
**Der Multigentest EndoPredict® als prognostischer Biomarker in
der klinischen Routine beim frühen Östrogenrezeptor-positiven,
Her2-negativen Mammakarzinom:**

Erste prospektive Studie zum Outcome und der Compliance von
Patientinnen nach Therapieentscheidung anhand des EndoPredict®-Tests

Sophie-Isabelle Anders

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Marion B. Kiechle
2. Prof. Dr. Susanne Kossatz

Die Dissertation wurde am 17.03.2022 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.10.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

I. Abstract	6
II. Widmung	8
III. Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis	9
1. Einleitung	11
1.1. Das Mammakarzinom	11
1.1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms	11
1.1.2. Metastasierung und Rezidive des Mammakarzinoms	13
1.2. Prognostische und prädiktive Faktoren	14
1.2.1. uPA/PAI-1	21
1.2.2. Ki-67	21
1.2.2.1. Auswertung des Ki-67-gefärbten Gewebes	22
1.2.2.2. Ki-67-Cut-Off	24
1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom	24
1.3.1. Intrinsische Subtypen	24
1.3.2. Allgemeine Therapieempfehlungen beim HR-positiven, Her2-/neu-negativem Mammakarzinom	27
1.3.3. Mammakarzinom des Mannes	27
1.3.4. Chemotherapie-Empfehlung	28
1.3.5. Multigentests	29
1.3.5.1. MammaPrint, OncotypeDX und Prosigna	31
1.3.5.2. EndoPredict	32
2. Zielsetzung	37
3. Material und Methoden	38
3.1. Patientenkohorte	38
3.1.1. Informationsdatenbanken	40
3.2. EndoPredict® Test	40
3.2.1. Durchführung	40
3.3. Ki-67	42
3.3.1. Kollektiv der Tumorblöcke	42
3.3.2. Erstellen der Schnitte	43
3.3.3. Hämatoxylin- Eosin- Färbung	43
3.3.4. Ki-67 Färbung Ventana	45
3.3.5. Auswertung Ki-67-Färbung	48
3.4. Follow-Up	50

3.5. Statistik	53
4. Ergebnisse	55
4.1. Patientencharakteristika	55
4.1.1. EndoPredict-Ergebnisse in der Gesamtkohorte	57
4.1.2. Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte	59
4.1.2.1. Geschlechter und Menopausenstatus	59
4.1.2.2. Tumorgröße	60
4.1.2.3. Histologische Tumortypen	60
4.1.2.4. Grading	61
4.1.2.5. Nodalstatus	62
4.1.2.6. Östrogenrezeptorstatus	63
4.1.2.7. Korrelation von Östrogenrezeptor und EndoPredict	63
4.1.2.8. Progesteronrezeptorstatus	64
4.1.2.9. Korrelation von Progesteronrezeptor und EndoPredict	64
4.2. Ki-67	66
4.2.1. Korrelation der Ki-67-Ergebnisse mit dem EP Score (12-Gen-Score)	66
4.2.2. Korrelation der Ki-67-Ergebnisse mit dem EPclin Score	68
4.2.3. Ki-67 und Grading	69
4.2.4. Risikoeinteilung von EPclin und Ki-67	70
4.3. Follow-Up	71
4.3.1. Therapieempfehlungen	71
4.3.2. Compliance	72
4.3.3. Outcome	75
4.3.3.1. Outcome nach EPclin High und Low Risk	76
4.3.3.2. Disease-free-Survival nach EP Score (12-Gen-Score) und EPclin Score	77
4.3.3.3. DFS der EPclin Hochrisikogruppe nach Chemotherapie-Compliance	78
4.3.3.4. Disease-free-Survival nach Ki-67	80
4.3.3.5. Outcome nach Grading	80
4.3.4. Lokalrezidive	81
4.3.5. Metastasen	81
4.3.5.1. Metastasen nach EPclin High und Low Risk	82
4.3.6. Todesfälle in der Kohorte	82
4.3.7. Outcome Männer	83
4.3.8. Der optimale Cut-Off für Ki-67	83
5. Diskussion	86
5.1. Diskussion der Methoden	87

5.2. Diskussion der Ergebnisse	90
5.2.1. Ki-67 und EndoPredict	93
5.2.2. Compliance	96
5.2.3. Outcome	97
6. Zusammenfassung	104
7. Appendix	106
7.1. Einleitung	106
7.1.1. Risikofaktoren	106
7.1.2. TNM-Stadien, 8. Auflage	107
7.1.3. UICC- Stadien	109
7.1.4. Beispiel eines Ergebnisberichts des EndoPredict-Tests mit Erläuterungen	110
7.2. Material und Methoden	112
7.2.1. Färbeprotokoll des Ki-67-MIB1-Klon	112
7.2.2. uPA/PAI-1	116
7.2.3. Follow-Up	117
7.3. Ergebnisse	119
7.3.1. Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte nach EP Score	119
7.3.2. Klinisch-pathologische Charakteristika der Ki-67-Kohorte	120
7.3.3. Ki-67 und EP Score	121
7.3.4. Ki-67 und Östrogenrezeptor	121
7.3.5. Ki-67 und Progesteronrezeptor	122
7.3.6. Proteasen	123
7.3.7. Proteasen nach EP/EPclin Score	124
7.3.8. Todesfälle	125
7.3.9. Lokalrezidive	125
7.3.10. Metastasen	126
7.3.11. Zweitumore	127
7.3.12. Resektionsstatus	127
7.3.13. Multizentrität und Multifokalität	127
7.4. Diskussion	128
7.4.1. Weitere vergleichende Studien der am häufigsten eingesetzten Genexpressionstests und des EndoPredicts	128
7.4.2. Männliche Patienten mit Therapieempfehlung mittels EndoPredict-Test	129
IV. Literaturverzeichnis	130
V. Bildquellen	142
VI. Abbildungsverzeichnis	144

VII. Tabellenverzeichnis	147
VIII. Danksagung	148

In der gesamten Dissertation wird zur der verständlichen Lesbarkeit meist das generische Femininum Patientinnen verwendet. Männliche (bei 6 von 373) Patienten werden dabei ebenfalls eingeschlossen, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

I. Abstract

Introduction: The EndoPredict is a clinical-molecular test, which is able to estimate an individual early and late risk of distant metastases in retrospective studies in patients with Estrogen-receptor-(ER)positive, Her2-negative breast cancer with 0-3 affected lymph nodes. Therefore, the test can support the decision making for or against a chemotherapy recommendation in everyday clinical practice. To this point, there was no prospective outcome data available concerning the EndoPredict Test. This work presents the first prospective outcome data from patients whose treatment decision was made using the EndoPredict result.

Material and methods: Patients with Estrogen-receptor-positive, Her2-negative breast cancer were included in the study at the breast center of the “Klinikum rechts der Isar” in Munich, Germany. The EndoPredict Test was conducted on the removed tumor tissue. In an interdisciplinary tumor conference, a recommendation for or against chemotherapy was made based on the EndoPredict result. The growth factor Ki-67 was analyzed retrospectively on patient's tumor tissue. A Follow-up was carried out concerning the patient's compliance, local recurrences, distant metastases, and the overall survival. Finally, a statistical evaluation was calculated using Kaplan-Meier survival curves, Pearson's product-moment correlation and Cox hazard ratio for Follow-up data.

Results: Using the EPclin Score, 238 (63.8%) of 373 patients were assigned to the Low-risk group and 135 patients (36.2%) to the High-risk group. In 307 retrospectively determined tumor samples, the Ki-67 median was 17%. The EP and EPclin score showed a significant association with Ki-67 and grading ($p < 0.001$). Ki-67 and the EP score showed a strong, statistically highly significant correlation ($r = 0.63$, $p < 0.001$). 71.9% were compliant to the recommended chemotherapy.

After 41.6 months of Follow-up, the 3-year disease-free survival and distant metastasis-free survival in the EPclin Low-risk group were 96.9% (95% CI 94.2-99.1%) and 99.6% (95% CI 98.7-100%) versus 94.9% (95% CI 90.9-99.0%) and 97.6% (95% CI 95.0-100%) in the High-risk group. Patients in the High-risk group had a significantly five-fold higher risk of distant metastases than patients in the Low-risk group (HR 5.18; 95% CI 1.04-25.74; $p = 0.0443$). High-risk patients that received the recommended chemotherapy had a 3-year disease-free survival of 96.3% and a Lower risk than the High-risk patients who did not receive chemotherapy (3-year DFS: 91.5% 95% CI 82.7-100 %; HR 0.32; 95% CI 0.10-1.05; $p = 0.061$).

Conclusion: This first prospective outcome data of the EndoPredict test confirms the EndoPredict test as a valid clinical-molecular marker. It is able to make a prognostic statement about the distant metastasis risk of patients with ER-positive, Her2-negative breast cancer through adequate risk stratification. Moreover, it indicates that High-risk patients benefit from adjuvant chemotherapy.

II. Widmung

Meinen Eltern,
Lele und Paul

III. Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis

95%-KI	95%-Konfidenzintervall
AZGP1	Zinc-Alpha-2-Glycoprotein
df	(engl.) Degrees of Freedom = Freiheitsgrade
DFS	(engl.) Disease free Survival = Krankheitsfreies Überleben
DHCR7	7-Dehydrocholesterol-Reductase
EndoPredict	EndoPredict®
EP Score	neu: Molekularer 12-Gen-Score
FFPE	Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe
Frequency	(engl.) = Häufigkeit
ggf.	gegebenenfalls
HDI	Human Development Index
HE- Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Her-2(/neu)	Human epidermal growth Factor, EBB2
High Risk	(engl.) = Hochrisiko
HR.	Hazard Ratio
HR	Hormonrezeptor
IHC	Immunhistochemische Färbung
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer
ISH	In-situ-Hybridisierung
LK	Lymphknoten

Low Risk	(engl.) = Niedrigrisiko
Max.	Maximum
MGP	Matrix Gamma-Carboxyglutamic acid
Min.	Minimum
NA's	(engl.) Non applicable = nicht zutreffend
ÖR	Östrogenrezeptor
PAI-1	Inhibitor des Plasminogen-Aktivators (Urokinase-Typ)
PR	Progesteronrezeptor
PST	Primär systemische Therapie
Qu.	Quantil
RBBP8	Retinoblastoma- binding protein 8
RF	Risikofaktoren
RT-qPCR	Reverse Transkription quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Score	(engl.) = Ergebnis, Punktestand
STC2	Stanniocalcin 2
TNM-Klassifikation	Tumor-Nodal-Metastasen-Klassifikation
TUM	Technische Universität München
u.a.	unter anderem
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C
uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ

1. Einleitung

Durch stetige Fortschritte in der Therapie und Früherkennung konnte die aktuelle relative Zehnjahres-Überlebensrate von Patientinnen mit Brustkrebs auf 83% gesteigert werden[1]. Kernpunkt der aktuellen Leitlinien ist eine Stratifizierung der Patientinnen entsprechend ihres Risikos, Metastasen und Rezidive zu entwickeln, was eine effektive und risikoadaptierte Behandlung ermöglicht. Bei einigen Subtypen haben sich die klassischen prognostischen Faktoren wie Grading, Tumorgröße, Nodal- oder der Hormonrezeptorstatus hierfür nicht als suffizient genug bewährt und erlauben demnach nicht, Patientinnen eindeutig einer Hoch- bzw. Niedrigrisikogruppe zuzuweisen [2]. Moderne Biomarker, wie der Wachstumsfaktor Ki-67, sollen bei der prognostischen Diskriminierung helfen, sind jedoch aufgrund fehlender Validierung weiterhin Gegenstand von Diskussionen[2].

Besonders in Bezug auf Patienten mit Hormonrezeptor-positiven, Her2/neu-negativen Karzinom, welches allgemein durch eine günstigere Prognose charakterisiert ist, gilt es, die Patienten zu identifizieren, die ein höheres Risiko für die Entwicklung von Metastasen besitzen und die Patienten mit geringem Risiko vor einer Übertherapie im Rahmen einer zusätzlichen Chemotherapie zu schützen.

Multivariate Genexpressionstest sollen nun zusätzliche Informationen zum individuellen Risiko dieser Patienten liefern, von denen einer, der sogenannte EndoPredict®-Test, insbesondere Gegenstand der folgenden Arbeit sein wird.

1.1. Das Mammakarzinom

1.1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit [3]. Mit 626 680 Frauen starben im Jahr 2018 über eine halbe Million Frauen an Brustkrebs[3], [4]. Weltweit ist damit das Mammakarzinom auch heute noch an 5. Stelle der krebsgeschuldeten Todesopfer [4]. Aufgrund von später Erkennung und inadäquaten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten werden mit 58% im Jahr 2011

prozentual mehr Krebstodesfälle in Entwicklungsländern verzeichnet [5]. Trotzdem gilt Brustkrebs bei einer jährlichen Neuerkrankungsrate von 75,2 auf 100 000 Personen aus Ländern mit einem sehr hohen HDI (Human Development Index; altersstandardisiert, 2018) als Erkrankung von Industrienationen; im Vergleich dazu erkranken in Ländern mit niedrigen Entwicklungsindex nur 32,8 von 100 000 Personen (altersstandardisiert, 2018) [6].

In Deutschland erkrankt jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs [7]. Dies spiegelt sich jährlich in einer Neuerkrankungsrate von circa 71 888 Patientinnen (Stand 2018; Abbildung 1.1-1) wider und stellt damit mit 25,9% die häufigste Krebserkrankungen unter deutschen Frauen dar [6]. Aufgrund der nach wie vor nichtexistierenden flächendeckenden Einspeisung in Krebsregister in Deutschland können Krebsinzidenzen auf nationaler Ebene jedoch bislang nur geschätzt werden. Die Faktoren, welche das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken, erhöhen, werden im Appendix unter Kapitel 7.1.1. aufgeführt.

Laut Robert-Koch-Institut beträgt das mediane Erkrankungsalter 64 Jahre (Stand 2018 aus dem Bericht von 2021)[8]. Die Relevanz des Mammakarzinoms für die Gesellschaft wird ebenfalls durch die Tatsache deutlich, dass über 30% der Krankheitsfälle vor dem 55. Lebensjahr auftreten [7].

Aufgrund von deutschlandweiten Früherkennungsmaßnahmen und gestiegenen Therapiestandards in meist spezialisierten Brustzentren konnte die relative 10-Jahres-

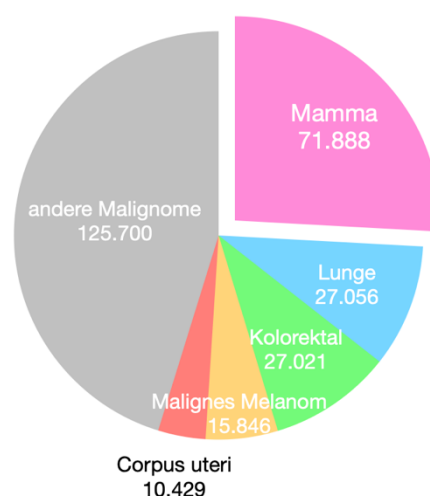


Abbildung 1.1-1 Krebsinzidenz in Deutschland, Frauen
 Quelle der Daten : GLOBOCAN: “Cancer Today IARC 2018”, unter:
<http://gco.iarc.fr/today/>[10.10.2019] (1)

Überlebensrate in Deutschland auf 83% (2017-2018, Bericht von 2021) gesteigert werden [8]. Die Früherkennungsmaßnahmen beinhalten eine Empfehlung zur Mammographie für alle Frauen im Alter von 50 - 69 Jahren. Etwa 45% der Neuerkrankungen fallen in dieser Altersgruppe auf [7].

Besonders zu verzeichnen ist eine Zunahme der Entdeckungsraten nach Einführung der Früherkennungsmaßnahmen. Der deutliche Rückgang von Tumoren im fortgeschrittenen Stadium kann als erster Erfolg des Mammographie-Screenings verstanden werden kann [1]. So können immer mehr Tumore frühzeitig und somit in anfänglichen klinischen Stadium entdeckt werden, was mit einer deutlich besseren Prognose und einem prognostizierten Mortalitätsabfall von 20 pro 100 000 Frauen in Europa der 90er auf 13,5 pro 100 000 Frauen einhergeht [9]. Für einige der Patientinnen mit frühem Mammakarzinom ist hier der Nutzen einer Chemotherapie fragwürdig.

1.1.2. Metastasierung und Rezidive des Mammakarzinoms

Trotz enormer Fortschritte in der Behandlung in den letzten 20 Jahren gibt es nach wie vor, mit circa 25%, einen signifikanten Prozentsatz an Patientinnen, die im Verlauf der Erkrankung Metastasen entwickeln, welche bis zum heutigen Tag nicht kurativ behandelbar sind [10].

Das Mammakarzinom kann per continuitatem (Thoraxwand, Pleurahöhle, Lunge) hämatogen oder lymphogen metastasieren, wobei die lymphogene Metastasierung über die axillären, infra-, supraklavikulären und parasternalen Lymphknoten erfolgt. Manifestationsorte der hämatogenen Metastasierung sind v.a. das Knochensystem, Lunge, Pleura, sowie Leber, das Gehirn und die Ovarien. Ein Befall zervikaler Lymphknoten gilt als Fernmetastasierung [11]. Das mediane Überleben von Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom liegt, trotz steter Verbesserung in den letzten Jahrzehnten, nach einer Metaanalyse für Hormonrezeptor-positive Karzinome bei 57 Monaten [12].

Lokal- und lokoregionale Rezidive bezeichnen ein erneutes Auftreten eines Mammakarzinoms, was in 5-10% bei Patientinnen nach brusterhaltener Therapie und

1. Einleitung / 1.2. Prognostische und prädiktive Faktoren

in ca. 4% nach Ablatio auftritt [11]. Ein Lokalrezidiv beschreibt ein Auftreten im Restdrüsengewebe bzw. bei Ablatio im Brustwandbereich, während ein lokoregionales Rezidiv definiert wird als Tumorbefall der Lymphknoten (Level I/II) nach primärer Therapie [11]. Das Risiko für einen Rückfall ist in den ersten 2 bis 3 Jahren am größten, mit einem 5-Jahres-Gesamtüberleben nach Lokalrezidiven von 55,5-81% [13]–[15].

Die Dekreszenz des relativen Überlebens nach Progression (je nach Progressionstyp) veranschaulicht die Abbildung 1.1-2:

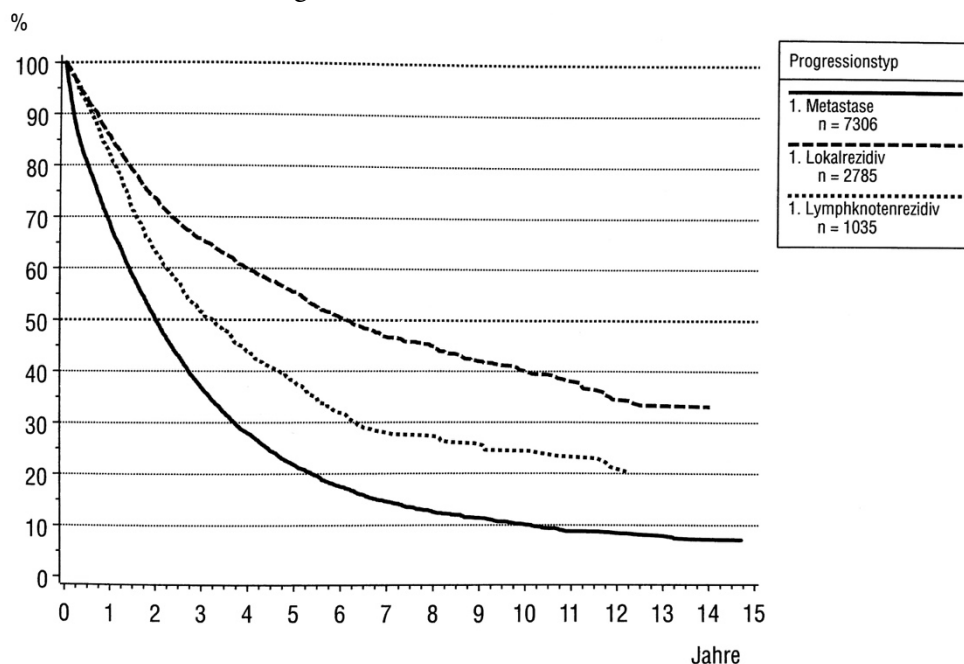


Abbildung 1.1-2 Relatives Überleben ab Progression nach Progressionstyp
Quelle: Tumorzentrum München (2017), Seite 11, Abbildung 11. (2) Mit freundlicher Genehmigung vom Zuckschwerdt-Verlag

1.2. Prognostische und prädiktive Faktoren

Brustkrebs zeichnet sich durch eine vielfältige Tumorerogenität aus, ohne deren Analyse keine optimale Therapie ermöglicht werden kann. Die pathomorphologische Klassifikation des Karzinomgewebes findet an Stanz- und Vakuumbiopsien und in seltenen Fällen an offenen Exzisionsbiopsien der Patientinnen statt. Dies dient in Korrelation mit der Bildgebung der adäquaten Therapieplanung [2].

Einige der pathologischen Parameter eignen sich als Prognosefaktoren zur Einschätzung des Krankheitsverlauf bei Erstdiagnose. Das heißt, sie lassen eine Differenzierung zwischen Patientinnen mit einem hohen Risiko für Metastasen oder Rezidive und Patientinnen mit einem vermutlich langen Gesamt- bzw. krankheitsfreien Überleben zu. Prädiktive Faktoren definieren das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie[16].

Prognostische und prädiktive Faktoren kohärieren in der Entscheidung der optimalen Therapie, z.B. in der Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie.

Zu den prognostischen Faktoren zählen u.a. die folgenden[2], [17]:

- **Nodalstatus, Tumorgröße, Vorliegen von Fernmetastasen:**

Der bedeutendste Prognosefaktor, nach dem Vorliegen von Fernmetastasen (Kapitel 1.1.2.), ist der Karzinombefall von Lymphknoten, da das Risiko eines Brustkrebs-assoziierten Versterbens pro positiven Lymphknoten um 6% steigt[18], [19].

Dieses Risiko steigt ebenfalls pro Millimeter Tumorgröße um circa 1%[18].

Die stetig von Ärzten jeweiliger Fachrichtungen und Pathologen aktualisierte TNM-Klassifikation (derzeit 8.Auflage[20]) klassifiziert und kodiert das Mammakarzinom nach Tumorgröße (T), Nodal- (N) und Metastasenstatus (M), sowie mithilfe von Präfixen nach dem diagnostischem Verfahren (p=pathologisch; c=klinisch; a=Autopsie; r=Rezidiv; u=sonographisch; y=Z.n. neoadjuvanter Therapie). Eine vereinfachte TNM-Klassifikation führt die Tabelle 1.2-1 auf. Die ausführliche dreiteilige Tabelle der aktuellen TNM-Unterteilung ist im Appendix zu finden (Tabelle 7.1-1).

Tabelle 1.2-1 Vereinfachte TNM-Klassifikation des Mammakarzinom, 8.Auflage
 Quelle: Auszug aus ‚Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche
 Krebshilfe; AWMF). 2019. “S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie Und Nachsorge
 Des Mammakarzinoms, Langversion 4.2.”“

Tumorgröße	Erläuterung
T1	Tumor maximal 2 cm in Durchmesser
T2	Tumor >2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor > 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Thoraxwand/ Haut
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ

Nodalstatus	Erläuterung
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in 1-3 beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten (Level I/II)
N2	Metastasen in 4-9 ipsilateralen LKs (Level I/II) oder entlang A.mammaria interna ohne Befall axillärer LKs
N3	Metastasen in ≥10 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder entlang A.mammaria interna mit Befall axillärer LKs
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z. B. vor klinischer Klassifikation bioptisch entfernt)

Metastasen	Erläuterung
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar

Durch Zusammenfassung der TNM-Klassifikation ergibt sich die „Union Internationale contre le Cancer“(UICC)- Stadieneinteilung. Die Einteilung ist ebenfalls im Appendix in Tabelle 7.1-2 aufgeführt.

- **Grading:**

Bei allen invasiven Mammakarzinomen soll nach der S3-Leitlinie zur Diagnostik des Mammakarzinoms eine Beurteilung des Grading nach Elston und Ellis[21] bzw. nach Modifikation des Bloom und Richardson-Grading erfolgen[2]:

Es erfolgt eine Einteilung des Gewebes in 3 Grade (G1=gut differenziert; G2=mäßig differenziert; G3=schlecht differenziert), beurteilt nach einem Summenscore aus Tubulusbildung, Kernpolymorphologie und Mitoserate[2], [22]. Das Grading korreliert stark mit der Prognose: Patientinnen mit einem G1-Tumor haben ein signifikant besseres Überleben als Patientinnen mit einem G2- oder G3-Tumor ($p < 0,0001$) (Abbildung 1.2-1) [21].

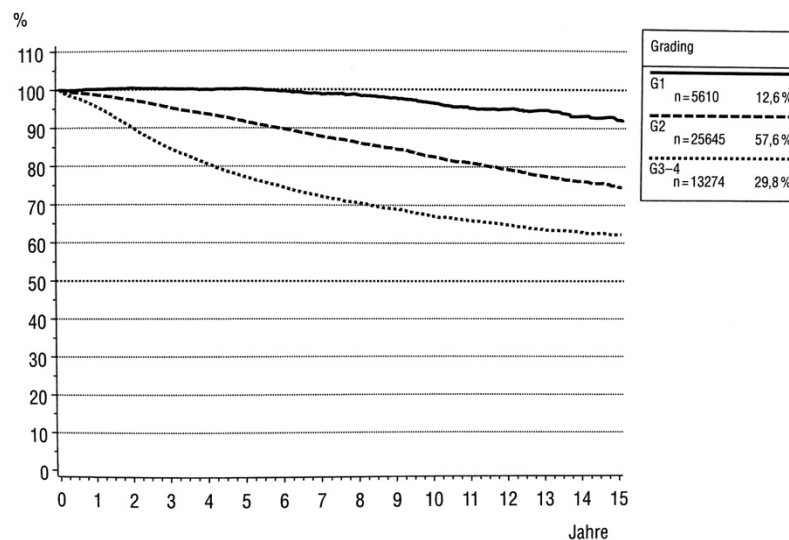


Abbildung 1.2-1 Überleben in Abhängigkeit vom Grading
 Quelle: Tumorzentrum München (2017), Seite 9, Abbildung 7 (3). Mit freundlicher Genehmigung vom Zuckschwerdt-Verlag

- **Histologischer Typ:**

In der pathomorphologischen Untersuchung wird der histologische Tumortyp des Tumorgewebes untersucht. Karzinome, die das Gewebe ihres Ursprungs noch nicht verlassen haben und dementsprechend die Basalmembran noch nicht invadiert haben, bezeichnet man als Carcinoma in situ. Sobald die Basalmembran nicht mehr intakt ist, bezeichnet man das Karzinom als invasiv[2].

1. Einleitung / 1.2. Prognostische und prädiktive Faktoren

Das invasive duktales, ausgehend von den Milchgängen (Ductus lactiferus), heute dem „no-special-Type“ (=NST) zuzuordnen, und das lobuläre Mammakarzinom, ausgehend von den Drüsenkörpern (Lobuli glandulae mammariae), stellen die häufigsten Tumortypen mit 70-80% bzw. 10% aller Mammakarzinome dar[23], [24]. Das medulläre, muzinöse, tubuläre und weitere in der aktualisierten WHO-Klassifikation von 2012 aufgeführten invasiven Mammakarzinome werden sehr viel seltener diagnostiziert[25], [26]. Über 90% der männlichen Patienten weisen ein invasiv-duktales Mammakarzinom auf.

Die Prognose hängt stark mit dem histologischen Tumortyp zusammen. So haben u.a. tubuläre und muzinöse Karzinome eine sehr gute Prognose, während duktales und lobuläre Karzinome eine vergleichbar schlechte Prognose haben[2], [27]–[29].

- **Resektionsstatus:**

Nachdem das Tumorgewebe chirurgisch entfernt wurde, wird das Präparat und insbesondere der Rand des Gewebes histologisch untersucht, um auszuschließen, dass Tumorrest in situ verbleibt. Bei intrinsischen Subtypen ist die Resektion ausreichend, wenn kein Tumorgewebe an den Schnittträgern zu finden ist, was als „no ink on tumor“ bezeichnet wird. Beim DCIS ist ein minimaler Resektionsrand von mindestens 2mm suffizient, sollte im Anschluss eine adjuvante Radiotherapie erfolgen[30].

Patientinnen, die keinen Tumorrest in situ aufweisen, haben ein geringeres Risiko für ein Tumorrezidiv und damit einhergehend eine bessere Prognose, als Patientinnen bei denen ein mikroskopischer (R1) oder makroskopischer (R2) Tumorrest verbleibt[2], [20], [31]–[33].

- **Multizentrität/-fokalität:**

In einzelnen Fällen können mehrere Karzinomherde gefunden werden, was als prognostisch ungünstig gilt[25]. Man unterscheidet hier zwischen multifokalen und multizentrischen Karzinomen, für die es international keine einheitliche Definition gibt[2]. Laut der aktuellen S3-Leitlinie ist Multifokalität definiert als

„Auftreten von makroskopisch erkennbaren, getrennten Karzinomherden in einem Quadranten bzw. [...] bei einem Abstand zwischen den Herden von weniger als 4 cm“ und Multizentrität als „Auftreten von getrennten Karzinomherden in mehr als einem Quadranten bzw. [...] bei einem Abstand von mindestens 4 cm zwischen den Herden“ [2], [34].

- **Alter:**

Auch das Alter gilt als Prognosefaktor: So haben sehr junge Brustkrebspatientinnen unter 30-35 Jahren ein deutlich schlechteres Überleben als Patientinnen über 70 Jahren, da sie häufig bei Diagnosestellung negative klinikopathologische Charakteristika aufweisen, wie einen positiven Nodalstatus, Hormonrezeptor-Negativität und einem größeren Tumor[35]–[37].

Die **peritumorale (Lymph-) Gefäßinvasion** gilt ebenfalls als wichtiger unabhängiger prognostischer Faktor[2], [38], wie auch **Übergewicht** mit einem BMI >30 kg/m² [17].

Die folgenden Parameter haben neben der prognostischen vor allem eine prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf eine endokrine bzw. HER2-gerichtete Therapie[39]:

- **Hormonrezeptorstatus:**

Der Hormonrezeptorstatus, unterteilt in Progesteron- und Östrogen, ist entscheidend für die weitere Therapie des Mammakarzinoms und sollte daher bereits während der Primärdiagnostik, vorzugsweise an der Stanzbiopsie, bestimmt werden. Die Status werden in Prozentzahlen angegeben, abhängig von der Anzahl immunhistochemisch angefärbter Zellen. Laut der aktuellen S3-Leitlinie gilt ein Karzinom als Hormonrezeptor-positiv, sobald $\geq 1\%$ aller Tumorzellkerne angefärbt wurden[2]. Es wird jedoch zusätzlich eine nochmalige Unterteilung der jeweiligen Östrogenrezeptorstatus in „niedrig positiv“ empfohlen bei einem Anteil von 1-9% positiver Zellen, da diese Hormonrezeptor-negativen Tumoren molekular näherzustehen scheinen[2], [40]. Bezugnehmend

1. Einleitung / 1.2. Prognostische und prädiktive Faktoren auf die Sankt Gallen Konsensus Konferenz soll entsprechend der Unterteilung in Luminal A/B (Kapitel 1.3.) ebenfalls eine Differenzierung zwischen niedrigen (<20%) und hohem Progesteronrezeptorstatus ($\geq 20\%$) vorgenommen werden[41].

Als prädiktiver Faktor gibt er unmittelbar Aufschluss über die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie[17], da die bessere Prognose durch die Effektivität der Hormontherapie zu erklären ist[42]. Der Östrogenrezeptor ist im Vergleich zum Progesteronrezeptor ein etwas potenterer, jedoch ebenfalls eher schwacher Prognosefaktor[29], [43].

- **Her-2/neu:**

Zusätzlich zum Hormonrezeptorstatus wird ebenfalls immer der Wachstumsfaktor-Rezeptor Her-2/neu-Rezeptor auf Positivität geprüft, bzw. das zugehörige Gen auf Chromosom 17[2]. Ein Nachweis ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert, charakterisiert durch eine erhöhte Invasivität, Metastasierungstendenz und Chemotherapie-Resistenz, und erfolgt mittels immunhistochemisch nachgewiesener Proteinüberexpression[44], [45]. Alternativ kann die Genamplifikation mittels In-situ-Hybridisierung (ISH; möglich mittels Fluoreszenz, Chromogen, Silber-verstärkt) gesichert werden. Als prädiktiver Faktor wird dem Patientinnen in Konsequenz einer Überexpression (Score>3[2]) eine humanisierter Antikörpertherapie (u.a. Trastuzumab) empfohlen[2], [17], [29].

85% aller Mammakarzinom-Patientinnen profitieren aufgrund einer Her-2/neu-Negativität nicht von dieser Antikörper -Therapie[2], [17], [29].

- **Menopausenstatus**

Mit 33% prämenopausalen und 64% postmenopausalen unter allen Mammakarzinompatienten gilt auch der Menopausenstatus als prädiktiver Faktor bezüglich eines Ansprechens auf eine endokrine Therapie[16].

Einige prädiktive Faktoren geben Aufschluss über eine höhere Chance auf **Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie**: Alter <35 Jahren, cT1/cT2-Tumore, G3-Grading, Hormonrezeptornegativität, Her2-Positivität.

Die Proteasen **uPA** und **PAI-1** sowie der Proliferationsfaktor **Ki-67** werden in den folgenden Unterkapiteln abgehandelt.

1.2.1. uPA/PAI-1

uPA, eine extrazelluläre matrixabbauende Protease und Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ, und sein Inhibitor PAI-1, promovieren Tumorprogression, Karzinominvasion und Metastasen[46]. Beide Faktoren können mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) in frischgefrorenem Gewebe gemessen werden[47]. Sie wurden aufgrund von Empfehlungen der AGO und ASCO Leitlinie seit 2007 als diagnostischer Standard in der Risikoselektion von nodal-negativen Patientinnen herangezogen. Hintergrund dessen waren u.a. die Chemo-N0-Studie (Harbeck et al. 2013), welche einen erhöhten Nutzen einer Chemotherapie für Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1, gegenüber Patientinnen mit niedrigen, beobachtete[48]. Da die Ergebnisse jedoch aufgrund der damals fehlenden endokrinen Therapie „auf die heutigen Behandlungsstandards nicht übertragbar sind“ [2] und ein patientenrelevanter Nutzen von uPA/PAI-1 fraglich ist, hat sich die S3-Leitliniengruppe und das Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen seit 2014 gegen eine weitere Empfehlung ausgesprochen[2], [49].

1.2.2. Ki-67

Das nukleäre Antigen Ki-67 ist ein Proliferationsmarker des Mammakarzinoms. Mittels immunhistochemischer Färbung u.a. mit dem MIB1- („Goldstandard“[50]) oder dem SP6-Antikörper werden Zellen in der G₁, S, G₂ und M-Phase angefärbt, jedoch nicht in der G₀-Ruhephase, und geben so unmittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors[51]. Ki-67-Ergebnisse sind niedrig in S- und G₁-Phasen und erreichen ihre Spitzenwerte während der Mitose[51].

Zahlreiche Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Proliferationsindex und der Prognose zeigen[51]. Gemäß der Metaanalyse von Petrelli et al. (2015) mit über 64.000 Patientinnen ist Ki-67 ein unabhängiger prognostischer Parameter bei einer signifikant schlechteren Prognose für Patientinnen mit einem Ki-67 >25% im Vergleich zu Patientinnen mit niedrigem Ki-67 (Hazard Ratio, HR=1,57; 95% CI 1,33-1,87; p<0,00001) [2], [52].

Patientinnen mit einem Hormonrezeptor-positiven, Her2/neu-negativem Karzinom, welches einen erhöhten Ki-67-Proliferationsindex aufweist, profitieren eher von einer Chemotherapie[53], [54]. Ki-67 sollte daher bei einer Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie, bzw. einer Unterscheidung zwischen Luminal A und B (Kapitel 1.3.), hinzugezogen werden[2], [55].

