt.

Validität der Probe:

- Median Cq [B2MProbe] - [CombRefPC] > 8,1 ODER
Median Cq [CALM2Probe] - [CombRefPC] > 15,1 bedeutet Probe ist invalide
- Median Cq [B2MProbe] - [CombRefPC] ≤ 8,1 UND
Median Cq [CALM2Probe] - [CombRefPC] ≤ 15,1 bedeutet Probe ist valide

3.4.2.5 Berechnung der quantitativen Einzelmarkerergebnisse

Für jede Probe wird die kombinierte Referenz (CombRef) durch Berechnung des Mittelwertes der medianen Cq-Werte der Referenzgene *B2M* und *CALM2* angegeben. Diese wird sowohl für die jeweilige Probe (CombRefProbe) als auch für die Positivkontrolle (CombRefPC) berechnet.

$$[\text{CombRef}] = (\text{Median Cq}[\text{B2M}] + \text{Median Cq}[\text{CALM2}]) / 2$$

Mit Hilfe der kombinierten Referenz werden anschließend die ΔCq bzw. $40 - \Delta\Delta\text{Cq}$ -Werte für die vier Biomarker berechnet.

$$40 - \Delta\Delta\text{Cq} = 40 - (\Delta\text{CqProbe} - \Delta\text{CqPositivkontrolle})$$

$$\text{ERBB2: } 40 - \Delta\Delta\text{Cq}[\text{ERBB2}] = 40 - ((\text{Median Cq}[\text{ERBB2 Probe}] - [\text{CombRef Probe}]) - (\text{Median Cq}[\text{ERBB2 PK}] - [\text{CombRef PK}]))$$

$$\text{ESR1: } 40 - \Delta\Delta\text{Cq}[\text{ESR1}] = 40 - ((\text{Median Cq}[\text{ESR1 Probe}] - [\text{CombRef Probe}]) - (\text{Median Cq}[\text{ESR1 PK}] - [\text{CombRef PK}]))$$

PGR: $40 - \Delta\Delta Cq [PGR] = 40 - ((\text{Median } Cq [PGR \text{ Probe}] - [\text{CombRef Probe}]) - (\text{Median } Cq [PGR \text{ PK}] - [\text{CombRef PK}]))$

MKI67: $40 - \Delta\Delta Cq [MKI67] = 40 - ((\text{Median } Cq [MKI67 \text{ Probe}] - [\text{CombRef Probe}]) - (\text{Median } Cq [MKI67 \text{ PK}] - [\text{CombRef PK}]))$

Neben der Angabe als kontinuierliche Variable ist anhand validierter Cut-offs für jeden Biomarker auch eine binäre Einteilung in positiv und negativ möglich. Die Cut-offs sind gerätespezifisch.(3)

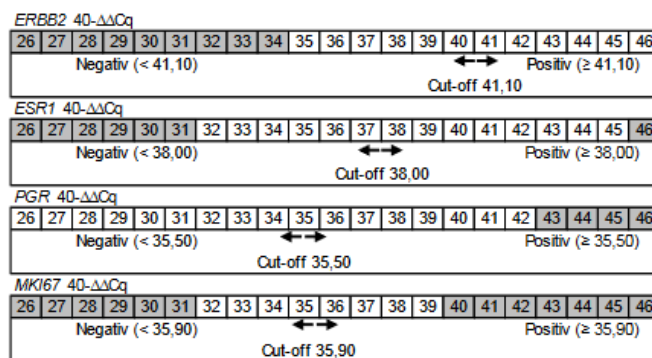


Abbildung 4 Gerätespezifischer Schwellenwert zur Dichotomisierung der MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse für den LightCycler® 480 Instrument II (Roche), Gebrauchsinformation MammaTyper®-Kit Ref 160301-90020-DE Rev 3.1

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs

Das Gesamtkollektiv umfasste 216 FFPE-Blöcke von Operationspräparaten hormonrezeptorpositiver, HER2-negativer Brustkrebspatientinnen, für die ein valides MammaTyper®-Ergebnis erzielt werden konnte und die alle Einschlusskriterien anhand des Studienprotokolls erfüllten. Eingeschlossen wurden Proben der Jahre 1990-2006. Unter Einschluss aller T- und N-Stadien kam es bei 13,4 % (N=29) der Patientinnen im Nachbeobachtungszeitraum zu einer Fernmetastasierung beziehungsweise zum krankheitsspezifischen Versterben. Der mittlere Nachbeobachtungszeitraum lag bei 145,0 Monaten. Das DDFS lag im Median bei 50,0 Monaten. Das DDFS war definiert als zeitliches Intervall zwischen Operation und Fernmetastasierung oder krankheitsspezifischem Versterben.

Auftreten einer Fernmetastasierung/Tod	Ja		Nein		Gesamt	
	N	%	N	%	N	%
DDFS (event occurrence)	29	13,4	187	86,6	216	100
OS (event occurrence)	146	67,6	70	32,4	216	100

Tabelle 6 Auftreten einer Fernmetastasierung/ Tod

Die mediane Zeit bis zum krankheitsspezifischen Versterben oder Auftreten einer Fernmetastasierung lag bei 50,0 Monaten. Der Mittelwert lag bei 55,3 Monaten.

Auftreten einer Fernmetastasierung /Tod		Zeit in Monaten					
		N	Mittelwert	SD	Min	Median	Max
DDFS (event occurrence)	Ja	29	55.3	46.9	0	50.0	152
	Nein	187	150.4	79.0	0	149.0	333
OS (event occurrence)	Ja	146	142.6	79.8	2	134.0	333
	Nein	70	150,1	75,5	0	159.5	294

Tabelle 7 Mediane Zeit und Mittelwert bis zum Auftreten einer Fernmetastasierung oder Tod

Innerhalb der ersten 5 Jahre kam es in der untersuchten Gruppe bei 7,9% (N=17) zum Auftreten einer Fernmetastasierung oder zum krankheitsspezifischen Versterben.

Auftreten einer Fernmetastasierung/ Tod innerhalb der ersten 5-Jahre	Nein		Ja		Gesamt
	N	%	N	%	N
DDFS (event occurrence)	199	92.1	17	7.9	216
OS (event occurrence)	191	88.4	25	11,6	216

Tabelle 8 Auftreten einer Fernmetastasierung/ Tod innerhalb der ersten 5 Jahre

4.1.1 Klinisch-pathologische Variablen des Gesamtkollektivs

In der untersuchten Kohorte waren mit über 98% fast alle Frauen älter als 50 Jahre. Mit 47,2% fast die Hälfte der Patientinnen (N=102) Nodalstatus-negativ, während am zweithäufigsten mit 28,7% 1-3 Lymphknoten befallen waren und pN3 mit 8,3% am seltensten vertreten war. In 4,6% war der Nodalstatus unbekannt.

Das am häufigsten vertretene Tumorstadium gemäß TNM-Klassifikation war pT1c mit N=98 Fällen, was 45,4% entsprach, wohingegen pT1a mit N=5 Fällen (2,3%), kurz nach pT4d mit 2,8% (N=6) am seltensten vertreten war.

Mit 63,9% (N=138) war Luminal B-like (HER2 negativ) der am häufigsten vertretene Subtyp, gefolgt von Luminal A-like mit 30,6% (N=66).

Nach Bestimmung mittels MammaTyper® waren mit 98,6% nahezu alle Fälle *ESR1* positiv. Auch der *PGR*-Status fiel mit 95,2% in den meisten der untersuchten Proben positiv aus. *ERBB2* zeigte sich hingegen in 95,8% negativ, während mit 63,9% in über der Hälfte des Kollektivs ein positiver *MKI67*-Status vorlag.

Patientencharakteristika	Anzahl (n=216)	Prozent 100%
Alter		
≤ 50	3	1,39
> 50	213	98,61
pT-Stadium		
pT 1a	5	2,31
pT 1b	15	6,94
pT 1c	98	45,37
pT 2	73	33,80
pT 3	9	4,17
pT 4a	1	0,46
pT 4b	9	4,17
pT 4d	6	2,78
pN-Stadium		
pN 0	102	47,22
pN 1	62	28,70
pN 2	24	11,11
pN 3	18	8,33
pN x	10	4,63
pM-Stadium		
pM 0	216	100
pM 1	0	0
Histologischer Differenzierungsgrad		
G1	38	17,59
G2	113	52,31
G3	31	14,35
n.a.	34	15,74
Tumorzellgehalt in %		
20-39	14	6,48
40-59	27	12,50
60-79	78	36,11
80-100	97	44,91
Subtypen		
Luminal A-like	66	30,56
Luminal B-like (HER2 negativ)	138	63,89
Luminal B-like (HER2 positiv)	9	4,17
Triple-negativ	3	1,39
ESR1-Status gemäß MammaTyper®		
Positiv	213	98,61%
Negativ	3	1,39%
PGR-Status gemäß MammaTyper®		
Positiv	184	85,19
Negativ	32	14,81
ERBB2-Status gemäß MammaTyper®		
Positiv	9	4,17%
Negativ	207	95,83%
MKI67-Status gemäß MammaTyper®		
Positiv	138	63,89
Negativ	78	36,11

Tabelle 9 Klinisch-pathologische Variablen des untersuchten Kollektivs

4.1.2 Verteilung der MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse

Die mittels MammaTyper® gemessenen quantitativen Einzelmarkerergebnisse für *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* sind nachfolgend als $40-\Delta\Delta Cq$ -Werte mittels Box Plots separat für jeden Marker dargestellt.

Die Ausgabe der Werte erfolgte außerdem anhand eines gerätespezifischen Grenzwertes dichotomisiert in positiv und negativ. Folgende Cut-offs wurden verwendet: *ESR1*: 38,00, *PGR*: 35,50, *ERBB2*: 41,10, *MKI67*: 35,90.

In den Box Plots dargestellt findet sich die Höhe der Markerexpression, angegeben als $40-\Delta\Delta Cq$ -Werte der 4 Einzelmarker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67*. Die Medianwerte der Markerexpression sind jeweils durch die horizontale Linie markiert, die die Plots teilt, die Minimal- und Maximal-Werte durch die jeweiligen Whiskers.

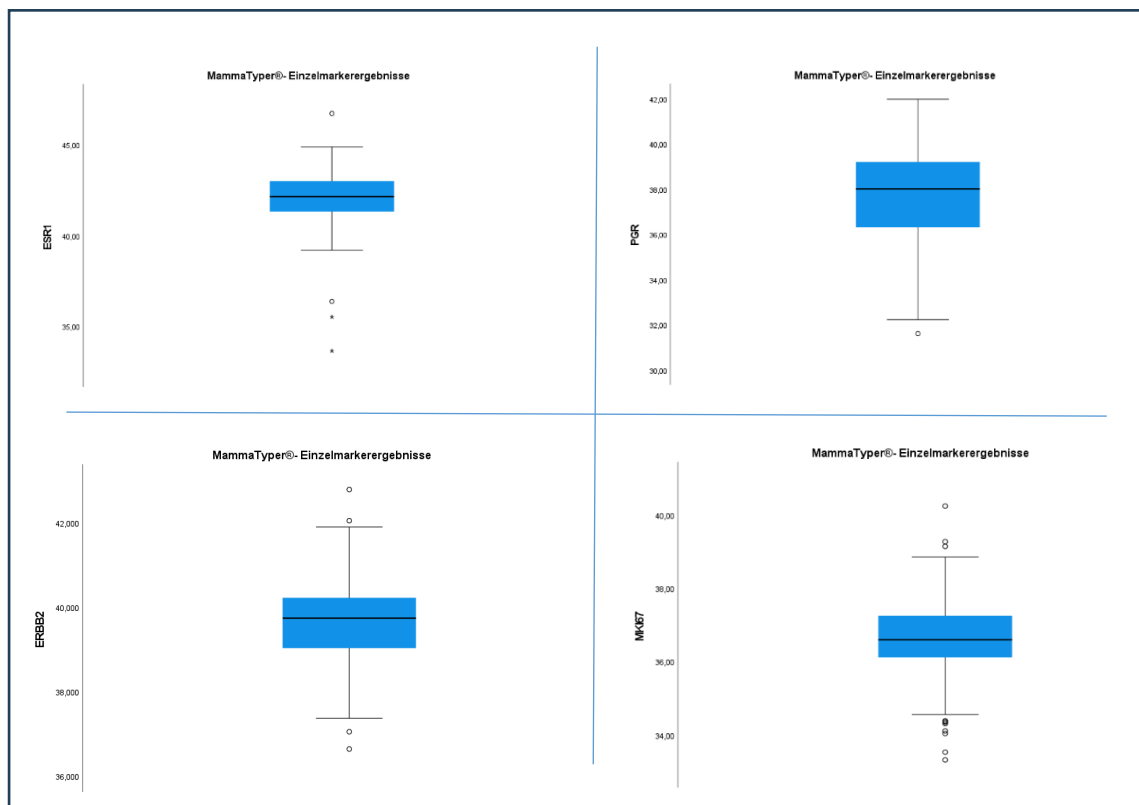


Abbildung 5 Verteilung der MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse

4.1.3 MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens

Anschließend erfolgte die Analyse der Verteilung der MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung beziehungsweise des krankheitsspezifischen Versterbens ebenfalls mittels Box-Plots. Auf der Y-Achse findet sich die Höhe der Markerexpression, angegeben als $40-\Delta\Delta Cq$ -Werte der 4 Einzelmarker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67*. Die Medianwerte der Markerexpression sind wie bereits in der vorangegangenen Darstellung jeweils durch die horizontale Linie markiert, die die Plots teilt, die Minimal- und Maximal-Werte durch die jeweiligen Whiskers.