Nach wie vor liegt jedoch keine einheitliche Standardisierung vor, da sich eine große Heterogenität im methodischen Vorgehen der Studien zeigte, die sowohl die prognostische als auch die prädiktive Relevanz von Ki-67 bestätigten[30], [52]. Zusätzlich präsentierten sie sich mit einer ausgeprägten Interobserver-Variabilität. Die lokalen Ki-67-Ergebnisse wurden bei großer Varianz gegenüber den vorhandenen Studien nicht validiert [30], [50], [52], [56]–[61].

1.2.2.1. Auswertung des Ki-67-gefärbten Gewebes

Aufgrund der großen Variabilität in der Ki-67-Färbung und Auswertung hat die „International Ki-67 in Breast Cancer Group“ einige Empfehlungen u.a. bezüglich der präanalytischen Handhabung des Gewebes (Dauer und Typ der Gewebefixierung, Gewebelagerung), Wahl des Antikörpers und der Auswertung herausgegeben (Dowsett M et al. 2011)[50]:

Bezüglich der Auswertung sollen von mind. 500-1000 beobachteten Zellen in drei zufällig gewählten Regionen (40-fach vergrößert), in der alle Nuclei gefärbt wurden, alle positiven Zellen gezählt werden. Es erfolgt keine Interpretation der Intensität.

MIB1 wird aufgrund der Validität als Goldstandard empfohlen.

Die Regionen sollen in der Peripherie des Tumors bewertet werden, da der invasive Rand allgemein als der biologisch aktivste Teil des Tumors angesehen wird und mit

größter Wahrscheinlichkeit den Ausgang der Krankheit bestimmt. Kontrovers diskutiert wird die Auswertung von Hot Spots, stark proliferierende Bereiche in homogenem Gewebe, da hier die Herangehensweise in Studien stark divergiert (Abbildung 1.2-2)[50], [62].

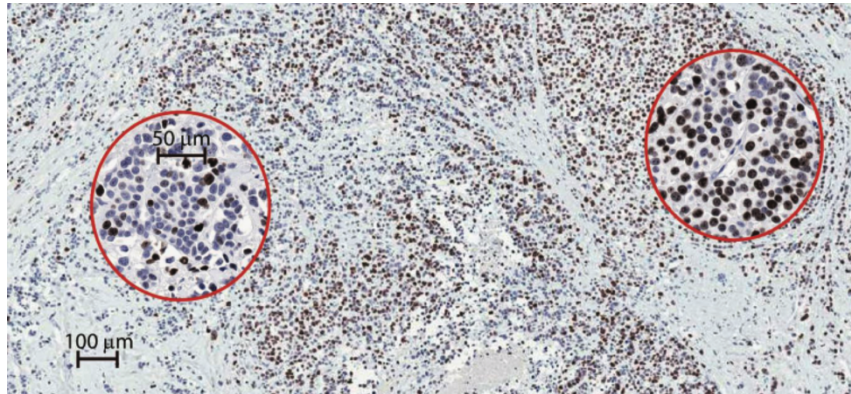
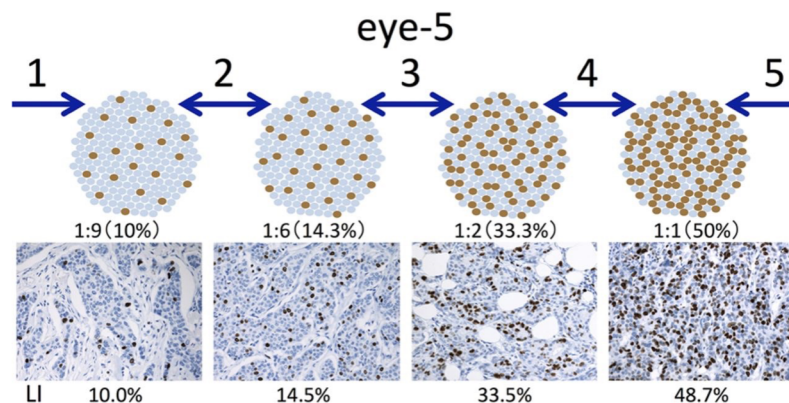


Abbildung 1.2-2 Auswertung eines MIB1-gefärbten Gewebes nach Ki-67
rechts eingekreist: Hot Spot, Ki-67= ca. 90% (positive Zellen: dunkelbraun gefärbt);
links eingekreist: Ausschnitt des ansonsten homogenen Gewebes, Ki-67= ca. 30%.
Die Abbildung illustriert, welche Auswertungsunterschiede in heterogenem Gewebe mit Hot Spots beobachtet werden können. Quelle: Dowsett M et al. (2011), Figure 3 (4))

Zur Vereinfachung wurde von Hida A, et al. die Methode der 5-Stufen-Skala (Eye-5) ausgewertet[63]: Zur objektiven Auswertung des prozentualen Anteils der Zellen wird visuell nach 5 Stufen verglichen, auf wie viele ungefärbte Zellen braunpigmentierte Ki-67-Antigen-Zellen kommen (1:9=10%/ 1:6=14,3%/ 1:2=33,3%/ 1:1=50%; s. Abbildung 1.2-3). Dies ermöglicht eine zusätzlich



Akira I Hida et al. J Clin Pathol 2015;68:356-361

Abbildung 1.2-3 Auswertung der immunhistochemischen Ki67- Färbung mit MIB1
LI=Labelling index; Quelle: Hida AI (2015), Figure 2 (5)

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom

niedrigere Intraobserver-Variabilität, korreliert direkt mit dem Ki-67 Labelling Index und ist ihm in der Praktikabilität des klinischen Alltags überlegen[63].

1.2.2.2. Ki-67-Cut-Off

Ein einheitlicher Cut-off bezüglich Prädiktion, Prognose und Monitoring ist nach wie vor nicht gefunden: Die Grenzwerte variieren je nach Studie zwischen 10-25% [52], [57], [60], mitunter unter Zuhilfenahme einer zusätzlichen Intermediärgruppe zwischen z.B. 8-15% [64]. Abweichungen in der Reproduzierbarkeit der Ki-67-Bestimmung sind im mittleren Bereich zwischen 10-25% am prägnantesten [2], [65]; die Übereinstimmung bei niedrigen (<10%) und hoch proliferierenden Tumoren (>25%) ist gut [2]. Petrelli et al. (2015) empfehlen eine Differenzierung von Tumoren >25%, da diese mit einem erhöhten Risiko für einen karzinombedingten Tod assoziiert sind [52]. Die offene Empfehlung der S3-Leitlinie 2021 unterstützt diese Differenzierung [2]. Trotzdem wird ein einheitlicher Cut-off aufgrund großer Varianz in der Literatur weiterhin Gegenstand von Diskussionen sein und eine Empfehlung bleibt aufgrund der therapeutischen Konsequenzen (Kapitel 1.3.) unerlässlich.

1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom

Das frühe Mammakarzinom bezeichnet alle Brustkrebserkrankungen, die ohne Aufweisen von Fernmetastasen auf die Brust und die lokoregionären Lymphknoten beschränkt sind und deren Therapieansatz kurativ ist [66].

1.3.1. Intrinsische Subtypen

Um eine an die ausgeprägte Tumorerheterogenität des Mammakarzinoms adaptierte Therapie zu realisieren, konnten mithilfe der Analyse von Genexpressionsprofilen einige molekulare Subtypen (Luminal A/B, Her2-positiv, basal-ähnlich) identifiziert werden, die sich in ihrem Ansprechen auf die verfügbaren Therapien und in ihrer Klinik signifikant unterscheiden [2], [67], [68]. Da deren Analyse im klinischen Alltag

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom

jedoch nicht realisierbar ist, wurde eine vereinfachte Stratifizierung mittels immunhistochemischer Surrogatparameter (Hormonrezeptor(HR)-status, Ki-67, Her2-Status) eingeführt (Abbildung 1.3-1):

- HR-positiv (Progesteron(PR)- und/oder Östrogenrezeptor(ÖR)- positiv), Her2-negativ:
 - Luminal A: Ki-67 niedrig
 - Luminal B: Ki-67 hoch
- Her2-positiv:
 - Luminal B: PR- und/oder ÖR-positiv, Ki-67 hoch/niedrig, Her2-positiv
 - HER2-Typ: PR-/ÖR-negativ, Her2-positiv
- Triple-negativ: Basel-Zell-Typ: PR-, ÖR-, Her2-negativ

Das HR-positive, Her2-negative Mammakarzinom beinhaltet mit 80,7% (Luminal A= 37,5%, Luminal B (Her2-neg.)= 43,2%) den Großteil aller Mammakarzinome und ist Gegenstand der folgenden Arbeit[15]. Allgemein zeichnen sich die HR-positiven, Her2-negativen Karzinome durch die vergleichsweise beste Prognose auf, jedoch mit erheblichen Unterschieden zwischen den Luminal-A- und -B-Tumoren, woraus eine unterschiedliche Therapieplanung resultiert (Kapitel 1.3.1.): Das 5-Jahres-Überleben

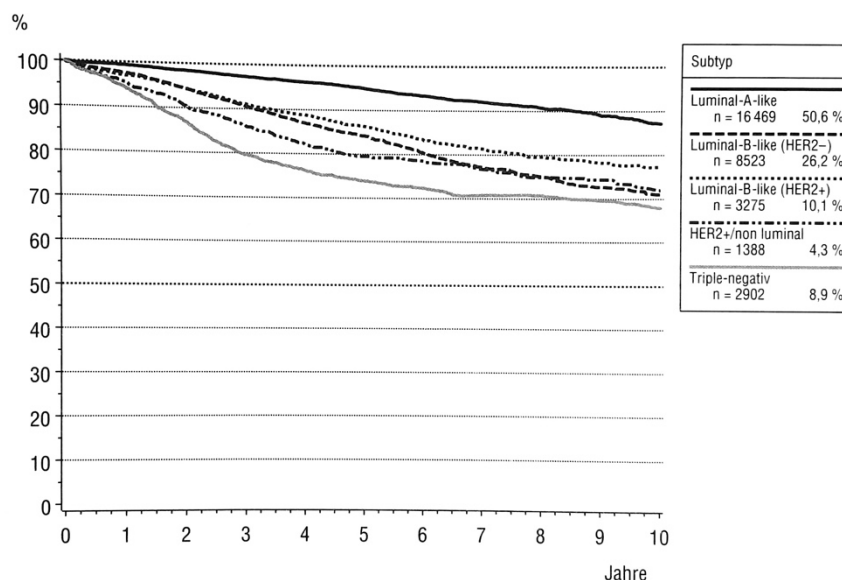


Abbildung 1.3-1 Relatives Überleben in Abhängigkeit von molekularen Subtypen (n=32557), Quelle: Tumorzentrum München (2017), Seite 10, Abbildung 10 (6) Mit freundlicher Genehmigung vom Zuckschwerdt-Verlag

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positiv/ HER2-negatives Mammakarzinom beträgt 94,9% (10-Jahres-Ü.: 87,2%) bzw. 84,2% (10-Jahres-Ü.: 71%) (Abbildung 1.3-1)[15].

Im Gegensatz zu Her2-positiven und HR-negativen Tumoren, welche besonders innerhalb der ersten 1-3 Jahre nach Diagnose ein erhöhtes Risiko für Rezidive aufweisen, haben Patientinnen mit einem Her2-negativen, HR-positiven Mammakarzinom eher ein bedeutend niedrigeres Risiko für Rezidive innerhalb der ersten 5 Jahre. Die Risikoreduktion stagniert jedoch nach 5 Jahren[69]: Über 50% aller Rezidive und zwei Drittel aller karzinomassoziierten Tode bei Her-2-negativen, HR-positiven Mammakarzinomen treten mehr als 5 Jahre nach Diagnose auf (Abbildung 1.3-2)[70]–[72].

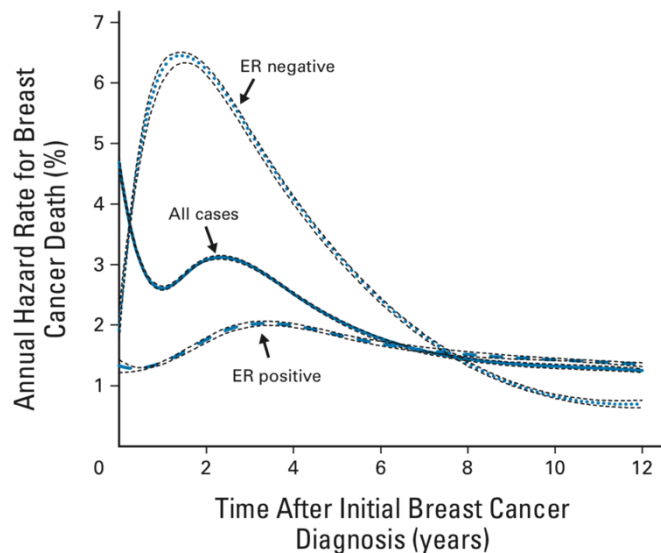


Abbildung 1.3-2 Jährliche Hazard Rate für Brustkrebsassoziierte Todesfälle nach Östrogenrezeptor-negativ und -positiv, n=401693; Quelle: Jatoi I (2011), Figure 1 (7)

Im Vergleich zu den Her2-positiven und Triple-negativen Karzinomen, bei denen eine Chemotherapie klar indiziert ist[73], ist bei diesen Patientinnen eine Chemotherapie oder Verlängerung der endokrinen Therapie daher vom individuellen Rezidenzrisiko abhängig.

1.3.2. Allgemeine Therapieempfehlungen beim HR-positiven, Her2-/neu-negativem Mammakarzinom

Nach Diagnosestellung mittels Vakuum- oder Stanzbiopsie sollte das Karzinomgewebe in sano reseziert werden: Die brusterhaltende Therapie (BET) mit anschließender Radiatio sowie die Mastektomie stehen hier zur Wahl und sind bezüglich des Verlaufs gleichwertig[74]. In Ausnahmefällen (u.a. begrenzte Lebenserwartung, <pT2, pN0) kann nach BET unter Inkaufnahme eines erhöhten Risikos für ein Lokalrezidiv auf eine Strahlentherapie verzichtet werden[75]. Eine Strahlentherapie nach Ablatio erhalten Patientinnen in Ausnahmefällen (Z.n. \geq pT3, \geq 3 axillären LKs,R1/2)[2], [76], ebenso wie eine neoadjuvante Chemotherapie (Kapitel 1.2.).

Das Her2-negative, Hormonrezeptor-positive Mammakarzinom zeichnet sich durch eine günstigere Prognose aus, die u.a. durch die klinische Effektivität der Antihormontherapie zu erklären ist[42]. Sollte ein erhöhtes Risiko für spätere Rezidive vorliegen[70]–[72], empfiehlt die AGO-Leitlinie von 2020, analog zu Davies et al. (2013), die initial auf 5 Jahre begrenzte Hormontherapie (Tamoxifen oder Aromatase-Inhibitoren bei eindeutig nachgewiesener postmenopausaler Situation) je nach Verträglichkeit um weitere 5 Jahre zu prolongieren[2], [77], [78].

Die Therapie des **duktalen Carcinoma in situ** (DCIS) erfolgt mittels Exzision in sano (Resektionsrand \geq 2mm), Radiatio bei brusterhaltender Therapie und ggf. adjuvanter endokriner Therapie mit Tamoxifen zum Schutz der kontralateralen Brust[79].

1.3.3. Mammakarzinom des Mannes

Das Mammakarzinom des Mannes ist mit einem Lebenszeitrisiko von 0,1% selten; im Vergleich liegt das von Frauen bei 12,8%[1]. Für Männer werden daher keine speziellen Früherkennungsmaßnahmen und Screenings empfohlen[2]. Aufgrund u.a. mangelnder Aufklärung der Patienten werden jedoch 40% erst in fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (UICC III/IV)[2]. Die operative Therapie beim **Mammakarzinom des Mannes** erfolgt analog der der postmenopausalen Frau (vollständiger Tumorentfernung, bei günstigem Brust-Tumor-Verhältnis

brusterhaltend, und Sentinel-Lymphknoten-Entfernung)[2]. Eine Radiatio soll unabhängig vom Operationsverfahren bei Tumoren >2cm und positivem Nodalstatus erfolgen. Bei positivem Hormonrezeptorstatus wird die Einnahme von Tamoxifen für 5 Jahre zur endokrinen Therapie empfohlen; eine schlechte Compliance ergibt sich u.a. aufgrund sexueller Dysfunktionen[2]. Aromatasehemmer werden aufgrund einer erhöhten Mortalität nicht empfohlen[2], [80].

1.3.4. Chemotherapie-Empfehlung

Trotz der generell sehr guten Prognose der HR-positiven, Her2-negativen Karzinome, gibt es große Unterschiede bezüglich des Outcomes innerhalb dieser Subgruppe. Kernpunkt der alltäglichen Therapieentscheidung ist es daher, zu identifizieren, welche Patientinnen ein höheres Risiko für ein Rezidiv oder Fernmetastasen aufweisen und daher von einer zusätzlich adjuvanten Chemotherapie profitieren. Aufgrund des Mangels an validierten prädiktiven Markern zur adjuvanten Chemotherapie stellt dies die behandelnden Ärzte jedoch vor große Herausforderungen. Klinisch-pathologische Parameter wie Grading, Tumorgröße, Nodalstatus und weitere können in der Entscheidung unterstützen, sind jedoch nicht präzise in der Prädiktion des Krankheitsverlauf und führen in vielen Fällen zur Übertherapie[81]. Laut IQWiG wurde bei ca. 80% dieser Patientinnen auch ohne Chemotherapie kein Rezidiv innerhalb von 10 Jahren diagnostiziert (nach einer von R. Kreienberg zur Verfügung gestellten unpublizierten Subgruppenanalyse zu Wolters et al.) [82], [83]. Eine akkurate Risikoeinschätzung ist daher essenziell, da Patientinnen mit einem geringen absoluten Risiko nur einen geringen absoluten Nutzen von einer Chemotherapie haben („Low absolute risk implies Low absolute benefit“[84])[2]: Sie müssen andernfalls beträchtliche Nebenwirkungen in Kauf nehmen, die die Lebensqualität mindern (z.B. sensorische Polyneuropathie, Fatigue) oder sogar letal (z.B. sekundäre Leukämie, Herzinsuffizienz) verlaufen können[2]. Um Patientinnen mit einer besseren von denen mit einer schlechteren Prognose abzugrenzen, bietet sich für therapeutische Strategien das biologische Modell mit Unterteilung in Luminal A und B an, welche sich durch eine signifikant

unterschiedliche Prognose voneinander unterscheiden (Abbildung 1.3-1): Die letzten St. Gallen-Konsensus empfiehlt für Patientinnen mit Luminal-A-Tumoren eine alleinige endokrine Therapie und für Patientinnen mit Luminal-B-Tumoren eine zusätzliche adjuvante Chemotherapie[55], [85]. Diskriminierung dieser intrinsischen Subtypen hängt hier jedoch ausschließlich vom Proliferationsfaktor Ki-67 ab, für den es nach wie vor weder einen einheitlichen Cut-off, noch eine Validierung gibt (Kapitel 1.2.2.2.). Keiner der verfügbaren Marker (u.a. Grading) kann zuverlässig zwischen Luminal A und B differenzieren[86].

Neu entwickelte Multigentest, die auf der Analyse unterschiedlicher Genexpressionen beruhen, sollen nun bei der exakten Risikostratifizierung helfen. Die am häufigsten in Deutschland eingesetzten sind OncotypeDX®, MammaPrint®, Prosigna®, sowie der EndoPredict®-Test[2], dessen Performance Gegenstand dieser Arbeit ist.

1.3.5. Multigentests

Basierend auf der Analyse unterschiedlicher Genexpressionen, liefern die neuen Multigentests, mithilfe von u.a. DNA-Microarrays und qRT-PCR, Ergebnisse mit einer Reproduzierbarkeit von mehr als 90%[87], womit sie bezüglich der Validierung den modernen Biomarkern überlegen sind[86].

Für alle vier Multigentests (OncotypeDX, MammaPrint, Prosigna, EndoPredict) liegen umfassende retrospektive Studien vor: Diese konnten verifizieren, dass alle vier Tests Patientinnen der Niedrigrisikogruppe, mit einem 10-Jahres-Fernmetastasenrisiko unter 10%, akkurat identifizieren konnten[2], [72], [88]–[90]. Diese Patientinnen können bei alleiniger endokriner Therapie auf eine adjuvante Chemotherapie verzichten. Die verschiedenen Multigentests analysieren unterschiedliche Gene und decken verschiedene Anwendungsbereiche ab. Bedeutend ist, dass alle Tests unabhängig von klinisch-pathologischen Parametern sind[2], [47]. Für den OncotypeDX- und MammaPrint-Test liegen zusätzlich prospektive Studien vor[91], [92].

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom

Aufgrund nicht ausreichender Datenlage und kurzen Nachbeobachtungszeiten empfiehlt die AGO 2021 die Durchführung der Tests zum derzeitigen Stand nur mit dem „AGO-Empfehlungsgrad +*“ (+* bedeutet übersetzt aus dem Englischen: „diese Untersuchung [...] ist von limitiertem Nutzen für den Patienten und kann durchgeführt werden“ und „[...] sollte[] nur im Kontext der klinisch-pathologischen Faktoren [...] eingesetzt werden“)[93].

Die S3-Leitlinie 2021 empfiehlt die Durchführung eines Multigenassays ebenfalls nur, wenn die konventionellen Marker bei Patientinnen mit Her2-negativem, HR-positiven Tumoren keine eindeutige Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie zulassen[2]. Der Empfehlungsgrad liegt bei 0 (= Empfehlung offen) [2].

Die folgenden vier Multigentest sind die am häufigsten auf dem deutschen Markt vertretenen Tests:

Tabelle 1.3-1 Vergleich von vier Multigentests (MammaPrint®, OncotypeDX®, Prosigna®, EndoPredict®), Quelle: AGO e. V. et al.: „Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs, Guidelines 2021“ unter: https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2021/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2021.pdf (abgerufen am 26.01.2022) [93]

	70-Gen-Signatur (MammaPrint®)	21-Gen Recurrence Score (Oncotype DX®)	PAM50 (Prosigna®)	8-Gen-Signatur (EndoPredict®)
Anbieter	Agendia	Genomic Health	NanoString	Myriad Genetics, Inc.
Typ	70-Gen Assay	21-Gene Recurrence Score	50-Gen Assay	11-Gen Assay
Gewebe	fresh frozen/(FFPE)	FFPE	FFPE	FFPE
Technik	RNA Microarrays	qRT-PCR	Direkte Hybridisierung	q-RT-PCR
Zentrallabor	ja	ja	nein	nein
Indikation	N-/+, < 70 Jahre	N-/+, ER+	postmenopausal, N-/+, ER+ HER2-	pre-/postmenopausal N-/+, ER+ HER2-
Prognose über Rekurrenz >5J.	nein	Ja/nein	ja	ja
Chemo-Prädiktion	wenig validiert	ja	Keine Evidenz	Keine Evidenz (AGO)
Level of Evidence (LoE) + Empf.	Ib +*	Ib +*	2b +*	2b +*

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom

Retrospektive Evidenz	Multizentrische Validierung	NSABP B-14, ATAC MA.12, MA.5, ABCSG8, NSABP B-20, ECOG ATAC 9127, SWOG 8814,	ABCSG6, ABCSG8, GEICAM-9906, ATAC
Prospektive Evidenz	MINDACT (N0, N1)	TAILORX (N0, Low-risk, RS<11), PlanB (N0, Highrisk/N+)	-- --
Risikoklassen	Low-High	Low-intermediate-High	Low-intermediate-High Low-High

1.3.5.1. MammaPrint, OncotypeDX und Prosigna

Der erste Test auf dem Markt war der **MammaPrint®**-Test (Agendia, Niederlande). Er analysiert 70 Gene in initial nur gefrorenem, seit 2017 auch formalinfixiertem, Tumormaterial und wird mittels RNA-Microarrays ausgewertet[47]. Für die Entwicklung wurde mithilfe von Tumorgewebe von nodal negativen, nicht vortherapierten Frauen <70 Jahren, welche innerhalb von 5 Jahren Metastasen entwickelten, sowie solche, welche 5 Jahre krankheitsfrei blieben, divergierend exprimierte Gene identifiziert[47]. Der Test kann sowohl an Patientinnen mit HR-positiven und -negativen, als auch an Her2-positiven und -negativen Karzinomen angewandt werden. Er liefert sowohl bei Nodal-negativen als auch bei Patientinnen mit bis zu 9 positiven Lymphknoten zusätzliche prognostische Aussagekraft[94]. Für die Auswertung ist eine Einsendung des Gewebes in ein Zentrallabor nötig[86]. Der Mindact-Trial lieferte prospektive Evidenz [86], [91]: Das 5-Jahres-Überleben der Niedrigrisikogruppe betrug 94,7%[86], [91]. Bezüglich des Risikos für späte Metastasen oder Rezidive, sowie des Chemotherapie-Nutzens liefert der Test keine separate Aussagekraft[86].

Der weit verbreitete **OncotypeDX®**-Test (Genomic Health, USA), mit Level of Evidence Ib (=einzelne randomisierte kontrollierte Studien[93]), basiert auf der Genexpression von 21-Genen (davon 5 Referenzgene), die mittels qRT-PCR an FFPE-Gewebe ausgewertet werden[86]. Anhand dessen wird durch einen mathematischen Algorithmus ein Recurrence Score (RS: 0-100) erstellt, der Patientinnen in drei Risikogruppen (RS 0–18= niedrig, RS 19–30= intermediär und RS ≥ 31= hoch) einteilt[92]. Die Messungen finden ausschließlich nach Einsenden von Her2-

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom negativem, HR-positiven, nodal-negativen (-und positiven[95]) Tumorgewebe in einem Zentrallabor in Kalifornien, USA statt. Gemäß der prospektiven TailorX-Studie (Nachbeobachtungszeit= 69 Monate) sind bei Patientinnen mit einem intermediären RS von 11-25 die endokrine und chemoendokrine Therapie gleichwertig. Sowohl die prospektiv-randomisierte PlanB-Studie, als auch die TAILORx-Studie konnten bei Patientinnen mit einem niedrigen Oncotype DX Recurrence Score <11, welche ausschließlich eine endokrine Therapie erhielten, ein sehr gutes 3- bzw. 5-Jahres-krankheitsfreies-Überleben mit 98% bzw. 93,8% (PlanB 5-Jahres-DFS: 94%) vorweisen[30], [53], [92], [95], [96]. Nach TAILORx-Studie liegen Langzeitdaten vor mit einem 9-Jahres-krankheitsfreiem-Überleben von 83,3% mit alleiniger endokriner Therapie und von 84,3% mit chemoendokriner Therapie [92]. Der Oncotype DX gibt Aufschluss über die Prädiktion einer Chemotherapie und das Risiko für ein spätes Auftreten (>5 Jahre) von Fernmetastasen[97].

Der als letzter auf den Markt gekommene **Prosigna®** (Nanostring Technologies, USA) ist ein 50-Gen-Assay (5 Kontrollgene), der an FFPE-Gewebe mittels direkter Hybridisierung ohne nötiges Zentrallabor den intrinsischen Subtyp auf Basis der PAM50-Gensignatur bestimmt. Durch einen Risk of Recurrence Score (ROR), ermittelt mithilfe von Tumorgöße und Nodalstatus, gibt er Aufschluss über das individuelle Fernmetastasierungsrisiko und Spätmetastasierung[98] von postmenopausalen, nodalpositiven und -negativen, HR-positiven, Her2-negativen Patientinnen. Die retrospektive Validierung erfolgte aus Tumorgewebeproben aus den Studien ABCSG 8 und TransATAC [90]. Zum derzeitigen Zeitpunkt liegen keine prospektiven Daten vor[86].

1.3.5.2. EndoPredict

Im Folgenden wird die Performance des Multigentests EndoPredict® (Sividon Diagnostics GmbH, Köln, Deutschland; heute Myriad Genetics, Inc.) untersucht, der erstmalig 2011 von Filipits et al. beschrieben wurde[99]. Er ist für post- und prämenopausale Patientinnen mit Her2-negativen, HR-positiven Mammakarzinom mit Befall von 0-3 Lymphknoten geeignet.

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom

Initial wurden anhand von 253 frisch gefrorenen Gewebeproben 22.283 Gene analysiert, die entweder mit Fernmetastasen oder einem 10-Jahres-DFS assoziiert sind. In mehreren Zwischenschritten wurden diese mithilfe von Cox-Regressionsanalysen auf 8 karzinomrelevante Gene reduziert, die verschiedene biologische Prozesse (Proliferation, Apoptose, Zelladhäsion, Zellsignalisierung, Östrogenrezeptor-Expression u.a.) im Verlauf des Karzinomgeschehens abdecken: 3 Zellteilungs-assoziierte Gene (UBE2C, BIRC5, DHCR7), 5 Hormonrezeptor-assoziierte Gene (STC2, AZGP1, IL6ST, RBBP8, MGP) und 3 Referenzgene (CALM2, OAZ1, RPL37A) (Abbildung 1.3-3)[99].

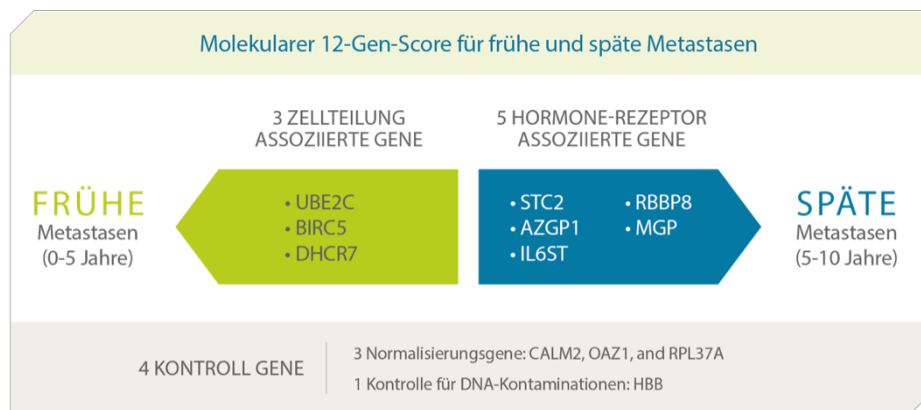


Abbildung 1.3-3 Molekularer 12-Gen-Score

Quelle: Myriad Genetics, Inc.: „Was ist EndoPredict“, unter: <https://EndoPredict.eu/de/was-ist-EndoPredict/#12molecule> (abgerufen am 27.10.2019). (8)

Der EndoPredict wird mittels RT-PCR (reverse Transkriptase PCR) an FFPE-Gewebe durchgeführt. Er kann dezentral an lokalen Pathologischen Instituten verlässlich durchgeführt werden und muss nicht ins Ausland versandt werden. Die individuelle präanalytische Handhabung des Gewebes (Stanzbiopsie oder Operationspräparat [100], Fixierungs- und Lagerungszeiten der Schnitte) hat keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse [98], [101], [102].

Der EndoPredict-Test teilt die Patientinnen in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe ein: Durch Vereinigung von Genexpressionsanalysen mit den klinisch-pathologischen Faktoren Tumorgröße und Nodalstatus, kann seine prognostische Aussagekraft noch verbessert werden[73]. Die Genexpressionen

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom

werden durch mathematisch lineare Kombination zu allererst zum sogenannten „EP Score“ (neu: Molekularer 12-Gen-Score) zusammengefasst (Abbildung 1.3-4)[99]: Die Skala des EP- (bzw. Molekularer 12-Gen-) Scores reicht von 1-15, wobei der Score 1-5 auf ein niedriges Risiko und der Score 5-15 auf ein hohes Risiko für spätere Fernmetastasen hindeutet. Die einzelne Genexpression eines jeden Gens wird, normalisiert nach den Referenzgenen, als Zyklusschwellenwert (Delta Cycle Threshold= DC_T) angegeben.

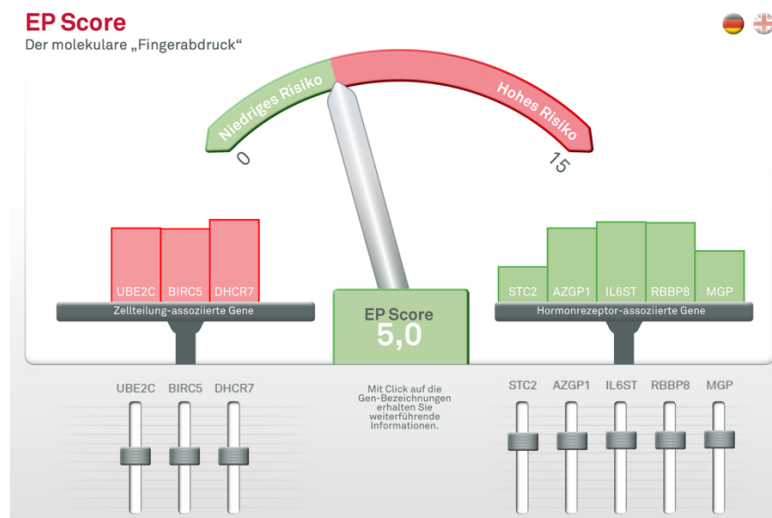


Abbildung 1.3-4 Erläuterung des EP Scores

Quelle: Myriad Genetics, Inc. Unter (10):

<http://www.EndoPredict.com/de/EndoPredict/funktionsprinzip.html> [abgerufen am 12.12.2017]

Durch rechnerische Integration von Nodalstatus und Tumorgröße kann dann der EPclin Score berechnet werden (Abbildung 1.3-5). Er reicht von 1,0 - 6,0. Der Cut-Off liegt bei 3,329, wobei ein Score über 3,329 das Metastasenrisiko in den nächsten 10 Jahre auf >10% schätzt und dementsprechend der Hochrisikogruppe zugeordnet ist. Ein Score unter 3,329 bemisst das Risiko auf <10% und schätzt das Chemotherapie-Nutzen auf <3%. Patientinnen mit einem hohen EPclin Score, welche eine chemoendokrine Therapie erhalten, haben eine signifikant niedrigere Fernmetastasierungsrate, als Patientinnen mit einer rein endokrinen Therapie[103].

1. Einleitung / 1.3. Das frühe Hormonrezeptor-positive/ HER2-negative Mammakarzinom

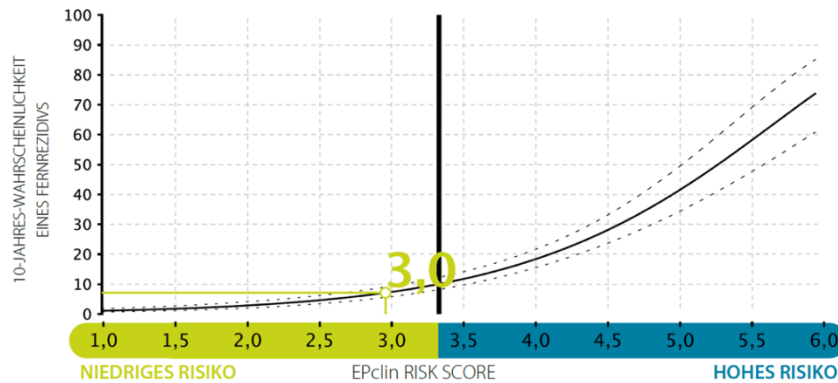
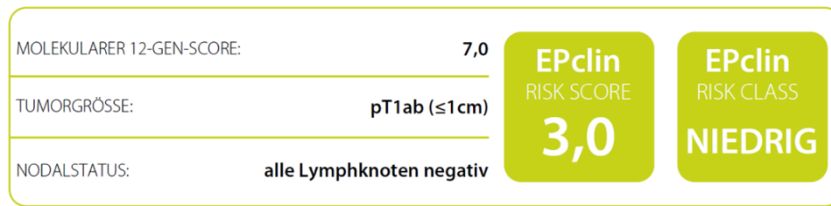


Abbildung 1.3-5 EPclin Risk Score

Quelle: Myriad Genetics, Inc.: „Was ist EndoPredict“, unter: <https://EndoPredict.eu/de/was-ist-EndoPredict/#12molecule> (abgerufen am 27.10.2019). (12)

Patientinnen mit einem niedrigen EPclin Score haben keinen Benefit durch eine zusätzliche Chemotherapie[103](Abbildung 1.3-6).

Jeder Patient erhält einen Ergebnisreport, der das individuelle Risiko für Fernmetastasen, explizit für späte Metastasen (>5-15 Jahre nach Diagnosestellung),

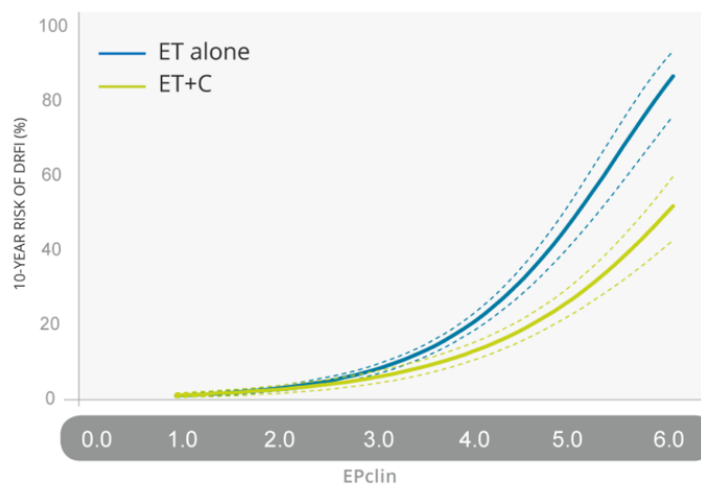


Abbildung 1.3-6 10-Jahres-Risiko für Fernmetastasen entsprechend des EPclin Scores unter Endokriner Therapie (ET) versus Endokriner- und Chemotherapie (ET+C)

Quelle: Myriad Genetics GmbH: „Chemotherapy Benefit“, unter: <https://EndoPredict.eu/chemotherapy-benefit/> (abgerufen am 08.04.2020). (11)

und den absoluten Nutzen einer Chemotherapie nach 10 Jahren angibt [104] (Beispiel eines Ergebnisberichts im Appendix: Kapitel 7.1.4.)

Die klinische Validierung erfolgte mittels zweier retrospektiver randomisierter Studien (ABCSG 6 und 8), welche bestätigten, dass EndoPredict wertvolle prognostische Aussagekraft liefert und Spätmetastasierung vorhersagen kann, unabhängig von klinikopathologischen Faktoren: In der endokrin-therapierten Niedrigrisikogruppe kam es nach zwölfjähriger Beobachtungszeit bei weniger als 2% der Patientinnen zu Fernmetastasen [72], [98]. 47-57% der durch geläufige klinische Leitlinien der Intermediären- oder Hochrisikogruppe zugewiesenen Patientinnen könnten mittels EndoPredict, durch Zuordnung in der Niedrigrisikogruppe, auf eine Chemotherapie verzichten [105]. EndoPredict ist nach retrospektiven Studien den konventionellen klinikopathologischen Risikofaktoren, wie Ki-67, uPA/PAI1 und Grading, überlegen [99], [106].

Das Evidenzlevel der AGO liegt aufgrund fehlender prospektiver Studien derzeit nur bei 2b [93].

Die folgende Dissertation hat das erste prospektive Datenmaterial des EndoPredict-Tests zur Grundlage.

2. Zielsetzung

Ziel der Dissertation ist die Nachbeobachtung des klinischen Verlaufs von 373 Patienten mit Östrogenrezeptor-positiven, Her2/neu-negativem Mammakarzinom, deren Therapie anhand des EndoPredict-Tests entschieden wurde:

- Wie ist die Compliance zur empfohlenen Therapie nach dem EndoPredict-Test?
- Wie ist das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben der Patientinnen?
- In wie weit korrelieren die Rezidiv- und Fernmetastasierungsraten der Patientinnen mit der EPclin-Risikostratifikation?
- Wie viele Patientinnen konnten aufgrund der Ergebnisse des EndoPredict-Tests auf eine Chemotherapie verzichten, im Vergleich zur Therapieempfehlungen nach Ki-67?
- Bietet der EndoPredict-Test eine überlegene Alternative zu den etablierten Prognosefaktoren in der Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie?

Zusätzlich wurde retrospektiv der Ki-67-Index von 307 Patientinnen bestimmt:

- Vor dem Hintergrund, dass der optimale Ki-67-Cut-Off nach wie vor diskutiert wird[41], [56]–[59], wo läge der optimale Cut-Off nach dem EP-/EPclin Score bzw. nach dem Outcome?
- In wie weit korrelieren EndoPredict- und Ki-67-Ergebnisse?
- Kann Ki-67 in unklaren Fällen, neben dem EndoPredict-Test, weiterführende prognostische Aussagekraft liefern?

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkohorte

Das Patientenkollektiv umfasst 373 Patienten (367 Frauen, 6 Männer) mit Östrogenrezeptor-positivem, HER2/neu-negativem Brustkrebs ohne Metastasierung mit maximal 3 befallenen Lymphknoten (maximal pN1c), die sich im Zeitraum von September 2011 bis einschließlich April 2015 einer primären Therapie im interdisziplinären Brustzentrum der Technischen Universität München unterzogen und bei denen zur Therapieentscheidung der EndoPredict® hinzugezogen wurde.

Die Studie wurde nach einem entsprechenden Antrag von der lokalen Ethikkommission der TU München genehmigt.

Ursprünglich umfasste die Kohorte 379 Patienten, von denen jedoch 6 Patienten ausgeschlossen wurden: Vier dieser Patienten hatten sich extern behandeln lassen, so dass deren paraffinierten Tumorblöcke dem Klinikum rechts der Isar nicht zur Ki-67-Färbung vorlagen. Für sie waren zusätzlich keinerlei Informationen bezüglich der erfolgten Therapien, noch des Outcomes einzuholen. Bei zwei Patienten wurde nachträglich ein Nodalstatus von über 3 befallenen Lymphknoten erhoben. Diese Patienten wurden aus der Kohorte ausgeschlossen, da der EndoPredict-Test® bei Befall von über 3 Lymphknoten nicht mehr geeignet ist. Tumore, welche im pT4-Stadium die Haut oder Brustwand, zu der die Rippen, der vordere Serratusmuskel und die interkostale Muskulatur zählen, ausgenommen eine Infiltration der Pektoralismuskulatur, infiltrierten, wurden in die Kohorte von Beginn an nicht eingeschlossen, da Tumore dieses Stadiums für den EndoPredict-Test nicht geeignet sind. Patientinnen mit einem DCIS-Tumor wurden von Beginn an nicht in die Kohorte eingeschlossen.

Bei 14 Patientinnen zeigte sich bei Diagnosestellung ein beidseitiges Mammakarzinom. An beiden Tumoren wurde der EndoPredict-Test® separat durchgeführt. Aufgrund der eventuell verfälschten Prognoseeinschätzung entschieden

wir uns, jeweils nur die Tumorseite mit dem prognostisch ungünstigeren EndoPredict-Ergebnis in die Kohorte aufzunehmen.

In die Kohorte bezogen wir prämenopausale und postmenopausale Patientinnen ein, sowie sechs Patienten männlichen Geschlechts.

Zehn Patientinnen unterzogen sich u.a. aufgrund von inoperablen Tumoren oder ungünstiger Brust-Tumor-Größenrelation einer primär systemischen Therapie; bei Ihnen wurde der EndoPredict-Test mittels Test-Kit an der Biopsie vor der neoadjuvanten Therapie durchgeführt (Kapitel 3.2.1. EndoPredict - Durchführung).

Diverse allgemeine Patienteninformationen (u.a. Geburtsdatum, Menopausenstatus, Geschlecht) wurden anamnestisch oder aus den klinikinternen Datenbanken ODSeasy, SAP oder dem Tumor- und Mammaboard erhoben.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurde bei allen Patientinnen operativ bzw. stanziobiologisch Tumorgewebe entnommen. Den S3-Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft entsprechend, wurde das Tumormaterial histopathologisch in Hinblick auf Tumortyp (invasiv-duktral, invasiv-lobulär und weitere), Grading nach dem sogenannten BRE-Score (nach Bloom, Richards und Scarff, modifiziert nach Ellis; G1-G3 nach TNM-Klassifikation), Progesteron-Rezeptorstatus, Östrogen-Rezeptorstatus, Resektionsstatus (R0-R2 nach TNM-Klassifikation), Her2/neu-Rezeptorstatus sowie bei 181 Patientinnen bezüglich der Proteasen uPA und PAI-1 im Institut für Pathologie des Klinikums rechts der Isar untersucht. Bei fraglichem Staging wurden der Nodalstatus, die Tumorgöße, sowie die Multizentrität mithilfe apparativer Diagnostik (Sonographie, Röntgen-Aufnahmen, Mammographie und weitere) bestimmt.

Das entnommene Tumorgewebe wurde anschließend in 10% neutral-gepuffertes Formalin fixiert und, aufgeteilt auf mehrere Gewebelöcke, in Paraffin eingebettet (FFPE). An allen Patienten wurde anschließend der EndoPredict®- Test (Sividon Diagnostics; heute Myriad Genetics, Inc.) angewandt.

3.1.1. Informationsdatenbanken

Für die Datenerhebung der Patienteninformationen wurden u.a. das Münchner Tumorregister, das ODSeasy und die elektronische SAP-Patientenakte zu Hilfe genommen.

Das Münchner Tumorregister ist eine Einrichtung der medizinischen Fakultäten der Technischen Universität München und der Ludwig-Maximilians-Universität München, welches vom Institut der Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) im Klinikum Großhadern geführt wird. Es werden Krankheitsverläufe unter Quantifizierung von Inzidenz, Mortalität, u.a. einer Erkrankung dokumentiert.

Das ODSeasy wird als Tumordokumentationssystem aller gynäkologischen Krebspatientinnen, mit dem Schwerpunkt Mammakarzinom und Ovarialkarzinom, in der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar genutzt.

Für weiterführende Informationen sind für Patientinnen im Klinikum rechts der Isar Patientenakten mit der SAP-Software angelegt, welche ebenfalls zur Datenerhebung genutzt wurden.

3.2. EndoPredict® Test

3.2.1. Durchführung

Im Labor der Pathologie der TU München als qualifizierte Molekularpathologie wurde der EndoPredict®-Test mittels EndoPredict®-Kit an geeigneten Tumorgewebeblöcken jeder Patientin durchgeführt. Unter den Gewebeblöcken zur Testung des EndoPredict®, waren 10 Blöcke, dessen Gewebe zuvor stanzbioptisch gesichert worden war.

EndoPredict®-Kit:

- EndoPredict® UNO Platte, geeignet zur Analyse einer Patientenprobe, inklusive 8er Deckelstreifen und Kurzanleitung
- EndoPredict® DUO Platte, geeignet zur Analyse zweier Patientenproben, inklusive 8er Deckelstreifen und Kurzanleitung

- EndoPredict® PICO qREF (6 x 15µl qREF RNA, Positivkontrolle) und EndoPredict PICO qPCR-H₂O (6 x 1ml qPCR-H₂O), ausreichend für 6 EndoPredict UNO- oder DUO-Platten

Weitere Geräte, Materialien und Reagenzien

- RNase-freie Einmalreaktionsgefäße (1,5ml, 5ml)
- RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter in entsprechenden Größen
- Zentrifuge für PCR-Platten
- Tiefkühlbarer Thermoständer für Reaktionsgefäße (-20°C)
- Gekühltes Thermo-Pipettiergestell für die PCR-Platten und QC-Streifen
- 96-Well-Base zur Zentrifugation der QC-Streifen
- Optional: Verschlusshilfe für Optical Caps (z.B. Strip Cap Tool, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Optional: elektrische Multi-Pipette

Die aus dem FFPE-Tumorgewebe entnommene Gewebeprobe (Tumoranteil mindestens 30%) wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, wo mittels Tissue Preparation Reagents (Sividon Diagnostics, heute Myriad Genetics, Inc.) bzw. VERSANT® Tissue Preparation Reagents (Siemens Healthcare Diagnostics) RNA isoliert wird. Zur Prüfung der extrahierten RNA auf eine ausreichende Menge, sowie einen effizienten DNA-Verdau, welche als Voraussetzung für ein valides EndoPredict®-Testergebnis gilt, wurde ein EndoPredict® Quality Control Streifen verwendet.

Nach Pipettieren der im Kit enthaltender Reagenzien (PCR-Mastermix: qPCR-H₂O, 2x Reaction Mix, Super Script® III RT/Platinum® Taq Mix) mit der gewonnen RNA nach Anleitung des Herstellers (Gebrauchsanweisung EndoPredict® Sividon Diagnostics GmbH; Myriad GmbH 2014) wurde die Substanz auf die EndoPredict® UNO/DUO Platte im VERSANT® kPCR System AD Modul aufgetragen.

Dort erfolgte basierend auf der Technologie der quantitativen Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkription (RT-qPCR) die Analyse der 8 Tumorgene (BIRC5, UBE2C, DHCR7, RBBP8, IL6ST, AZGP1, MGP und STC2), sowie der 3 Referenzgene (CALM2, OAZ1 und RPL37A), welche deren Expression im Tumorgewebe wiedergibt. Die Messdaten wurden in die Software EndoPredict® Report Generator exportiert.

Neben einer Qualitätsprüfung ließ sich nun anhand der Genexpressionsanalyse durch einen mathematischen Algorithmus aus den Hormonrezeptor-assoziierten Genen (STC2, AZGP1, IL6ST, RBBP8, MGP) und den Zellteilungs-assoziierten Genen (UBE2C, BIRC5, DHCR7) der EP Score (12-Gen-Score) berechnen.

Durch zusätzliche Angabe der Informationen bezüglich Tumorgröße nach TNM-Klassifikation (pT1ab; pT1c; pT2; pT3) und Nodalstatus (negativ; 1-3 positive Lymphknoten) konnte der EPclin Score berechnet werden.

3.3. Ki-67

3.3.1. Kollektiv der Tumorblöcke

Ki-67 konnte retrospektiv für 307 Patientinnen immunhistochemisch bestimmt werden. Anhand der vorhandenen Tumorblöcke wurden mithilfe einer erfahrenen Pathologin makroskopisch geeignete Tumorblöcke ausgewählt.

Bezogen auf die Gesamtkohorte von 373 Patientinnen konnten folgende Tumorblöcke nicht verwendet werden (siehe Tabelle 3.3-3):

- Tumorblöcke von 18 Patientinnen aufgrund von externer Archivierung
- Tumorblöcke von 12 Tumorblöcke, da diese nicht auffindbar waren
- Tumorblöcke von 8 Patientinnen mit Z.n. primär systemischer Therapie vor Tumorblockentnahme, dementsprechend ohne Gewährleistung der Aussagekraft der Ki-67-Färbung
- Tumorblöcke von 3 Patientinnen aufgrund der Entsorgung nach Parasitenbefalls (Dermestidae)

Von 13 Patientinnen war schon vor Beginn des Projekts eine Ki-67-Färbung angefertigt worden, welche nun von einer erfahrenen Pathologin wiederholt ausgewertet werden konnte und keiner weiteren Färbung mehr bedurften. Von 6 Patientinnen wurden Biopsiepräparate zur Färbung gewählt, welche in die Ki-67-Kohorte eingeschlossen werden konnten.

3.3.2. Erstellen der Schnitte

Die Tumorblöcke wurden vor Anfertigen der Schnitte auf der Kühlplatte COP-30 (SKU: 02-1130-00) der Firma Medite Cancer Diagnostics, Inc., auf -15 Grad gekühlt. Nach Voreinstellung des Schneidmessers auf den zu schneidenden Tumorblock, wurden mithilfe des Microtoms Microm HM 335 E (GMI, SKU: 8243-30-0001) jeweils 4 Leerschnitte von 5µm eines jedes Tumorblockes angefertigt. Unter Zuhilfenahme von zwei Feinhaarpinsel der Firma Brunnen (10-48909-BR, Größe 4 und 0) wurden die Schnitte vom Schneidmesser zum Paraffinstreckbad TFB 35 der Firma Medite (Art.-Nr. 01-3500-02) geführt und dort manuell auf Adhäsionsobjektträger von Thermo Scientific SuperFrost®Plus (Artikelnummer: 10149870) gezogen. Anschließend wurden die Objektträger nach Datum und Histologienummer des Archivs der Technischen Universität München gekennzeichnet und die Schnitte zum Trocknen in Färbekasten nach Schiefferdecker (Material: Kalk-Soda-Glas, Fassmenge: 20 Objektträger, Artikelnummer H551.1, Firma Carl Roth GmbH & Co. KG) gestellt.

3.3.3. Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Zur Sicherstellung von vorhandenem Tumorgewebe auf dem ausgewählten Schnitt wurde jeweils ein Leerschnitt eines jeden Blockes mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) nach einem laborinternen Färbeprotokoll gefärbt:

Tabelle 3.3-1 Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll

Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
1. Vorbereitung:	
1.1.	Wärmeschrank 60 Grad 30min.
2. Entparaffinieren:	
2.1.	2x 10 min. Xylol
2.2.	2x 5 min. % Isopropanol
2.3.	5 min. 96% Ethanol
2.4.	5 min. 70% Ethanol
3. Färbung:	
3.1.	2 x 2,5 min. TBS- Puffer (Tris-buffered Saline)
3.2.	5 min. Hämalaun, filtriert
3.3.	10 min. bläuen unter fließendem, warmem Leitungswasser
3.4.	2x 2 min Aqua dest.
3.5.	1 min. färben in 0,1 % Eosin
3.6.	2x kurz auswaschen in Aqua dest.
3.7.	Differenzieren in 1 min. 70 % Ethanol
3.8.	3 min. 96 % Ethanol
3.9.	2x 3 min. Iso
3.10.	2x 3 min. Xylol
4. Nachbereitung	
4.1.	Belegung mit Deckgläser durch Corbitbalsam-Fixierung

Das Resultat einer HE-Färbung sind angefärbtes blassrotes Zytoplasma, violett-blaue Zellkerne, rote Muskelfasern und rotes kollagenes Bindegewebe im Gewebeschnitt. Mikroskopisch wurden darauffolgend alle HE-gefärbten Schnitte mit Hilfe derselben erfahrenen Pathologin auf das Vorhandensein von Tumorgewebe geprüft, um zu gewährleisten, dass die richtigen Tumorschnitte für die immunhistochemische Ki-67-Färbung ausgewählt worden waren. Auch vermerkt wurden Schnitte, auf denen wenig Tumorgewebe vorhanden war. Von Patientinnen, auf deren Tumorgewebeschnitten

kein Tumorgewebe zu finden war, wurden Schnitte von Alternativblöcken oder eine wiederholte Färbung angefertigt.

Von 9 Patientinnen war auch nach wiederholtem Anfertigen von Schnitten und Färbungen kein Tumorgewebe sicherzustellen. Von 13 Patientinnen konnte nur wenig Tumorgewebe dargestellt werden.

3.3.4. Ki-67 Färbung Ventana

Die Ki-67-Färbung wurde nach den Empfehlungen der ‚International Ki-67 in Breast Cancer Group‘ von 2011 durchgeführt[50]. Die immunhistochemische Färbung wurde mittels des VENTANA-Färbesystems BenchMark XT der Firma Roche Deutschland Holding GmbH mithilfe des OptiView DAB IHC Detection Kit (Katalognummer: 760-700, Ventana Medical Systems, Inc.) auf speziell für immunhistochemische Färbungen geeigneten Objektträgern (Thermo Scientific SuperFrost®Plus) angefertigt.

Die VENTANA-Färbesysteme automatisieren Färbeschritte der Immunhistochemie und ggf. in-situ-Hybridisierung. Durch die VENTANA Routinemaschine werden die meisten immunhistochemischen Färbungen im klinischen Alltag am Klinikum rechts der Isar durchgeführt, wodurch aufgrund standardisierter Färbebedingungen konsistente und reproduzierbare Resultate gewährleistet werden können. Wegen der unzureichenden Vergleichbarkeit in Bezug auf den klinischen Alltag wurde daher auf eine manuelle immunhistochemische Färbung verzichtet.

Als Antikörper wurde der monoklonale Antikörper (Typ IgG1/k) der Maus MIB-1 der Firma Medac Diagnostika GmbH (VWRKILM9252-C05; 0,5ml) gewählt, welcher während des Nicht-Verwendens bei 2-8°C gekühlt gelagert wurde[108]. Zur Positivkontrolle, sowie um die Funktionsweise und optimale Verdünnung des Antikörpers zu testen, wurden vorhergehend Gewebeproben von Tonsillen mithilfe des MIB1-Antikörpers gefärbt. Die optimale Verdünnung des MIB-1-Klons von Medac Diagnostika liegt zwischen 1:150- 1:300[108].

Zur Vorbereitung der Immunhistochemie wurden die angefertigten Tumorschnitte vor der Färbung über Nacht bei 36 Grad im Trockenschrank Typ UM400 (Produkt ID:

17620) der Firma Memmert GmbH & Co. KG gelagert. Jede Färbung wurde mittels eines Barcode-Druckers mit einem probenspezifischen Etikett nach Datum, Histologienummer des Archivs der TUM und Protokoll des immunhistochemischen Färbeprozesses codiert, um die spätere Auswertung zu erleichtern.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte durch die Ventana Benchmark XT vollautomatische Färbepattform im XT ultraView DAB v3 „T MIB-1“-Färbeprotokoll 207 der Experimentellen Pathologie des Klinikums rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, München.

Die Protokollschritte des Färbeprozesses waren wie folgt (gesamtes detailliertes Färbeprotokoll findet sich im Appendix in Tabelle 7.2-1):

Tabelle 3.3-2 MIB1-Ki-67-Färbeprotokoll VENTANA[109]

Ki-67-Färbung des MIB1-Klons in der VENTANA BenchMark XT
1) Entparaffinierung durch Hitze und EZPrep ^b , Cover Slip ^c
2) Hitzevorbehandlung bis 76°C, Cover Slip ^c
3) Cell Conditioner ^d und Cover Slip ^c auftragen
4) Titration mit Reaktionspuffer ^e und UV Peroxidase Inhibitor ^g , Cover Slip ^c
5) Antikörperauftrag, Inkubation, Reaktionspuffer ^e , UV HRP Universal Multimer ^g , UV DAB ^g , UV DAB H ₂ O ₂ ^g , UV COPPER ^g , Cover Slip ^c
6) Gegenfärbung mit COUNTERSTAIN 2 Gegenfärbung, Inkubation und Reaktionspuffer ^e , Cover Slip ^c
7) Nach-Gegenfärbung mit BLUING REAGENT ^h Nach-Gegenfärbung, SSC Wash ^f , Reaktionspuffer ^e , Cover Slip ^c
<u>Erläuterungen</u>
^b EZ Prep Concentrate solution (Katalognummer 950-102, Bestellnummer 05279771001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) zum Entfernen des Paraffins vom Gewebe [110]
^c Cover Slip (Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) = vorverdünnte Deckglaslösung, die als Barriere zwischen den wässrigen Reagenzien und der Luft dient. Dies verhindert die Verdunstung und liefert dadurch eine stabile wässrige Umgebung für die Immunhistochemie[111]
^d Cell Conditioner (Katalognummer 950-124, Bestellnummer 05279801001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) = vorverdünnte Lösung als Vorbehandlungsschritt bei der Verarbeitung von Gewebeproben für immunhistochemische Reaktionen [112]

^e Reaktionspuffer (Katalognummer 950-300, Bestellnummer 05353955001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) = Pufferlösung auf Tris-Basis (pH 7,6 ± 0,2) zur Spülung der Objektträger zwischen Färbungsschritten zur Gewährleistung einer stabilen wässrigen Umgebung für die Immunhistochemie[113]

^f SSC = Sodium Chloride Sodium Citrate Buffer (Katalognummer 950-110, Bestellnummer 05353947001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) = Natriumchlorid-Natriumcitrat-Pufferlösung zur Stringenzwaschung und Spülen der Objektträger zwischen den Färbungsschritten zur Gewährleistung einer stabilen wässrigen Umgebung für die Immunhistochemie[114]

^g Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit (Katalognummer 760-500, Bestellnummer 05269806001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.)-Komponenten[115]:

1. ultraView Universal DAB Inhibitor (enthält 3 % Wasserstoffperoxidlösung)
2. ultraView Universal HRP Multimer (enthält HRP-markierten Antikörpern (Ziege-Anti-Maus-IgG, Ziege- Anti-Maus-IgM und Ziege-Anti-Kaninchen) (< 50 µg/mL) in einem proteinhaltigen Puffer mit dem Konservierungsmittel ProClin 300)
3. ultraView Universal DAB Chromogen (enthält 0,2 % 3,3'- Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, firmeneigenen Stabilisatorlösung mit firmeneigenen Konservierungsmittel)
4. ultraView Universal DAB H₂O₂ (enthält 0,04% Wasserstoffperoxid in Phosphatpufferlösung),
5. ultraView Universal Copper (enthält Kupfersulfat (5g/L) in Acetatpuffer mit firmeneigenem Konservierungsmittel)

^h Bluing Reagent (Katalognummer 760-2037, Bestellnummer 05266769001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.)= wässrige Lösung von gepuffertem Lithiumcarbonat[116]

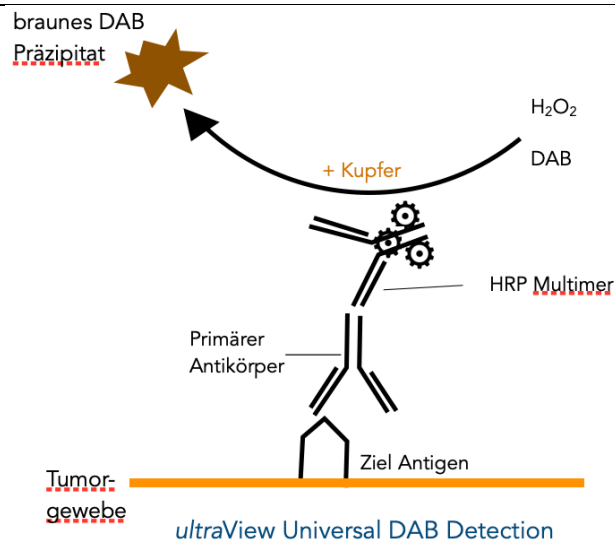


Abbildung 3.3-1 ultraView Universal DAB Detection; adaptiert von (9)

Im ersten Schritt der immunhistochemischen Färbung durch den MIB1-Klons wurden alle Objektträger mithilfe von EZ Prep Concentrate Solution (Katalognummer 950-102, Bestellnummer 05279771001, Ventana Medical Systems, Inc.) [110], Waschschrinen und Hitzebehandlung mit 75°C und 76°C für jeweils 4 Minuten

entparaffiniert. Mithilfe von Cell Conditioner (Katalognummer 950-124, Bestellnummer 05279801001, Ventana Medical Systems, Inc.) sowie Natriumchlorid-Natriumcitrat-Pufferlösung (Katalognummer 950-110, Bestellnummer 05353947001, Ventana Medical Systems, Inc.), welches zur Stringenzwaschung und Spülen der Objektträger zwischen den Färbungsschritten zur Gewährleistung einer stabilen wässrigen Umgebung geeignet ist, wurde das Gewebe für die Immunhistochemie vorbehandelt[112], [114]. Nach jeder Inkubation führte die BenchMark XT Waschschriffe durch, wodurch ungebundenes Material von den Schnitten entfernt wurde[115]. Zusätzlich wurde eine Coverslip-Lösung aufgetragen, die als Barriere die Verdunstung von wässrigen Reagenzien vom Objektträger minimiert[117] und, wie auch der Reaktionspuffer (Katalognummer 950-300, Bestellnummer 05353955001, Ventana Medical Systems, Inc.), auf Tris-Basis ($\text{pH } 7,6 \pm 0,2$) ebenfalls eine stabile wässrige Umgebung für die Immunhistochemie gewährleistet[111], [113].

Zum Nachweis der gebundenen MIB-1-Maus-Antikörper und damit Identifizierung des Ki-67-Antigens diente das ultraView Universal DAB Detection Kit (siehe Tabelle 3.3-2 MIB1-Ki-67-Färbeprotokoll VENTANA[109]). Das Kit verwendet den Universal HRP Multimer zur indirekten Antikörper-Nachweismethode (siehe Abbildung 3.3-1 ultraView Universal DAB Detection): Das Gemisch aus HRP-markierten Antikörpern (Ziege-Anti-Maus-IgG, Ziege-Anti-Maus-IgM, Ziege-Anti-Kaninchen) in einem proteinhaltigen Puffer mit Konservierungsmittel ProClin 300 richtet sich als Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper. Durch ein Enzym mit einem entsprechenden Substrat-Chromogen-System werden an Antigene gebundene Antikörper durch ein kupferverstärktes Wasserstoffperoxidsubstrat und 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)-Chromogen als braunes Präzipitat unter dem Lichtmikroskop sichtbar[115].

3.3.5. Auswertung Ki-67-Färbung

Um konstante Auswertungen zu gewährleisten, wurden anschließend alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte verblindet ohne Kenntnisse der EndoPredict-Ergebnisse einheitlich von derselben auf Brustkrebs spezialisierten

Pathologin mikroskopisch untersucht, so dass die Interobserver-Variabilität ausgeschaltet werden konnte. Die Färbungen wurden nach klinischen Maßstab der „International Ki-67 in Breast Cancer Group“ mithilfe der vereinfachten 5-Stufen-Skala (Eye-5-Methode), beschrieben durch Hida A, et al. (2015), ausgewertet (Kapitel 1.2.2.1. [63]).

Von 16 Patientinnen konnte aufgrund der Beschaffenheit des Gewebes auch nach zweifacher Wiederholung keine auswertbare Ki-67-Färbung angefertigt werden.

Tabelle 3.3-3 Ki-67-Kohorte Erläuterungen für Ein- und Ausschluss von Patientinnen

Einschluss in die Ki-67-Kohorte	Anzahl der Patientinnen (N = 307)
Ki-67 gefärbt	275
Ki-67 gefärbt - wenig Tumor	13
Ki-67 gefärbt - an Biopsie	6
vorher schon auswertbares Ki-67	13
Ausschluss aus Ki-67-Kohorte	Anzahl der Patientinnen (N = 66)
kein Tumor auf Gewebeblöcken	9
nicht auswertbar; 2x wiederholt	16
externe Tumorblöcke	18
keine archivierten Tumorblöcke	12
Zustand nach PST	8
Entsorgt nach Parasitenbefall	3
Gesamtzahl	373

Insgesamt konnte für 307 Patienten eine Ki-67-Färbung ausgewertet werden.

Zusammenfassend veranschaulicht dies die Tabelle 3.3-3.

Zur Vereinfachung der Auswertung wurde in eine EndoPredict-Kohorte mit 373 Patienten, sowie eine Ki-67-Kohorte mit 307 Patienten unterteilt.

3.4. Follow-Up

Parallel zur Anfertigung der immunhistochemischen Ki-67-Färbungen wurde ab Januar 2017 bis Oktober 2017 durch das Qualitätsmanagements des Interdisziplinären Brustzentrums der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar ein Follow-Up der 373 Patienten durchgeführt.

Mittels telefonischer Kontaktaufnahme zu den Patientinnen wurden Informationen über den Krankheitsverlauf auch in Hinblick auf Rezidive, Metastasen und über die Compliance zur endokrinen Therapie, ggf. empfohlenen Chemotherapie und ggf. empfohlenen Radiotherapie eingeholt. Auch nach den Gründen bei fehlender Compliance des Patienten wurde gefragt.

Exakt auf die gesuchten Informationen zugeschnitten, wurde ein Fragebogen erstellt, welcher vier Fragen beinhaltet:

Frage 1, bezüglich Lokalrezidiv und Metastasen: Gab es im Zusammenhang mit dem Brustkrebs nochmal ein Ereignis?

Antwortmöglichkeiten: „nein“ oder „ja“

wenn „ja“:

"an der gleichen Brust"; „Wann?“

„auf der Gegenseite“; „Wann?“

"wo anders im Körper“; „Wo?“ „Wann?“

Frage 2, bezüglich einer Chemotherapie: Haben Sie eine Chemotherapie erhalten?

Antwortmöglichkeiten: „ja“ oder „nein“

wenn „nein“:

„weil nicht empfohlen“

„weil: ___?“

Frage 3, bezüglich einer Bestrahlung: Haben Sie eine Strahlentherapie erhalten?

Antwortmöglichkeiten: „ja“ oder „nein“

wenn „nein“:

„weil nicht empfohlen“

„weil: ___?“

Frage 4, bezüglich einer endokrinen Therapie: Nehmen Sie aktuell noch Tabletten ein bzw. haben Sie Tabletten gegen die Erkrankung eingenommen?

Antwortmöglichkeiten: „ja“ oder „nein“

Weitere Antwortmöglichkeiten: Welche Tabletten? „Tamoxifen“, „Arimidex“, „Anastrozol“, „andere: ___“

Wenn ja: „Seit wann?“

Wenn nein:

„Seit wann nicht mehr?“

„Warum nicht mehr?“ Antwortmöglichkeiten: „Nebenwirkungen/ eigener Wunsch“, „Arzt Empfehlung“, „nach 5 Jahren fertig“, „weiterer Grund: ___“

Der verwendete Fragebogen ist im Appendix in Abbildung 7.2-1 und Abbildung 7.2-2 zu finden.

Die Noncompliance der Endokrinen Therapie wurde definiert als nicht erfolgte Medikamenteneinnahme für mindestens 5 Jahre, unabhängig von der Dauer der Einnahme und den Gründen des Therapieabbruchs.

Ob Patientinnen, die eine Chemotherapie vor Abschluss der empfohlenen Zyklen abbrechen, als compliant gezählt wurden, wurde von der Anzahl der Zyklen abhängig gemacht, die vollständig durchgeführt wurden: So brachen zwei Patientinnen die Chemotherapie nach 3 von 4 Zyklen ab, eine Patientin nach 12 von 14 Zyklen. Beide Patientinnen stuften wir aufgrund der fast abgeschlossenen Chemotherapie-Zyklen als compliant ein.

Die Radiotherapie wurde nur als compliant eingestuft, soweit alle Bestrahlungstermine eingehalten wurden.

Tabelle 3.4-1 Quelle des Follow-Ups

Quelle des Follow-Ups	Anzahl der Patientinnen (N = 373)
Telefonisch: Patient	270
Fragebogen per Fax an Arzt	35
ODSeasy	35
Tumorregister	12
Telefonisch: Angehörige des Patientinnen	9
SAP	4
Persönlich im Klinikum rechts der Isar	3
Fragebogen per Brief an Patient	2
Arztbrief im Klinikum rechts der Isar	2
Telefonisch: behandelnder Arzt	1

Bei Nichterreichbarkeit des Patientinnen nach wiederholten Versuchen wurde der behandelnde Hausarzt oder Gynäkologe via Faxfragebogen oder telefonisch kontaktiert. Beigelegt wurde die vom Patientinnen unterschriebene „Einwilligungserklärung zur Weitergabe von Informationen, welche den Patientinnen betreffen, unter den behandelnden Ärzten“.

Konnten weder die Ärzte noch der Patient erreicht werden, so wurde auf den letzten Termin zurückgegriffen, an dem der Patient im Klinikum rechts der Isar vorstellig geworden war. Dies erfolgte mittels interner Datenbanken ODSeasy, SAP oder aktueller Arztbriefe. Auch das Münchner Tumorregister wurde auf Informationen überprüft, die bei aktuellerer Datenlage daraus bezogen wurden.

Bezüglich eines Zweitkarzinoms der Patientinnen wurden Informationen aus den klinikinternen Datenbanken ODSeasy und SAP, sowie aus dem Tumorregister eingeholt, sowie im Einzelfall im Rahmen des telefonischen Follow-Ups.

Zwei Patientinnen wollten telefonisch keine Information weitergeben, waren jedoch mit dem Ausfüllen des Fragebogens und der Einsendung via postalischem Weges

einverstanden. Zwei Patientinnen gaben ihren Fragebogen persönlich im Klinikum rechts der Isar ab. In einzelnen Fällen, u.a. wenn der Patient verstorben oder nicht zu kontaktieren war, wurde telefonisch ein Angehöriger befragt.