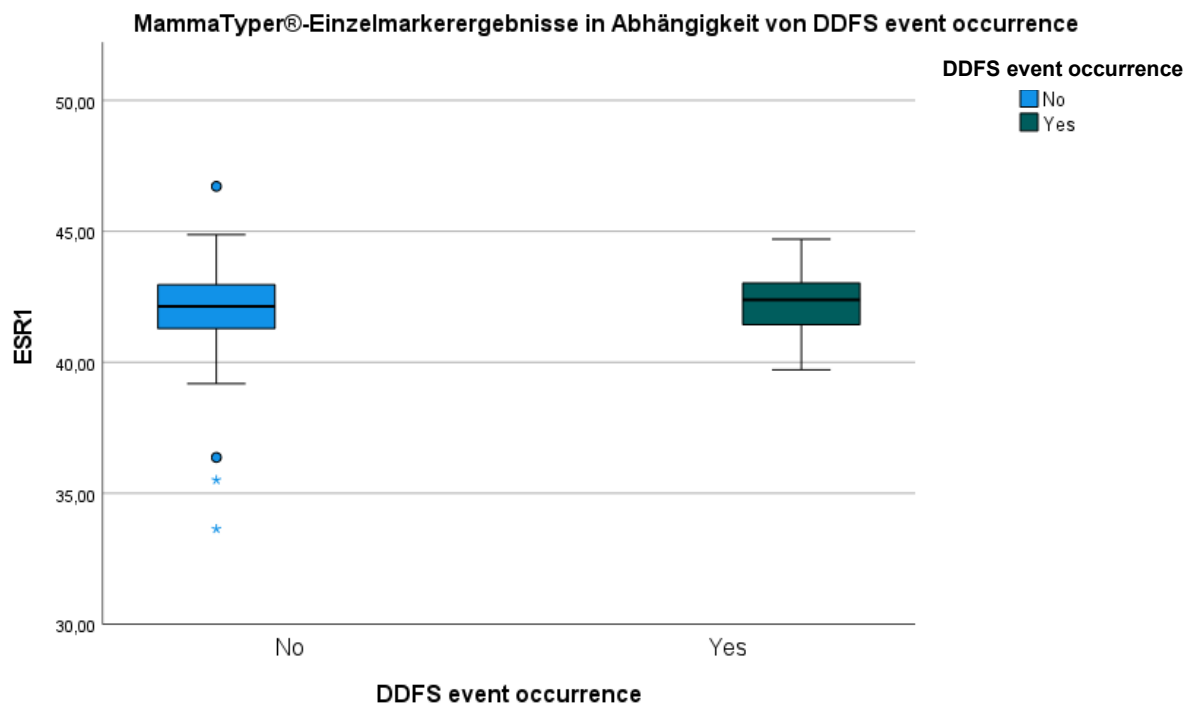


Abbildung 6 Verteilung der *ESR1*-Werte in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens

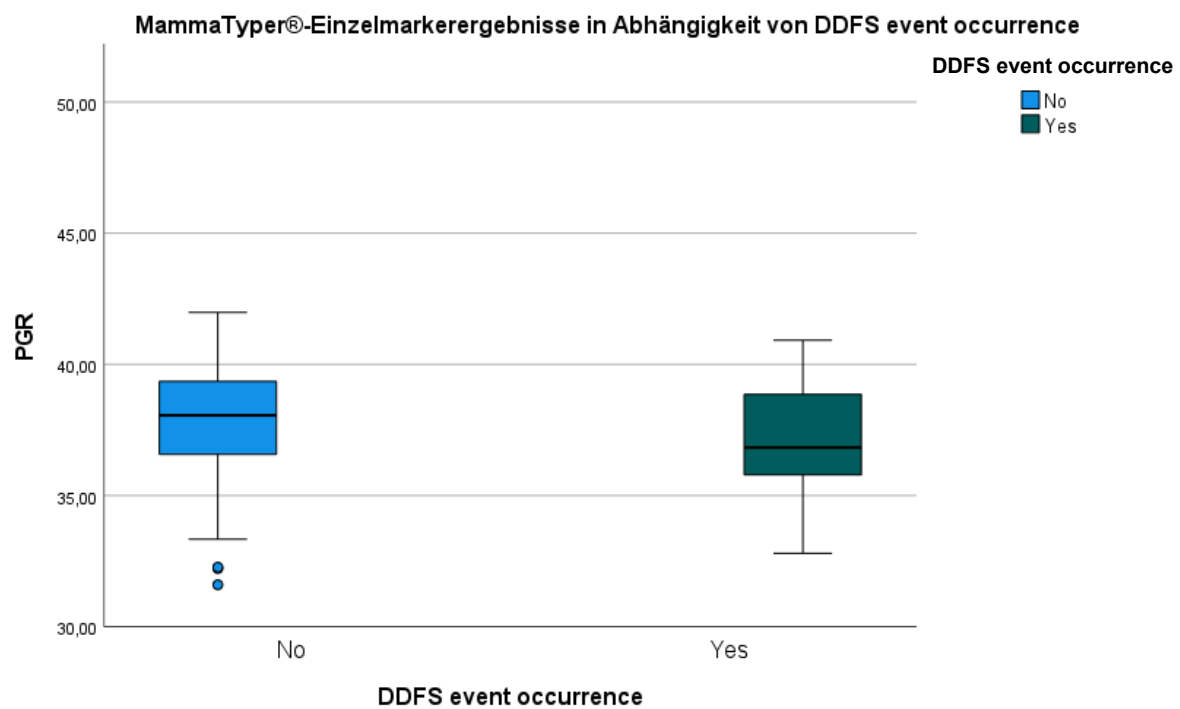


Abbildung 7 Verteilung der *PGR*-Werte in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens

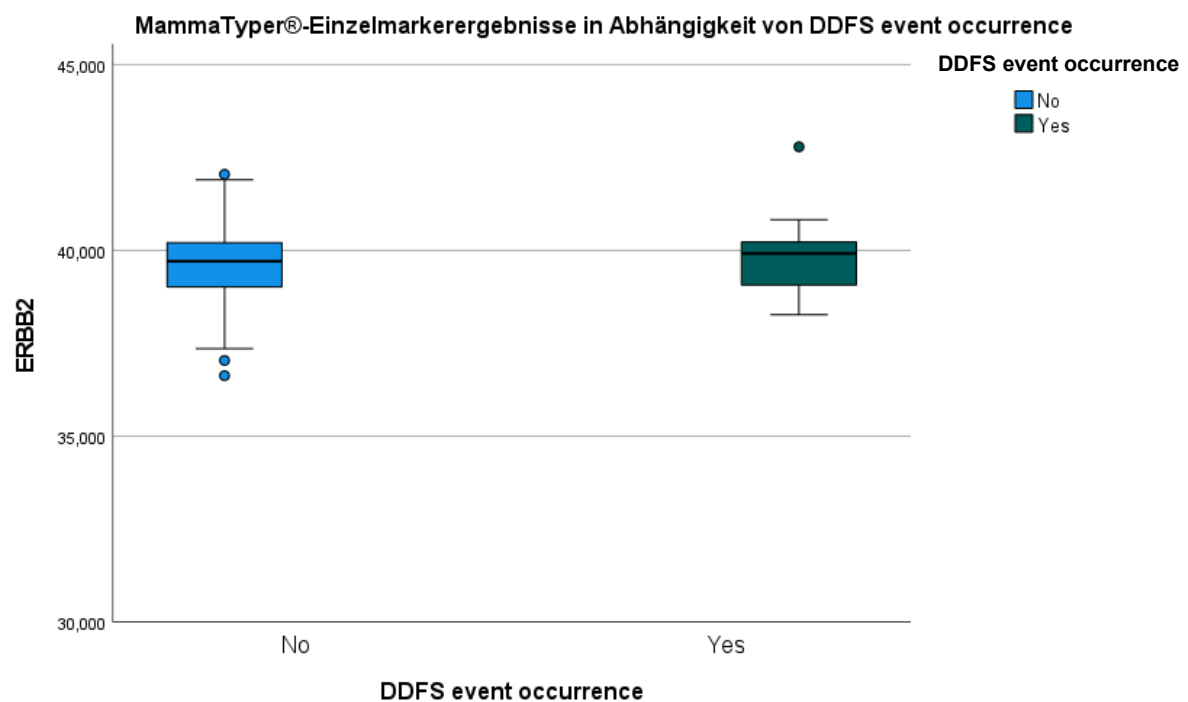


Abbildung 8 Verteilung der *ERBB2*-Werte in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens

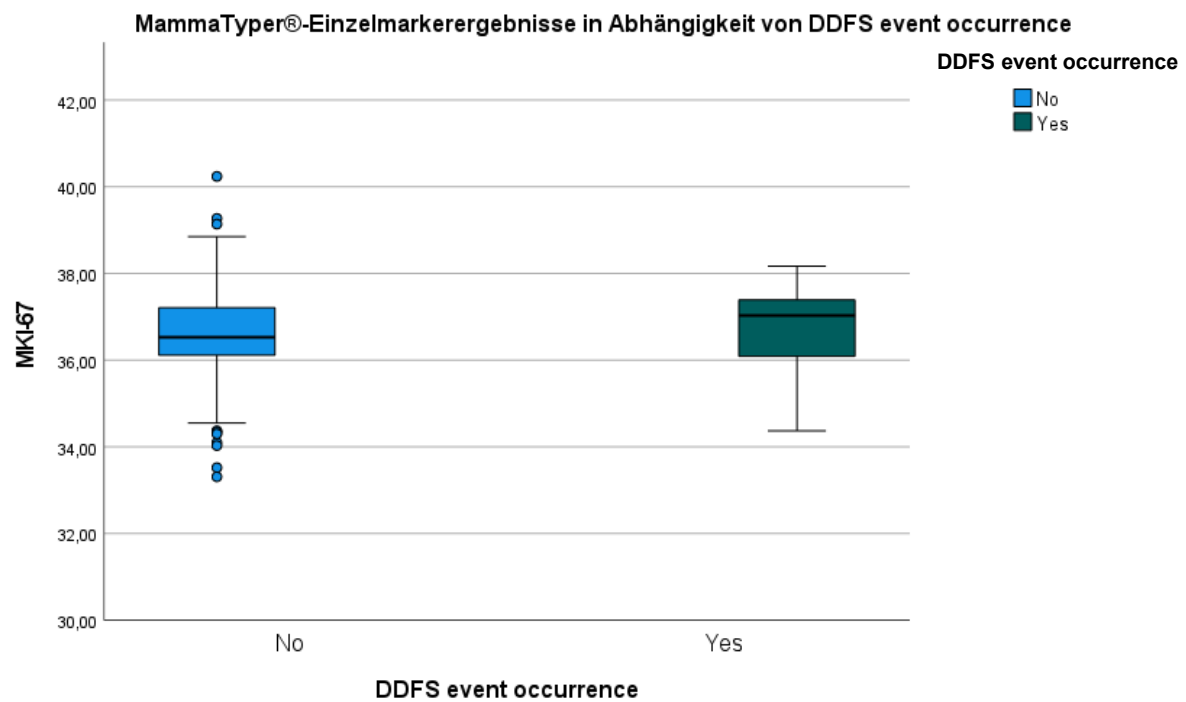


Abbildung 9 Verteilung der *MKI67*-Werte in Abhängigkeit des Auftretens einer Fernmetastasierung bzw. des krankheitsspezifischen Versterbens

4.2 Analyse der Überlebenszeiten mittels Kaplan-Meier Schätzung

Die Überlebenszeitanalyse erfolgte für DDFS und OS mittels Kaplan-Meier-Schätzung.

Als fernmetastasenfreies Überleben (distant disease-free survival, DDFS) wurde die Zeit zwischen Operation und Fernmetastasierung oder krankheitsspezifischem Versterben definiert. Das Gesamtüberleben (overall survival, OS) entspricht der Zeit zwischen Operation und Versterben (aufgrund jeglicher Ursache). Ein p-Wert von $< 0,05$ galt als signifikant.

4.2.1 *ESR1*-Status

Der *ESR1*-Status wurde in positiv und negativ dichotomisiert. Der gerätspezifische Cut-off der $40-\Delta\Delta Cq$ -Werte lag bei 38,00. Mit einem p-Wert von 0,638 für DDFS zeigte sich der mittels MammaTyper® bestimmte Östrogenrezeptorstatus hinsichtlich einer Fernmetastasierung oder krankheitsspezifischem Versterben nicht statistisch signifikant. Allerdings zeigte sich *ESR1* mit $p = < 0,001$ signifikant hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Somit ist ein positiver *ESR1*-Status in dieser Untersuchung nicht mit dem fernmetastasenfreien- aber mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert. Zu berücksichtigen bleibt hierbei, dass sich die Fallzahl hinsichtlich der Patientinnen mit positivem und negativem Östrogenrezeptorstatus deutlich unterschied. Nur in drei der mittels MammaTyper® bestimmten Proben zeigte sich der Östrogenrezeptorstatus negativ.