Alle Informationen der ausgefüllten Fragebögen wurden, größtenteils codiert, in die Excel-Tabelle übertragen.

Das Ziel des Follow-Ups war das Einholen von aktuellen Informationen der Patientin, welche weniger als 3 Monate zurücklagen, um ein möglichst langes Follow-up zu gewährleisten. War dies nicht möglich, konnten statistisch auch Informationen, welche mehr als 3 Monate zurücklagen, verwendet werden.

3.5. Statistik

Sowohl die histopathologischen Parameter jeder der 373 Patienten (Tumorgröße, Tumortyp, Grading, Nodalstatus, Menopausenstatus, Hormonrezeptorstatus, Multizentrität, Resektionsstatus; Ki-67, uPA/PAI-1, EP- und EPclin Score), die Informationen des Follow-Ups über das Patientenoutcome (Lokalrezidiv, Metastasen, Second Malignancy), als auch die Compliance zur Chemotherapie, Radiotherapie und endokrinen Therapie (inkl. Wirkstoff) wurden in einer Microsoft Excel-Tabelle (Version 16.27 für Mac), soweit möglich, zahlenkodiert erfasst und chronologisch nach Datum der EndoPredict-Testdurchführung sortiert und anonymisiert.

Im Rahmen der statistischen Auswertung des Projekts wurde das Programm R Version 3.2.0. verwendet.

Es kamen unterschiedliche statistische Tests zur Verwendung:

Korrelation zweier Parameter wurde mithilfe der Pearsons-Produkt-Moment-Korrelation bestimmt, welche immer einen linearen Zusammenhang beschreibt und mithilfe des Korrelationskoeffizienten r angegeben wird (z.B. kein linearer Zusammenhang: $r = 0$; schwacher Zusammenhang: $r = +/-0.10$, mittelstarker Zusammenhang: $r = +/-0.30$, starker Zusammenhang: $r = +/-0.50$.)[118].

Unterschiedliche Chi-Quadrat-Tests, welche zwei nominal skalierte Merkmale auf stochastische Unabhängigkeit prüfen, kamen zum Einsatz: Der McNemar-Test mit Stetigkeitskorrektur vergleicht zwei verbundene Stichproben hinsichtlich eines

dichotomen Merkmals und kann z.B. Aufschluss darüber geben, bei wie vielen Patientinnen es zu einer Änderung eines Parameters kam. Pearsons Chi-Quadrat-Test vergleicht beobachtete mit erwarteten Verteilungen; Yates Stetigkeitskorrektur wurde hier bei kleinen Prüfgrößen modifizierend angewandt[119].

T-Tests prüfen, ob zwei Stichproben sich statistisch signifikant unterscheiden: Zum Einsatz kam der Zweistichproben-t-Test, welcher auf Differenz zweier Mittelwerte getestet, wenn die Varianzen in etwa gleich sind. Falls dies nicht der Fall ist, wurde der Welch's-T-Test als Näherungslösung angewandt[119].

Wilcoxon-Rank-Sum-Test ist ein nicht-parametrischer T-Test und vergleicht beobachtete Rangsummen mit erwarteten Rangsummen. Er wurde u.a. für den Vergleich von Medianen unterschiedlicher Parameter verwendet[119].

Disease-free-Survival und Overall-Survival können graphisch mithilfe von Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt werden. Zum Vergleich zweier Überlebenskurven wurde der LogRank-Test angewandt; zum Vergleich von momentanen Überlebenszeiten zwischen zwei verschiedenen Gruppen von Patientinnen kam das Hazard Ratio als deskriptives Maß zum Einsatz[120].

Die optimalen Cut-Off-Werte wurden mithilfe von ROC (receiver-operating-characteristics) analysiert, welche die Spezifität und Sensitivität eines Tests bezüglich eines Parameters (z.B. krank/nicht krank) gegenüberstellt. Die Area under the Curve (=AUC; Fläche unter der Kurve) gibt Aufschluss über die Qualität des Testes und liegt maximal bei 1: Je höher der Wert, desto höher die Diskriminierungsfähigkeit des Test[121].

4. Ergebnisse

4.1. Patientencharakteristika

Der EndoPredict-Test wurde an 373 Patientinnen in einem Zeitraum von März 2012 bis März 2015 prospektiv bei Diagnosestellung durchgeführt. Das mediane Alter der Gesamtkohorte betrug bei Testdurchführung 59,92 Jahre.

Die Tabelle 4.1-1, welche im Folgenden spezifiziert wird, fasst die ermittelten allgemeinen klinisch-pathologischen Charakteristika der gesamten Kohorte, zusätzlich unterteilt nach EPclin Low und High Risk, zusammen:

Tabelle 4.1-1 Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte nach EPclin High und Low Risk

Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte, unterteilt in EPclin Score High und Low			
Charakteristika	EPclin Low Risk (N = 238)	EPclin High Risk (N = 135)	Gesamtkohorte (N = 373)
Mittleres Alter - Jahre (Bereich)	60 (30-88)	58 (29-88)	59,8 (29 - 88)
Menopausenstatus - Anzahl (%*)			
Prämenopausal	77 (32,3)	47 (34,8)	124 (33,2)
Postmenopausal	157 (66)	86 (63,7)	243 (65,2)
Männlich	4 (1,7)	2 (1,5)	6 (1,6)
Tumorgröße - Anzahl (%*)			
T1	179 (75,2)	51 (37,8)	230 (61,7)
pT1a	18 (7,6)	2 (1,5)	20 (5,4)
pT1b	55 (23,1)	9 (6,6)	64 (17,1)
pT1c	106 (44,5)	36 (26,7)	142 (38,1)
cT1	0 (0)	4 (3)	4 (1,1)
T2	54 (22,7)	77 (57)	131 (35,1)
pT2	54 (22,7)	71 (52,6)	125 (33,5)
cT2	0 (0)	6 (4,4)	6 (1,6)
T3	5 (2,1)	7 (5,2)	12 (3,2)
pT3	5 (2,1)	7 (5,2)	12 (3,2)
Grading - Anzahl (%*)			
G1	60 (25,2)	10 (7,4)	70 (18,8)
G2	161 (67,5)	79 (58,5)	240 (64,3)
G3	17 (7,1)	46 (34,1)	63 (16,9)
Östrogenrezeptorstatus in % positiv - Anzahl	283 (30-100)	135 (15-100)	373 (15 - 100)

4. Ergebnisse / 4.1. Patientencharakteristika

Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte, unterteilt in EPclin Score High und Low			
(Bereich)			
Progesteronrezeptorstatus			
- Anzahl (%*)			
≥20%	209 (87,8)	92 (68,2)	301 (80,7)
<20%	29 (12,2)	43 (31,9)	72 (19,3)
Histologische Subtypen			
- Anzahl (%*)			
Duktal	161 (67,6)	103 (76,3)	264 (70,7)
Lobulär	48 (20,2)	22 (16,3)	70 (18,8)
andere:	29 (12,2)	10 (7,4)	39 (10,4)
duktulo-lobulär	15 (6,3)	4 (3)	19 (5,1)
tubulär	10 (4,2)	1 (0,7)	11 (2,9)
muzinös	1 (0,4)	2 (1,5)	3 (0,8)
medullär	0 (0)	2 (1,5)	2 (0,5)
duktulo-tubulär	1 (0,4)	1 (0,7)	2 (0,5)
neuroendokrin	1 (0,4)	0 (0)	1 (0,3)
lobulo-tubulär	1 (0,4)	0 (0)	1 (0,3)
Nodalstatus - Anzahl (%*)			
pN0	216 (90,8)	67 (49,6)	283 (75,9)
pN0	216 (90,8)	60 (44,4)	276 (74,0)
cN0	0 (0)	7 (5,2)	7 (1,9)
pN1 (1-3 Lymphknoten)	22 (9,2)	68 (50,4)	90 (24,1)
pN1	20 (8,4)	53 (39,3)	73 (19,6)
pN1(mi)	2 (0,8)	11 (8,1)	13 (3,5)
cN1	0 (0)	4 (3)	4(1,1)
Ki-67	203	104	307
≤10%** (%*)	59/203 (29,1)	14/104 (13,5)	73/307 (23,8)
>10%** (%*)	144/203 (70,9)	90/104 (86,5)	234/307 (76,2)
<25%*** (%*)	182/203 (89,7)	62/104 (59,6)	244/307 (79,5)
≥25%*** (%*)	21/203 (10,3)	42/104 (40,4)	63/307 (20,5)

* Prozentangaben spaltenweise

** Cut-Off ≤10%/>10% und Cut-Off <25%/≥25% nach der Interdisziplinären S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2019. 4. Auflage bei guter Übereinstimmung in den Bereichen ≤10% und ≥25%.

Eine Unterteilung in EP (Molekularer 12-Gen-Score) High und Low Risk, welche im Vergleich zum EPclin Score unabhängig von Tumorgröße und Nodalstatus ist, ist im Appendix in Tabelle 7.3-1 aufgeführt.

4.1.1. EndoPredict-Ergebnisse in der Gesamtkohorte

Der Median des EPclin Scores aller Patientinnen der Gesamtkohorte lag mit 3,0 bei einem definiertem Cut-off zwischen High und Low Risk bei 3,3[122] im Bereich der Low Risk Gruppe (Abbildung 4.1-1). Die Kennwerte aller EPclin Scores veranschaulicht Abbildung 4.1-1. Für 5 Patientinnen konnte, trotz der vorhandenen Information „Low Risk/ High Risk“, nachträglich aufgrund fehlender Dokumente kein exakter EPclin Score ermittelt werden (Abbildung 4.1-1).

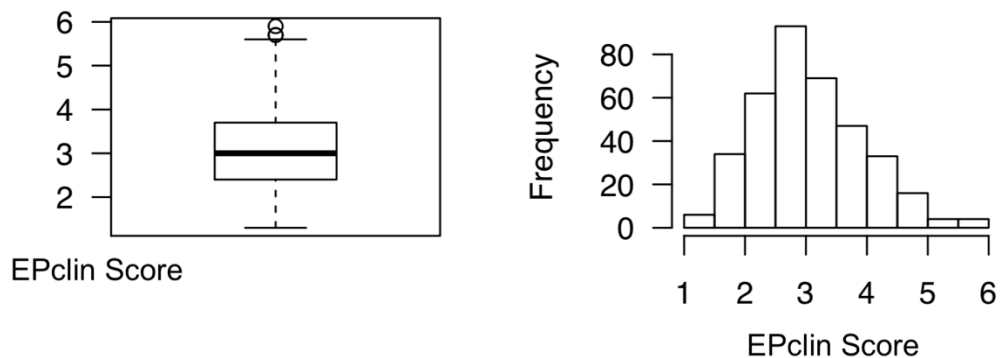


Abbildung 4.1-1 Verteilung der EPclin Scores in der Gesamtkohorte
(Minimum=1,3, Maximum=5,9, 1. Quartil=2,4; 3. Quartil=3,7, Mittelwert=3,1; Median=3,0;
kein eingetragener Wert: 5 Patientinnen)

Der Mittelwert aller EP Scores (12-Gen-Score) lag, bei möglichen Werten zwischen 1-15, bei 5,49. Bei einem Cut-Off von 5,0 liegt damit der Mittelwert aller EP Scores im Bereich der High Risk Gruppe.

Der EP Score (12-Gen-Score) zeigte bei 172 der Patientinnen ein niedriges und bei 201 der Patientinnen ein hohes Risiko. Durch das Einbeziehen von klinischen Faktoren anhand der Tumorgröße und des Nodalstatus, wurden durch den EPclin Score mit 238 Patientinnen mehr Patientinnen der Low Risk Gruppe zugeordnet als durch den EP Score (Abbildung 4.1-2):

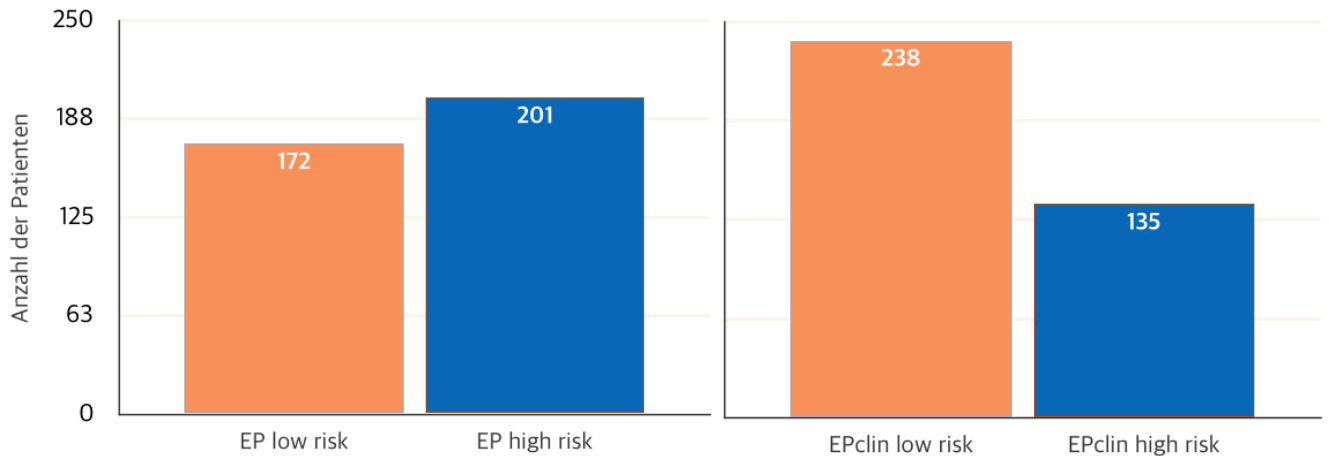


Abbildung 4.1-2 Anzahl aller Patientinnen der Gesamtkohorte in EP (links) und EPclin (rechts) High und Low Risk

Der McNemar-Chi-Quadrat-Test zeigt bei EndoPredict-Ergebnissen von 96 Patientinnen (25,7%) eine Risikogruppen-Veränderung (Abbildung 4.1-3): 15 Patientinnen der EP Score (12-Gen-Score)- Niedrigrisikogruppe wurden nach EPclin Score der Hochrisikogruppe attachiert (5,7%). Dem gegenübergestellt wurden 81

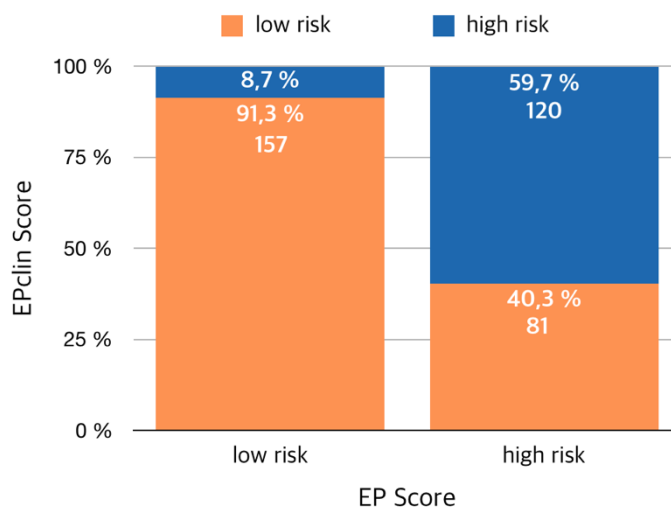


Abbildung 4.1-3 McNemar-Chi-Quadrat-Test des EP- (12-Gen-Score) und EPclin-Score mit Stetigkeitskorrektur

($\chi^2=44,01$; Freiheitsgrade=1; p-Wert= $3,266 \times 10^{-11}$ = $p < 0.001$)

Patientinnen (40,3%), die laut EP Score (12-Gen-Score) in der Hochrisikogruppe lagen, durch Einbeziehung von Tumorgröße und Nodalstatus der EPclin-Niedrigrisikogruppe zugeordnet und konnten somit auf eine Chemotherapie verzichten. 74,3% der Patientinnen blieben auch nach Einbeziehung der klinischen Faktoren unverändert in der gleichen Risikogruppe ($\chi^2=44,01$; Freiheitsgrade=1; p-Wert= $3,266 \times 10^{-11} = p < 0.001$).

4.1.2. Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte

4.1.2.1. Geschlechter und Menopausenstatus

Knapp zwei Drittel der Patientinnen in der Gesamtkohorte waren postmenopausal (65,2%), ein Drittel prämenopausal (Tabelle 4.1-1)

Auch im Vergleich zwischen Hoch- und Niedrigrisikogruppe fiel eine ähnliche Verteilung auf (Tabelle 4.1-1). Des Weiteren waren in der Kohorte 6 Männer zu verzeichnen, welche 1,6% der Gesamtkohorte ausmachten; von diesen wurden 4 in die Niedrig- und 2 in die Hochrisikogruppe eingeteilt (Abbildung 4.1-4).

Die Verteilung zwischen EPclin High und Low Risk waren mit circa ein Drittel zu zwei Drittel sowohl unter den prämenopausalen, postmenopausalen als auch männlichen Patienten nahezu übereinstimmend (Abbildung 4.1-4).

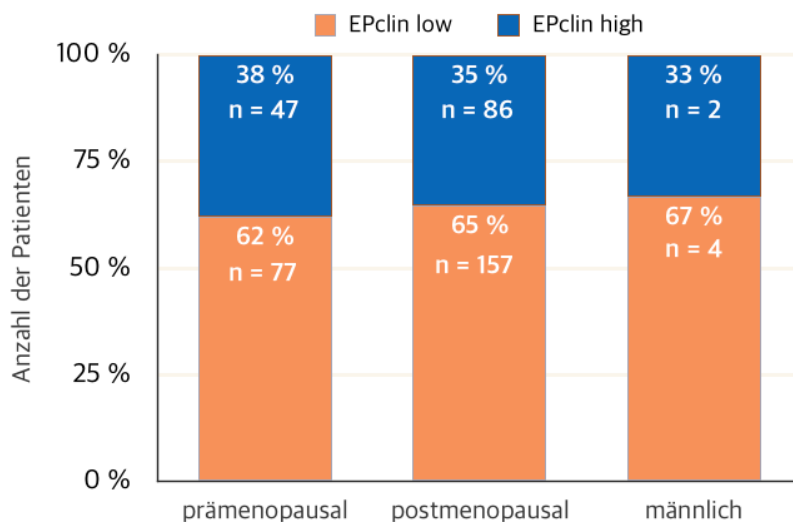


Abbildung 4.1-4 Menopausenstatus nach EPclin Score

4.1.2.2. Tumorgröße

Bei der Auswertung der Tumorgrößen konnten die meisten der Tumore mit 61,7% im Stadium pT1 beobachtet werden und wiesen damit eine Tumorgröße von bis zu 2 cm in größter Ausdehnung auf (Tabelle 4.1-1).

Der EPclin Score ist von der Tumorgröße abhängig, daher ist ein Blick auf die Verteilung der Tumorgröße im EP Score (12-Gen-Score) aussagekräftiger: Hier zeigt sich kein statistischer Trend, so ist sowohl im T1-, als auch im T3-Stadium das Verhältnis zwischen EP High und Low Risk annähernd ausgeglichen (Abbildung 4.1-5).

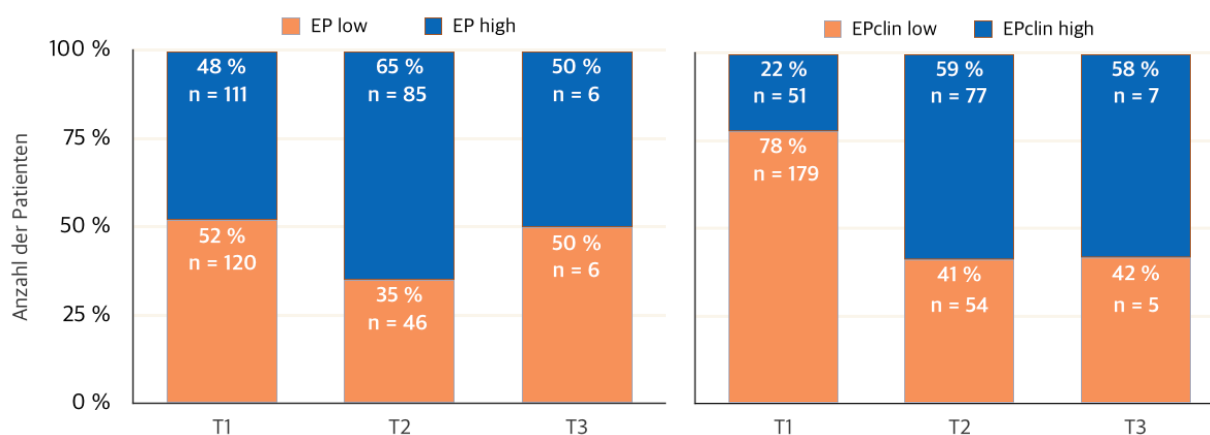


Abbildung 4.1-5 Tumorgrößen nach EP Score (links) und EPclin Score (rechts)

4.1.2.3. Histologische Tumortypen

Die meisten Tumoren, sowohl in der High (76,3%) als auch Low Risk Gruppe (67,6%), wiesen mit 70,7% der Patientinnen in der Gesamtkohorte einen „no special type (NST)“, ehemals invasiv-duktalem Tumortyp auf. Die histologischen Tumortypen werden in der Tabelle 4.1-1, die Verteilung nach EPclin Score in Abbildung 4.1-6 dargestellt.

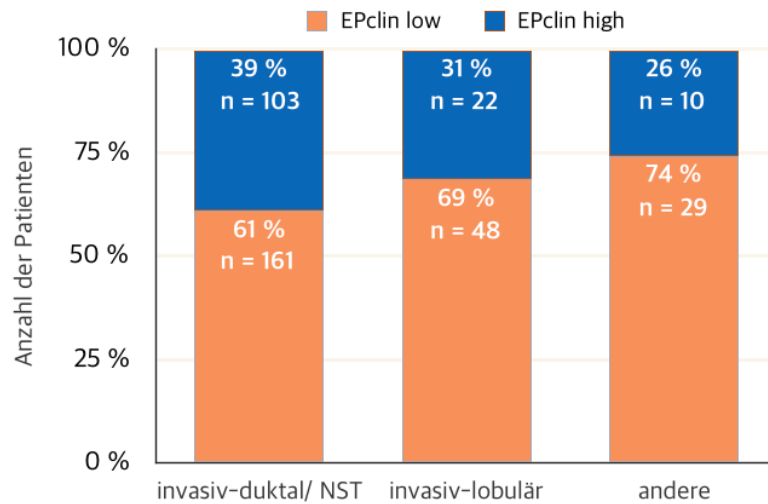


Abbildung 4.1-6 Histologische Tumortypen nach EPclin- Score in Prozent

4.1.2.4. Grading

Durch histopathologische Untersuchungen konnte eine Klassifizierung des Differenzierungsgrades der Tumore durch Berücksichtigung von tubulärer Differenzierung, Polymorphismen und des Anteils der Mitosen vorgenommen werden. Die meisten Patientinnen mit 64,3% wiesen einen Tumor mit einem mäßig differenzierten bösartigen Gewebe (G2) auf (Tabelle 4.1-1).

Im Vergleich zwischen EPclin Low- und High-Risk-Gruppe fiel auf, dass in der Niedrigrisikogruppe mehr Patientinnen einen gut differenzierten Tumor aufwiesen (G1) als in der Hochrisikogruppe, während der Hochrisikogruppe mehr Patientinnen mit schlecht differenzierten Tumoren zugewiesen wurde als der Niedrigrisikogruppe (Abbildung 4.1-7).

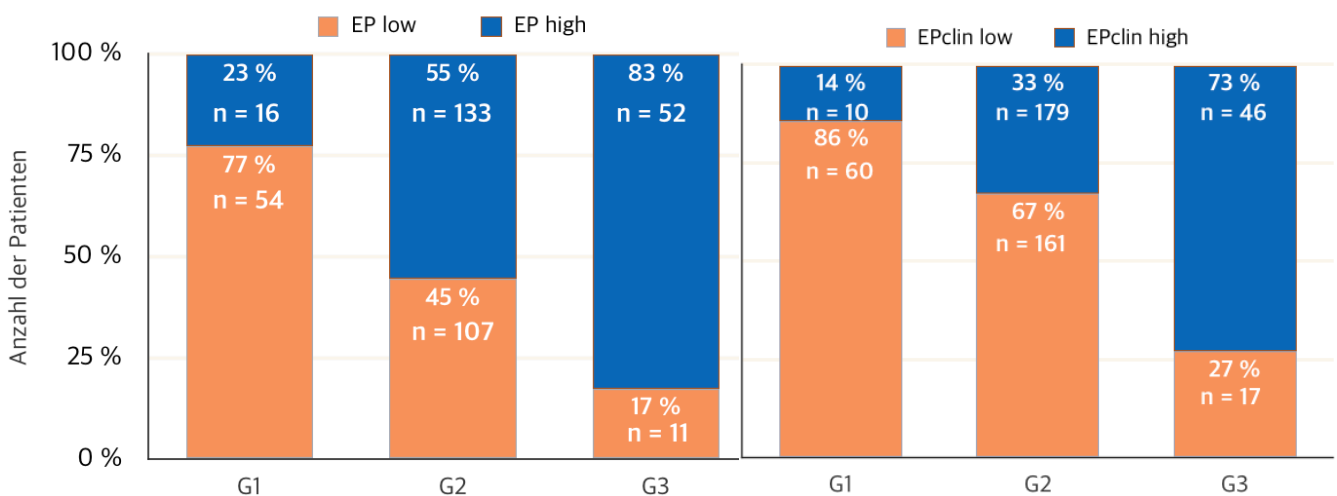


Abbildung 4.1-7 Grading nach EPclin Score in Prozent

Bei einem p-Wert < 0,001 (Signifikanzniveau < 5%; $p < 0,05$) zeigt die Durchführung des Pearson-Chi-Quadrat-Tests, dass ein statistischer Zusammenhang zwischen EP Score (12-Gen-Score) und Grading ($X^2 = 48.164$, $df = 2$, p-Wert = 3.478×10^{-11}) und zwischen EPclin Score und Grading ($X^2 = 52.653$, $df = 2$, p-Wert = 3.686×10^{-12}) besteht.

Bei der Errechnung des EPclin Scores fließt das Grading nicht mit ein.

4.1.2.5. Nodalstatus

Im Rahmen von Ultraschalluntersuchungen und anschließender intraoperativer Sentinellymphknotenbestimmung zeigten sich 75,9% und damit 283 der Patientinnen nodal-negativ (Tabelle 4.1-1): Alle untersuchten Lymphknoten dieser Patientinnen galten als tumorfrei.

13 der 90 Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen im N1-Stadium zeigten Lymphknoten-Mikrometastasen (Tabelle 4.1-1), die durch eine Metastase unter 2mm im Durchmesser definiert ist.

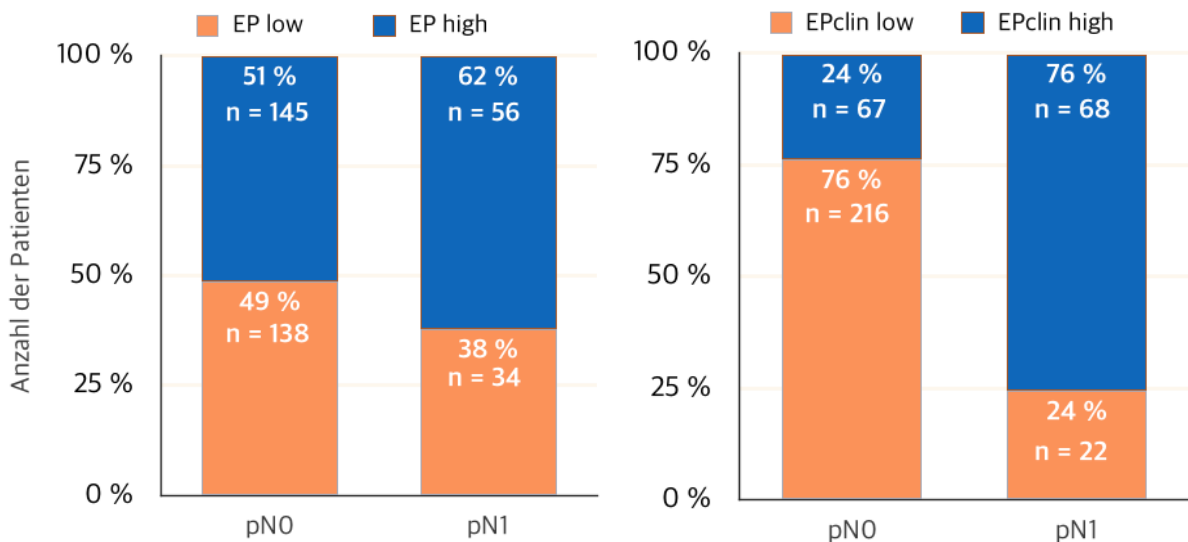


Abbildung 4.1-8 Nodalstatus nach EP (links) und EPclin (rechts) in Prozent

Aufgrund der Berechnung des EPclin Scores mit dem Nodalstatus fallen 76% der nodal-negativen Patientinnen in die Niedrigrisikogruppe, während 76% der nodal-positiven Patientinnen der Hochrisikogruppe zugeordnet wurde (Abbildung 4.1-8).

Da der EPclin Score neben der TumorgroÙe mithilfe des Nodalstatus errechnet wird, ist auch hier ein Blick auf die Verteilung nach EP Score (12-Gen-Score) interessant, der keine klinisch-pathologischen Charakteristika einbezieht: Hier zeigt sich ein leichter Unterschied in der Verteilung; so sind 62% nodal-positive Patientinnen der Hochrisikogruppe zugeteilt worden, im Vergleich zu 51% der nodal-negativen Patientinnen (Abbildung 4.1-8).

4.1.2.6. Östrogenrezeptorstatus

Alle 373 Patientinnen hatten einen positiven Östrogenrezeptorstatus. Der Mittelwert der Gesamtkohorte lag bei 91,1%. Das Minimum der Expression aller Patientinnen war 15%, das Maximum 100% (Tabelle 4.1-1). Dementsprechend beinhaltete die Kohorte keine Patientinnen mit niedrig-positivem (1-9%) Östrogenrezeptorstatus (Kapitel 1.2.) [2], [40].

4.1.2.7. Korrelation von Östrogenrezeptor und EndoPredict

Weder der EP Score (12-Gen-Score) ($r=-0,25$, $p<0,001$) noch der EPclin Score ($r=-0,17$, $p<0,001$) weisen eine lineare Korrelation zum Östrogenrezeptorstatus auf (Abbildung 4.1-9).

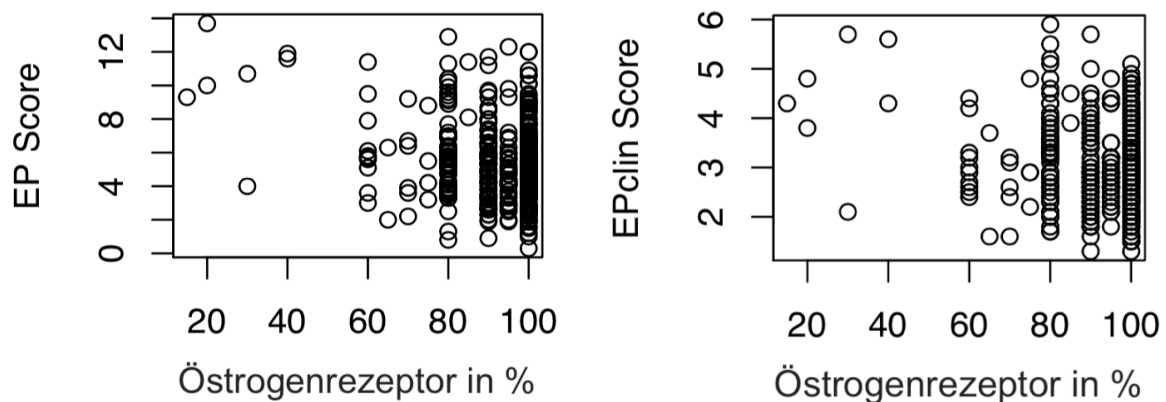


Abbildung 4.1-9 Korrelation von Östrogenrezeptorstatus und EndoPredict
 Links: Pearsons Produkt-Moment-Korrelation zwischen EP Score und dem Östrogenrezeptorstatus in Prozent aller Patientinnen der Gesamtkohorte ($r=-0,254$, $t=-4,96$, $df=357$, $p\text{-Wert} = 1,09 \times 10^{-6}$, $95\%\text{-KI} = (-0,35) - (-0,15)$)
 Rechts: Pearsons Produkt-Moment-Korrelation zwischen EPclin Score und dem Östrogenrezeptorstatus in Prozent aller Patientinnen der Gesamtkohorte ($r = -0.173$, $t = -3.3033$, $df = 355$, $p\text{-Wert} = 0.001053$, $95\%\text{-KI} = (-0.27) - (-0.07)$)

4.1.2.8. Progesteronrezeptorstatus

80,7% der Tumore aller Patientinnen zeigten eine hohe Progesteronrezeptor-Expression von über 20% (Tabelle 4.1-1).

Die Abbildung 4.1-10 zeigt, dass der Anteil der Patientinnen mit Progesteronrezeptor <20%, die in die Hochrisikogruppe eingeteilt wurden, gegenüber dem der Niedrigrisikogruppe, überwiegt.

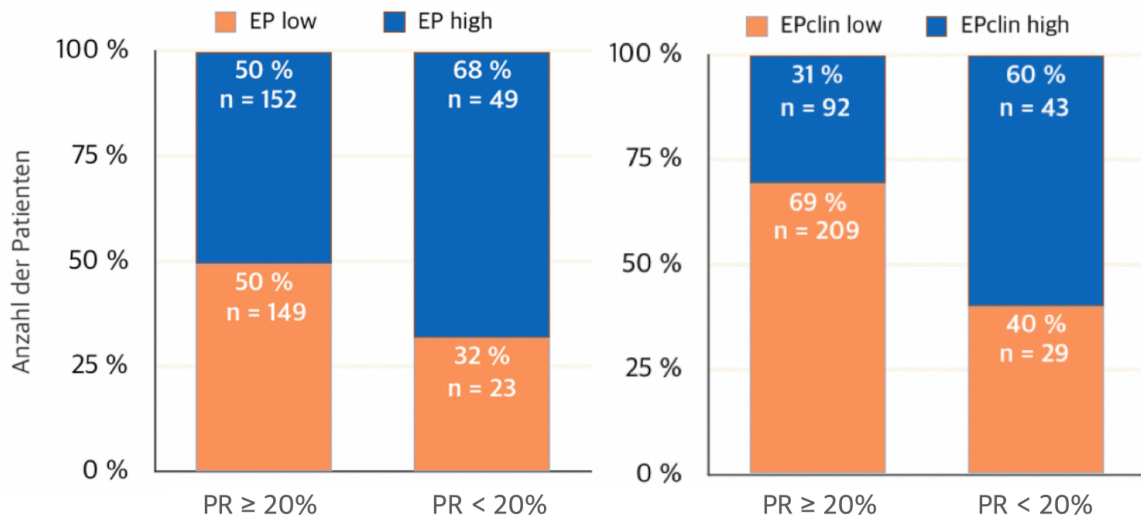


Abbildung 4.1-10 McNemar Chi-Quadrat-Test von Progesteronrezeptorstatus und EndoPredict
 Links: McNemars Chi-Quadrat-Test mit Stetigkeitskorrektur des Progesteronrezeptorstatus und EP High und Low Risk in Prozent ($X^2=49,5$, $df=1$, $p\text{-Wert}=1,98 \times 10^{-12}$)
 Rechts: McNemars Chi-Quadrat-Test mit Stetigkeitskorrektur des Progesteronrezeptorstatus und EPclin High und Low Risk in Prozent ($X^2=108$, $df=1$, $p\text{-Wert}<2,2 \times 10^{-16}$)

4.1.2.9. Korrelation von Progesteronrezeptor und EndoPredict

Auch wenn aus der linken Grafik der Abbildung 4.1-11 nicht eindeutig eine Korrelation ersichtlich ist, besteht nach Pearsons Korrelationskoeffizient ($r=-0,37$, $p\text{-Wert}<0,001$) ein mittelstarker negativer linearer Zusammenhang zwischen dem Progesteronrezeptorstatus in Prozent und dem EP Score (12-Gen-Score): So besagt dieser, dass ein hoher EP Score eher mit einem niedrigen Progesteronrezeptorstatus einhergeht.

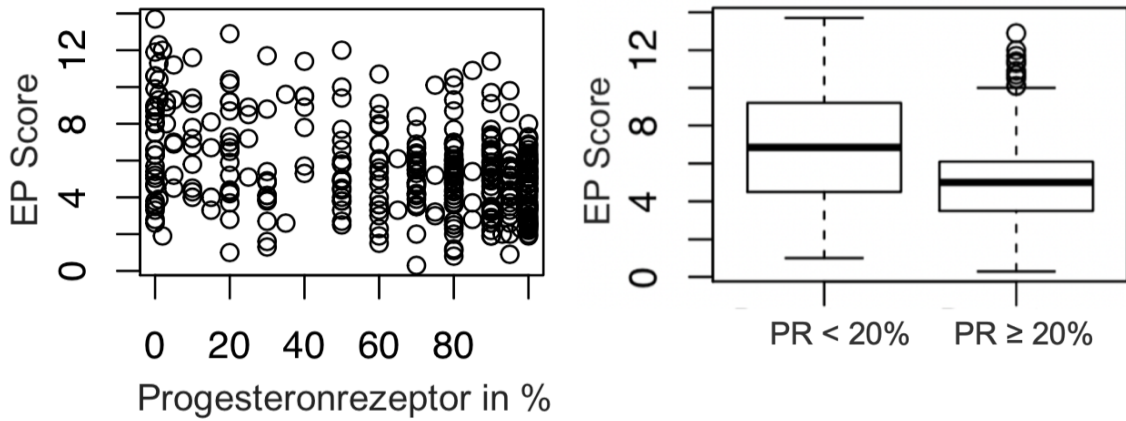


Abbildung 4.1-11 Korrelation von Progesteronrezeptorstatus und EP Score

Links: Pearsons Produkt-Moment-Korrelation des Progesteronrezeptorstatus in Prozent und de EP Scores ($r=-0,37$, $t=-7,59$, $df=368$, $p\text{-Wert}=2,73 \times 10^{-13}$, 95%-KI: $(-0,453)$ - $(-0,276)$); rechts: Two-Sample-T-Test nach Welch des Progesteronrezeptorstatus und EP Score ($t=5,14$, $df=89,79$, $p\text{-Wert}=1,63 \times 10^{-6}$, 95%-KI $1,44$ - $2,589$; Mittelwert $PR < 20\% = 7,01$; Mittelwert $PR \geq 20\% = 5,12$)

Auch zwischen dem EPclin Score und dem Progesteronrezeptorstatus besteht ein, mit $r=-0,33$, etwas geringerer, aber signifikanter ($p < 0,001$) Zusammenhang (Abbildung 4.1-12). Diese sind ebenfalls in den Boxplot-Diagrammen (Abbildung 4.1-12) ersichtlich.

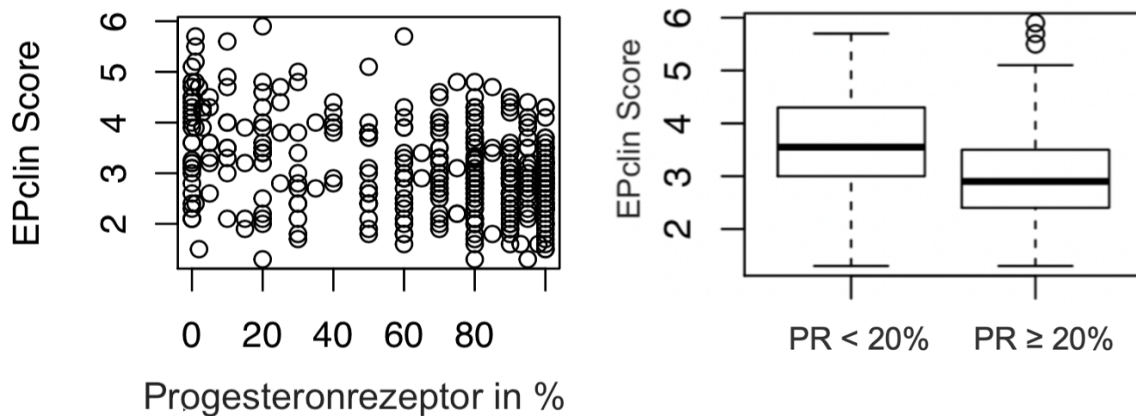


Abbildung 4.1-12 Korrelation von Progesteronrezeptor und EPclin Score

Links: Pearsons Produkt-Moment-Korrelation des Progesteronrezeptor in Prozent und des EPclin Scores ($r=-0,33$, $t = -6,77$, $df = 366$, $p\text{-Wert} = 5,13 \times 10^{-11}$, 95%-KI: $(-0,421)$ - $(-0,24)$). Rechts: Two-Sample-T-Test nach Welch des Progesteronrezeptorstatus und EPclin Scores ($t = 4,51$, $df = 92,1$, $p\text{-Wert} = 1,91 \times 10^{-5}$, 95%-KI $0,326$ - $0,84$; Mittelwert $PR < 20\% = 3,58$; Mittelwert $PR \geq 20\% = 2,99$)

4.2. Ki-67

Bei 307 Patienten von allen 373 Patienten der Gesamtkohorte konnte der Proliferationsmarker Ki-67 in Prozent erhoben werden. Die Verteilung aller Ki-67-Ergebnisse wird in der folgenden Abbildung 4.2-1 dargestellt.

Einen Überblick über alle klinisch-pathologischen Parameter der Ki-67-Kohorte gibt die Tabelle 7.3-2 im Appendix.

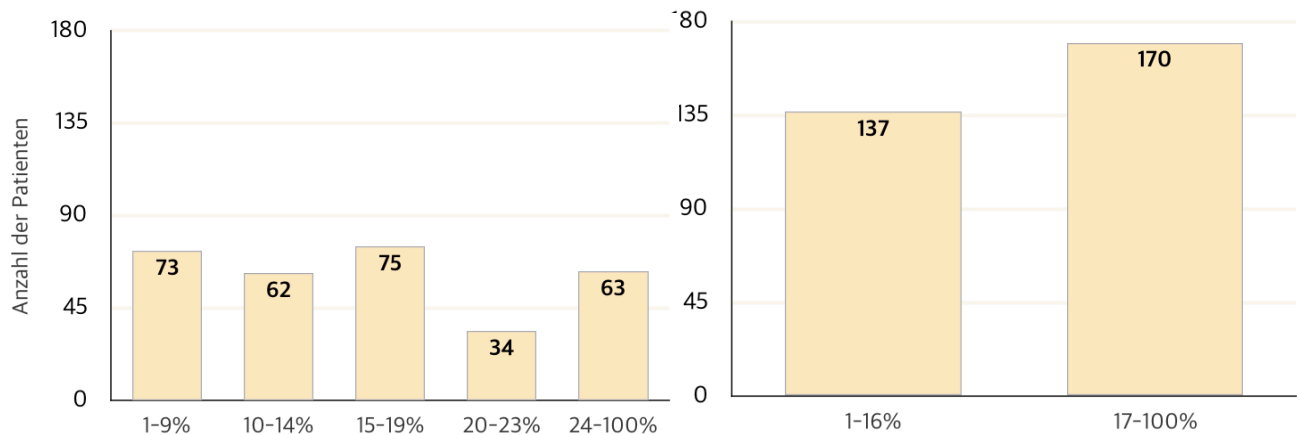


Abbildung 4.2-1 Verteilung der Ki-67-Ergebnisse

Links: Verteilung der Ki-67-Ergebnisse nach Prozent

Rechts: Verteilung der Ki-67-Ergebnisse in Prozent nach Median; Median= 17%

Eine Übersicht über die Korrelation zwischen Ki-67 und Östrogen- und Progesteronrezeptor ist ebenfalls unter Kapitel 7.3.4. und 7.3.5. im Appendix zu finden.

4.2.1. Korrelation der Ki-67-Ergebnisse mit dem EP Score (12-Gen-Score)

Von den 307 Patientinnen mit Ki-67-Ergebnis zeigten 140 einen niedrigen und 167 einen hohen EP (12-Gen-) Score. Niedrige Ki-67-Werte waren häufiger in Karzinomgewebe der EP Niedrigrisikogruppe, hohe Ki-67-Werte vermehrt in der EP Hochrisikogruppe zu finden. Dem gegenüber gestellt wurden niedrige Ki-67-Werte ($\leq 10\%$) in 10% (95% KI 6,9-15,8%) der Patientinnen mit EP (12-Gen-) High Risk Scores gefunden und hohe Ki-67-Werte ($\geq 25\%$) in 5,7% (95% KI 2,4-10,9%) der EP Low Risk Gruppe. Die Ki-67-Ergebnisse und die Ergebnisse des EP Scores (12-Gen-

Score), welcher ohne Einbeziehung von klinischen Faktoren errechnet wird, werden in der Abbildung 4.2-2 gegenübergestellt:

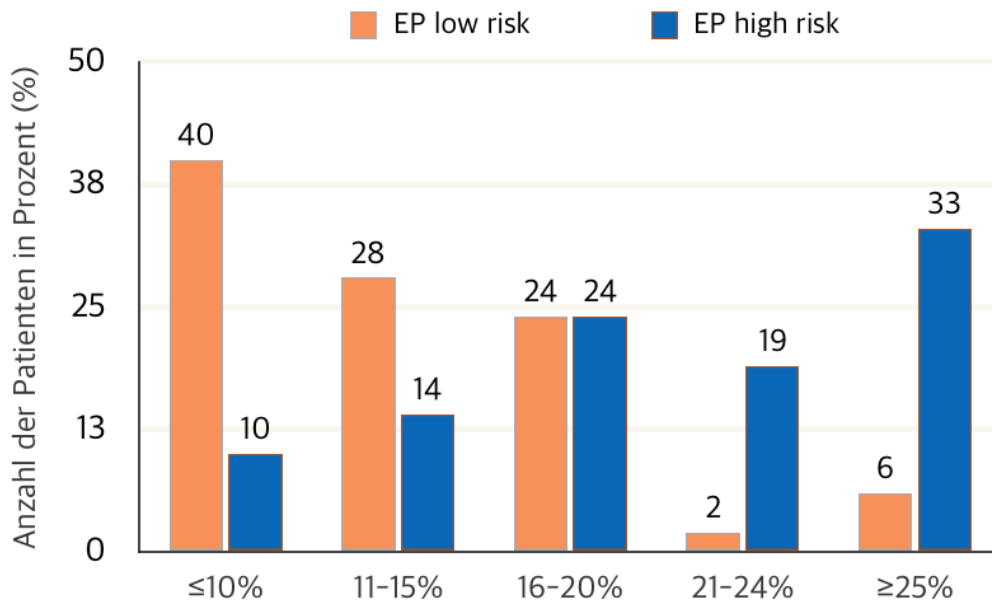


Abbildung 4.2-2 Ki-67-Ergebnisse nach EP Score (12-Gen-Score) in High und Low Risk in Prozent

Die Pearson's Produkt-Moment-Korrelation zeigt eine statistisch höchst signifikante (p -Wert = $<0,001$) starke Korrelation ($r=0,63$) zwischen dem Ki-67 und dem EP (12-Gen-) Score (Abbildung 4.2-3) [118]: So zeigen Patientinnen mit einem hohen EP (12-Gen-) Score ebenfalls eher hohe Ki-67-Ergebnisse.

Auch der Chi-Quadrat-Test wurde zwischen Ki-67 und EPclin High und Low Risk durchgeführt: Auch hier zeigt sich ein statistisch höchst signifikanter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von Ki-67 und dem EP (12-Gen-) Score ($\chi^2 = 82$, $p = <0,001$, $df=4$; Appendix Abbildung 7.3-1).

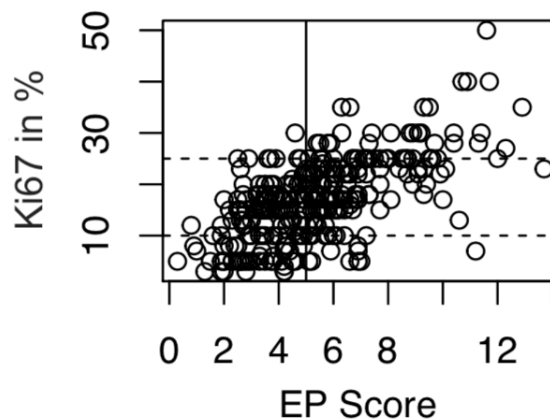


Abbildung 4.2-3 Pearsons Produkt-Moment-Korrelation von Ki-67 und EP (12-Gen-) Score ($r=0,63$, $t = 14,202$, $df = 303$, p -value $< 2,2e-16$, 95%-KI=0.56- 0.7)

4.2.2. Korrelation der Ki-67-Ergebnisse mit dem EPclin Score

Von den 307 Patientinnen mit Ki-67-Ergebnis zeigten nach Einbeziehung der klinischen Faktoren Tumorgroße und Nodalstatus 203 einen niedrigen und 104 einen hohen EPclin Score. Die Ki-67-Ergebnisse werden in der Abbildung 4.2-4 den EPclin Ergebnissen, unterteilt nach High und Low Risk, gegenübergestellt.

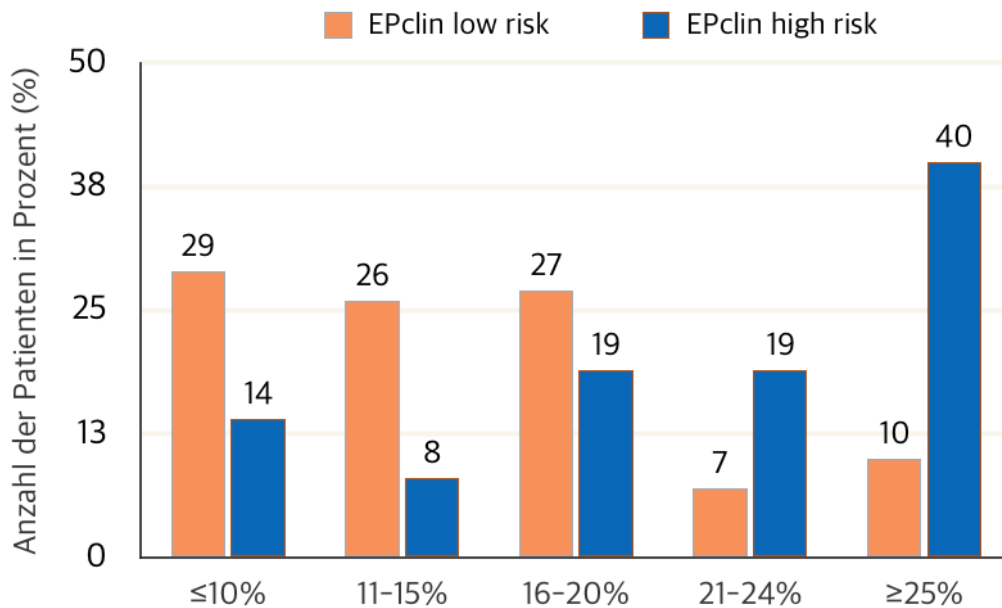


Abbildung 4.2-4 Ki-67-Ergebnisse nach EPclin Score in High und Low Risk in Prozent

Niedrige Ki-67-Werte ($\leq 10\%$) wurden in 13,5% (95% KI 7,5-21,5%) der EPclin High Risk Scores gefunden und hohe Ki-67-Werte ($\geq 25\%$) in 10,3% (95% KI 6,5-15,3%) der EP Low Risk Gruppe.

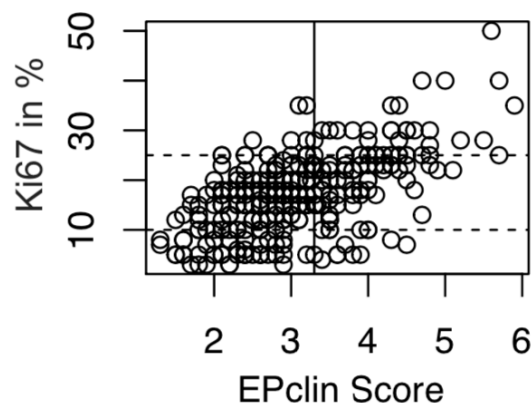


Abbildung 4.2-5 Pearsons Produkt-Moment-Korrelation von Ki-67 und EPclin Score
($r=0.59$, $t=12,81$, $df=304$, $p\text{-value} < 2.2e-16$, $95\%\text{-KI}=0.51-0.66$)

Zwischen EPclin Score und Ki-67 besteht ebenfalls eine signifikante ($p < 0,001$) starke Korrelation (Abbildung 4.2-5; $r = 0,59$) [118].

Auch Pearsons Chi-Quadrat-Test (Abbildung 4.2-6 rechts; p -Wert $< 0,001$) und der Zwei-Stichproben-T-Test (Abbildung 4.2-6 links; p -Wert $< 0,001$) zeigen einen statistisch höchst signifikanten Zusammenhang zwischen EPclin und Ki-67.

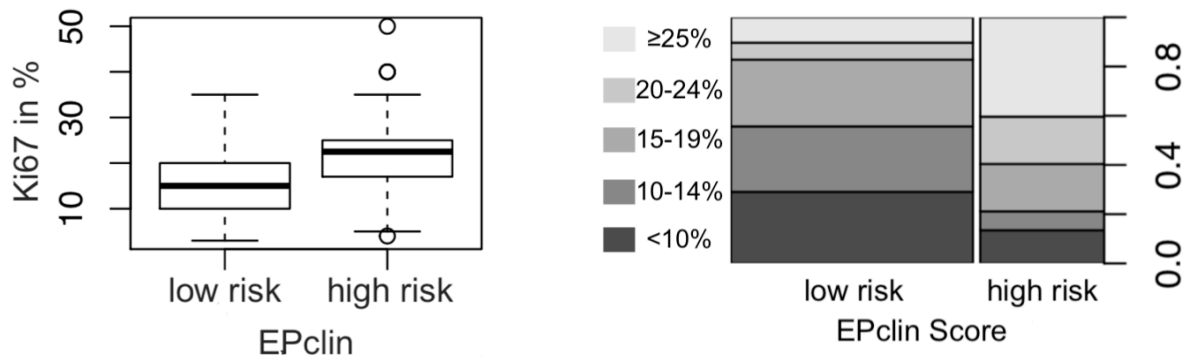


Abbildung 4.2-6 Ki-67 und EPclin Score

Links: Zwei-Stichproben-T-Test von Ki-67 und EPclin Class nach Low und High Risk, $t = -7,16$, $df = 171,8$, p -Wert = $2,26 \times 10^{-11}$, 95%-KI = $(-8,59) - (4,88)$, Mittelwert Low Risk = 14,94; Mittelwert High Risk = 21,67

Rechts: Pearson's Chi-Quadrat-Test von Ki-67 (Y-Achse in %) und dem EPclin Class nach Low und High Risk, $\chi^2 = 60,64$, $p = < 2,1 \times 10^{-12}$, $df = 4$, Low Risk: $< 10\% = 59$, $10-14\% = 54$, $15-19\% = 55$, $20-24\% = 14$, $> 25\% = 21$; High Risk: $< 10\% = 114$, $10-14\% = 8$, $15-19\% = 20$, $20-24\% = 20$, $> 25\% = 42$

4.2.3. Ki-67 und Grading

Zwischen Ki-67 und Grading besteht nach Pearson's Chi-Quadrat-Test und Spearman Rank Korrelation ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$). Dieser wird auch in der Abbildung 4.2-7 erkennbar.

Gut differenzierte Karzinome (G1) wiesen niedrige Ki-67-Ergebnisse auf (Median 12%, Bereich 3-25%), während Karzinome mit mittlerer (G2) und schlechter Differenzierung (G3) höhere Ki-67-Ergebnisse mit weiterer Spannweite zeigten (G2: Median 17%, Bereich 3-35%; G3: Median 23%, Bereich 5-40%).

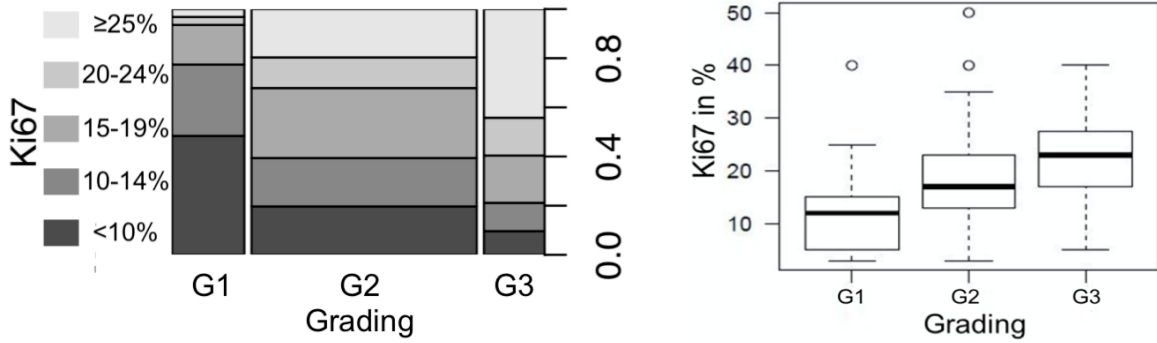


Abbildung 4.2-7 Ki-67 und Grading
 Links: Pearson's Chi-Quadrat-Test von Ki-67 und Grading ($\chi^2=57,5$, $df=8$, $p\text{-Wert}=1,43 \times 10^{-9}$, G1: <10%=30, 10-14%=18, 15-19%=10, 20-24%=2, >25%=2; G2: 10%=38, 10-14%=38, 15-19%=55, 20-24%=24, >25%=38; G3: 10%=5, 10-14%=6, 15-19%=10, 20-24%=8, >25%=23)
 Rechts: Boxplot der Spearman Rank Korrelation von Ki-67 und Grading; Koeffizient rho 0.412, $p<0.0001$

4.2.4. Risikoeinteilung von EPclin und Ki-67

Bei Beobachtung der Risikoeinteilung wird deutlich, dass EPclin mehr Patientinnen der Niedrigrisikogruppe zuordnet als Ki-67, codiert nach Median[60], [123]. Durch eine Therapieempfehlung nach EndoPredict können damit mehr Patientinnen auf eine Chemotherapie-Empfehlung verzichten, als durch eine Therapieempfehlung nach Ki-67.

Bei 181 Patientinnen der Gesamtkohorte wurden die Konzentrationen der Eiweiße Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ „uPA“ und sein Inhibitor „PAI-1“ ermittelt. Eine Übersicht über die Ergebnisse im Vergleich zu denen des EndoPredict und deren Risikoeinteilung geben die Kapitel 7.3.6. und 7.3.7. im Appendix.

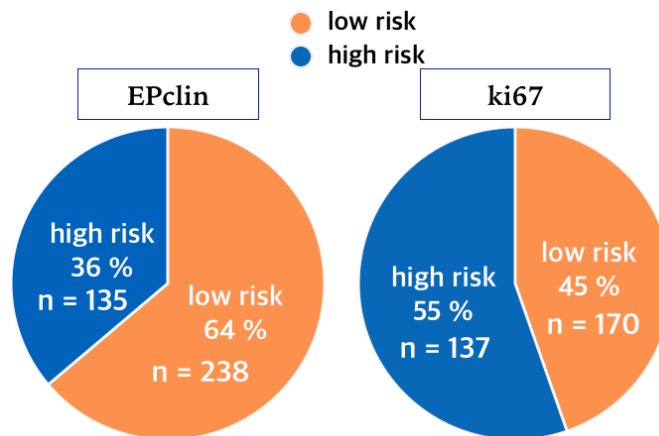


Abbildung 4.2-8 Risikoeinteilung in Hoch- und Niedrigrisiko nach EPclin und Ki-67 ($\leq 17\%/>17\%$, codiert nach Median (Bustreo S et al., 2016; Coates AS et al.,2015))

4.3. Follow-Up

4.3.1. Therapieempfehlungen

Aufgrund des in der gesamten Kohorte positiven Östrogenrezeptorstatus wurde allen Patientinnen eine endokrine Therapie empfohlen. Die Therapieentscheidung für oder gegen eine Chemotherapie wurde abhängig vom EPclin-Testergebnis getroffen. Bei EPclin High Risk (Cut-off 3,3) wurde eine Chemotherapie empfohlen, bei EPclin Low Risk entschied man sich gegen die Aussprache einer Chemotherapie-Empfehlung (Tabelle 4.3-1).

Eine Ausnahme bildeten 19 Patientinnen:

Bei 13 Patientinnen entschied man sich im Tumorboard individuell trotz EPclin High Risk gegen eine Chemotherapie: Darunter waren 6 Patientinnen, die als multimorbide eingeschätzt wurden. Bei weiteren 7 Patientinnen waren die Gründe dafür, neben einem sehr grenzwertigen Testergebnis zur Low Risk Gruppe (3 der Patientinnen hatten ein EPclin-Ergebnis bei 3,4; Cut-off: 3,3), die Durchführung des Tests kurz nach Einführung 2011/2012 (3 Patientinnen: Testdurchführung 08/2012; 11/2012; 02/2013), sowie eine besser als das Testergebnis eingeschätzte Prognose aufgrund von damals einbezogenen niedrigen Proteasen (uPA und PAI-1) oder einem niedrigem Grading. Bei all diesen Patientinnen vermutete man damals keinen Profit durch eine Chemotherapie.

Bei 6 Patienten entschied man sich trotz EPclin Low Risk für eine Chemotherapie. Ein Patient war männlichen Geschlechts: Da die Aussagekraft des EndoPredict Tests für Männer zu Beginn fragwürdig erschien, entschied man sich bei einem G3-Tumor trotz grenzwertigem EPclin Low Risk bei 3,2 für eine Chemotherapie. 2 Patienten waren laut EPclin-Ergebnis knapp an der Grenze zur High Risk Gruppe (Testergebnisse: 3,3; 3,3) bei gleichzeitig hohen Proteasen. Bei einer Patientin zeigte der EPclin kurz nach Einführung dieses im April 2012 ein niedriges Risiko; aufgrund der geringen Erfahrung mit dem Test wurde jedoch bei hohen Proteasen und damit einer geschätzt schlechteren Prognose eine Chemotherapie durchgeführt. Eine Patientin zeigte bei EPclin Low Risk (2,9) einen multizentrischen Tumor. Eine

Patientin mit EPclin von 2,8 zeigte ein kontralaterales Mammakarzinom. Bei all diesen Patientinnen schätzte man den individuellen Profit durch eine Chemotherapie als hoch ein.

Eine Radiotherapie wurde allen Patientinnen mit brusterhaltender Therapie empfohlen. Bei 90 Patientinnen mit Ablatio oder im Einzelfall gesundheitlichen Risikofaktoren bei z.B. Multimorbidität oder anderen Kontraindikationen wurde durch das Tumorboard keine Radiotherapie empfohlen.

Tabelle 4.3-1 Erläuterungen über Chemotherapie-Empfehlungen

Chemotherapie empfohlen	Anzahl der Patientinnen (N = 128)
EPclin High Risk	122
EPclin Low Risk, männlich	1
EPclin Low Risk, grenzwertig zu High Risk/ RF /Anfänge EP	3
EPclin Low Risk bei Multizentrität	1
EPclin Low Risk bei kontralateralem Mammakarzinom	1
Keine Chemotherapie empfohlen	Anzahl der Patientinnen (N = 245)
EPclin Low Risk	231
EPclin High Risk bei Multimorbidität	6
EPclin High Risk, grenzwertig zu Low Risk bei guter Prognose laut TB / Anfänge EP	7

4.3.2. Compliance

Informationen über die Durchführung einer empfohlenen oder nicht empfohlenen Chemotherapie und Radiotherapie konnte für alle 373 Patientinnen eingeholt werden (siehe Abbildung 4.3-1). Bei 29 Patientinnen konnten keine Informationen bezüglich der Compliance zur endokrinen Therapie eingeholt werden (siehe Abbildung 4.3-1): Drei Patientinnen wollten diesbezüglich keine Auskunft geben. Für drei Patientinnen,

die zuvor verstorben waren, konnten die Informationen nur über die Angehörigen, für einen über den behandelnden Hausarzt eingeholt werden; sowohl der Hausarzt, als auch die Angehörigen hatten keine Informationen bezüglich der Compliance zur endokrinen Therapie. Für 13 Patientinnen, deren Informationen aus dem ODSeasy, sowie für 10 Patientinnen, deren Informationen aus dem Tumorregister bezogen wurden, konnten keine Informationen bezüglich der Compliance zur endokrinen Therapie ermittelt werden.

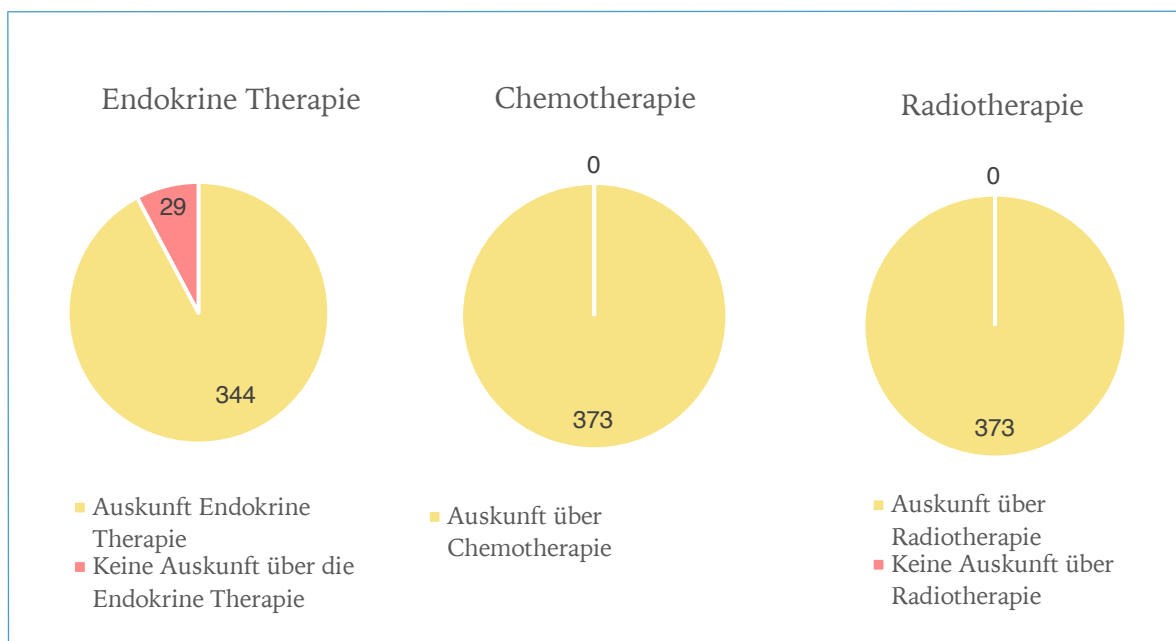


Abbildung 4.3-1 Auskunft über die durchgeführte oder nicht durchgeführte empfohlene Therapie der gesamten Kohorte

Aufgrund der Therapieentscheidung nach dem EndoPredict-Ergebnis wurde 128 Patientinnen zu einer Chemotherapie (CTX) geraten, von denen 92 compliant waren (72%). 28% der Patientinnen lehnten die empfohlene Chemotherapie ab (McNemar's Chi-Quadrat-Test mit Stetigkeitskorrektur=26.256, $df=1$, $p\text{-value}=2.99 \times 10^{-7} = <0,001$). 3 Patientinnen von 245 Patientinnen, die keine Empfehlung zur Chemotherapie erhielten, führten eine Chemotherapie durch.

Von 282 Patientinnen mit einer Empfehlung zur Radiotherapie, führten 91% die vollständige Therapie durch (McNemar's Chi-Quadrat-Test mit Stetigkeitskorrektur=24.038, $df=1$, $p\text{-value}=9.443 \times 10^{-7}$).

Allen Patientinnen wurde eine endokrine Therapie empfohlen. Von diesen waren 78% compliant. 52 Patientinnen lehnten die endokrine Therapie ab oder unterbrachen sie nach weniger als 5 Jahren. Von 29 Patientinnen erhielten wir keine Informationen bezüglich der Compliance zur endokrinen Therapie.

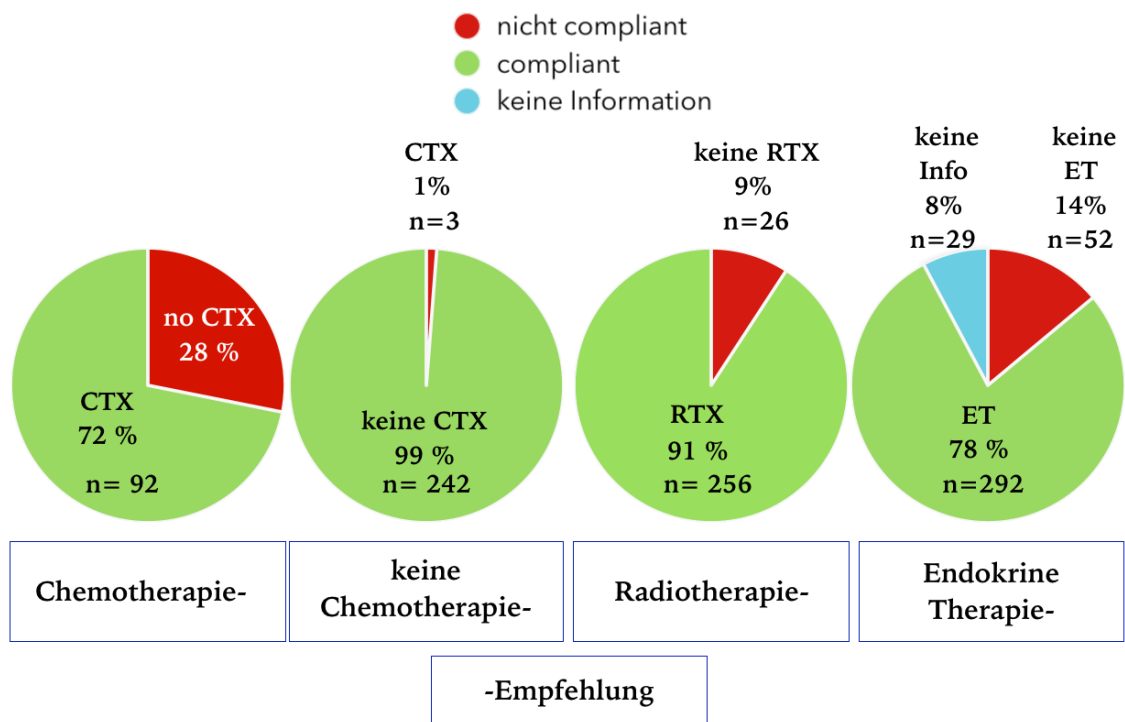


Abbildung 4.3-2 Compliance zur Therapieempfehlung der gesamten Kohorte (CTX= Chemotherapie; RTX= Radiatio; ET= Endokrine Therapie)

4.3.3. Outcome

Die mediane Follow-Up betrug 3,47 Jahre (41,6 Monate; 95%-KI 3,3 - 3,59; Abbildung 4.3-3):

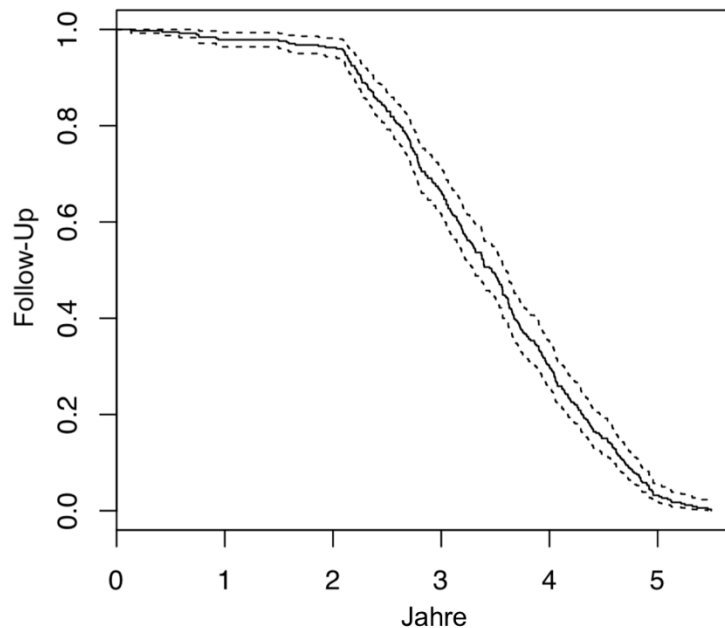


Abbildung 4.3-3 Dauer des Follow-Ups der Gesamtkohorte
(Median=3,47 Jahre (durchgängige Linie); 95%KI 3,30-3,59 (gestrichelte Linie))

Das 3-Jahres-Gesamtüberleben der Gesamtkohorte betrug 97,4% (95%KI 0.956-0.992; Abbildung 4.3-4). Das 3-Jahres-DFS (Disease-free-Survival) betrug 96,0%

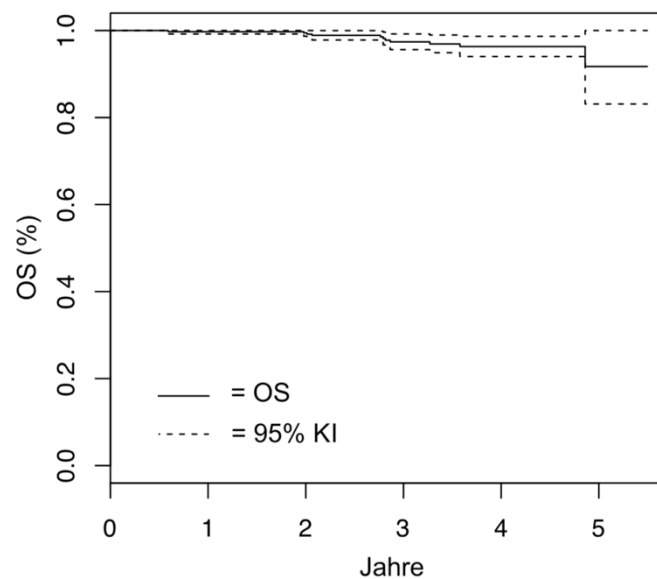


Abbildung 4.3-4 Gesamtüberleben (OS=Overall-Survival) der Gesamtkohorte in Jahren
3-Jahres-Überleben: 97,4% (95%KI 0.956- 0.992)

(95%KI 0,938 – 0,982; Abbildung 4.3-5). DFS wurde definiert als Zeit zwischen der Diagnose und Tod bzw. Lokalrezidiv bzw. Fernmetastasen.