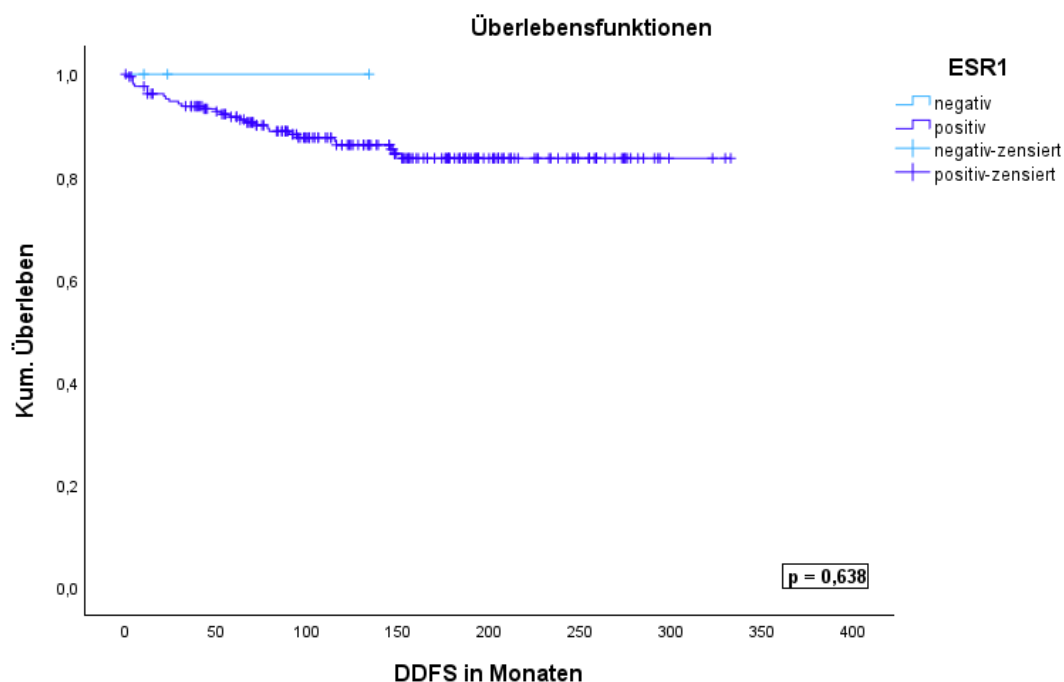


Abbildung 10 Einfluss des *ESR1*-Status auf das DDFS

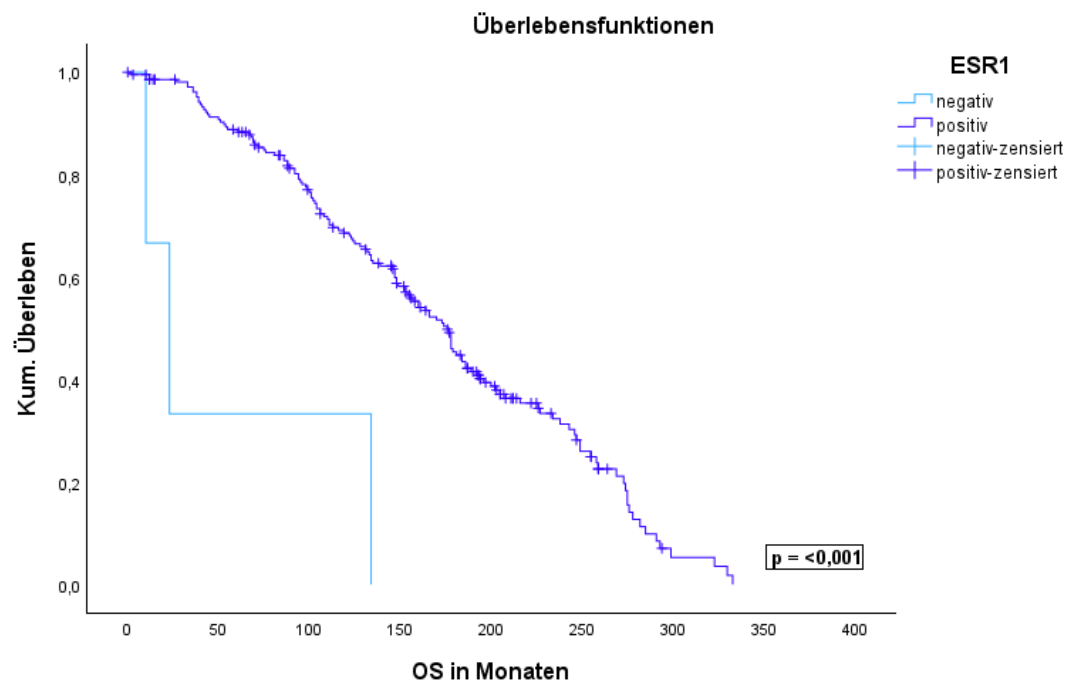


Abbildung 11 Einfluss des *ESR1*-Status auf das OS

4.2.2 *PGR*-Status

Der *PGR*-Status wurde anhand der $40\text{-}\Delta\Delta\text{Cq}$ -Werte ebenfalls in positiv und negativ dichotomisiert. Der Grenzwert hierfür lag bei 35,50. Mit einem p-Wert von 0,999 für DDFS und 0,959 für OS zeigte sich der *PGR*-Status weder signifikant hinsichtlich des fernmetastasenfreien- noch des Gesamtüberlebens.

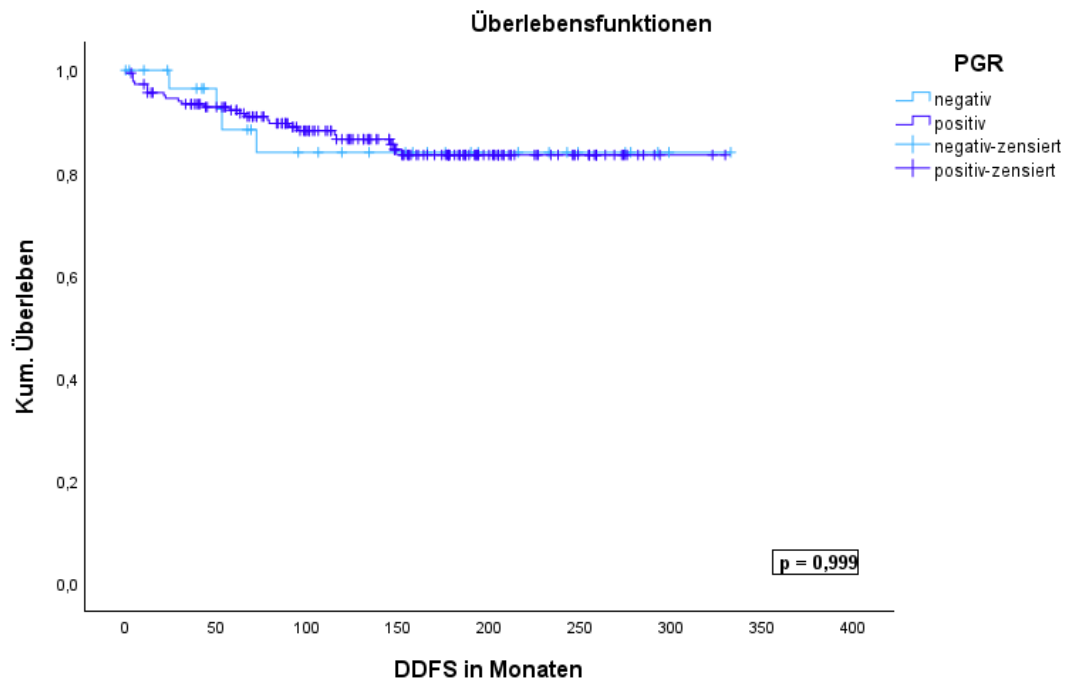


Abbildung 12 Einfluss des *PGR*-Status auf das DDFS

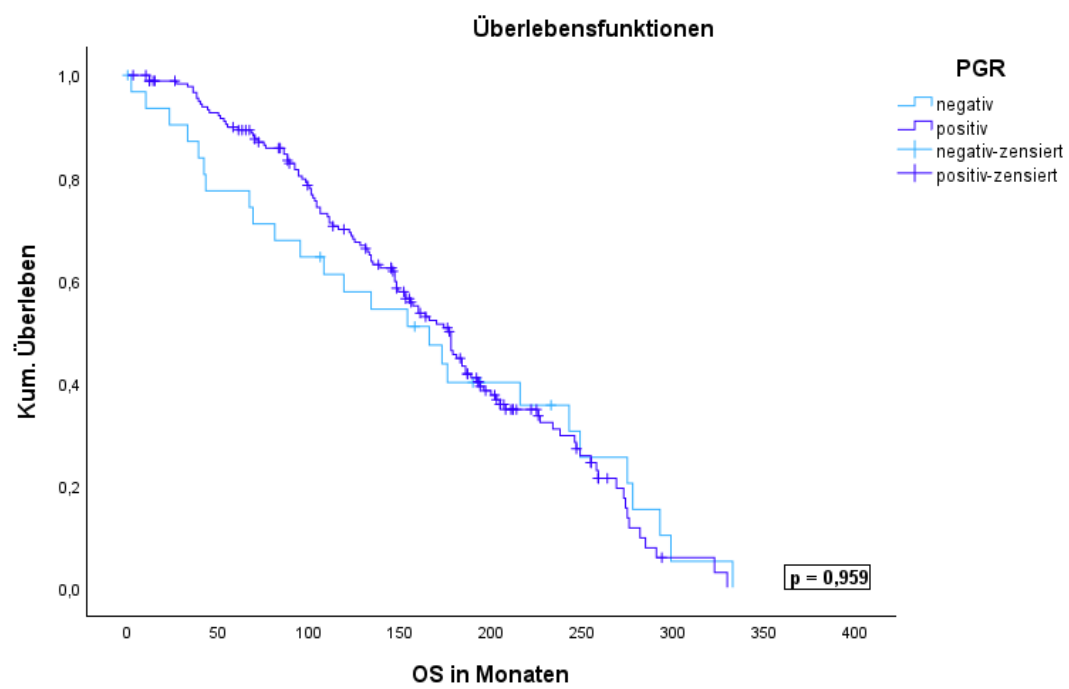


Abbildung 13 Einfluss des *PGR*-Status auf das OS

4.2.3 *ERBB2*-Status

Der Grenzwert zur Dichotomisierung des *ERBB2*-Status in positiv und negativ lag bei einem $40-\Delta\Delta Cq$ - Wert von 41,10. Mit $p = 0,832$ für das fernmetastasenfreie Überleben sowie $p = 0,797$ für das Gesamtüberleben zeigte sich der *ERBB2*-Status für beide Endpunkte nicht signifikant.

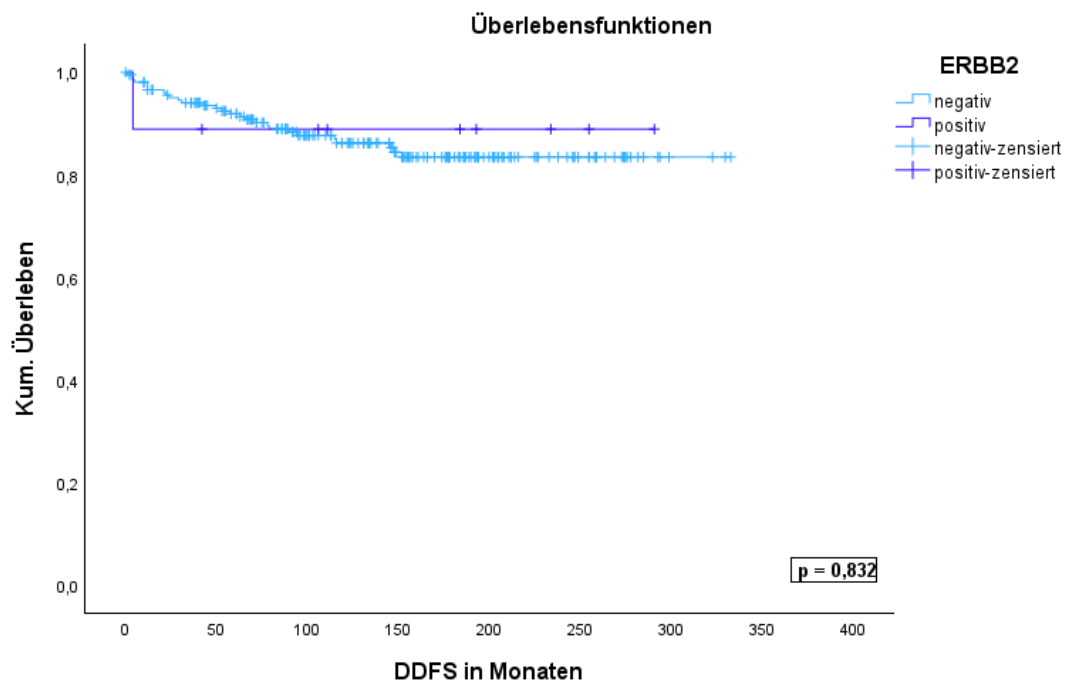


Abbildung 14 Einfluss des *ERBB2*-Status auf das DDFS

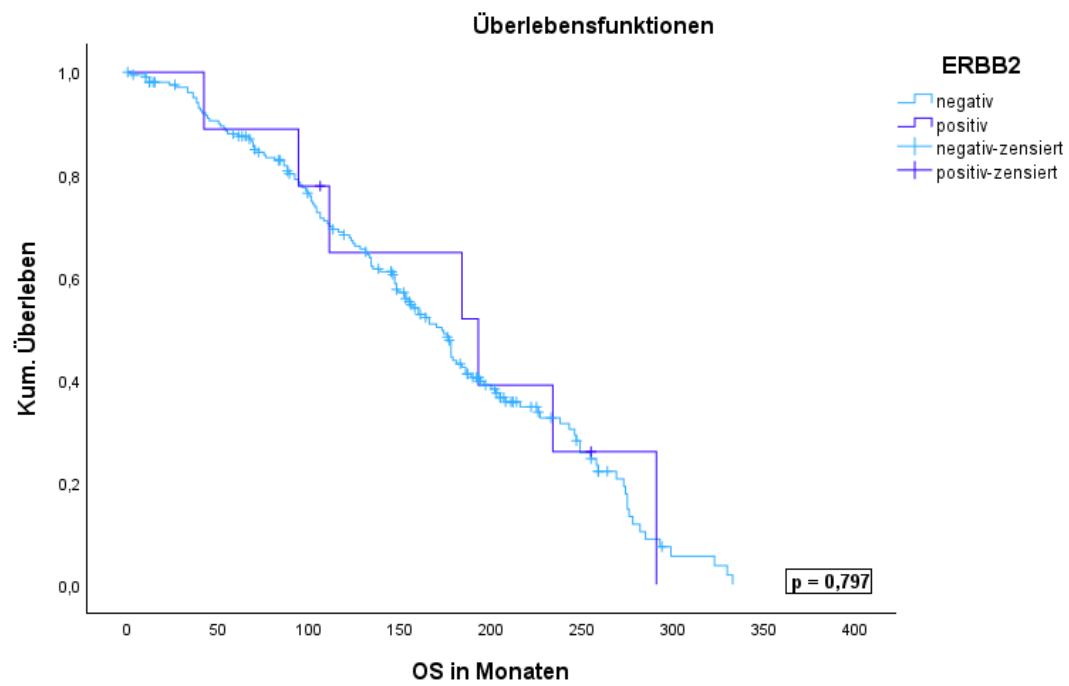


Abbildung 15 Einfluss des *ERBB2*-Status auf das OS

4.2.4 *MKI67*-Status

Mit einem p-Wert von 0,409 für DDFS und 0,053 für OS zeigte sich der *MKI67*-Status nur für das Gesamtüberleben mit einem deutlichen Trend zu Signifikanz. Die Dichotomisierung erfolgte anhand eines 40- $\Delta\Delta Cq$ - Wertes von 35,90.