Es traten insgesamt 22 Events auf bei 20 Patientinnen (Lokalrezidiv, Metastasen, Tod) auf (Kapitel 7.3.8. ff.). 9 Patientinnen entwickelten Zweitkarzinome.

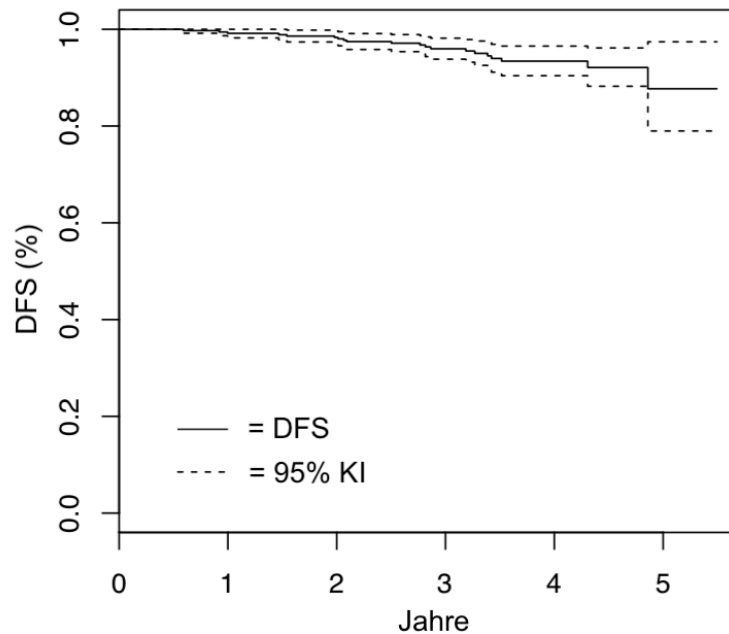


Abbildung 4.3-5 Krankheitsfreies Überleben (Disease-free-Survival=DFS) der Gesamtkohorte
3-Jahres-Überleben 96,0% (95%KI 0,938 – 0,982)

4.3.3.1. Outcome nach EPclin High und Low Risk

Die Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberleben nach EndoPredict Low- und High-Risk demonstriert die Abbildung 4.3-6. Der LogRank Test lag mit $p=0,62$ nicht unter dem Signifikanzniveau von 5%.

Das krankheitsfreie Überleben nach 3 Jahren lag in der EPclin Low Risk Gruppe bei 96,6% (95%KI 94,2-99,1) versus 94,9% (95%KI 90,9-99,0) in der EPclin High Risk Gruppe (Abbildung 4.3-8). Mit einem Hazard Ratio von 2,05 (95%KI 0,85-4,95; $p=0,110$) war das Risiko für Fernmetastasen, ein lokoregionäres Rezidiv oder Tod bei den EPclin High Risk Patientinnen zweifach so hoch wie bei den EPclin Low Risk Patientinnen. Mit einem Signifikanzniveau von 5% war dies bei $p=0,11$ aufgrund der geringen Tumoreventzahl nicht statistisch signifikant.

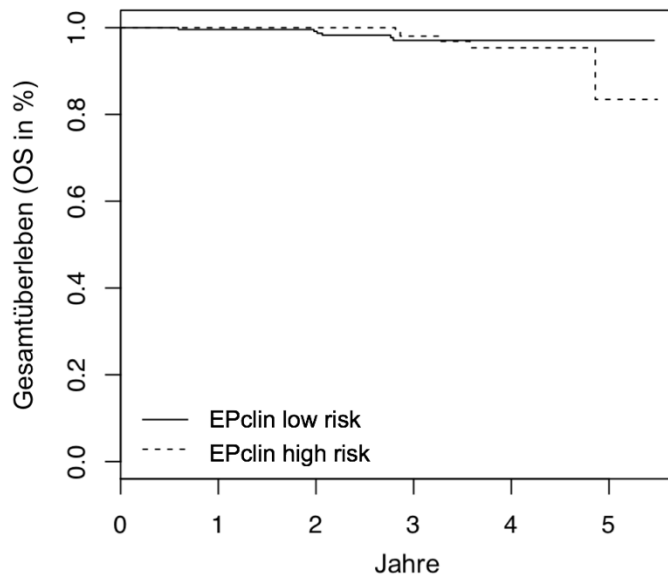
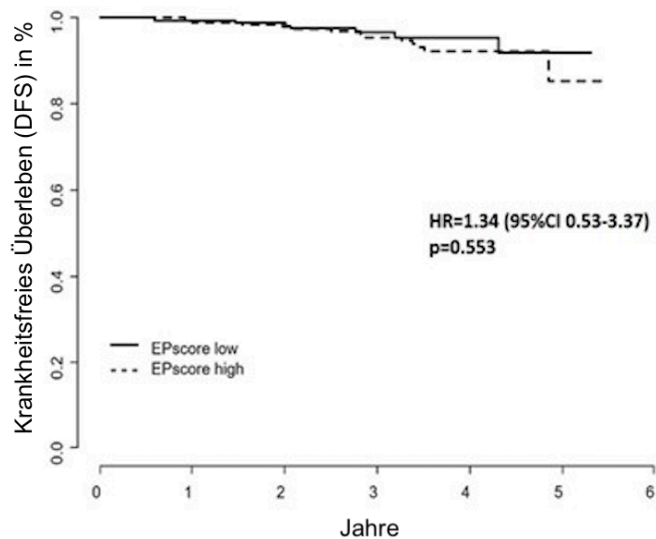


Abbildung 4.3-6 Gesamtüberleben (Overall Survival=OS) der Kohorte nach EPclin High und Low Risk Score
(logrank test=0.24, df=1, p=0.6234)

4.3.3.2. Disease-free-Survival nach EP Score (12-Gen-Score) und EPclin Score

Mit einem Hazard Ratio von 1,34 (95%KI 0,53-3,37; p=0,553) zeigte die EP-(12-Gen) Score Low Risk Gruppe ein besseres DFS-Outcome als die EP High Risk Gruppe (Abbildung 4.3-7).



166	163	160	90	37	5	EPscore low
192	188	185	142	68	6	EPscore high

Abbildung 4.3-7 Krankheitsfreies Überleben (Disease-free-Survival=DFS) in % nach EP(12-Gen-) High und Low Risk Score
(HR.=1,34; 95% KI 0,53-3,37; p=0,553)

Im Vergleich liefert die Addition von Tumorgröße und Nodalstatus im EPclin Score eine exaktere prognostische Differenzierung (Abbildung 4.3-8).

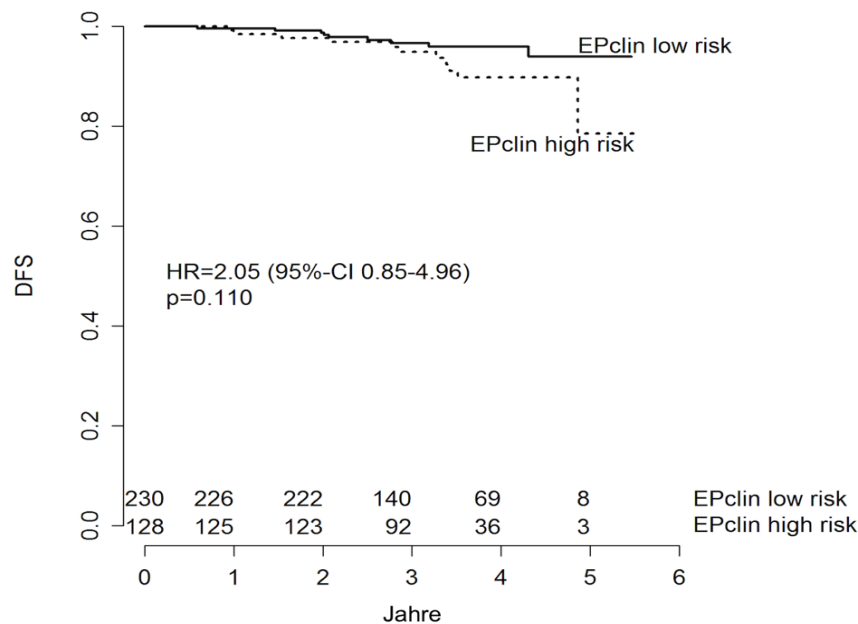


Abbildung 4.3-8 Krankheitsfreies Überleben (DFS= Disease-free-Survival) nach EPclin High und Low Risk in Jahren

(Low Risk: 3-Jahres-Überleben 96.6% (95%CI 94.2-99.1); High Risk: 3-Jahres-Überleben 94.9% (95%CI 90.9-99.0); HR.=2.05 (95%CI 0.85-4.96) p= 0.110)

4.3.3.3. DFS der EPclin Hochrisikogruppe nach Chemotherapie-Compliance

Die Patientinnen, die aufgrund der Zuordnung zur EPclin Hochrisikogruppe die adjuvante Chemotherapie tatsächlich durchführten, hatten ein deutlich niedrigeres Risiko für Rezidive, Tod oder Fernmetastasen als Patientinnen, die diese nicht durchführten (HR 0.32; 95%KI 0.10-1.05; p=0.061): So hatten Hochrisiko-Patienten nach Chemotherapie ein 3-Jahres-krankheitsfreies-Überleben von 96,3% (95%KI 92,2-100), während das Überleben der Patientinnen, die die Chemotherapie nicht durchführten, nur bei 91,5% (95%KI 82.7-100) lag. Dies demonstriert die Abbildung 4.3-9.

Damit erfuhren EPclin High Risk Patientinnen, die die adjuvante Chemotherapie erhielten, eine Rückfall-Reduktion von 68% (HR. 0,32; 95%ki 0,10-1,04, P=0,061), verglichen mit den Hochrisiko-Patientinnen ohne Chemotherapie (HR. 3,93; 95%KI 1,41-10,92; p=0,009).

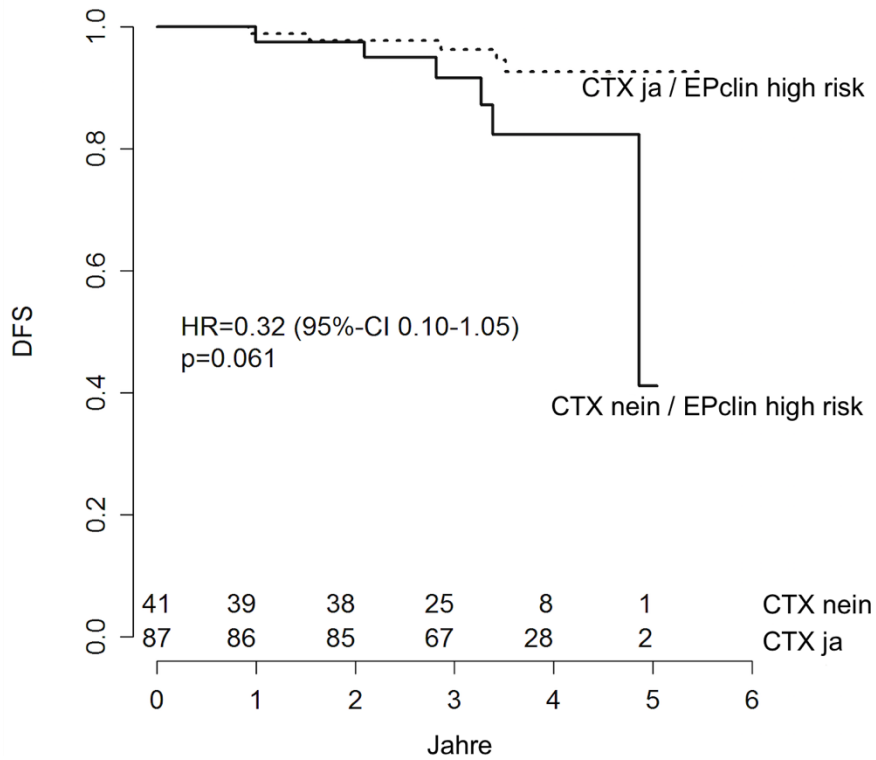


Abbildung 4.3-9 Krankheitsfreies Überleben (DFS= Disease free survival) von EPclin High Risk Patienten mit durchgeführter CTX vs. EPclin High Risk mit nicht durchgeführter CTX (3-Jahres-DFS: EPclin High Risk/CTX ja: 96,3% (95%KI 92,2-100); EPclin High Risk/CTX nein: 91,5% (95%KI 82.7-100); HR. 0.32; 95%KI 0.10-1.05; p=0.061).
Abkürzungen: CTX= Chemotherapie, DFS = Krankheitsfreies Überleben

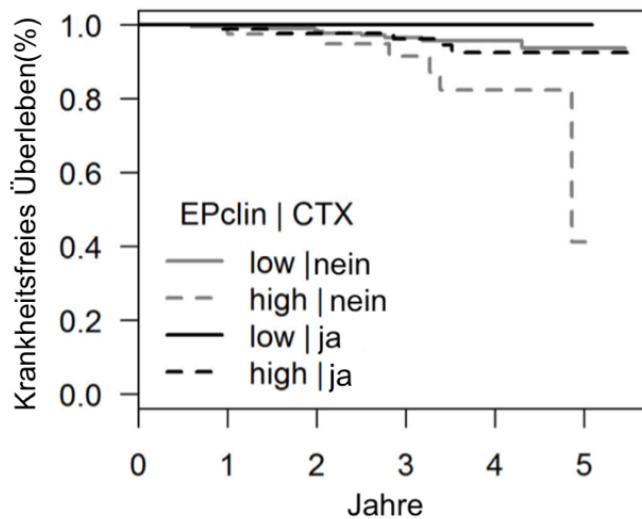


Abbildung 4.3-10 Krankheitsfreies Überleben (DFS= Disease free survival) von EPclin High/Low und CTX/keine CTX (3-Jahres-DFS: EPclin High Risk/CTX ja: 96,3% (95%KI 92,2-100); EPclin High Risk/CTX nein: 91,5% (95%KI 82.7-100); HR. 0.32; 95%KI 0.10-1.05; p=0.061). Abkürzungen: CTX= Chemotherapie

Das DFS der Patientinnen, die bei EPclin Low Risk neben einer alleinigen endokrinen Therapie keine Chemotherapie empfohlen bekamen, ist vergleichbar mit Patientinnen, die bei EPclin High Risk eine Chemotherapie durchführten (Abbildung 4.3-10).

4.3.3.4. Disease-free-Survival nach Ki-67

Wir waren ebenfalls interessiert an der prognostischen Aussagekraft von Ki-67: Das Risiko für ein Disease-Event war für Patientinnen mit $Ki-67 \geq 25\%$ erhöht, wie die Abbildung 4.3-11 demonstriert.

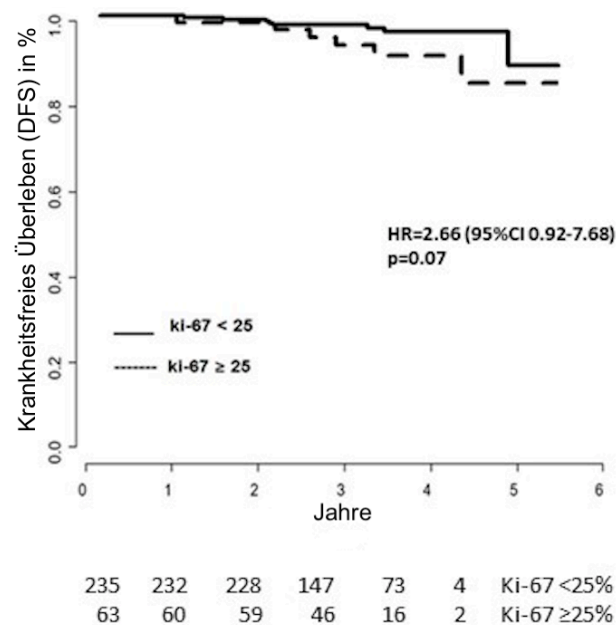


Abbildung 4.3-11 Krankheitsfreies Überleben (Disease-free-Survival=DFS) in % nach Ki-67 <25%/≥25%

(HR.=2,66; 95% KI 0,92-7,68; p=0,07)

4.3.3.5. Outcome nach Grading

Die Überlebenskurven nach Grading werden in der Abbildung 4.3-12 dargestellt. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenskurven des guten bis schlechten Gradings (G1-G3).

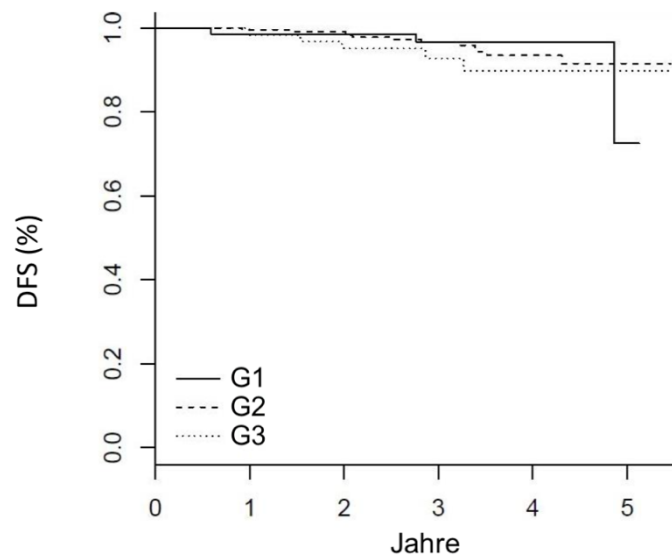


Abbildung 4.3-12 Krankheitsfreies Überleben (DFS=Disease free Survival) nach Grading
(Logrank-Test = 1.03 on 2 df, p=0.5961)

4.3.4. Lokalrezidive

3 von 373 Patientinnen entwickelten nach abgeschlossener Therapie ein Lokalrezidiv. Die pathologischen Parameter und die Compliance dieser Patientinnen werden im Appendix aufgeführt (Tabelle 7.3-4).

4.3.5. Metastasen

8 von 373 Patientinnen entwickelten Fernmetastasen: 4 Patientinnen entwickelten Knochen, 2 Leber- und eine Patientin Pleurametastasen; bei einer Patientin fanden sich Leber, Knochen und Lungenmetastasen. Die Patientin mit Pleurametastasen und die Patientin mit multiplen Metastasen verstarben während des Follow-Up-Zeitraums. Das 3-Jahres-metastasenfreie Überleben betrug 98,9% (95% KI 0,97-1,0). Die pathologischen Parameter und die Compliance der Patientinnen werden im Appendix aufgeführt (Tabelle 7.3-5).

4.3.5.1. Metastasen nach EPclin High und Low Risk

Das 3-Jahres-Fernmetastasen-freies-Überleben in der EPclin Low Risk Gruppe war 99,6% (95%KI 98,7-100) versus 97,6% (95%KI 95,0-100) in der EPclin High Risk Gruppe (Abbildung 4.3-13). Patientinnen aus der EPclin High Risk Gruppe hatten ein signifikant höheres Risiko Fernmetastasen zu entwickeln, als Patientinnen aus der EPclin Low Risk Gruppe (HR 5.18; 95%CI 1.04-25.74; $p=0.0443$).

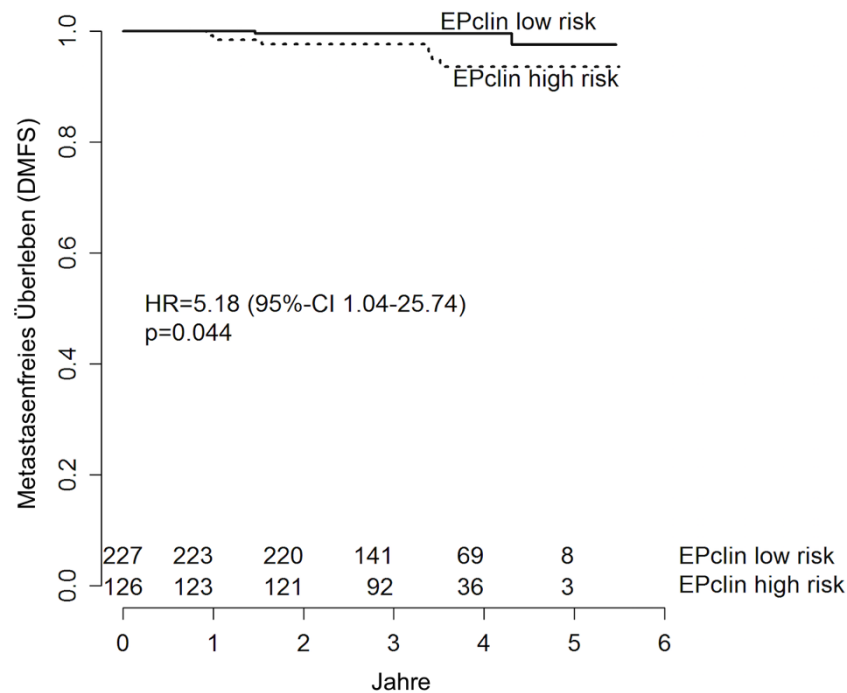


Abbildung 4.3-13 Fernmetastasenfreies Überleben (Distant metastasis free survival =DMFS) der Gesamtkohorte nach EPclin High und Low Risk
(3-Jahres-DMFS: Low Risk=99,6%(95%KI 98,7-100); High Risk=97,6% (95%KI 95,0-100); HR. 5.18; 95%CI 1.04-25.74; $p=0.044$).

4.3.6. Todesfälle in der Kohorte

In der Kohorte wurden 11 Todesfälle verzeichnet (Tabelle 7.3-3 im Appendix).

2 Patientinnen in der Kohorte verstarben, vermutlich, tumorassoziiert: Bei einer Patientinnen wurden im Verlauf Pleurametastasen diagnostiziert (Kapitel 4.3.5.); bei der zweiten Patientin Leber-, Knochen und Lungenmetastasen(Kapitel 4.3.5.).

Eine Patientin verstarb an einem Infekt infolge einer vermutlich therapieassoziierten Leukämie.

7 Patientinnen verstarben nicht tumorassoziiert. Zu den Todesursachen zählten: Sepsis im Rahmen einer unbekanntenen Fistelbildung, Myokardinfarkt, Sepsis eines

unbekannten Fokus und ein Merkelzellkarzinom. Bei 3 Patientinnen wurde bis auf die Information „tumorunabhängig“ keine Angabe zur Todesursache gemacht.

Bei einer Patientin wurde keine Aussage über eine mögliche Tumorassoziation oder Ursache getroffen.

4.3.7. Outcome Männer

Unter den 6 männlichen Patienten in der Kohorte wurde kein Tumorrezidiv, keine Fernmetastasen und kein Todesfall registriert.

4.3.8. Der optimale Cut-Off für Ki-67

In der letzten statistischen Analyse untersuchten wir den optimalen Ki-67-Cut-Off, um bestmögliche Übereinstimmung mit der dichotomen Risikostratifikation nach EndoPredict zu erreichen. Hierzu stellte die ROC-Kurve die Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher Ki-67-Cut-Offs dieser gegenüber:

Die Area under the Curve für Ki-67 und den EP (12-Gen-) Score lag bei 0,797 (Abbildung 4.3-14; 95% CI: 0.748-0.846, $p < 0.0001$). Der Cut-Off von 20% zeigte hierbei eine Sensitivität von 68% und eine Spezifität von 80%.

Die Area under the Curve für den EPclin Score und Ki-67 lag bei 0,7454 (Abbildung 4.3-15; 95% CI 0.684-0.806, $p < 0.0001$). Der Cut-Off von 20% zeigte hierbei eine Sensitivität von 67% und eine Spezifität von 78%.

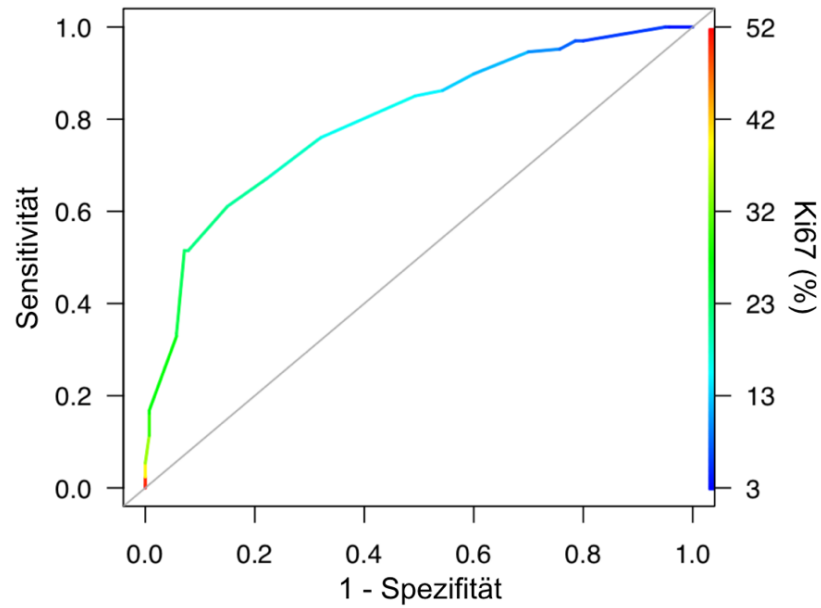


Abbildung 4.3-14 ROC-Analyse des Ki-67-Cut-Off nach EP Score
(Area under the Curve=0,797; 95% CI: 0.748-0.846, $p < 0.0001$)

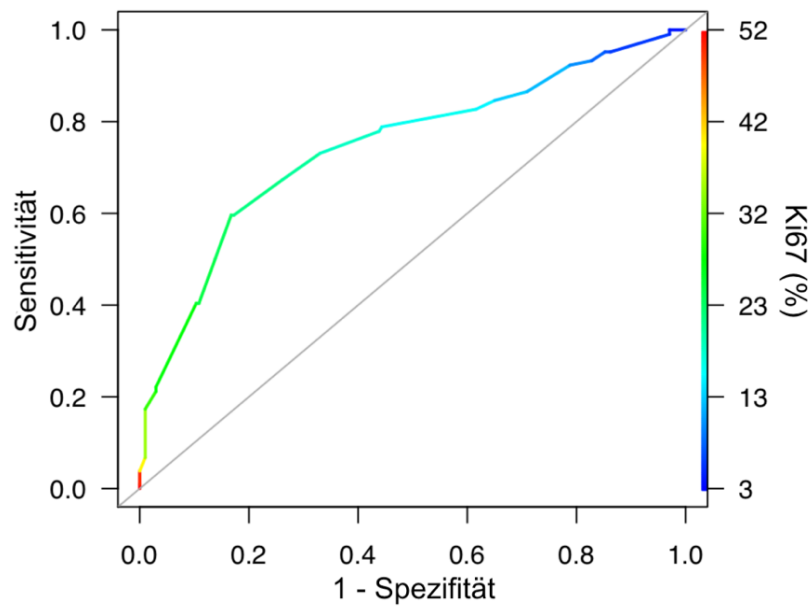


Abbildung 4.3-15 ROC-Analyse des Ki-67-Cut-Off nach EPclin Scores
(Area under the Curve (AUC)=0,7454; 95% CI 0.684-0.806, $p < 0.0001$)

Durch eine andere Näherung mittels LogRank-Test, welcher Überlebenskurven nach Cut-Off vergleicht, analysierten wir zwei weitere optimale Ki-67-Cut-Off nach krankheitsfreiem Überleben und Gesamtüberleben: Für das Gesamtüberleben (OS) wurde der größte Unterschied bei einem Cut-Off von 18% gefunden (Abbildung 4.3-17), beim krankheitsfreien Überleben (DFS) lag dieses bei 24% (Abbildung 4.3-16) ohne statistische Signifikanz.

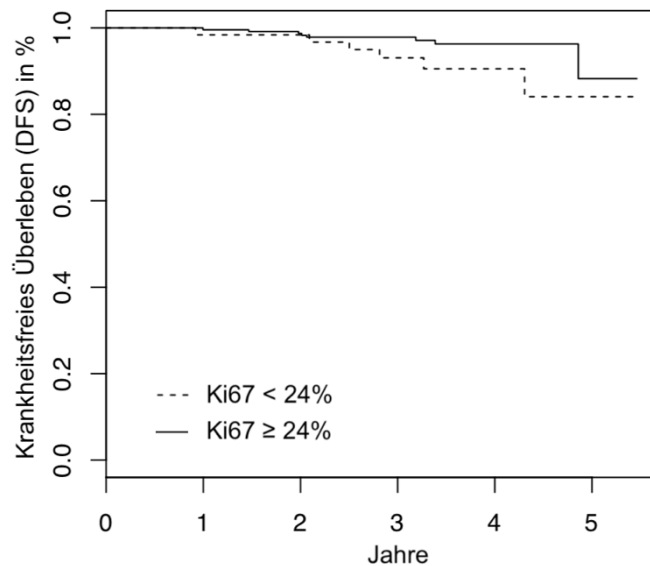


Abbildung 4.3-16 LogRank-Statistik für das Cut-Off des Ki-67-Wertes nach krankheitsfreiem Überleben (Disease Free Survival=DFS) in der Gesamtkohorte (M = 1.917, p-value = 0.2793, estimated cutpoint: 24)

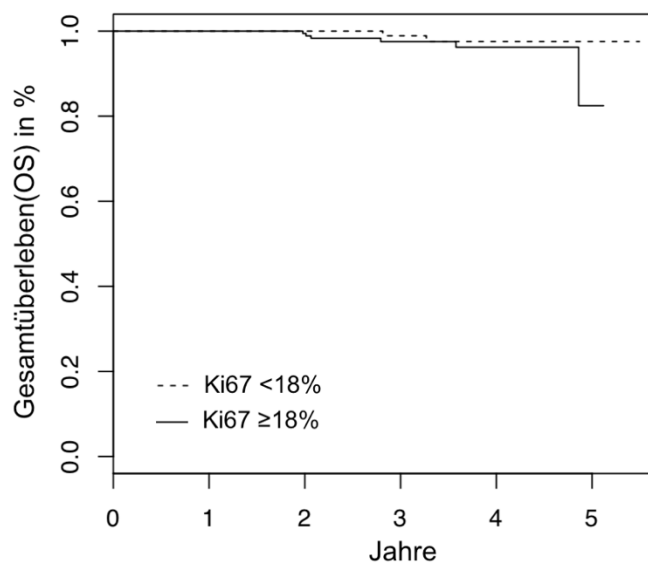


Abbildung 4.3-17 LogRank-Statistik für das Cut-Off des Ki-67-Wertes nach Gesamtüberleben (Overall Survival=OS) in der Gesamtkohorte (M = 1.0889, p-value = 0.8756, estimated cutpoint:18)

5. Diskussion

Die etablierten klassischen Prognosefaktoren erlauben häufig keine objektive Einschätzung des individuellen Fernmetastasierungsrisiko:

Neue Genexpressionstests sollen die Identifikation der Patientinnen mit Mammakarzinom ermöglichen, die aufgrund eines erhöhten Risikos von einer Chemotherapie profitieren, gegenüber den Patientinnen mit geringem Risiko, die durch eine alleinige endokrine Therapie vor einer Übertherapie durch eine Chemotherapie zu schützen sind.

Im Rahmen dieser Dissertation wird das Outcome von 373 Patientinnen mit Her2-negativem, Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs, deren Therapie anhand der Risikostratifizierung des Genexpressionstests EndoPredict entschieden wurde, präsentiert. Zum aktuellen Kenntnisstand sind dies die ersten prospektiven klinischen Outcome-Daten zum EndoPredict Test.

Nach Durchführung des Tests bei Diagnosestellung von März 2012 bis März 2015 wurden 238 Patientinnen (63,8%) in die Niedrigrisikogruppe und 135 Patientinnen (36,5%) in die Hochrisikogruppe klassifiziert. Von 128 der 373 Patientinnen, denen auf Grundlage des EndoPredict-Testergebnisses neben der endokrinen Therapie und ggf. Bestrahlung eine Chemotherapie empfohlen wurden, waren 92 (71,9%) compliant zur Chemotherapie. Nach einem medianem Follow-Up von 3,47 Jahren (41,6 Monate) zeigte sich, dass Patientinnen in der Hochrisikogruppe ein signifikant fünffach höheres Risiko für Fernmetastasen hatten als Patientinnen der Niedrigrisikogruppe (HR 5.18; 95%KI 1.04-25.74; $p=0.044$). Das 3-Jahres-krankheitsfreie und -metastasenfreie Überleben war in der EPclin Niedrigrisikogruppe 96,9% (95%KI 94.2-99.1%) und 99,6% (95%KI 98.7-100%) versus 94,9% (95%KI 90.9-99.0%) und 97,6% (95%KI 95.0-100%) in der EPclin Hochrisikogruppe.

Besonders hervorzuheben ist, dass Patientinnen in der Hochrisikogruppe, welche eine Chemotherapie durchführten, ein krankheitsfreies Überleben von 96,3% (95%KI

92,2-100) verzeichneten. Patientinnen, welche die Chemotherapie trotz Hochrisikogruppe nicht durchführten, hatten im Vergleich nach 3 Jahren ein deutlich geringeres krankheitsfreies Überleben mit 91,5% (95%KI 82.7-100%; HR 0.32, 95%KI 0.10-1.05; $p=0.061$).

In der Differenzierung zwischen Luminal A- und B-Typ-Tumoren, welche nach aktueller Empfehlung zur Risikostratifizierung mittels Ki-67 für die Therapieentscheidung herangezogen werden soll[30], besteht u.a. bezüglich eines geeigneten Cut-Offs von Ki-67 fortwährend Diskussionsbedarf: Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge lag der optimale Cut-Off nach EP-Score-Ergebnissen bei 20% ($p<0,0001$), nach krankheitsfreiem Überleben bei 24% ($p=0,28$). Es wurde eine starke Korrelation zwischen den Ki-67- und EndoPredict-Ergebnissen (EP-Score: $r=0,63$; EPclin: $r=0,59$) beobachtet.

5.1. Diskussion der Methoden

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in vier methodische Arbeitsschritte:

Die Durchführung des EndoPredict-Tests am geeigneten Patientenkollektiv, die retrospektive Bestimmung des Ki-67-Status, sowie die Erhebung der Compliance zur Therapieempfehlung und Nachbeobachtung.

Die Studie, auf der die vorliegende Arbeit basiert, ist, zum Zeitpunkt der erstmaligen Publikation, die erste prospektive Studie, welche Outcome Daten zum EndoPredict-Test präsentiert: So wurde jede Patientin, entsprechend der EndoPredict-Indikationen nach retrospektiver Datenlage der ABCSG-6 und -8-Kohorte von Filipits et al. (2011), eingeschlossen, bei der im Zeitraum von März 2012 bis März 2015 ein Östrogenrezeptor-positives, Her2-negatives Mammakarzinom ohne Fernmetastasierung mit maximal N1c-Nodalstatus diagnostiziert und anschließend der EndoPredict Test durchgeführt wurde.[99] Ein großer Vorteil von prospektiven Studien gegenüber retrospektiver Studien liegt in der höheren Datenqualität mit Darstellung von Veränderungen im Zeitablauf und somit höherer Aussagekraft.

In Anlehnung an eine Studie von Müller et al. wurden 97,3% der Tests an Operationspräparaten und 2,7% ($n=10$) an Biopsien durchgeführt. Müller et al.

haben, durch eine nachgewiesene starke Korrelation ($r=0,92$) zwischen EndoPredict-Ergebnissen an Stanzbiopsien und dessen korrespondierenden Operationspräparat eine große Reliabilität der EndoPredict-Ergebnisse an Biopsien demonstriert [100].

Ein großer Vorteil des EndoPredict Tests ist, dass dieser nicht an ein Zentrallabor eingesendet werden muss: So konnte er dezentral im Labor der Pathologie der TU München als qualifizierte Molekularpathologie nach Standard durchgeführt und ausgewertet werden. Denkert et al. und Kronenwetter et al. bestätigten die Validität und zuverlässige dezentrale Auswertung des EndoPredict Tests [102], [124], Poremba et al. seine Robustheit und Reliabilität in der klinischen Routine [101].

Das Patientenkollektiv bestand zu circa 1/3 aus prämenopausalen und zu 2/3 aus postmenopausalen Patientinnen. Initial galt ein prämenopausaler Status in der ABCSG-6 und -8-Kohorte, auf der die klinische Validierung des Tests fußt, als Ausschlusskriterium [99], [125]. Martin et al. konnten jedoch im GEICAM 9906 Trial sowohl für postmenopausale als auch prämenopausale Patientinnen eine unabhängige prognostische Aussagekraft durch den EndoPredict nachweisen [126].

Die heterogene Auswahl der Patienten spiegelt somit das allgemeine Anwendungsspektrum des EndoPredicts bezüglich des Menopausenstatus wider, bis auf eine Ausnahme: Nach aktueller Studienlage ist dies die erste EndoPredict-Studie, die männliche Patienten ($n=6$) einschließt. Diese wurden aufgrund ihrer Östrogenrezeptorpositivität analog zu Patientinnen mit östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom behandelt (Diskussion des Outcomes unter Kapitel 7.4.2.).

Mit einer Kohortengröße von 373 Patientinnen war es möglich angesichts der klinischen Relevanz u.a. auch bei geringen Korrelationskoeffizienten statistische Signifikanz zu erhalten.

Zehn Patientinnen unterzogen sich nach EPclin Ergebnis einer neoadjuvanten Therapie, bei denen der EndoPredict-Test an der Biopsie durchgeführt wurde und so vor systemischer Therapie erfolgte. Gestützt durch die Studie von Bertucci et al., nach der EndoPredict ebenfalls fähig ist, das neoadjuvante Chemotherapie-Ansprechen zu präzisieren, wurden diese Patientinnen in unsere Kohorte eingeschlossen.

Die Ki-67-Bestimmung erfolgte retrospektiv: Belegt durch Camp et al. (2000), Cattoretti et al. (1992) und Dowsett et al. (2011) ist die Antigenität bei ordnungsgemäßer Fixierung, Paraffinierung und präanalytischen Handhabung des Tumorgewebes, wie sie in diesem Fall gegeben war, auch über Jahrzehnte erhalten und demnach validiert[50], [127], [128].

Um sicherzustellen, dass genug auswertbares Tumormaterial verfügbar war, wurden nach Erstellen der Gewebeschnitte alle Schnitte nach Klinikstandard Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mikroskopisch auf Tumorgewebe untersucht. Anstatt einer manuellen Färbung wurde die maschinelle Färbung mittels MIB1-Klons im VENTANA-Färbesystems BenchMark XT gewählt, da diese auch im klinischen Alltag zur Ki-67-Bestimmung genutzt wird. So können konstante standardisierte Färbebedingungen (inkl. Positivkontrollen an Tonsillen) und reproduzierbare Resultate gewährleistet werden, die auf die Praxis übertragbar sind. Der MIB-1-Antikörper wurde gewählt, da dieser aufgrund seiner hohen Validität als Goldstandard in der Ki-67-Färbung gilt[50]. In 6 Fällen erfolgte die Färbung an Biopsie-Präparaten, welche nach der „International Ki-67 in Breast Cancer Group“ ebenfalls für die immunhistochemische Färbung geeignet sind[50].

Um eine Interobserver-Variabilität auszuschließen, welche bei Ki-67 aufgrund der fehlenden Standardisierung hoch ist[2], [50], [56]–[61], [129], wurden alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte, verblindet ohne Kenntnisse der EndoPredict-Ergebnisse, einheitlich von einer auf Brustkrebs spezialisierten Pathologin mikroskopisch untersucht. Orientiert wurde sich an den klinischen Maßstäben der „International Ki-67 in Breast Cancer Group“ und der vereinfachten 5-Stufen-Skala (Eye-5-Methode; Kapitel 1.2.2.1.) [50], [63]. Die vereinfachte 5-Stufen-Skala wurde beschrieben durch Hida et al. (2015) und ist anderen Verfahren, wie dem Ki-67 Labelling Index, in Praktikabilität und niedriger Variabilität im klinischen Alltag überlegen[63].

Der Follow-Up-Erhebung durch das Qualitätsmanagements des Brustzentrums des Klinikums rechts der Isar wurde einem Telefongesprächs anstelle eines Fragebogens,

der Vorzug gegeben, um einen tagesaktuellen Informationsstand zu erhalten und Rückfragen direkt klären zu können. Dies war in 72,4% der Fälle erfolgreich. Zweitrangig erfolgte eine Abfrage mittels Fragebogen, Arztkontakt und klinikinterner Datenbank u.w. (Tabelle 3.4-1).

Die Variabilität des Follow-Up-Zeitraums (Abbildung 4.3-3) trotz der hohen Zahl an erreichten Patientinnen per Fax, Telefon u.a., ist gegeben durch die Anzahl an Patientinnen, die nicht erreichbar waren, deren letzte Informationen aber trotzdem statistisch mit in die Follow-Up-Daten einfließen konnten.

Die in dieser Arbeit gewählte Definition, eine vor 5 Jahren abgebrochenen endokrine Therapie als Incompliance zu werten, unabhängig von der Einnahmedauer, basiert auf einer Studie der Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG, 2005): Diese suggeriert einen deutlich signifikanten Unterschied im Outcome zwischen Patientinnen, die die endokrine Therapie 1-2 Jahre einnahmen, zu denen, die diese 5 Jahre durchführten ($2p < 0,00001$ für Rezidive, $2p = 0,01$ für Brustkrebsmortalität)[42], weshalb ein Cut-Off bei 5 Jahren weitaus aussagekräftiger erscheint.

Eine Compliance zur Radiotherapie bestand, soweit alle Bestrahlungstermine eingehalten wurden. Die Compliance zur Chemotherapie war gegeben bei Durchführung von $>75\%$ der Zyklen. Dies ist vergleichbar mit der Definition von Neugut et al. (2016) mit $>80\%$ der Zyklen[130].

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Der EndoPredict-Test trifft Aussage über das prognostische Risiko einer Fernmetastasierung innerhalb von 10 Jahren[131]. Nur Patientinnen, die laut des EndoPredict-Ergebnis ein Fernmetastasierungsrisiko von über 10% innerhalb dieser 10 Jahre haben, sollen von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren[72], [99], [131]–[133]. Aufgrund des Mangels an prospektiven Outcome-Daten konnte eine Validierung des EndoPredict-Tests bis dato nur auf Basis von retrospektiven Studien erfolgen. Das Evidenzlevel der AGO 2021 liegt daher derzeit nur bei 2b [2], [93].

Kritische Stimmen bezüglich Multigentests kamen 2016 vom IQWiG (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen), die aufgrund der „nicht ausreichende[n] Datenlage“ die Durchführung nicht empfahlen[134]. Diese Entscheidung wurde u.a. aufgrund der weiterbestehenden Gefahr von Übertherapien in der S3-Leitlinie 2019 kritisch gesehen[2], da Patientinnen mit einem „geringen absoluten Risiko nur einen geringen absoluten Nutzen“ von einer adjuvanten Chemotherapie haben und so entsprechend mit Verzicht auf eine Chemotherapie potenziell lebensgefährliche Nebenwirkungen vermeiden können[30], [84].

Nachdem 2019 die Verwendung des Oncotype DX u.a. aufgrund der prospektiven Datenlage durch den Gemeinsamen Bundesausschuss (G-BA) für bestimmte Frauen ohne Lymphknotenbefall in die Regelversorgung aufgenommen wurde[135], erschien 2020 eine aktualisierte Einschätzung des IQWiG bezüglich der Frage, ob in die Regelversorgung auch weitere Tests eingegliedert werden sollten: Aufgrund der geringen Übereinstimmung der Zuordnung in die Risikogruppen durch die jeweiligen Tests, des Mangels an randomisierten kontrollierten Studien und der geringen Ergebnissicherheit der Prognose- und Konkordanzstudien wurde kein weiterer Multigentest zur Aufnahme in die Regelversorgung empfohlen[96].

Die Diskussion demonstrierte die dringende Notwendigkeit ausreichender prospektiver Evidenz der weiteren verfügbaren Tests.

In der vorliegenden Arbeit wurden Patientinnen unter realen Alltagsbedingungen prospektiv eingeschlossen:

Der EndoPredict Test wies zwei Drittel der Gesamtkohorte der Niedrigrisikogruppe zu, während ein Drittel als Hochrisikopatienten klassifiziert wurden. Dies ist im Einklang mit vorangegangenen Real-World-Daten: Eine französische multizentrische Studie, welche bei 201 Patientinnen prospektiv den Einfluss auf die Therapieentscheidung durch den EndoPredict-Test untersuchte, ordnete ebenfalls

67% der Patientinnen der Niedrigrisikogruppe zu [136]. Eine Studie aus 82 deutschen Fallbeispielen ordnete circa 68% der Niedrigrisikogruppe zu [137].

Diese Daten weisen darauf hin, dass die vorgestellten Daten die realen Alltagsbedingungen widerspiegeln und untermauern die Robustheit des Tests in der klinischen Routine.

Durch Einbeziehen von klinischen Faktoren wie Tumorgröße und Nodalstatus konnte der EPclin Score in der vorliegenden Arbeit 238 Patientinnen mehr der Niedrigrisikogruppe zuordnen als der EP Score. Dies legt nahe, dass durch die klinische Verrechnung des EndoPredicts weniger Patientinnen eine Chemotherapie empfohlen werden kann, als durch eine rein-genetisch errechneten Score. Der EndoPredict-Test war bei seiner Einführung 2011 der erste Genexpressionstest, der sowohl Gensignaturen als auch klassische klinische Parameter berücksichtigte [138]. Durch die Möglichkeit einer Integration des Nodalstatus konnte der Test zum einen sowohl an Patientinnen mit negativem als auch positivem Nodalstatus durchgeführt werden, was eine breitere Anwendungsmöglichkeit erlaubt: Patientinnen mit positivem Nodalstatus müssen sich so nicht automatisch einer Chemotherapie unterziehen. Zum anderen konnten Studien von Buus et al. und Sestak et al., welche den EndoPredict mit unterschiedlichen Genexpressionstest verglichen, zeigen, dass Tests mit einer Verflechtung von molekularen und klinischen Faktoren gegenüber den rein molekularen Tests in Bezug auf Langzeitprognosen überlegen sind, insbesondere bei Patientinnen mit positivem Nodalstatus und späten Metastasen [30], [139], [140]. Eine mögliche Interpretation dessen, dass diese Überlegenheit des EndoPredict-Test nur auf die Hinzunahme klinischer Parameter zurückzuführen ist [30], lässt sich durch die Beobachtung der vorliegenden Korrelationen und Outcome Daten des EP Score (12-Gen-Score) entkräften: So zeigt der EP Score auch ohne klinische Faktoren einen signifikanten Zusammenhang mit Grading, Progesteronrezeptor und Ki-67 nach High- und Low Risk. Auch das Outcome nach EP Score unterteilt in Low und High Risk Score demonstriert zwar ein geringeres

Hazard Ratio als der EPclin Score, zeigt jedoch auch ohne Inklusion von Tumorgröße und Nodalstatus eine Differenzierung mit $HR=1,34$ (95% KI 0,53-3,37; $p=0,553$).

Die beobachtete histologische Verteilung, nach der 70,7% der Mammakarzinome dem duktaalen Subtypen zuzuordnen sind, ist vergleichbar mit der Real-World-Data[24]. Das mediane Alter der Kohorte lag bei 59,92 Jahren und liegt mit 4,3 Jahren etwas unter dem mittleres Erkrankungsalter der deutschen Bevölkerung laut Robert-Koch-Institut mit 64,3 Jahre (Stand 2013)[1]. Eine mögliche Ursache hierfür liegt im Ausschluss von Patientinnen mit fortgeschrittenen Tumoren, wie u.a. einer Tumorgröße $>T3$, welche im Durchschnitt bei 76,5 Jahren und somit im Vergleich höherem Alter apparent werden[15]. Auch vermag die Monozentrität an einem Zentrum des Deutschen Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs eine Rolle spielen, da nach Anbindung so Neoplasien bei jungen Frauen häufig schon früh entdeckt werden können. Auch die Urbanität Münchens und Umgebung mit hoher Ärztedichte bietet eine umfangreiche Eingliederung in Früherkennungsscreenings, so dass Tumorerkrankung früher diagnostiziert werden können.

5.2.1. Ki-67 und EndoPredict

Laut Filipits et al. war der EndoPredict Test in der ABCSG-6 und -8-Kohorte allen konventionellen klinisch-pathologischen Risikofaktoren überlegen[99]. Die letzten St. Gallen-Konsensus empfehlen jedoch, u.a. aufgrund des Evidenzlevels und des Bedarf weiterer bestätigender Studien, anstelle von Genexpressionstests weiterhin eine Risikostratifizierung in Luminal-A- und B-Tumore: Patientinnen, die einen Luminal-A-Tumor aufweisen, benötigen eine alleinige endokrine Therapie, während Patientinnen mit Luminal-B-Tumor aufgrund des erhöhten Fernmetastasierungsrisikos eine zusätzliche adjuvante Chemotherapie empfohlen wird (Kapitel 1.3.) [55], [85]. Diskriminierung dieser intrinsischen Subtypen hängt hier jedoch ausschließlich vom Proliferationsfaktor Ki-67 ab, der deshalb einen besonderen Stellungswert einnimmt. Da jedoch nach wie vor trotz der großen Interobserver- und Cut-Off-Variabilität keine einheitliche Standardisierung der

Auswertung von Ki-67 vorliegt [2], [50], [56]–[61], [129], bestand besonders großes Interesse bezüglich einer potenziellen Äquivalenz zwischen der Risikostratifizierung durch Ki-67 und den EndoPredict-Test:

Neben einer nachgewiesenen Korrelation zwischen Grading und Ki-67 konnte zwischen den 307 Ki-67-Ergebnissen und dem EP (12-Gen Molekular-Score; $r=0,63$, p -Wert= $<0,001$), als auch dem EPclin- Score ($r=0,59$; p -Wert= $<0,001$) eine statistisch signifikante Assoziation und Korrelation nachgewiesen werden. Auch Varga et al. zeigten in ihrer Studie unter 34 Patientinnen eine statistisch signifikante Pearson's Korrelation zwischen EP (12-Gen-) Score und Ki-67 mit $r=0,55$ ($p<0.0001$). 40% der EP (12-Gen)-Score Niedrigrisikogruppe erhielt ein Ki-67-Ergebnis von $\leq 10\%$ und 68% ein Ergebnis von $\leq 15\%$. Vergleichbar dazu hatten mit 51,5% die Mehrheit aller EP Hochrisikopatientinnen ein Ki-67-Ergebnis von $>20\%$ [131].

Die deutlich niedrigere Korrelation zwischen dem klinischen EPclin und Ki-67 mit $r=0,24$ war nicht statistisch signifikant[141]: Bei näherem Blick auf den EPclin Score nach Einbeziehung von Tumorgröße und Nodalstatus zeigten nur 29,1% der Tumore mit niedrigen EPclin Ergebnis ein Ki-67-Ergebnis mit einem Cut-Off von $\leq 10\%$ [131]. Mit überdies 13,5% aller Hochrisikopatientinnen wies ein beachtlicher Teil einen Ki-67-Wert unter diesem Cut-Off von 10% auf und wäre damit bei einer Therapieentscheidung nach Ki-67, dem EndoPredict-Test nach zu urteilen, vor einer Untertherapie gefährdet[131].

Die größte Schnittmenge fand sich bei einem Ki-67-Cut-Off von $\geq 25\%$, bei dem 40% aller EPclin High Risk Tumore zu finden waren[131]. Dies deckt sich mit der, durch das krankheitsfreie Überleben festgestellte, prognostischen Aussagekraft durch Ki-67, bei der die größte Differenzierung zwischen hohem und niedrigem Rezidivrisiko ebenfalls bei 25% lag (Kapitel 4.3.3.4.) [131]. Auch die multizentrischen Erhebungen aus einem der deutschen klinischen Krebsregister untermauern diese Beobachtung[30], [142].

Zudem fand die Näherung mittels LogRank-Test, welche in Kapitel 4.3.8. aufgeführt wurde, den optimalen Cut-off mittels krankheitsfreiem Überleben (DFS) und EPclin bei 24%, dies jedoch ohne statistische Signifikanz (p-Wert = 0.2793).

Nichtsdestotrotz erschienen neben den 40% der EndoPredict-Hochrisikogruppe auch 10% aller Niedrigrisikopatientinnen unter den $\geq 25\%$ Ki-67-Ergebnissen, was demnach nach einer Therapieentscheidung alleine durch das Ki-67-Ergebnis, gemäß dem Ergebnis des EndoPredict-Tests, höchstwahrscheinlich in einer Übertherapie durch eine Chemotherapie mit entsprechenden Nebenwirkungen resultiert wäre[131].

Die vorgestellten Ergebnisse bestätigen die Fähigkeit von Ki-67, Patientinnen mit einem ungünstigen Tumorprofil und einhergehendem erhöhtem Fernmetastasierungsrisiko zu identifizieren. So kann Ki-67, wie auch durch die S3-Leitlinie vorgegeben, in der Entscheidung für eine Chemotherapie helfen. Da jedoch eine große Unzuverlässigkeit der Stratifizierung im niedrigen und mittleren Ki-67-Bereich zu beobachten ist, kann Ki-67 Patientinnen der Niedrigrisikogruppe nicht sicher erkennen.

Alles in allem, ist Ki-67 als zusätzlicher Biomarker in der Risikostratifizierung in Zusammenschau mit anderen Parametern hilfreich und kann so gegebenenfalls genutzt werden, um Patientinnen mit z.B. niedrigem Ki-67-Ergebnis auszuwählen, an deren Tumorgewebe der EndoPredict Test zur Bestätigung des niedrigen Ergebnisses durchgeführt werden sollte[131]. Eine alleinige Therapieentscheidung mittels Ki-67, wie sie derzeit durch die Einteilung in Luminal A und B empfohlen wird, sollte jedoch kritisch gesehen werden, da eine vermehrte Über- und Untertherapie nach den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich scheint und somit risikobehaftet ist. Demzufolge ist der EndoPredict Test mit seinem klarem Cut-Off Ki-67 im klinischen Alltag überlegen.

Auch eine positive Korrelation sowohl zwischen dem EP Score und Grading, als auch zwischen dem EP Score und Progesteronrezeptorstatus bekräftigen den Score als unabhängigen Biomarker. Beide Parameter sind nicht in der Bestimmung des

EndoPredict Ergebnisses beteiligt. Dies unterstützt die Hypothese, dass der EPclin Score fähig ist als unabhängiger Prognosefaktor das Rückfallrisiko der Karzinome richtig einzuschätzen.

5.2.2. Compliance

Ein weiterer Fokus der Arbeit war die Erhebung der Compliance zur Therapieempfehlung, welche individuell mithilfe des EndoPredict-Testergebnisses im interdisziplinären Tumorboard entschieden wurde. Nach einem medianen Follow-Up von 3,5 Jahren ergab sich eine Noncompliance der Patientinnen bezüglich der empfohlenen endokrinen Therapie von 14%. Diese relativ hohe Zahl deckt sich mit der Literatur [143]–[146]: Nach Huiart et al. brachen 18,9-31% die Therapie innerhalb der 5 Jahre ab [147]. Partridge et al. beobachteten retrospektiv basierend auf Analysen aus Datenbanken, dass jährlich die Compliance sank und nach 3 Jahren nur noch bei 62-79% lag [143]. Murphy et al. erfassten in einer Review aus 29 Studien sogar einen Abbruch vor Abschluss der 5-jährigen Therapie in 31-73% der Fälle [144].

Empfehlungen für eine adjuvante Chemotherapie wurden, bis auf die in Kapitel 4.3.1. beschriebenen Ausnahmen, analog zum EndoPredict Testergebnis festgelegt. Da der EndoPredict-Test Hochrisiko-Patientinnen einen Nutzen durch eine empfohlene Chemotherapie zusagt[103], wurde die Compliance zur Chemotherapie ebenfalls untersucht: Von 128 Patientinnen, welche eine Chemotherapie-Empfehlung erhielten, unterzogen sich 36 Patientinnen nicht der empfohlenen Chemotherapie. Somit liegt die Noncompliance damit bei 28%. Diese erstaunlich hohe Rate korrespondiert mit Zahlen der multizentrischen BRENDA-II-Studie, welche prospektiv 857 Brustkrebs-Patientinnen mit Chemotherapie-Empfehlung nach Tumorboard-Entscheid einschloss und eine Gesamt-Non-Compliance zur Chemotherapie von 19% in Erfahrung brachte: In der Intermediate Risk Group lag die Non-Compliance-Rate ebenfalls bei 28%[146], [148]. Die Gründe hierfür waren in der Hochrisikogruppe der BRENDA-II-Studie ein hohes Lebensalter mit gleichzeitig

erniedrigter Lebensqualität[148]. In der intermediären Risikogruppe überwog die Sorge vor potenziellen Nebenwirkungen der Chemotherapie[148].

5.2.3. Outcome

In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer Fokus auf die Nachbeobachtung von Patientinnen gelegt, deren Therapieempfehlung mittels EndoPredict-Risikostratifikation entschieden wurde.

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit war ein beobachtetes fünffach erhöhtes Risiko für Fernmetastasen in der Hochrisikogruppe im Vergleich zur Niedrigrisikogruppe (HR 5,18, $p=0,04$). Dieses Resultat ist statistisch signifikant und wird untermauert durch vorangegangene Daten von retrospektiven Analysen der ABCSG-6- und -8- und TransATAC-Kohorten: Diese bestätigten den EPclin Score als unabhängigen Prognosefaktor für Fernmetastasen. Auch die Hazard Ratios für Fernmetastasen zwischen beiden Risikogruppen mit jeweils 4,77 und 5,99 ist vergleichbar mit dem Risikoquotienten der vorliegenden Arbeit (HR 5,18) [139], [146], [149].

Aufgrund der oben beschriebenen Non-Compliance-Rate zur Chemotherapie bestand ein großes Interesse in der Nachbeobachtung der Hochrisiko-Patientinnen, die eine Chemotherapie erhielten, im Vergleich zu denen, die diese ablehnten oder nicht erhielten: Mit einer erstaunlichen Reduktion des Risikos für Tod oder Fernmetastasen um 68% (HR 0.32; 95% CI 0.10-1.05; $p=0.06$) durch eine durchgeführte Chemotherapie, zeigt das Ergebnis deutlich, dass der EndoPredict-Test Patientinnen, die von einer Chemotherapie profitieren, identifizieren kann. Dies impliziert eine hohe Relevanz des EndoPredict-Tests in der Therapieentscheidung der klinischen Anwendung. Das Ergebnis kann als prospektive Bestätigung der retrospektiven Studie von Sestak et al. mit einer Gesamtkohorte von 3746 Patientinnen angesehen werden, welche ein signifikant geringeres 10-Jahres-Fernmetastasierungsrisiko bei Hochrisiko-Patientinnen beobachteten, die die chemoendokrine Therapie vollzogen, im Vergleich zu den Hochrisikopatientinnen, die nur eine endokrine Therapie erhielten[103], [146]. Sestak et al stellten daher in Aussicht, dass ein hoher EPclin

Score somit einen Chemotherapie-Nutzen vorhersagen kann[103]; die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen dies.

Sestak et al. ermittelten ebenfalls, dass zwischen Niedrigrisiko-Patientinnen, die eine Chemoendokrine Therapie erhielten und denen, die ausschließlich eine endokrine Therapie einnahmen, kein Unterschied im 10-Jahres-Fernmetastasierungsrisiko bestand. Auch in der vorliegenden Arbeit, in der Patientinnen der Niedrigrisikogruppe nur eine endokrine Therapie erhielten, zeigte sich eine 3-Jahres-Fernmetastasierungs-freies-Überleben von 99,6% (95%KI 98,7-100%, $p=0,044$)[103].

Die Ergebnisse legen nahe, dass Patientinnen, die durch den EndoPredict Test als Niedrigrisikopatientinnen identifiziert werden, vor einer Übertherapie durch eine unnötige Chemotherapie bewahrt werden können und eine statistisch signifikantes exzellentes Überleben aufweisen.

Hervorzuheben ist, dass das krankheitsfreie Überleben der Patientinnen, die bei EPclin Low Risk nur eine alleinige endokrine Therapie durchführten, vergleichbar ist mit Patientinnen, die bei EPclin High Risk eine Chemotherapie durchführten (Abbildung 4.3-10).

Über die Gründe für eine Ablehnung der Chemotherapie ist in der vorliegenden Arbeit, bis auf die Tatsache, dass diese auf Wunsch der Patientinnen abgelehnt wurde, nichts genaueres bekannt: So muss erwähnt werden, dass Patientinnen diese auch aufgrund von Vorerkrankungen oder eines schlechten Allgemeinzustandes trotz einer ausgesprochenen Empfehlung abgelehnt haben könnten, was generell zu einem erhöhtes Sterberisiko in dieser Gruppe führen könnte. Ein erhöhtes Fernmetastasierungsrisiko würde dies allerdings nicht erklären und demnach keinen Einfluss auf das fernmetastasenfreie Überleben haben. Ebenfalls wurden multimorbiden Patientinnen in der Regel, auch trotz High Risk, keine Chemotherapie-Empfehlung ausgesprochen.

Neben dem EndoPredict Test werden in der klinischen Routine weitere Genexpressionstests eingesetzt. Der häufigste ist der OncotypeDX®, seltener der MammaPrint® und der Prosigna® Test (Kapitel 1.3.5.).

In umfangreichen retrospektiven Studien konnte sowohl der EndoPredict® ([72], [99], [105], [126]), der OncotypeDX® ([88], [97], [150]–[152]), als auch der Prosigna® Test ([89], [90], [153], [154]) beim frühen Mammakarzinomen zeigen, dass sie fähig sind, Patientinnen mit einem 10-Jahres-Fernmetastasenrisiko unter 10% zu identifizieren, die nur eine rein endokrine Therapie und keine adjuvante Chemotherapie erhielten, unabhängig von klinisch-pathologischen Charakteristika[2]. Prospektive Daten lagen zuletzt nur für den Oncotype DX und den MammaPrint Test vor[93].

Auch wenn die verfügbaren Tests generell aufgrund ihrer unterschiedlichen Anwendungsspektren nicht direkt vergleichbar sind, so gibt es doch praktikable Unterschiede zwischen den Tests: Ein wichtiger Vorteil des EndoPredict-Test gegenüber dem Oncotype DX und dem MammaPrint ist, dass er neben dem Prosigna-Test der einzige Test ist, der an einem standortnahen Labor durchgeführt werden kann und nicht in ein Zentrallabor eingeschickt werden muss. Dies vereinfacht die Anwendung und verkürzt die Zeit bis zum Ergebnis und der entsprechenden Therapie wesentlich.

Ein weiterer sehr wichtiger Vorteil ist, dass der EndoPredict-Test im Gegensatz zum weit verbreiteten Oncotype DX- und dem Prosigna-Test klar zwischen einer Hoch- und Niedrigrisikogruppe differenziert und keine weitere Unterteilung in eine intermediäre Risikogruppe vornimmt. Eine intermediäre Gruppe stellt behandelnde Ärzte erneut vor große Konflikte bezüglich der Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie; ein Konflikt, weswegen die Genexpressionstest u.a. in erster Linie entwickelt wurden.

Der EndoPredict-Test kann sowohl an prä- und postmenopausalen, als auch nodal-positiven und -negativen Patientinnen angewandt werden und kann daher für eine

andere Patientenkohorte in Betracht gezogen werden, als der Oncotype DX. Der EndoPredict Test bezieht jedoch im Gegensatz zum Oncotype DX keine Patientinnen mit positivem Her2- oder negativen Hormonrezeptorstatus ein.

Varga et al. überprüften und fassten 2019 14 Studien mit 34 bis 1005 eingeschlossenen und insgesamt 5514 Patientinnen zusammen, welche unterschiedliche Genexpressionstest verglichen[155].

Die Studie von Varga et al beschreibt, dass der EndoPredict Test im Vergleich zu anderen Genexpressionstest mit 48,4% mehr Patientinnen der Hochrisikogruppe zuordnete. Im Vergleich dazu ordnete der weit verbreitete Oncotype DX nur 11,5% der Patientinnen der Hochrisikogruppe zu. Somit müssten nach EndoPredict-Ergebnis tendenziell mehr Patientinnen eine Chemotherapie durchführen. Von Bedeutung wäre hier das Outcome der Patientinnen, die nach EndoPredict von einer Chemotherapie profitieren, jedoch nach Oncotype DX keine Chemotherapie benötigen würden und diese daher nicht durchführten. Da bis zuletzt keine prospektiven Daten zum EndoPredict vorlagen, konnte bisweilen keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob trotz der prozentual höheren Anzahl an Hochrisikopatientinnen, diese wirklich eine Chemotherapie benötigen würden oder ob eine Entscheidung mittels EndoPredict in einer Übertherapie resultieren würde.

Hier kann die vorliegende Arbeit nun erstmals prospektive Daten liefern, in dem sie demonstriert, dass Patientinnen, die mittels EndoPredict der Hochrisikogruppe zugeordnet wurden, jedoch eine Chemotherapie nicht durchführten, ein schlechteres Outcome hatten (HR 0,32; 95%KI 0,10-1,04, P=0,061). Demnach ist nach aktuellem Kenntnisstand nicht von einer Übertherapie durch den EndoPredict auszugehen.

Eine Gegenüberstellung des EndoPredict Test und der weiteren verfügbaren Tests auf Grundlage der derzeit verfügbaren Studien ist im Kapitel 7.4. des Appendix zu finden.

Es muss berücksichtigt werden, dass der Follow-Up-Zeitraum der vorliegenden Arbeit mit 3,47 Jahren kurz ist und Langzeitdaten nötig sind, um die Ergebnisse zu bestätigen. Besonders bei Her2-negativen, ÖR-positiven Karzinomen, welche sich allgemein durch eine gute Prognose auszeichnen, treten gehäuft Fernmetastasen und Rezidive auch über 5 Jahren nach Diagnosestellung auf [70]–[72], weshalb eine erneute Datenerhebung nach über 5 Jahren zwingend erforderlich ist.

Dennoch bekräftigen weitere retrospektive Studien auch im Langzeitverlauf den oben beschriebenen Trend: Filipits et al. veröffentlichten 2019 die reevaluierte verlängerte Nachbeobachtung der ABCSG-6 und -8-Kohorte und konnten in der Niedrigrisikogruppe auch nach 10 Jahren ein Fernmetastasen-freies-Überleben von 95,5% (95%KI 94,1%–97,0%) nachweisen[149]. Das 10-Jahres-Fernmetastasen-freie-Überleben in der Hochrisikogruppe lag demgegenüber bei 80,3% (76,9%–83,9%, HR 4,77 (3,37–6,67), $P < 0.0001$)[149]. Schätzungen auf Basis einzelner 15-Jahres-Follow-Up-Daten zufolge wird dieses nach 15 Jahren in der Niedrigrisikogruppe bei 93,4% und in der Hochrisikogruppe ohne Chemotherapie bei 78,9% liegen[146], [149].

Eine Studie von Buus et al. verglich den weit verbreiteten Oncotype DX direkt mit dem EPclin-Test[139]. In den Jahren 0-5 nach Diagnosestellung zeigten beide Tests in etwa eine Übereinstimmung; in den Jahren 5-10 und darüber wies der EndoPredict-Test gegenüber dem Oncotype DX eine größere prognostische Aussagekraft auf[30]: So lag das 10-Jahres-Rückfallrisiko bei der EPclin Niedrig- vs. Hochrisikogruppe bei 5,8% vs. 28,8%, im Kontrast zu 10,1% vs. 23,5% der Oncotype DX RS Niedrig- vs. Intermediate- und Hochrisikogruppe.

Buus et al. empfehlen daher bei Diskordanz der beiden Tests dem EndoPredict in der Therapieentscheidung mehr Bedeutung beizumessen[139].

Die Möglichkeit durch den EndoPredict eine prognostische Aussagekraft bezüglich späterer Rezidive treffen zu können, wäre ein entscheidender Fortschritt in der Behandlung des frühen Mammakarzinoms.

Im Verlauf des Follow-Ups wurden nur 22 Tumorevents verzeichnet, was ein allgemein gutes Outcome und adäquate Therapieempfehlungen suggeriert. Jedoch ließ dies bei der gewählten Kohortengröße einige Outcome-Analysen unter das Signifikanzniveau von $p > 0,05$ fallen. Diese Ergebnisse sollten durch einen späteren Follow-Up-Zeitpunkt affirmiert werden.

Ein weitere Schwäche dieser prospektiven Kohortenstudie ist neben dem kurzen Follow-Up-Zeitraum die fehlende Randomisierung und monozentrische Durchführung. Eine Randomisierung wurde nicht als ethisch vertretbar gewertet, da dies bedeutet hätte, Patientinnen in der Hochrisikogruppe gegebenenfalls eine Chemotherapie zu verwehren, die von dieser nach vorliegendem Testergebnis hätten profitieren können. Da das Klinikum rechts der Isar eines der ersten Kliniken war, die ihre Therapieentscheidung anhand des EndoPredict-Tests fällten, war zu Beginn eine multizentrische Studie nicht realisierbar. Weitere prospektive multizentrische Studien werden nötig sein, um die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit zu bekräftigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden ersten prospektiven Nachbeobachtungsergebnisse zeigen, dass der EndoPredict Test fähig ist, durch eine adäquate Risikostratifizierung eine prognostische Aussage über das Fernmetastasierungsrisiko von Patientinnen mit östrogenrezeptorpositiven, Her2-negativen Mammakarzinom zu treffen. Die eingangs gestellte Frage konnte somit beantwortet werden: Er ist hinsichtlich der klinischen Anwendung nach den vorliegenden Ergebnissen den klassischen klinisch-pathologischen Parametern, wie Alter und Grading, überlegen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Hochrisikopatientinnen von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. Die vorliegende Studie kann die retrospektive Evidenz und somit den EndoPredict im klinischen Alltag als validen klinisch-pathologischen Marker in der Therapieentscheidung bestätigen.