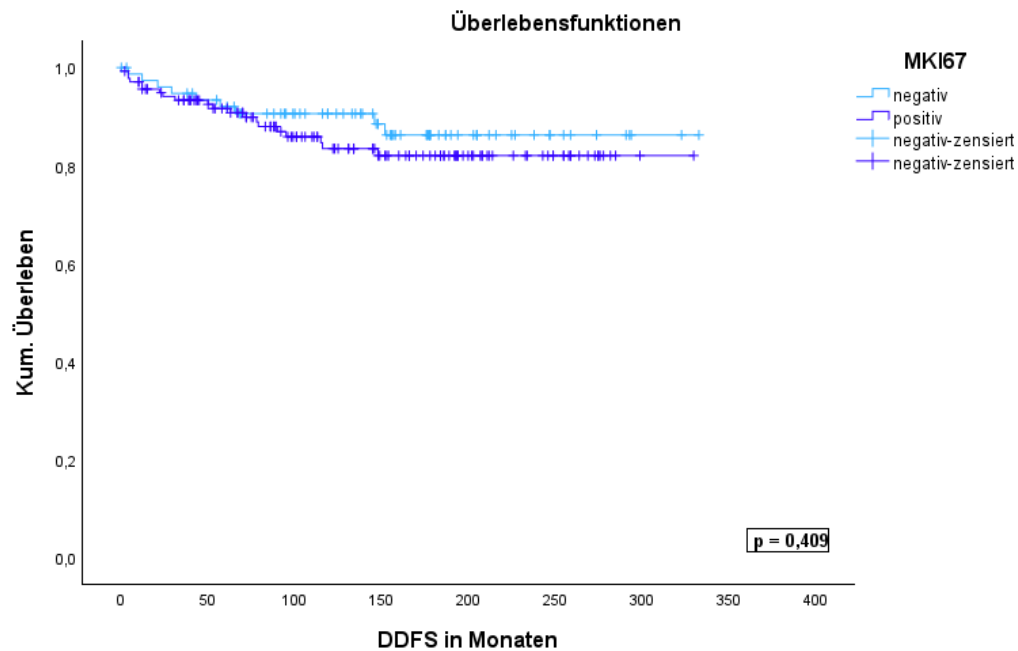


Abbildung 16 Einfluss des *MKI67*-Status auf das DDFS

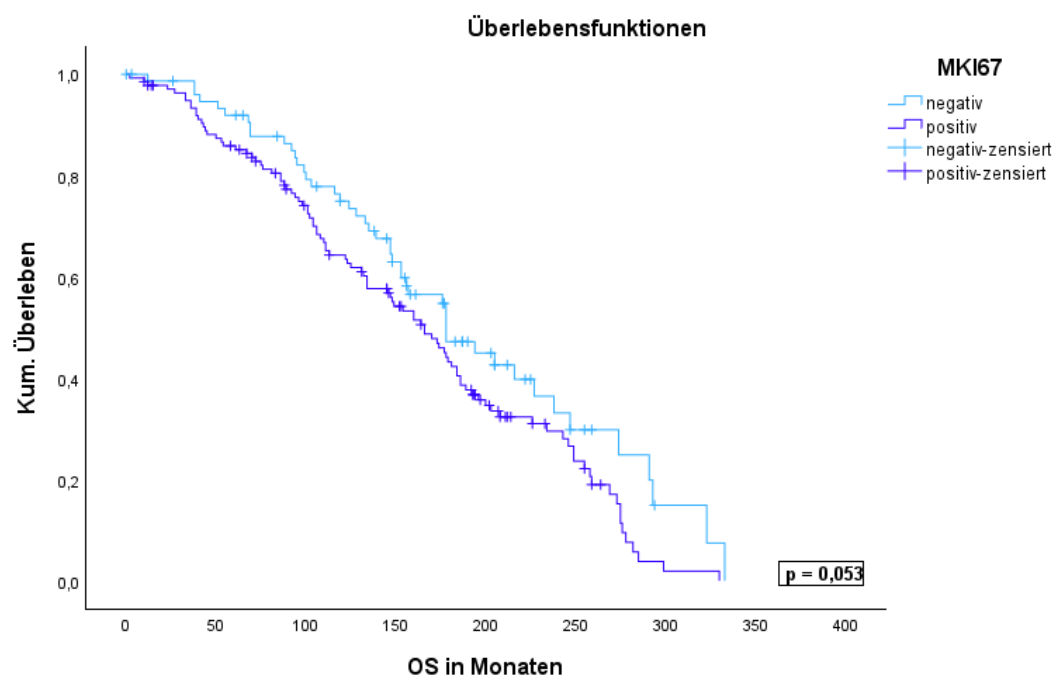


Abbildung 17 Einfluss des *MKI67*-Status auf das OS

4.2.5 pN-Stadium

Zur vereinfachten Darstellung erfolgte die Einteilung des Lymphknotenstatus ebenfalls in negativ und positiv. Als negativ wurde nur pN0 klassifiziert. Als positiv wurden alle weiteren vorkommenden pN-Stadien zusammengefasst. In diesem Fall pN1-3 und pNx. Mit p-Werten von $<0,001$ (DDFS) und $0,003$ (OS) zeigte sich der Nodalstatus sowohl für das DDFS als auch für das OS signifikant. Somit ist in dieser Untersuchung ein fehlender Lymphknotenbefall sowohl mit einem längeren fernmetastasenfreien- als auch Gesamtüberleben assoziiert.

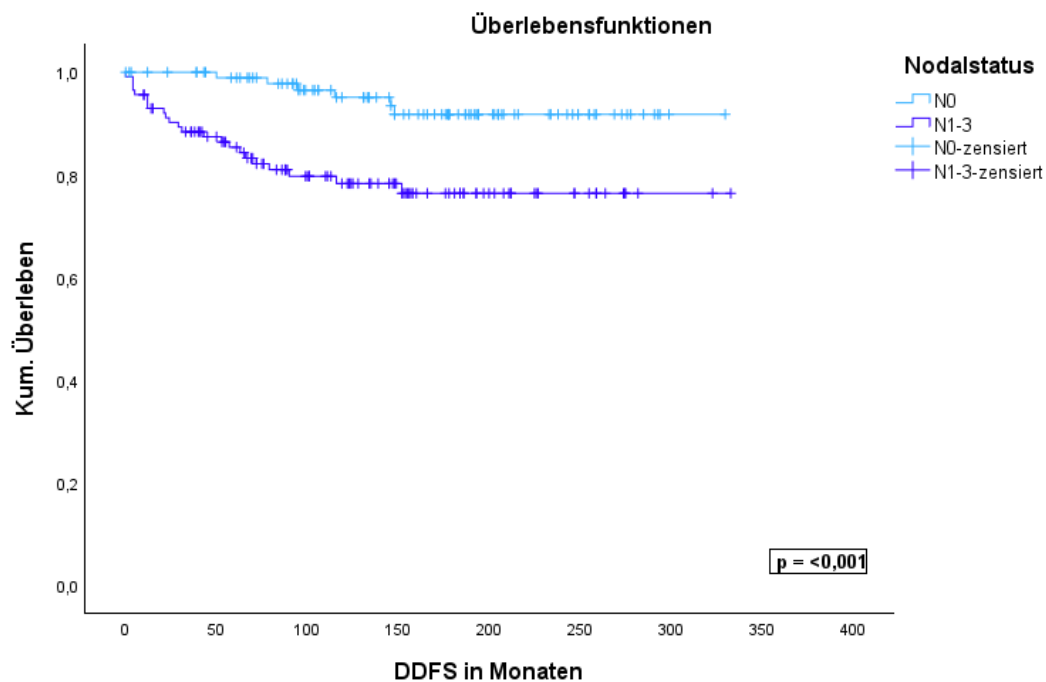


Abbildung 18 Einfluss des pN-Stadiums auf das DDFS

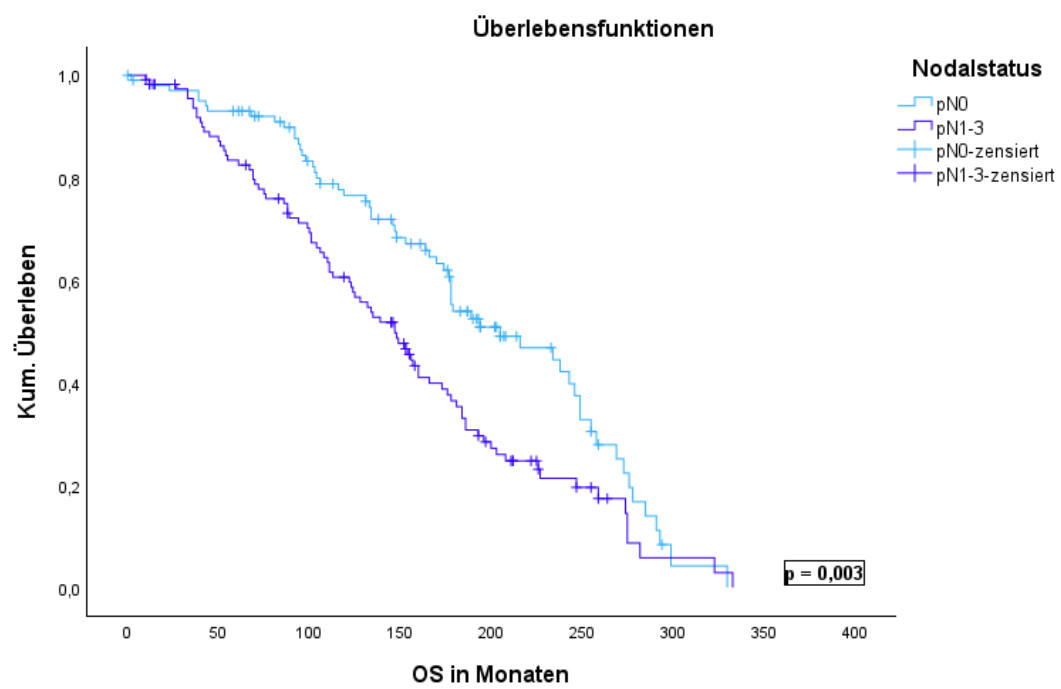


Abbildung 19 Einfluss des pN-Stadiums auf das OS

4.2.6 pT-Stadium

Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen frühen und eher fortgeschrittenen Mammakarzinomen wurde das pathologische Tumorstadium ebenfalls in 2 Gruppen dichotomisiert. In die erste Gruppe wurden nur Patientinnen mit Tumorstadium pT1 eingeschlossen. In die zweite Gruppe wurden die übrigen Stadien von pT2-4 zusammengefasst. Auch für das Tumorstadium konnte mit p-Werten von $< 0,001$ sowohl für das DDFS also auch das OS ein signifikanter Einfluss nachgewiesen werden. Somit geht ein höheres pathologisches Tumorstadium mit einem schlechteren fernmetastasenfreien- und Gesamtüberleben einher.

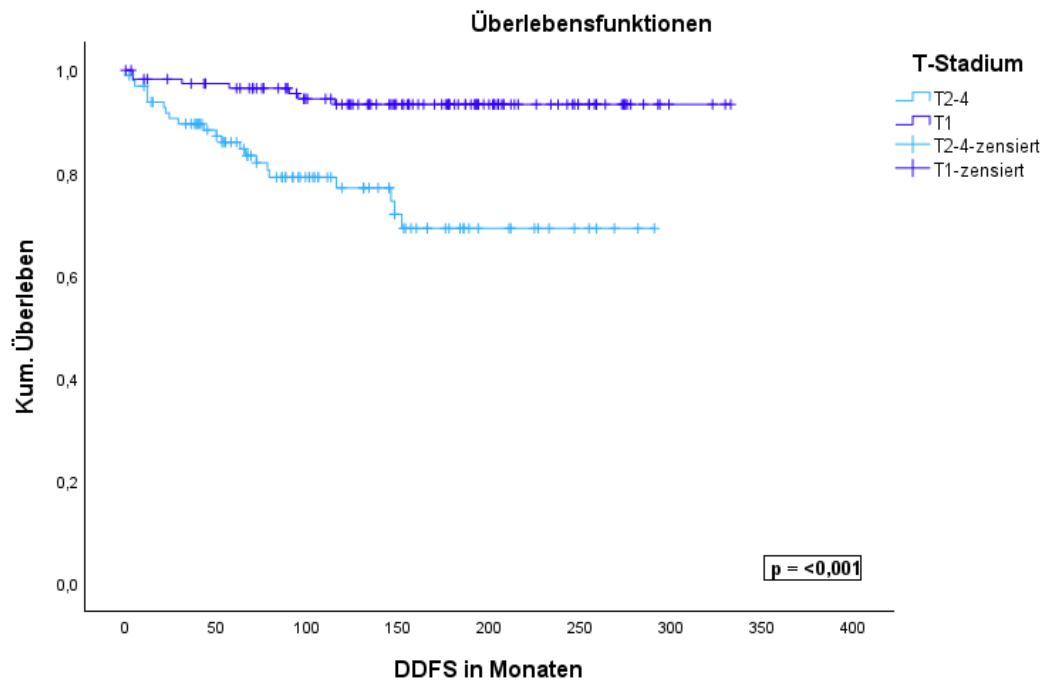


Abbildung 20 Einfluss des pT-Stadiums auf das DDFS

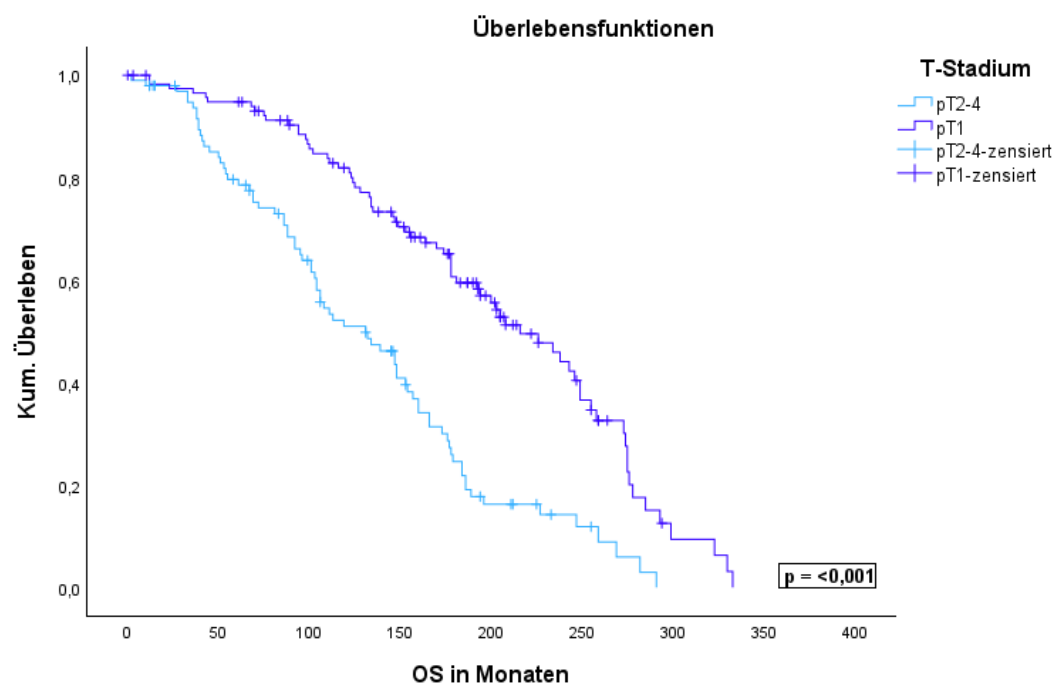


Abbildung 21 Einfluss des pT-Stadiums auf das OS

4.2.7 Alter

Das Alter wurde in zwei Gruppen eingeteilt. In die erste Gruppe wurden Patientinnen bis 50 Jahre eingeschlossen. Die zweite Gruppe beinhaltete alle anderen Patientinnen ab 51 Jahren, die den Großteil des Kollektivs ausmachte. Die Kaplan-Meier-Schätzungen zeigten mit p-Werten von 0,479 für DDFS und 0,497 für OS für beide Gruppen keine signifikanten Werte. Somit war das fernmetastasenfreie- und Gesamtüberleben in dieser Untersuchung nicht mit dem Patientenalter assoziiert. Allerdings ist, wie bereits oben aufgeführt, zu berücksichtigen, dass das hier untersuchte Kollektiv zum überwiegenden Teil Patientinnen im Alter von über 50 Jahren umfasste. Die Fallzahl der Patientinnen im Alter von unter 50 Jahren betrug lediglich drei Fälle, sodass diese Einschränkung in der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

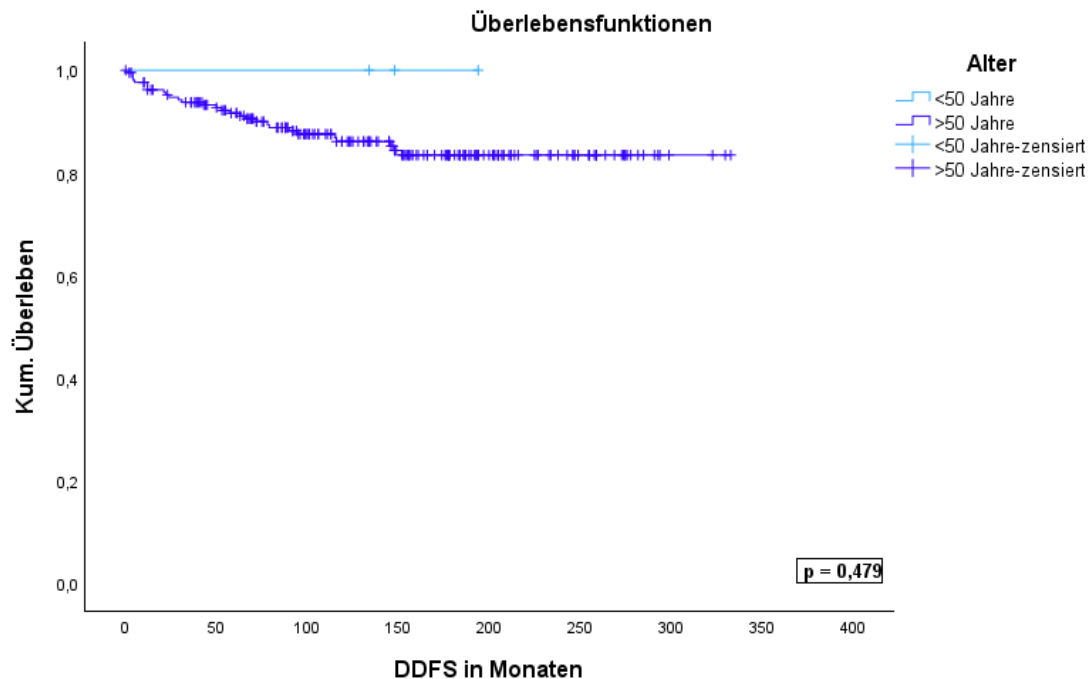


Abbildung 22 Einfluss des Alters auf das DDFS

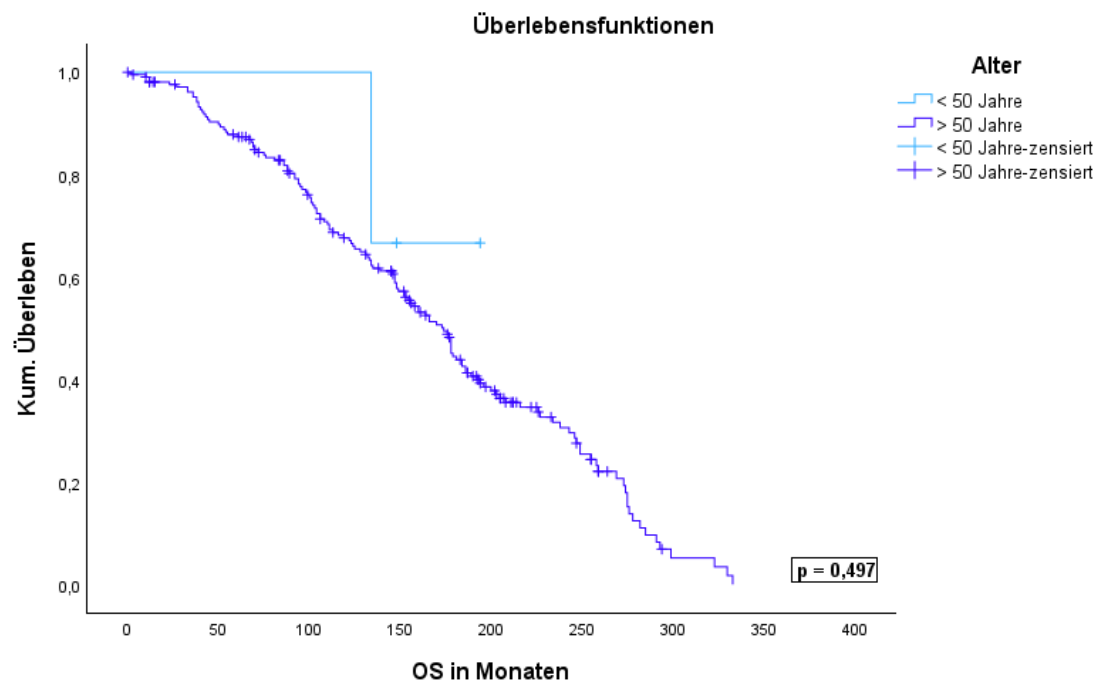


Abbildung 23 Einfluss des Alters auf das OS

4.2.8 Subtyp

Von besonderer Bedeutung in dieser Untersuchung war das Kollektiv der hormonrezeptorpositiven frühen Mammakarzinome und somit nach Einteilung nach St. Gallen insbesondere der molekulare Subtyp Luminal A-like. Aus diesem Grund wurden die Subtypen in zwei Kategorien eingeteilt. In die erste Gruppe wurden nur Proben eingeteilt, die dem ersten molekularen Subtyp zugeordnet werden konnten (Luminal A-like). In der zweiten Gruppe wurden die übrigen Subtypen Luminal B-like (HER2 positiv und negativ), HER2 positiv (nicht-luminal), sowie Triple negativ (ductal) zusammengefasst. Mit p-Werten von 0,871 für DDFS und 0,338 für OS zeigten die Kaplan-Meier-Schätzungen für beide Gruppen keine signifikanten Werte. Somit war das fernmetastasenfreie- und Gesamtüberleben in dieser Untersuchung nicht mit den mittels MammaTyper® bestimmten Subtypen assoziiert.

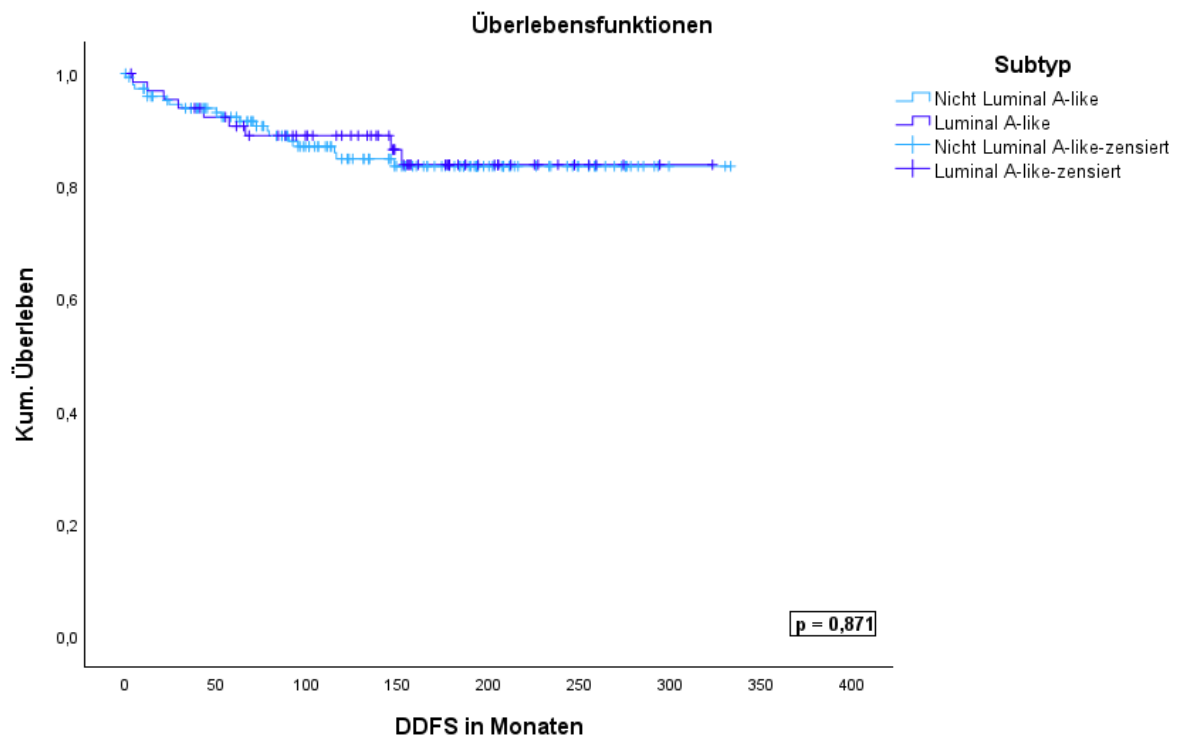


Abbildung 24 Einfluss der Subtypen auf das DDFS

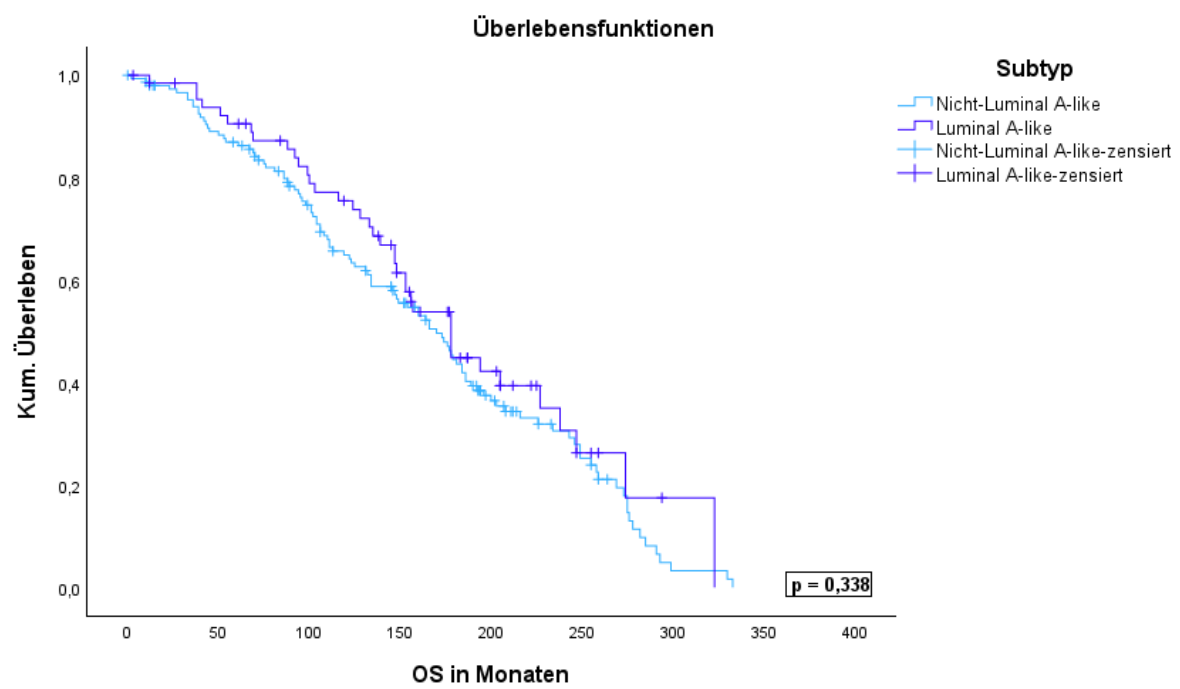


Abbildung 25 Einfluss der Subtypen auf das OS

4.2.9 Grading

Die Einteilung des Gratings nach Elston und Ellis erfolgt für invasive Mammakarzinome in 3 Grade abhängig vom histologischen Bild.(63) Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte hier ebenfalls eine Dichotomisierung, sodass die Gruppe der gut differenzierten Mammakarzinome (G1) getrennt von den mäßig bis gering differenzierten Karzinomen (G2-3) dargestellt wurde. Mit einem p-Wert von 0,033 zeigten sich die gut differenzierten Mammakarzinome mit einem verbesserten fernmetastasenfreien Überleben. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigte sich das Grading in dieser Untersuchung nicht signifikant. ($p = 0,159$)

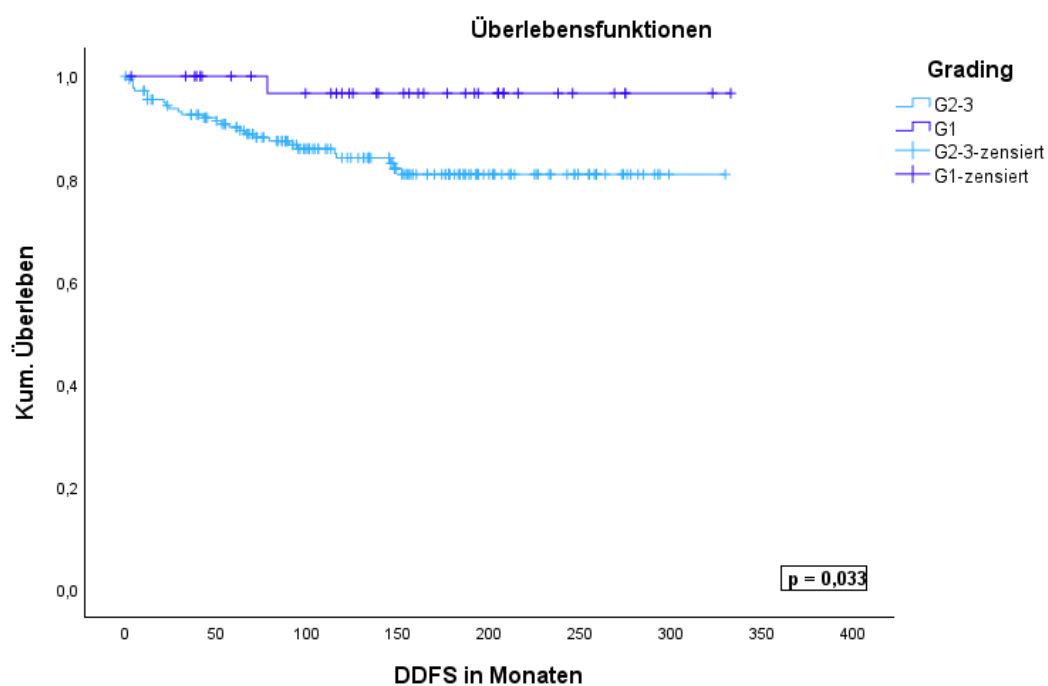


Abbildung 26 Einfluss des Grading auf das DDFS

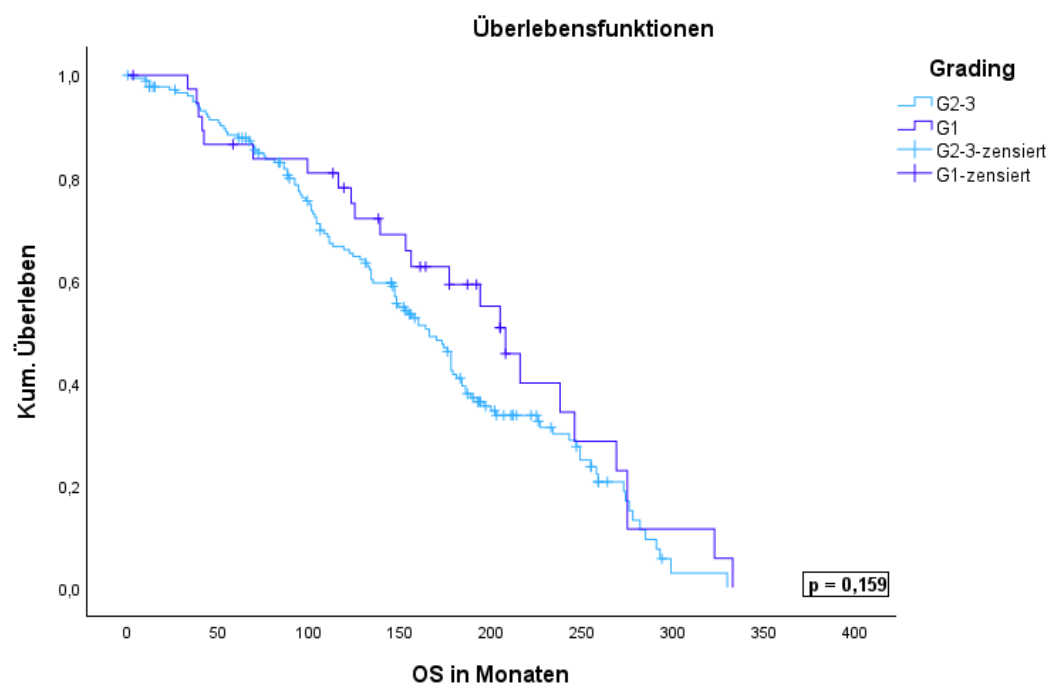


Abbildung 27 Einfluss des Grading auf das OS

4.3 Cox-Regressionsanalyse

4.3.1 Univariate Cox-Regressionsanalyse des fernmetastasenfreien Überlebens (DDFS)

Mittels univariater Cox-Regressionsanalyse sollte für die mittels MammaTyper® bestimmten Einzelmarker ESR1, PGR, ERBB2 und MKI67, als auch für die dadurch bestimmten Subtypen, sowie für die klassischen klinisch-pathologischen Parameter wie Tumorstadium, Nodalstatus, Alter und Grading der Einfluss auf das DDFS und OS untersucht werden.

Es wurde ein 95%-Konfidenzintervall verwendet. P-Werte <0,05 wurden als signifikant betrachtet.

Insgesamt wurden 216 Proben in die Untersuchungen eingeschlossen.

In der untersuchten Kohorte konnte mittels univariater Analyse weder für die untersuchten MammaTyper®-Marker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* oder *MKI67*, noch für die dadurch ermittelten Subtypen eine statistische Signifikanz und somit Einfluss auf das DDFS nachgewiesen werden. Unter den klassischen klinisch-pathologischen Parametern zeigten sich mit p-Werten von < 0,001 und 0,002 nur der Lymphknotenstatus und die Tumorgroße signifikant. Mit einem p-Wert von 0,065 zeigte das Grading einen Trend zur Signifikanz. Das Alter beeinflusste das DDFS in dieser Untersuchung hingegen nicht.

	<i>p</i>	<i>HR</i>	<i>95% KI</i>
ESR1	0,754	20,381	0 – 31,248
PGR	0,999	0,999	0,348 – 2,872
ERBB2	0,833	0,806	0,110 – 5,929
MKI67	0,411	1,391	0,633 – 3,057
T-Stadium	<0,001	0,204	0,087 – 0,479
Nodalstatus	0,002	4,075	1,657 – 10,020
Alter	0,638	20,627	0 – 61,586
Subtyp	0,871	0,937	0,426 – 2,059
Grading	0,065	0,153	0,021 – 1,125

Tabelle 10 Univariate Cox-Regressionsanalyse des DDFS

4.3.2 Univariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens (OS)

Anders als für das DDFS zeigte sich der Östrogenrezeptorstatus in Bezug auf das Gesamtüberleben mit einem p-Wert von 0,002 deutlich signifikant. Auch der mittels MammaTyper® bestimmte Marker *MKI67* zeigte mit $p = 0,055$ einen Trend zur Signifikanz. Auch für das Tumorstadium und den Nodalstatus konnten mit p-Werten von $<0,001$ und 0,003 ebenfalls statistisch relevante Einflüsse auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden.

	<i>p</i>	<i>HR</i>	<i>95% KI</i>
ESR1	0,002	0,162	0,051 – 0,515
PGR	0,959	1,012	0,651 – 1,572
ERBB2	0,798	0,905	0,423 – 1,939
MKI67	0,055	1,415	0,992 – 2,016
T-Stadium	<0,001	0,388	0,276 – 0,544
Nodalstatus	0,003	1,640	1,177 – 2,286
Alter	0,506	1,951	0,272 – 13,979
Subtyp	0,340	0,834	0,575 – 1,210
Grading	0,162	0,729	0,469 – 1,135

Tabelle 11 Univariate Cox-Regressionsanalyse des OS

4.3.3 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des fernmetastasenfreien Überlebens (DDFS)

In der multivariaten Regressionsanalyse wurde in einer ersten Untersuchung ebenfalls der Einfluss der MammaTyper®-Marker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67*, sowie der klinisch-pathologischen Parameter Tumorstadium und Nodalstatus, Alter und Grading auf das fernmetastasenfreie Überleben untersucht. Gesondert wurde im multivariaten Modell anschließend der Einfluss der Kombination der ermittelten Subtypen mit den genannten klinisch-pathologischen Variablen hinsichtlich des DDFS dargestellt.

Von den untersuchten Variablen zeigten in der multivariaten Analyse nur der Nodalstatus und das Tumorstadium eine statistisch signifikante Assoziation hinsichtlich des fernmetastasenfreien Überlebens. Für keinen der untersuchten Biomarker konnte in der multivariaten Analyse eine Signifikanz nachgewiesen werden. Bei einer sehr niedrigen Fallzahl hormonrezeptornegativer Proben und lediglich drei Patientinnen im Alter von unter fünfzig Jahren ergaben sich erwartungsgemäß sehr hohe Hazard Ratios für den Östrogenrezeptorstatus und das Alter. Auch die Subtypen zeigten sich im multivariaten Modell ohne signifikanten Einfluss auf das fernmetastasenfreie Überleben.

	<i>p</i>	<i>HR</i>	<i>95% KI</i>
ESR1	0,989	52994,746	0 – infinity
PGR	0,850	0,902	0,311 – 2,615
ERBB2	0,650	0,629	0,085 – 4,647
MKI67	0,664	1,192	0,539 – 2,636
T-Stadium	0,012	0,319	0,131 – 0,775
Nodalstatus	0,032	2,761	1,093 – 6,973
Alter	0,987	49086,790	0 – 3,841e+227
Grading	0,196	0,262	0,034 – 1,997

Tabelle 12 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des DDFS für Einzelmarker und klinisch-pathologische Faktoren

	<i>p</i>	<i>HR</i>	<i>95% KI</i>
Subtypen	0,868	1,070	0,484 – 2,363
T-Stadium	0,010	0,315	0,130 – 0,762
Nodalstatus	0,034	2,716	1,076 – 6,855
Alter	0,981	27525,026	0 – 5,132e+244
Grading	0,182	0,252	0,033 – 1,908

Tabelle 13 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des DDFS für Subtypen und klinisch-pathologische Faktoren

4.3.4 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens (OS)

Auch für das Gesamtüberleben wurde mittels multivariater Cox-Regressionsanalyse sowohl der Einfluss der einzelnen MammaTyper® -Marker in Kombination mit den aufgeführten klinisch-pathologischen Parametern als auch gesondert für die Kombination derselben mit den ermittelten molekularen Subtypen untersucht.

Für das Gesamtüberleben zeigte sich im Gegensatz zum fernmetastasenfreien Überleben in der multivariaten Analyse für den *ESR1*-Status mit $p < 0,001$ eine statistisch relevante Assoziation hinsichtlich des Gesamtüberlebens während sich für die übrigen Biomarker kein Einfluss auf das Gesamtüberleben ergab, ebenso wie für die Analyse der Subtypen. Die Tumorgroße zeigte sich als einzige Variable mit einem p-Wert von $< 0,001$ sowohl in Kombination mit den Einzelmarkerergebnissen als auch der Subtypen, ebenso wie im univariaten Modell, statistisch signifikant. Für den Nodalstatus ließ sich sowohl in Kombination mit Einzelmarkern als auch der Subtypen nur ein Trend zur Signifikanz nachweisen. ($p = 0,094$, bzw. $p = 0,093$). Die Variable „Alter“ zeigte sich bei hoher Hazard Ratio und großem Konfidenzintervall in der multivariaten Analyse nur im Modell unter Berücksichtigung der Einzelmarker signifikant.

	p	HR	95% KI
ESR1	<0,001	0,007	0,001 – 0,049
PGR	0,931	1,021	0,640 – 1,628
ERBB2	0,483	0,758	0,350 – 1,643
MKI67	0,124	1,331	0,925 – 1,914
T-Stadium	<0,001	0,414	0,287 – 0,597
Nodalstatus	0,094	1,348	0,951 – 1,910
Alter	0,007	39,376	2,678 – 578,858
Grading	0,998	0,999	0,624 – 1,600

Tabelle 14 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des OS für Einzelmarker und klinisch-pathologische Faktoren

	p	HR	95% KI
Subtypen	0,522	0,884	0,607 – 1,289
T-Stadium	<0,001	0,427	0,297 – 0,615
Nodalstatus	0,093	1,346	0,952 – 1,904
Alter	0,909	1,123	0,154 – 8,208
Grading	0,826	0,949	0,595 – 1,513

Tabelle 15 Multivariate Cox-Regressionsanalyse des OS für Subtypen und klinisch-pathologische Faktoren

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht ob die algorithmische Kombination der quantitativen Expressionswerte der vier MammaTyper®-Marker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* in Kombination mit klinisch-pathologischen Faktoren wie Tumorgröße und Anzahl pathologischer Lymphknoten in ein mathematisches Modell integriert werden können das es ermöglicht einen Risikoscore (MammaTyper®-Score, MT-Score), ähnlich dem IHC 4 zu etablieren, der geeignet ist unabhängige prognostische Informationen hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven für hormonrezeptorpositive, HER2-negative weibliche Mammakarzinompatientinnen zu liefern. Dieses Modell sollte durch Regressionsanalysen unter Einbezug der oben genannten Marker einzeln und in Kombination mit den Parametern Tumorgröße und Nodalstatus erstellt werden. Ziel war es, dass der so erstellte MT-Score zusätzlich zu den etablierten klinischen Parametern signifikante prognostische Informationen liefert.

Mit Beginn des 21. Jahrhunderts und den Möglichkeiten genetischer und molekularer Analysen legten Perou et al. den Grundstein für die bestehende molekulare Einteilung der Mammakarzinome. Anhand ihrer Erkenntnisse wurde deutlich, dass Brustkrebs aus heterogenen und biologisch distinkten Subtypen besteht, die sich durch charakteristische molekulare und genetische Profile und somit auch hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens, ihrem Risiko zur Metastasierung und ihres Therapieansprechens deutlich unterscheiden.(4, 21)

Die vier molekularen Subtypen lassen sich anhand der Genexpression der vier Biomarker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* mithilfe der klinisch-pathologischen Surrogat-Klassifikation nach St. Gallen unterscheiden.

Da die einzelnen Subtypen mit spezifischen Behandlungsempfehlungen einhergehen kommt der zuverlässigen und reproduzierbaren Bestimmungen des Subtyps eine essentielle Bedeutung zu.(4, 21)

Die Grenzen der aktuell etablierten Methode, der Bestimmung auf Proteinebene mittels Immunhistochemie, insbesondere hinsichtlich der schwierigen Beurteilbarkeit des Proliferationsmarkers Ki-67, verdeutlicht die Notwendigkeit alternative Verfahren zu etablieren, die in Reproduzierbarkeit, Zuverlässigkeit und Präzision der Immunhistochemie überlegen und insbesondere unabhängig von subjektiven Bewertungsmethoden sind.(65, 66)

Bei dem in dieser Studie verwendeten Test MammaTyper® (BioNTech Diagnostics, Mainz, Deutschland) handelt es sich um einen, auf RT-qPCR basierenden in-vitro Test, zur quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression der 4 Biomarker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67*.(7)

Im Gegensatz zur Immunhistochemie werden die Ergebnisse der Einzelmarker jeweils quantitativ als $40\text{-}\Delta\Delta\text{Cq}$ -Werte angegeben und beschreiben die jeweilige Markerexpression als Verhältnis zur Menge der Gesamt-RNA. Diese wird wiederum durch die Ermittlung der

medianen Expressionslevel der Referenzgene Calmodulin 2 und Beta-2-Mikroglobulin bestimmt als auch anhand eines gerätespezifischen Cut-offs in positiv und negativ dichotomisiert.

Die Angabe der Einzelmarkerergebnisse auf einer kontinuierlichen Skala ermöglicht außerdem eine genauere Bestimmung der Expression der einzelnen Marker als mittels Immunhistochemie möglich ist.(7)

Während Studien zur IHC-Reproduzierbarkeit mit ICC-Werten von 0,59 nur eine geringe standortübergreifende Übereinstimmung zeigten, zeigte sich mit ICC-Werten von 0,976 hingegen eine sehr gute Reproduzierbarkeit und geringe Varianz hinsichtlich der Bestimmung der einzelnen Marker mittels MammaTyper®.(7) Dies lässt vermuten, dass ein objektives Verfahren wie die RTq-PCR besser zur routinemäßigen Anwendung zur Bestimmung der vier Biomarker und somit auch zuverlässigen Einteilung in die molekularen Subtypen nach St. Gallen geeignet ist.(6)

Im Gegensatz zur Immunhistochemie erfolgt die Genexpressionsbestimmung mittels MammaTyper® aus RNA-Eluaten aus Formalin-fixiertem in Paraffin eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe. Natürlicherweise können extrahierte Tumorblöcke auch zu einem nicht unwesentlichen Teil aus nicht-invasiven Tumoranteilen bestehen.(3) Tests, die Gewebekomogenate verwenden können prinzipiell durch einen zu geringen Tumorzellgehalt oder eine hohe lymphatische Infiltration beeinflusst werden.(3)

Hierbei bietet hingegen die Immunhistochemie einen Vorteil gegenüber quantitativer Verfahren indem eine qualitative Beurteilung der Tumorprobe möglich ist. Somit können beispielsweise tumorfremde Areale optisch erkannt und von der Untersuchung ausgeschlossen werden, da mittels immunhistochemischer Bestimmung die „Gewebemorphologie intakt bleibt“.(64) Dies gilt auch für die Beurteilbarkeit sogenannter Hot-Spot-Regionen.(53) Im Rahmen eines quantitativen Verfahrens wie der RT-qPCR sind diese Ausschlüsse nicht zu bewertender Areale zwar im Vorfeld auch mittels Makro- oder Mikrodissektion möglich, allerdings nicht ohne Weiteres so komplikationslos umsetzbar. Um diese Limitation zu umgehen war für die valide Durchführbarkeit des MammaTyper® ein invasiver Tumoranteil von mindestens 20 % vorausgesetzt.(3) Tumorblöcke mit invasiven Anteilen unterhalb dieses Grenzwertes wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Die Einführung adjuvanter Therapien nach operativer Tumorresektion hat in den letzten Jahrzehnten das Gesamtüberleben und das brustkrebsspezifische Überleben maßgeblich beeinflusst. Für frühe hormonrezeptorpositive Mammakarzinome wird unter fünfjähriger Tamoxifeneinnahme eine Reduktion des brustkrebsspezifischen Überlebens von über 30% angenommen.(67)

Eine Herausforderung bleibt weiterhin herauszufinden, welche Patientinnen mit luminalem, HER2-negativem Brustkrebs von einer zusätzlichen systemischen Chemotherapie

profitieren. Die Gabe von Chemotherapeutika kann mit akuten Toxizitäten wie Neutropenien, aber besonders im Rahmen von beispielsweise anthrazyklinhaltigen Regimen, auch relevanten Organtoxizitäten wie beispielsweise Kardiotoxizität einhergehen, was mit langfristigen und höhergradigen Lebensqualitätseinschränkungen einhergehen kann. Somit ist es von großer klinischer Relevanz Kollektive zu definieren die von einer additiven Chemotherapie profitieren.

Mittels Multigen-Assays wie beispielsweise Oncotype DX® (Genomic Health, Redwood City, CA, USA), MammaPrint® (Agendia, Irvine, CA, USA), EndoPredict® (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) wurden bereits Risikoscores etabliert die prognostische Informationen hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven in luminalen Mammakarzinomen ermöglichen.(65) Allerdings ist bisher nur der 21-Gen-Recurrence-Score (Oncotype DX®, Genomic Health) als prädiktiver Test für die Vorhersage eines Chemotherapienutzens validiert.(57-59)

Aus der Metaanalyse von Wirapati ging die Vermutung hervor, dass ein Großteil der prognostischen Aussagekraft der kommerziellen Multigen-Assays ebenfalls aus den Genen hervorgehen, die für proliferative Marker codieren.(68)

Ein Nachteil dieser Assays sind einerseits die relativ hohen Kosten andererseits auch die in der Regel, so auch für Oncotype DX® und MammaPrint®, notwendige Durchführung an zentralen Diagnostiklaboren.(7) Diese Einschränkungen limitieren ihre Anwendung in weiten Teilen der Welt, insbesondere in Ländern mit weniger strukturellen und monetären Möglichkeiten. Somit besteht weiterhin die Notwendigkeit kostengünstige Alternativen zu etablieren besonders im Hinblick auf Verfügbarkeit sowie Unabhängigkeit von zentralen Diagnostikzentren.

Die Anwendung des MammaTyper®-Kit ist ebenso wie die Analyse mittels Immunhistochemie an jedem lokalen Pathologie-Standort möglich und ermöglicht somit eine dezentrale und gleichzeitig robuste und reproduzierbare Bestimmung der zur molekularen Subtypisierung benötigten Biomarker.(54)

Mit dem IHC4-Score wurde bereits ein Score etabliert, der allein auf der Kombination der mittels Immunhistochemie bestimmten Proteinexpression der Marker ER, PR, HER2 und Ki-67 beruht und prognostische Informationen für hormonrezeptorpositive frühe Mammakarzinome ermöglicht, die über die klassischen klinischen Prognosefaktoren hinausgehen.(54) Cutzick et al. konnten zeigen, dass das Modell noch optimiert werden kann, wenn klinisch-pathologische Parameter, wie Tumorgröße oder Nodalstatus, einbezogen werden.(55, 56)

Obwohl der Score in einer unabhängigen Studie validiert wurde und einen vergleichbaren prognostischen Wert wie beispielsweise der 21-Gen-Recurrence-Score (Oncotype DX®, Genomic Health) liefert, wurde er bisher nicht in die klinische Routine integriert.(46) Die bisher noch immer unzureichende Standardisierung der Immunhistochemie schränken die Validität

und Reliabilität des Scores und damit seine Verwendung, besonders im Bereich grenzwertiger Proteinexpression, beispielsweise im Bereich eines vordefinierten Cut-offs, weiterhin ein.(46, 56)

Wirtz et al. beschrieben eine gute Übereinstimmung zwischen RT-qPCR- basierten Verfahren und IHC-Assays beziehungsweise In-situ-Hybridisierung für die Bestimmung der Hormonrezeptor- sowie *ERBB2*- beziehungsweise HER2-Expression. Für die *MKI67*-Expression sowie Ki-67-IHC war die Korrelation hingegen eingeschränkt, was vermutlich auf die methodischen Limitationen der Immunhistochemie zurückzuführen ist.(52)

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass im Gegensatz zur Ki-67 Proteinexpression nur die *MKI67*-mRNA-Expression Vorhersagen hinsichtlich des DDFS ermöglichte, was wiederum die Überlegenheit eines quantitativen Verfahrens wie der RT-qPCR im Vergleich zur Immunhistochemie hinsichtlich der Bestimmung von Ki-67 als Surrogat der Zellproliferation und Zellteilungsaktivität darstellt.(52)

Auf Basis dieser Ergebnisse müsste die prognostische Aussagekraft des IHC 4 auch auf einen Score übertragbar sein der auf der Kombination der quantitativen MammaTyper®-Einzelmarkerergebnisse beruht, bei gleichzeitig verbesserter Reproduzierbarkeit und robusterer Ki-67 Bestimmung.

Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich die *MKI67*-mRNA-Expression nicht signifikant hinsichtlich des Auftretens einer Fernmetastasierung oder des krankheitsspezifischen Versterbens. Für die *MKI67*-Expression konnte nur eine Assoziation hinsichtlich des Gesamtüberlebens gezeigt werden. Sowohl uni- als auch multivariat zeigte sich in dieser Untersuchung keiner der untersuchten Biomarkern statistisch signifikant hinsichtlich des DDFS. Eine Ursache hierfür ist am ehesten in der geringen Fallzahl der untersuchten Patientenproben und somit einhergehend der geringen „Eventzahl“ im Sinne des Auftretens einer Fernmetastasierung zu sehen. Hierbei besonders hervorzuheben sind außerdem die in der multi- als auch univariaten Cox-Regressionsanalyse sehr hohen Hazard Ratios und Konfidenzintervalle insbesondere für den Östrogenrezeptorstatus als auch das Alter. Dies ist in erster Linie durch die sehr geringe Anzahl an hormonrezeptornegativen Proben (n=3) und das überwiegend ältere Patientenkollektiv (98,61 % des Kollektivs > 50 Jahre) bedingt.

Unter den klassischen klinisch-pathologischen Variablen zeigte sich nur das pathologische Tumorstadium sowie der Nodalstatus übergreifend für das fernmetastasenfreie- und Gesamtüberleben sowohl in der univariaten als auch multivariaten Analyse statistisch signifikant.

In der hier untersuchten Kohorte erfüllten 216 FFPE-Blöcke hormonrezeptorpositiver, HER2-negativer Mammakarzinome der Jahre 1990-2006 die erforderlichen Einschlusskriterien und lieferten ein valides MammaTyper®-Ergebnis. Verglichen mit anderen Studien wie

beispielsweise der TAILORx-Studie, in der unter anderem untersucht wurde, ob Patientinnen mit einem mittleren Oncotype DX Breast Recurrence Score® von der Hinzunahme einer adjuvanten Chemotherapie profitieren und in die 10.273 Brustkrebspatientinnen eingeschlossen wurden (59) oder der Arbeit von Wirtz et al. die ihre Untersuchungen an 769 Proben der insgesamt 1010 Patientinnen des FinHer-Studienkollektivs durchführten handelt es sich bei der untersuchten Kohorte um eine verhältnismäßig geringe Fallzahl, was sich somit auch in der niedrigen Zahl der Events (N=29) widerspiegelt. Dies geht in diesem Fall mit einer geringen Teststärke einhergeht und stellt die größte Limitation dieser Arbeit dar.

Unter Einschluss aller T- und N-Stadien kam es nur bei 13,4 % (N=29) der Patientinnen im Untersuchungszeitraum zum Auftreten eines Rezidivs bzw. einer Fernmetastasierung. Das DDFS lag im Median bei 50 Monaten. In der univariaten und multivariaten Analyse zeigte sich in dieser Untersuchung keiner der untersuchten Biomarker als unabhängiger Prädiktor für das DDFS. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu früheren Arbeiten zu Biomarker-Untersuchungen. Cutzick et al. konnten in ihrer Arbeit zum IHC4-Score beispielsweise zeigen, dass alle vier mittels Immunhistochemie bestimmten Biomarker ER, PR, HER2 und KI-67 bei Vorhandensein der klassischen klinisch-pathologischen Parameter wie Tumorgroße und Nodalstatus unabhängige prognostische Informationen liefern.(55)

Somit konnte das primäre Studienziel nicht erreicht werden.

Auch wenn hier für keinen der genannten Biomarker ein signifikanter Einfluss auf das DDFS gezeigt werden konnte, sind die Ergebnisse aufgrund der geringen Fallzahl mit Vorsicht zu interpretieren. Eine aussagekräftige Schlussfolgerung ist somit nicht möglich. Die Proben stammten alle aus der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Somit unterliegt die Patientenauswahl auch einem gewissen Selektionsbias.

Eine mögliche Einschränkung dieser Arbeit stellt außerdem die retrospektive Analyse archivierter FFPE-Blöcke der Jahre 1990 bis 2006 dar. Im Vergleich zu anderen Studien zu Prognosescores wie beispielsweise TAILORx, die einerseits prospektiv durchgeführt wurden und in die Patientinnen zwischen den Jahren 2006 und 2010 eingeschlossen wurden, handelt es sich hier um verhältnismäßig alte Tumorproben aus unter anderem den 1990-Jahren. Von Ahlfen et al. konnten zeigen, dass RNA aus FFPE-Blöcken mit der Zeit abgebaut wird.(69, 70) Außerdem hat auch die Fixierung mittels Formaldehyd und die Lagerung der Proben Auswirkungen auf die Probenintegrität, was die Auswertung mittels RT-qPCR-basierten Verfahren einschränken kann.(71, 72) Blöcke vor 1990 wurden aufgrund möglicher Einschränkungen der Probenintegrität bereits im Vorfeld von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Diese Auswirkungen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, sollten aber in der Bewertung Berücksichtigung finden.

Auch wenn die statistischen Analysen prospektiv geplant und durchgeführt wurden stellt der retrospektive Charakter der Studie ebenfalls eine Limitation dar.

Aufgrund der Planung des Kollektivs ergaben sich wie bereits oben aufgeführt durch die niedrige Fallzahl an hormonrezeptornegativen Patientenproben, sowie auch sehr homogenem Alter mit nur 3 Patientinnen unter 50 Jahren für das fernmetastasenfreie Überleben eine sehr hohe Hazard Ratio mit großen Konfidenzintervallen. Auch dies limitiert die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse, insbesondere in Kombination mit der geringen Eventzahl. Somit hätte möglicherweise auch ein Studiendesign mit einem inhomogeneren Kollektiv zur besseren Beurteilbarkeit und Aussagekraft, insbesondere innerhalb der Variablen „Alter“ und „Östrogenrezeptorstatus“, beitragen können.

Ob ein MammaTyper®-Score (MT-Score) etabliert werden kann, der eine ähnliche prognostische Aussagekraft wie der IHC4-Score ermöglicht, kann nur in weiteren prospektiven Untersuchungen mit einer deutlich höheren Fallzahl und möglicherweise neueren Proben evaluiert werden, da die Zahl der Patientenproben und Events in der untersuchten Patientenkohorte zu gering war um eine statistische Relevanz zu erreichen.

Die Durchführung einer prospektiven randomisierten Doppelblindstudie bleibt allerdings der Goldstandard für den Nachweis des klinischen Nutzens eines Prognosescores, beziehungsweise zur Etablierung eines Solchen.(73) Dies sollte in weiteren Studien perspektivisch angestrebt werden um möglicherweise eine Alternative zu herkömmlichen Genexpressionsassays zu ermöglichen, bei deutlich besserer Kosteneffizienz.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht ob die algorithmische Kombination der quantitativen Expressionswerte der vier MammaTyper®-Marker *ESR1*, *PGR*, *ERBB2* und *MKI67* in Kombination mit klinisch-pathologischen Faktoren wie Tumorgröße und Nodalstatus in ein mathematisches Modell integriert werden können um einen Risikoscore (MammaTyper®-Score, MT-Score), ähnlich dem IHC4-Score, zu etablieren. Ziel war es, dass der so erstellte MT-Score über die etablierten klinischen Parameter hinaus signifikante prognostische Informationen liefert.

Anstelle der bisher etablierten Bestimmung der Proteinexpression der vier Biomarker ER, PR, HER2 und Ki-67 mittels Immunhistochemie ermöglicht der hier verwendete *in-vitro* diagnostische Test MammaTyper® eine objektive und quantitative Analyse der mRNA-Expressionsstärke der vier Markergene. Durch die Anwendung eines quantitativen Verfahrens wie der RT-qPCR ermöglicht MammaTyper® die methodischen Limitationen der Immunhistochemie insbesondere die subjektive Bewertung durch verschiedene Untersucher zu umgehen. Die binäre Einteilung der genannten Marker in positiv und negativ ermöglicht eine Einteilung anhand der klinisch-pathologischen Surrogat-Klassifikation nach St. Gallen und ermöglicht somit eine zuverlässige und reproduzierbare Subtypisierung des Tumorgewebes. Mithilfe des RNA-Extraktionskit RNXtract® (BioNTech Diagnostics GmbH) wurde die Gesamt-RNA zunächst extrahiert und die quantitativen Einzelmarkerergebnisse der Biomarker ESR, PGR, ERBB2 und MKI67 anschließend mittels MammaTyper® (BioNTech Diagnostics GmbH) bestimmt. Die Einzelmarkerergebnisse wurden sowohl als $40\text{-}\Delta\Delta\text{Cq}$ -Werte auf einer kontinuierlichen Skala angegeben als auch anhand folgender gerätespezifisch validierter Grenzwerte in positiv und negativ dichotomisiert: ESR1: 38,00, PGR: 35,50, ERBB2: 41,10, MKI67: 35,90.

Von den ursprünglich untersuchten 304 Proben erfüllten in der untersuchten Kohorte 216 FFPE-Blöcke hormonrezeptorpositiver, HER2-negativer Mammakarzinome der Jahre 1990-2006 die erforderlichen Einschlusskriterien und lieferten ein valides MammaTyper®-Ergebnis. Unter Einschluss aller T- und N-Stadien kam es bei 13,4 % (N=29) der Patientinnen im Untersuchungszeitraum zu einer Fernmetastasierung beziehungsweise krankheitsspezifischem Versterben. Sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse zeigte sich keiner der untersuchten Biomarker oder die Kombination derselben in Form der intrinsischen Subtypen als signifikanter Prädiktor hinsichtlich des DDFS. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu früheren Arbeiten zu Biomarker-Untersuchungen. Cutzick et al. konnten in ihrer Arbeit zum IHC4-Score beispielsweise zeigen, dass die auf Proteinebene, mittels Immunhistochemie bestimmten Biomarker ER, PR, HER2 und Ki-67 bei Vorhandensein der klassischen klinisch-pathologischen Parameter wie Tumorgröße und Nodalstatus unabhängige prognostische Informationen liefern.(55)

Somit konnte das primäre Studienziel nicht erreicht werden.

Insbesondere aufgrund methodischer Limitationen wie beispielsweise des Alters der FFPE-Blöcke aber auch der geringen Eventzahl im Sinne des Auftretens einer Fernmetastasierung im untersuchten Kollektiv, sind die Ergebnisse nur eingeschränkt zu interpretieren. Eine weitere Limitation stellt außerdem das insgesamt mit nur 216 Proben eher kleine, und durch die Einschlusskriterien sehr homogene Patientenkollektiv dar, was die Aussagekraft der einzelnen Parameter limitiert.

Ob ein prognostischer Score anhand der quantitativen MammaTyper®-Ergebnisse in Kombination mit klinisch-pathologischen Faktoren etabliert werden kann, der eine ähnlich prognostische Aussagekraft wie der IHC4-Score ermöglicht, kann nur in weiteren Untersuchungen mit einer deutlich höheren Fallzahl und möglicherweise neueren Proben evaluiert werden. Dies sollte nach Möglichkeit in Form einer prospektiven randomisierten Doppelblind-Studie erfolgen.

7 Literaturverzeichnis

1. Institut RK. Zentrum für Krebsregisterdaten- Brustkrebs (Mammakarzinom), : Robert Koch Institut; 2024 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html].
2. 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.
3. Laible M, Schlombs K, Kaiser K, Veltrup E, Herlein S, Lakis S, et al. Technical validation of an RT-qPCR in vitro diagnostic test system for the determination of breast cancer molecular subtypes by quantification of ERBB2, ESR1, PGR and MKI67 mRNA levels from formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer*. 2016;16:398.
4. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
5. Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(24):1897-906.
6. Du X, Li XQ, Li L, Xu YY, Feng YM. The detection of ESR1/PGR/ERBB2 mRNA levels by RT-QPCR: a better approach for subtyping breast cancer and predicting prognosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(1):59-67.
7. Varga Z, Lebeau A, Bu H, Hartmann A, Penault-Llorca F, Guerini-Rocco E, et al. An international reproducibility study validating quantitative determination of ERBB2, ESR1, PGR, and MKI67 mRNA in breast cancer using MammaTyper(R). *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):55.
8. Katalinic A, Eisemann N, Kraywinkel K, Noftz MR, Hubner J. Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program. *Int J Cancer*. 2020;147(3):709-18.
9. Malek D, Kaab-Sanyal V. Implementation of the German Mammography Screening Program (German MSP) and First Results for Initial Examinations, 2005-2009. *Breast Care (Basel)*. 2016;11(3):183-7.
10. Bilimoria MM, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA Cancer J Clin*. 1995;45(5):263-78.
11. LaBarge MA, Mora-Blanco EL, Samson S, Miyano M. Breast Cancer beyond the Age of Mutation. *Gerontology*. 2016;62(4):434-42.
12. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000;321(7261):624-8.
13. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(22):1819-27.
14. Ewertz M, Jensen MB, Gunnarsdottir KA, Hojris I, Jakobsen EH, Nielsen D, et al. Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(1):25-31.
15. Lee K, Kruper L, Dieli-Conwright CM, Mortimer JE. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(5):41.
16. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(3):250-63.

-
17. Shaikh AA, Braakhuis AJ, Bishop KS. The Mediterranean Diet and Breast Cancer: A Personalised Approach. *Healthcare (Basel)*. 2019;7(3).
 18. Mahdavi M, Nassiri M, Kooshyar MM, Vakili-Azghandi M, Avan A, Sandry R, et al. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5741-50.
 19. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet*. 2012;82(2):105-14.
 20. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch*. 2018;472(5):697-703.
 21. 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.
 22. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(8):790-800.
 23. Sinn HP, Schneeweiss A, Keller M, Schlombs K, Laible M, Seitz J, et al. Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):124.
 24. Pakdel F. Molecular Pathways of Estrogen Receptor Action. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
 25. Jensen EV, Khan SA. A two-site model for antiestrogen action. *Mech Ageing Dev*. 2004;125(10-11):679-82.
 26. Jensen EV. On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med*. 1962;6:47-59.
 27. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986;320(6058):134-9.
 28. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):5925-30.
 29. Thiel G. LM. Regulator neuronaler Gene: Zinkfingerprotein REST. *Biologie in unserer Zeit*. 2004;34(2):96-101.
 30. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):685-704.
 31. Speirs V, Viale G, Mousa K, Palmieri C, Reed SN, Nicholas H, et al. Prognostic and predictive value of ERbeta1 and ERbeta2 in the Intergroup Exemestane Study (IES)-first results from PathIESdagger. *Ann Oncol*. 2015;26(9):1890-7.
 32. Yi M, Huo L, Koenig KB, Mittendorf EA, Meric-Bernstam F, Kuerer HM, et al. Which threshold for ER positivity? a retrospective study based on 9639 patients. *Ann Oncol*. 2014;25(5):1004-11.
 33. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
 34. Sareyeldin RM, Gupta I, Al-Hashimi I, Al-Thawadi HA, Al Farsi HF, Vranic S, et al. Gene Expression and miRNAs Profiling: Function and Regulation in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5).
 35. Ahn S, Woo JW, Lee K, Park SY. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. *J Pathol Transl Med*. 2020;54(1):34-44.

-
36. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int.* 2014;2014:852748.
 37. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2105-22.
 38. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol.* 2007;18(6):977-84.
 39. Zabaglo L, Salter J, Anderson H, Quinn E, Hills M, Detre S, et al. Comparative validation of the SP6 antibody to Ki67 in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2010;63(9):800-4.
 40. Farshid G, Dhatrak D, Gilhotra A, Koszyca B, Nolan J. The impact of 2018 ASCO-CAP HER2 testing guidelines on breast cancer HER2 results. An audit of 2132 consecutive cases evaluated by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Mod Pathol.* 2020;33(9):1783-90.
 41. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983;31(1):13-20.
 42. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007;96(10):1504-13.
 43. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
 44. 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.
 45. Davey MG, Hynes SO, Kerin MJ, Miller N, Lowery AJ. Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(17).
 46. Bartlett JM, Christiansen J, Gustavson M, Rimm DL, Piper T, van de Velde CJ, et al. Validation of the IHC4 Breast Cancer Prognostic Algorithm Using Multiple Approaches on the Multinational TEAM Clinical Trial. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(1):66-74.
 47. Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo L, Arun I, Badve SS, Bane AL, et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. *NPJ Breast Cancer.* 2016;2:16014.
 48. Polley MY, Leung SC, Gao D, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JM, et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol.* 2015;28(6):778-86.
 49. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2784-95.
 50. Li J, Chen Z, Su K, Zeng J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8500-5.
 51. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 2008;68(9):3108-14.

-
52. Wirtz RM, Sihto H, Isola J, Heikkilä P, Kellokumpu-Lehtinen PL, Auvinen P, et al. Biological subtyping of early breast cancer: a study comparing RT-qPCR with immunohistochemistry. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(3):437-46.
53. 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.
54. Abubakar M, Figueroa J, Ali HR, Blows F, Lissowska J, Caldas C, et al. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and Ki67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. *Mod Pathol.* 2019;32(9):1244-56.
55. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4273-8.
56. 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. *J Clin Oncol.* 2013;31(22):2783-90.
57. 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. *J Clin Oncol.* 2006;24(23):3726-34.
58. 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. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):55-65.
59. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(2):111-21.
60. Pryor RJ, Wittwer CT. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods Mol Biol.* 2006;336:19-32.
61. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):165-256.
62. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209-19.
63. Ruiz-Villalba A, Ruijter JM, van den Hoff MJB. Use and Misuse of C(q) in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life (Basel).* 2021;11(6).
64. Hartmann K, Schlombs K, Laible M, Gurtler C, Schmidt M, Sahin U, et al. Robustness of biomarker determination in breast cancer by RT-qPCR: impact of tumor cell content, DCIS and non-neoplastic breast tissue. *Diagn Pathol.* 2018;13(1):83.
65. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Hayes DF. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Summary. *J Oncol Pract.* 2016;12(4):384-9.
66. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, Haddow JE, Piper M, Calonge N, et al. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med.* 2009;11(1):3-14.

-
67. Johnston SR, Yeo B. The optimal duration of adjuvant endocrine therapy for early stage breast cancer--with what drugs and for how long? *Curr Oncol Rep.* 2014;16(1):358.
 68. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 2008;10(4):R65.
 69. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One.* 2007;2(12):e1261.
 70. 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.
 71. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(22):4436-43.
 72. Macabeo-Ong M, Ginzinger DG, Dekker N, McMillan A, Regezi JA, Wong DT, et al. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod Pathol.* 2002;15(9):979-87.
 73. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(21):1446-52.

8 Danksagung

Inhalt in elektronischer Version gelöscht

9 Lebenslauf

Inhalt in elektronischer Version gelöscht