Um die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit zu bekräftigen und prognostische Aussagekraft des EndoPredict bezüglich späterer Rezidive treffen zu können, werden eine erneute Datenerhebung nach über 5 Jahren, sowie weitere prospektive multizentrische Studien erforderlich sein.

6. Zusammenfassung

Durch stetige Fortschritte in der Therapie und Früherkennung konnte die aktuelle Zehnjahres-Überlebensrate von Patientinnen mit Brustkrebs auf über 82% gesteigert werden. Im Mittelpunkt der Therapie steht die individuelle Risikoeinschätzung einer jeden Patientin bezüglich ihres Risikos Metastasen und Rezidive zu entwickeln.

In der klinischen Routine werden hierfür zunehmend häufiger Multigentests eingesetzt, welche bei der Selektion der Patientinnen helfen, die aufgrund eines erhöhten Risikos von einer Chemotherapie profitieren könnten.

Die vorliegende Arbeit präsentiert die ersten prospektiven Outcome-Daten von Patientinnen, deren Therapieentscheidung mithilfe des klinisch-molekularen EndoPredict-Multigentests getroffen wurde.

Patientinnen mit ÖR-positivem, Her2-negativem Mammakarzinom wurden monozentrisch am Brustzentrum des Klinikums rechts der Isar in die Studie eingeschlossen. Am entnommenen Tumormaterial wurde bei Diagnosestellung der EndoPredict Test durchgeführt, sowie klassische klinisch-pathologische Faktoren erhoben. In einer interdisziplinären Tumorkonferenz wurde mithilfe des EndoPredict-Ergebnisses eine Empfehlung für oder gegen eine Chemotherapie ausgesprochen. Retrospektiv wurde am vorliegenden Tumorgewebe der Patientinnen der Wachstumsfaktor Ki-67 bestimmt. Es erfolgte eine Nachbeobachtung hinsichtlich Compliance, Lokalrezidiven, Fernmetastasen und des Gesamtüberlebens. Eine statistische Auswertung erfolgte mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven, Pearsons-Produkt-Moment-Korrelation und Nachbeobachtungsdaten mittels Cox Hazard Ratio.

Durch den EPclin Score wurden von 373 Patientinnen 238 (63,8%) der Niedrigrisiko- und 135 Patientinnen (36,2%) der Hochrisikogruppe zugeordnet. Bei 307 retrospektiv bestimmten Tumorproben lag der Ki-67-Median bei 17%. Der EP und EPclin Score zeigten eine signifikante Assoziation zu Ki-67 und Grading ($p < 0,001$).

Nach 41,6 Monaten Nachbeobachtung zeigte sich das 3-Jahres-krankheitsfreie Überleben und Fernmetastasen-freie Überleben in der EPclin Niedrigrisikogruppe bei 96,9% (95% KI 94.2-99.1%) und 99.6% (95% KI 98.7-100%) versus 94.9% (95% KI 90.9-99.0%) und 97.6% (95% KI 95.0-100%) in der Hochrisikogruppe. Patientinnen der Hochrisikogruppe hatten ein signifikant fünffach höheres Risiko für Fernmetastasen als Patientinnen der Niedrigrisikogruppe (HR 5.18; 95% KI 1.04-25.74; $p=0.0443$). 71,9% der Patientinnen waren compliant zur empfohlenen Chemotherapie. Hochrisikopatientinnen, die die empfohlene Chemotherapie durchführten, hatten ein 3-Jahres-krankheitsfreies Überleben von 96,3% und damit ein geringeres Risiko, als die Hochrisikopatientinnen, die die Chemotherapie nicht durchführten (3-year-DFS: 91.5% 95% KI 82.7-100%; HR 0.32; 95% KI 0.10-1.05; $p=0.061$).

Die vorgestellten ersten prospektivem Outcome Daten des EndoPredict Test bestätigten den EndoPredict-Test im klinischen Alltag als validierten klinisch-molekularen Marker. Er ist fähig, durch eine adäquate Risikostratifizierung eine prognostische Aussage über das Fernmetastasierungsrisiko von Patientinnen mit ÖR-positiven, Her2-negativen Mammakarzinom zu treffen. Es konnte gezeigt werden, dass Hochrisikopatientinnen von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren.

7. Appendix

7.1. Einleitung

7.1.1. Risikofaktoren

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Entstehung eines Mammakarzinoms ein multifaktorielles Geschehen ist. Wichtigster Risikofaktor ist das weibliche Geschlecht; so liegt die Geschlechterverteilung von Mammakarzinom bei 1:100[156]. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken[157]·[158].

Exogene und endogene endokrinologische Faktoren spielen hierbei ebenfalls eine wesentliche Rolle. Physiologisch wird das natürliche Brustwachstum von den Östrogenen, endogen produziert in den Ovarien, stimuliert: The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group zeigte in einer Studie 2002 eine Risikoverminderung für Brustkrebs durch Ovariectomie[159]. Auch die exogene Zufuhr im Rahmen von u.a. Hormonersatztherapien scheint eine Rolle in der Promotion des malignem Wachstums zu spielen[160]. Durch eine verlängerte endogene hormonale Stimulation auf den Körper wird analog dessen als ein Risikofaktor eine frühere Menarche und späte Menopause angenommen[157]·[161]. Nulliparität und eine Geburt nach dem >35.Lebensjahr steigern signifikant das Brustkrebsrisiko[157].

Ein Viertel der Patientinnen weisen eine positive Familienanamnese bezüglich Brustkrebserkrankungen auf: Eine Erkrankung eines weiblichen Verwandten 1.Grades führt zu einem 1,75-fachen Risikoanstieg[162].

Bei 5-10% der Frauen mit Brustkrebs liegt die Ursache in einer autosomal-dominant vererbaren Prädisposition, wovon circa 60% eine Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 und ca. 40% 15 seltene Genmutationen (PALB2, RAD51C, RAD51D, CHEK2 und weitere) aufweisen[163].

Patientinnen, die eine Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 aufweisen, haben, neben einem erhöhtem Ovarialkarzinomrisiko, ein Risiko von 72%

bzw. 69% bis zum 80. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken, einhergehend mit einem durchschnittlich früheren Erkrankungsbeginn verglichen mit Patientinnen ohne genetische Disposition[164].

PALB2-Genmutationen gehen einher mit einem moderaten bis hohen Lebenszeitrisiko für Brustkrebs von 35-65% bei einem zusätzlich erhöhtem Risiko für Pankreaskarzinome, während RAD51- und -D-Mutationen bei einem moderat erhöhtem Tumorrisiko für Brustkrebs ebenfalls Ovarialkarzinome bedingen können[163]. CHEK2-Mutationen haben ein Brustkrebslebenszeitrisiko von circa 25%[163].

Neben den obengenannten Ursachen sollten auch mangelnde Bewegung, Übergewicht und hoher Alkoholkonsum durch eine erhöhte Östradiolkonzentration in den Fettzellen als Risikofaktor nicht außer Acht gelassen werden[165]:[166] .

7.1.2. TNM-Stadien, 8. Auflage

Tabelle 7.1-1 (dreiteilig) TMN-Klassifikationen beim Mammakarzinom (8.Auflage);
Quelle: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe;
AWMF). 2019. "S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des
Mammakarzinoms, Langversion 4.2."

Tumorgröße	Erläuterung
T1	Tumor maximal 2cm in Durchmesser
T1mi	Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger im größten Durchmesser
T1a	>0,1 cm bis maximal 0,5 cm im größten Durchmesser
T1b	>0,5 cm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser
T1c	>1 cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor >2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor > 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Thoraxwand/Haut
T4a	Ausdehnung auf Brustwand (Rippen/Interkostalmuskulatur/M. serratus ant.) ausgenommen die Pektoralismuskulatur
T4b	Ödem (auch „peau d'orange“)/Ulzeration der Brusthaut/ Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust
T4c	Kriterien von T4a + T4b erfüllt
T4d	Inflammatorisches Mammakarzinom
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor

Tis	Carcinoma in situ
-----	-------------------

Nodalstatus	Erläuterung
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten (Level I und II)
pN1mi	Mikrometastase(n) (> 0,2 mm und/oder mehr als 200 Tumorzellen, aber nicht größer als 0,2 cm)
pN1a	1–3 axilläre Lymphknotenmetastase(n), mindestens eine > 2 mm
pN1b	Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n)
pN1c	Metastasen in 1–3 axillären Lymphknoten und Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
N2	Metastasen wie unten beschrieben:
pN2a	Metastasen in 4–9 ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II, untereinander oder an anderen Strukturen fixiert, darunter mindestens eine > 2 mm
pN2b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
N3	Metastasen wie unten beschrieben:
pN3a	Metastase(n) in ≥10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (wenigstens eine > 2 mm) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Lymphknotenmetastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Untersuchung des/der Sentinellymphknoten(s), aber nicht klinisch erkennbar
pN3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z. B. vor klinischer Klassifikation bioptisch entfernt)

Metastasen	Erläuterung
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar

7.1.3. UICC- Stadien

Tabelle 7.1-2 UICC-Stadieneinteilung des Mammakarzinoms

Quelle: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF). 2019. "S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie Und Nachsorge Des Mammakarzinoms, Langversion 4.2."

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I A	T1 *	N0	M0
Stadium I B	T0,T1*	N1mi	M0
Stadium II A	T0, T1*	N1	M0
	T2	N0	
Stadium II B	T2	N1	M0
	T3	N0	
Stadium III A	T0, T1*, T2	N2	M0
	T3	N1,N2	
Stadium III B	T4	N0,N1,N2	M0
Stadium III C	Alle T	N3	M0
Stadium IV	Alle T	Alle N	M1

7.1.4. Beispiel eines Ergebnisberichts des EndoPredict-Tests mit Erläuterungen

NEW ENDOPREDICT RESULT REPORT QUICK GUIDE



One Test - Three Clinical Answers

EndoPredict is the only test that answers three critical clinical questions:

1. Risk up to 15 years^{1,3} - Can chemotherapy be avoided?
2. Chemotherapy benefit² - What is the absolute benefit from chemotherapy?
3. Risk between 5 and 15 years³ - Can endocrine therapy be stopped after 5 years?

EndoPredict is a second-generation gene expression assay that combines a molecular score with clinical features (tumor size and nodal status). The five-page report provides the risk of developing distant recurrence (0-10 and 5-15 years) and the absolute chemotherapy benefit at 10 years for a woman with ER+, HER2- breast cancer. Results are summarized by treatment planning stage on the front page. Detailed information is available on the pages that follow.

The EndoPredict Result Report uses the colors of the arrows of the product logo to provide a clear and immediate indication of the patient's risk: blue EPclin Risk Score and EPclin Risk Class indicate high risk, while green indicates low risk.

Elements of the EndoPredict Result Report

Front Page

EPclin Risk Score: Patient's predictor of distant recurrence and chemobenefit

- Calculated using an algorithm including three independent variables:
 1. 12-Gene Molecular Score
 2. Tumor size (pT)
 3. Nodal status (pN).
- Reported on a scale of 1 to 6. The value of 3.32867 is associated with 10% risk of breast cancer recurrence within 10 years.

EPclin Risk Class: Patient's risk category

- Low if EPclin Risk Score < 3.32867
- High if EPclin Risk Score ≥ 3.32867

12-Gene Molecular Score (previously called EP Score)

- A measurement of expression levels of the genes included in the EndoPredict test (range 0-15).

Summary of result interpretations for the individual patient organized by treatment planning stage

- 10-year likelihood of distant recurrence
- Absolute chemotherapy benefit at 10 years
- Likelihood of late distant recurrence within years 5-15

Result Report
Created by EndoPredict Report Generator* CE

Sample Name: Sample Bb
Note:
Report Created: 2019-01-09 01:48 PM (CET)

12-GENE MOLECULAR SCORE: Range 0-15: 4.9

TUMOR SIZE: pT1ab (s1cm)

NODAL STATUS: 1 to 3 positive lymph nodes (incl. pN1mic)

RESULT
EPclin RISK SCORE: 3.0
EPclin RISK CLASS: LOW

EndoPredict* is a gene expression assay for patients with ER-positive, HER2-negative early-stage breast cancer. From this genomic analysis, a 12-Gene Molecular Score is assigned. This score, combined with tumor size and nodal status, contributes to the EPclin Risk Score, from which the risks of distant recurrence (10-year and 5 to 15-years) with 5 years of adjuvant endocrine therapy alone and the estimated absolute benefit of chemotherapy (at 10 years) are determined. The EPclin risk class refers to the risk of distant recurrence with 5 years of adjuvant endocrine therapy alone.

INITIAL Treatment Planning	LIKELIHOOD OF DISTANT RECURRENCE WITHIN YEARS 0-10 For patients treated with 5 years of endocrine therapy alone	7%
	ABSOLUTE CHEMOTHERAPY BENEFIT AT 10 YEARS	2%
LONG-TERM Treatment Planning	LIKELIHOOD OF LATE DISTANT RECURRENCE WITHIN YEARS 5-15 For patients with no recurrence after 5 years of endocrine therapy alone	6%

AUTHORIZED SIGNATURE

myriad
Myriad, the Myriad logo, EndoPredict and the EndoPredict logo are either trademarks or registered trademarks of Myriad Genetics, Inc. or the United States and other jurisdictions. ©2019, Myriad Genetics GmbH
EPIC VAL13-SNAPSHOT page 1 of 5

Abbildung 7.1-1 Beispiel eines Ergebnisberichts des EndoPredict Tests mit Erläuterungen Teil 1
Quelle: Myriad Genetics GmbH „TEST REPORT SAMPLE“; <https://EndoPredict.eu/Low-test-report-sample/> (aufgerufen am 08.04.2020) (13)

NEW ENDOPREDICT RESULT REPORT QUICK GUIDE



Page 2

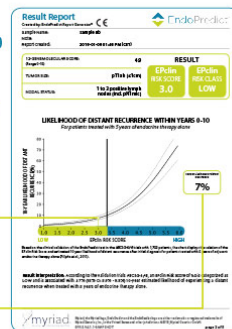
LIKELIHOOD OF DISTANT RECURRENCE WITHIN YEARS 0-10

EPclin Risk Score's continuous risk curve

- Graphically illustrates the patient's individualized risk of distant recurrence within years 0-10 based on the ABCSG 6&8 validation studies.

10-year likelihood of distant recurrence for the individual patient

- Patient's individual risk of distant recurrence when treated with 5 years of endocrine therapy alone.



Page 3

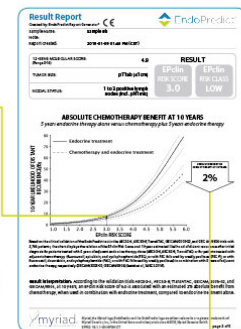
ABSOLUTE CHEMOTHERAPY BENEFIT AT 10 YEARS

EPclin Risk Score's continuous risk curves to determine the chemotherapy benefit

- Graphically illustrates the patient's individualized chemotherapy benefit based on the ABCSG 6&8, TransATAC, GEICAM/2003-02 and GEICAM/9906 studies.

Absolute chemotherapy benefit for the individual patient

- Patient's individual absolute chemotherapy benefit.



Since launch, EndoPredict has provided an accurate answer to an important clinical question: **What is the risk of distant recurrence in the first ten years after diagnosis with endocrine therapy only?** With this information, your patients with a low risk of recurrence could be identified and could safely avoid chemotherapy.

With the new report EndoPredict answers a second question: **What is the personalized absolute chemotherapy benefit?** This leads to a confident chemotherapy treatment decision for your patient.

Page 4

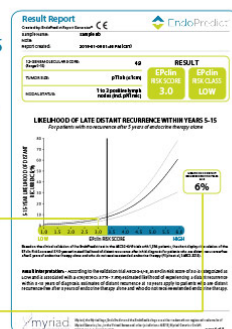
LIKELIHOOD OF LATE DISTANT RECURRENCE WITHIN YEARS 5-15

EPclin Risk Score's continuous risk curve

- Graphically illustrates the patient's individualized risk of distant recurrence within years 5-15 based on the ABCSG 6&8 validation studies.

10-year likelihood of late distant recurrence for the individual patient

- Patient's individual late distant recurrence risk. Provides estimates of distant recurrence at 15 years for patients who are distant recurrence-free after 5 years of endocrine therapy alone and who do not receive extended endocrine therapy.



The third answered question is: **What is your patient's risk of late recurrence (5-15 years)?** This information guides treatment decisions to extend endocrine therapy beyond 5 years.

Page 5

Page 5 of the **Result Report** provides additional details on the EndoPredict assay design, intended use, and its clinical applications.

Important Note

An EndoPredict **Result Report** is only generated if both patient's tumor size and nodal status are available. If an EndoPredict test is performed on a biopsy specimen, and therefore patient's tumor pathological information is not yet available, the EndoPredict **Result Report** is not provided. However, the 12-Gene Molecular Score and a table showing the EPclin Risk Score and the EPclin Risk Class for all possible combinations of Tumor Size and Nodal Status will be available in the EndoPredict **Summary Report**.

References:

- Filipits M. et al.: A New Molecular Predictor of Distant Recurrence in ER-Positive, HER2-Negative Breast Cancer Adds Independent Information to Conventional Clinical Risk Factors. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(18):6012-6020
- Sestak I. et al.: Prediction of chemotherapy benefit by EndoPredict in patients with breast cancer who received adjuvant endocrine therapy plus chemotherapy or endocrine therapy alone. *Breast Cancer Res Treat.* 2019; 176:377-386
- Filipits M. et al.: Prediction of Distant Recurrence using EndoPredict among Women with ER+, HER2- Node- Positive and Node-Negative Breast Cancer Treated with Endocrine Therapy Only. *Clin Cancer Res.* 2019;25:3865-3872

For additional information regarding the EndoPredict Result and Summary Reports, please refer to the EndoPredict Quick Guides and the EndoPredict Instruction Manuals, available from Myriad International. Please contact: epsupport@myriadgenetics.eu.



Myriad Genetics GmbH
Leutschenbachstrasse 95
8050 Zurich - Switzerland

Myriad, the Myriad logo, EndoPredict and the EndoPredict logo are either trademarks or registered trademarks of Myriad Genetics, Inc. and its subsidiaries in the United States and other jurisdictions. ©2019, Myriad Genetics GmbH. Not for distribution in USA.

Abbildung 7.1-2 Beispiel eines Ergebnisberichts des EndoPredict Tests mit Erläuterungen Teil

2

Quelle: Myriad Genetics GmbH „TEST REPORT SAMPLE“; <https://EndoPredict.eu/Low-test-report-sample/> (aufgerufen am 08.04.2020) (13)

7.2. Material und Methoden

7.2.1. Färbeprotokoll des Ki-67-MIB1-Klon

Tabelle 7.2-1 Vollständiges detailliertes Färbeprotokoll des Ki-67-MIB1-Klon durch die VENTANA-Maschine (Auszug aus Quelle: [109]-[115])

Ki-67-Färbung des MIB1-Klons in der VENTANA BenchMark XT**1) Entparaffinierung**

- a) EZPrep^b Auswählen
- b) Getimete Schritte starten
- c) Mischer Aus
- d) Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- e) EZPrep^b Volume ausgleichen
- f) Objektträger waschen
- g) EZPrep^b Volume ausgleichen
- h) Objektträger waschen
- i) EZPrep^b Volume ausgleichen
- j) Cover Slip^c auftragen

2) Hitzevorbehandlung

- a) Aufheizen des Objektträgers bis 76 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- b) Objektträger waschen
- c) Deparaffinierung Volume ausgleichen
- d) Cover Slip^c auftragen
- e) Objektträger-Heizung ausschalten

3) Cell Conditioner^d

- a) Mischer An
- b) Kurz-8 Minuten Conditioning
- c) Objektträger waschen
- d) Cell Conditioner^d Nr. 1 lang auftragen
- e) Abgabe von Cell Conditioner^d und Cover Slip^c lang
- f) SSC Wash^f auswählen
- g) Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C und für 8 Minuten inkubieren
- h) Mild - 30 Minuten Conditioning
- i) Cell Conditioner^d Nr. 1 auftragen
- j) Cell Conditioner^d und Coverslip^c auftragen (ohne Barcode BLowoff)
- k) Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C. und für 4 Minuten inkubieren
- l) Cell Conditioner^d und Cover Slip^c auftragen (ohne Barcode BLowoff)
- m) Cell Conditioner^d Nr.1 auftragen
- n) Cell Conditioner^d und Cover Slip^c auftragen (ohne Barcode BLowoff)
- o) Cell Conditioner^d Nr. 1 auftragen
- p) Cell Conditioner^d und Cover Slip^c auftragen (ohne Barcode BLowoff)
- q) Cell Conditioner^d Nr. 1 auftragen
- r) Cell Conditioner^d und Cover Slip^c auftragen (ohne Barcode BLowoff)
- s) Cell Conditioner^d Nr.1 auftragen
- t) Cell Conditioner^d und Cover Slip^c auftragen (ohne Barcode BLowoff)
- u) Cell Conditioner^d Nr. 1 auftragen
- v) Cell Conditioner^d und Cover Slip^c auftragen (ohne Barcode BLowoff)
- w) Objektträger-Heizung ausschalten
- x) Inkubieren für 8 Minuten

4) Titration

- a) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- b) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- c) Cover Slip^c auftragen

- d) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- e) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- f) Cover Slip^c auftragen
- g) Synchronisieren der Prozeduren
- h) Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
- i) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- j) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- k) 1 Tropfen^a UV Peroxidase Inhibitor^g auftragen, Cover Slip^c auftragen und für 4 Minuten inkubieren
- l) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- m) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- n) Cover Slip^c auftragen
- o) Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C und für 4 Minuten inkubieren
- p) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- q) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- r) Cover Slip^c auftragen

5) Antikörperauftrag

- a) Handauftrag des Primär-Antikörpers und für 32 Minuten inkubieren
- b) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- c) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- d) Cover Slip^c auftragen
- e) Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
- f) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- g) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- h) 1 Tropfen^a UV HRP Universal Multimer^g auftragen, Cover Slip^c auftragen, und für 8 Minuten inkubieren
- i) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- j) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- k) Cover Slip^c auftragen

- l) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- m) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- n) 1 Tropfen^a auf UV DAB^g und einen Tropfen UV DAB H₂O₂^g auftragen, Liquid Cover Slip^c auftragen und für 8 Minuten inkubieren
- o) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- p) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- q) 1 Tropfen^a UV COPPER^g auftragen, Cover Slip^c auftragen, und für 4 Minuten inkubieren

6) Gegenfärbung

- a) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- b) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- c) 1 Tropfen^a von COUNTERSTAIN 2 Gegenfärbung auftragen, Liquid Cover Slip^c auftragen und für 8 Minuten inkubieren
- d) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- e) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- f) Cover Slip^c auftragen

7) Nach-Gegenfärbung

- a) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- b) Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- c) 1 Tropfen^a von BLUING REAGENT^h Nach-Gegenfärbung auftragen, Liquid Cover Slip^c auftragen und für 4 Minuten inkubieren
- d) Spülen mit Reaktionspuffer^e
- e) Cover Slip^c auftragen
- f) Objektträger-Heizung ausschalten
- g) Optionalen Waschvorgang auswählen
- h) SSC Wash^f auswählen
- i) Getimete Schritte starten
- j) Spülen mit Reaktionspuffer^e

Erläuterungen

^a 1 Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe

^b EZ Prep Concentrate solution (Katalognummer 950-102, Bestellnummer 05279771001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) zum Entfernen des Paraffins vom Gewebe [110]

^c Cover Slip (Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) = vorverdünnte Deckglaslösung, die als Barriere zwischen den wässrigen Reagenzien und der Luft dient. Dies verhindert die Verdunstung und liefert dadurch eine stabile wässrige Umgebung für die Immunhistochemie[111]

^d Cell Conditioner (Katalognummer 950-124, Bestellnummer 05279801001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) = vorverdünnte Lösung als Vorbehandlungsschritt bei der Verarbeitung von Gewebeproben für immunhistochemische Reaktionen [112]

^e Reaktionspuffer (Katalognummer 950-300, Bestellnummer 05353955001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) = Pufferlösung auf Tris-Basis (pH 7,6 ± 0,2) zur Spülung der Objektträger zwischen Färbungsschritten zur Gewährleistung einer stabilen wässrigen Umgebung für die Immunhistochemie[113]

^f SSC = Sodium Chloride Sodium Citrate Buffer (Katalognummer 950-110, Bestellnummer 05353947001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.) = Natriumchlorid-Natriumcitrat-Pufferlösung zur Stringenzwaschung und Spülen der Objektträger zwischen den Färbungsschritten zur Gewährleistung einer stabilen wässrigen Umgebung für die Immunhistochemie[114]

^g Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit (Katalognummer 760-500, Bestellnummer 05269806001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.)-Komponenten[115]:

6. ultraView Universal DAB Inhibitor (enthält 3 % Wasserstoffperoxidlösung)
7. ultraView Universal HRP Multimer (enthält HRP-markierten Antikörpern (Ziege-Anti-Maus-IgG, Ziege- Anti-Maus-IgM und Ziege-Anti-Kaninchen) (< 50 µg/mL) in einem proteinhaltigen Puffer mit dem Konservierungsmittel ProClin 300)
8. ultraView Universal DAB Chromogen (enthält 0,2 % 3,3'- Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, firmeneigenen Stabilisatorlösung mit firmeneigenen Konservierungsmittel)
9. ultraView Universal DAB H₂O₂ (enthält 0,04% Wasserstoffperoxid in Phosphatpufferlösung),
10. ultraView Universal Copper (enthält Kupfersulfat (5g/L) in Acetatpuffer mit firmeneigenem Konservierungsmittel)

^h Bluing Reagent (Katalognummer 760-2037, Bestellnummer 05266769001, Roche Tissue Diagnostics, Ventana Medical Systems, Inc.)= wässrige Lösung von gepuffertem Lithiumcarbonat[116]

7.2.2. uPA/PAI-1

Zu Beginn der Studie wurden bei 181 Patientinnen routinemäßig die Proteasen uPA und PAI-1 bestimmt. Nachdem keine allgemeine S3-Empfehlung zur Analyse von uPA/PAI-1 herausgegeben wurde (Kapitel 1.2.1.), wurden die Proteasen nur in Einzelfällen bei Diskrepanz zwischen den klinisch-pathologische Prognosefaktoren und EndoPredict erhoben.

7.2.3. Follow-Up

Antwortfax an das Interdisziplinäre
Brustzentrum des Klinikums rechts der Isar:

+49 89 xxxxxxxx oder +49 89 xxxxxxxx



Patientenaufkleber oder Name, Vorname, Geburtsdatum

FOLLOW UP - Interdisziplinäres Brustzentrum MRI

Erhebung durch: Arzt Praxisangestellte Patient Datum Erhebung: _____

Frage 1: Gab es im Zusammenhang mit dem Brustkrebs nochmal ein Ereignis?

- nein
- ja , wenn „ja“:
 - an der gleichen Brust. Wann? _____
 - auf der Gegenseite. Wann? _____
 - wo anders im Körper.
 - Wo? _____
 - Wann? _____

Details zur Therapie

Frage 2: Haben Sie eine Chemotherapie erhalten?

- ja, von _____ bis _____
- nein; wenn nein:
 - weil nicht empfohlen
 - weil: _____

Frage 3: Haben Sie eine Strahlentherapie erhalten?

- ja, von _____ bis _____
- nein; wenn nein:

Abbildung 7.2-1 Follow-Up-Fragebogen Teil 1



weil nicht empfohlen

weil: _____

Frage 4: Nehmen Sie aktuell noch Tabletten ein oder haben Tabletten gegen die Krankheit eingenommen?

ja, wenn ja, welche Tabletten?

Tamoxifen Arimidex Anastrozol andere: _____

seit wann/bis wann? _____

nein; wenn nein:

seit wann nicht mehr? _____

Warum nicht mehr?

Nebenwirkungen/ Eigener Wunsch

Arztempfehlung

nach 5 Jahren fertig

anderer Grund: _____

Vielen Dank !

Abbildung 7.2-2 Follow-Up Fragebogen Seite 2

7.3. Ergebnisse

7.3.1. Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte nach EP Score

Tabelle 7.3-1 Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte nach EP High und Low Risk

Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte nach EP High und Low Risk			
Charakteristika	EP Low Risk (N = 172)	EP High Risk (N = 201)	Gesamtkohorte (N = 373)
Tumorgröße - Anzahl (%*)			
T1	120 (69,8)	111 (55,2)	230 (61,7)
pT1a	11 (6,4)	9 (4,5)	20 (5,4)
pT1b	44 (25,6)	20 (10,0)	64 (17,1)
pT1c	65 (37,8)	77 (38,3)	142 (38,1)
cT1	0 (0)	5 (2,4)	4 (1,1)
T2	46 (26,7)	85 (42,3)	131 (35,1)
pT2	46 (26,7)	79 (39,3)	125 (33,5)
cT2	0 (0)	6 (3,0)	6 (1,6)
T3	6 (3,5)	6 (3,0)	12 (3,2)
pT3	6 (3,5)	6 (3,0)	12 (3,2)
Grading - Anzahl (%*)			
G1	54 (31,4)	16 (8,0)	70 (18,8)
G2	107 (62,2)	133 (66,2)	240 (64,3)
G3	11 (6,4)	52 (25,8)	63 (16,9)
Östrogenrezeptorstatus in % positiv - Anzahl (Bereich)	166 (30-100)	196 (15-100)	373 (15 - 100)
Progesteronrezeptor - Anzahl (%*)			
≥20%	149 (86,6)	152 (75,6)	301 (80,7)
<20%	23 (13,4)	49 (24,4)	72 (19,3)
Histologische Subtypen - Anzahl (%*)			
Duktal	112 (65,1)	152 (75,6)	264 (70,7)
Lobulär	37 (21,5)	33 (16,4)	70 (18,8)
andere:	23 (13,4)	16 (8,0)	39 (10,4)
duktulo-lobulär	11 (6,4)	8 (4,0)	19 (5,1)
tubulär	11 (6,4)	0 (0)	11 (2,9)
muzinös	0 (0)	3 (1,5)	3 (0,8)
medullär	0 (0)	2 (1,0)	2 (0,5)

Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte nach EP High und Low Risk			
duktulo-tubulär	1 (0,6)	1 (0,5)	2 (0,5)
neuroendokrin	0 (0)	1 (0,5)	1 (0,3)
lobulo-tubulär	0 (0)	1 (0,5)	1 (0,3)
Nodalstatus - Anzahl (%*)			
N0	138 (80,2)	145 (72,1)	283 (75,9)
pN0	137 (79,6)	139 (69,1)	276 (74,0)
cN0	1 (0,5)	6 (3,0)	7 (1,9)
N1 (1-3 Lymphknoten)	34 (19,8)	56 (27,9)	90 (24,1)
pN1	28 (16,3)	45 (22,4)	73 (19,6)
pN1(mi)	6 (3,5)	7 (3,5)	13 (3,5)
cN1	0 (0)	4 (2,0)	4(1,1)

* Prozentangaben spaltenweise

7.3.2. Klinisch-pathologische Charakteristika der Ki-67-Kohorte

Tabelle 7.3-2 Klinisch-pathologische Charakteristika der Ki-67-Kohorte

Charakteristika	Gesamtkohorte (N = 307)	Charakteristika	Gesamtkohorte (N = 307)
Mittleres Alter - Jahre (Bereich)	57,17 (29-88)	Histologische Subtypen Anzahl (%*)	
Menopausenstatus -Anzahl (%*)		Duktal	212 (69,1)
Prämenopausal	96 (31,3)	Lobulär	59 (19,2)
Postmenopausal	205 (66,8)	andere:	36 (11,7)
Männlich	6 (2,0)	duktulo-lobulär	18 (5,9)
Tumorgroße - Anzahl (%*)		tubulär	9 (2,9)
T1	187 (60,9)	muzinös	3 (0,9)
pT1a	17 (5,4)	medullär	2 (0,7)
pT1b	50 (16,3)	duktulo-tubulär	2 (0,7)
pT1c	119 (38,8)	neuroendokrin	1 (0,3)
cT1	1 (0,3)	lobulo-tubulär	1 (0,3)
T2	110 (35,8)	Nodalstatus - Anzahl (%*) §	
pT2	109 (35,5)	pN0	232 (75,6)
cT2	1 (0,3)	pN1 (1-3 Lymphknoten)	75 (24,4)
T3	10 (3,2)	Östrogenrezeptorstatus in %	
pT3	10(3,2)	positiv - Anzahl (Bereich)	307 (15-100)
Grading - Anzahl (%*)		Progesteronrezeptor	

G1	62 (20,2)	Anzahl (%*)	
G2	193 (62,9)	≥20%	250 (81,4)
G3	52 (16,9)	<20%	57 (18,6)

*Prozentangabe spaltenweise

7.3.3. Ki-67 und EP Score

Der Chi-Quadrat-Test zwischen Ki-67 und EPclin High und Low Risk zeigt einen statistisch höchst signifikanten Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von Ki-67 und dem EP (12-Gen-) Score ($x^2 = 82$, $p = <0,001$, $df=4$; Appendix Abbildung 7.3-1).

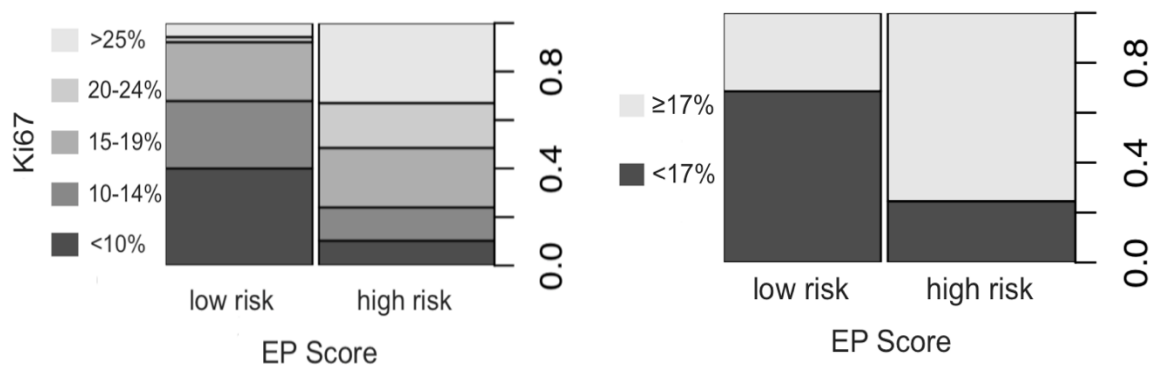


Abbildung 7.3-1 Pearson's Chi-Quadrat-Test von Ki-67 und EP Score

Links: Pearson's Chi-Quadrat-Test von Ki-67 und dem EP Score nach Low und High Risk, $x^2 = 82$, $p = <2,2 \times 10^{-16}$, $df=4$, Absolute Werte Low Risk: $<10\% = 56$, $10-14\% = 39$, $15-19\% = 34$, $20-24\% = 3$, $>25\% = 8$; High Risk: $<10\% = 17$, $10-14\% = 23$, $15-19\% = 41$, $20-24\% = 31$, $>25\% = 55$

Rechts: Pearson's Chi-Quadrat-Test mit Yates Stetigkeitskorrektur von Ki-67 nach Median (Median=17%) und dem EP Scores nach Low und High Risk, $X^2 = 31,38$, $df=1$, $p\text{-Wert} = 2,12 \times 10^{-8}$; Absolute Werte Low Risk: $<17\% = 96$; $>17\% = 44$; High Risk: $<17\% = 41$; $>17\% = 126$

7.3.4. Ki-67 und Östrogenrezeptor

Ki-67 und der Östrogenrezeptor zeigen eine minimale negative bis nicht messbare Korrelation ($r = -0,16$) bei einem Signifikanzniveau von 0,4%, wie die Abbildung 7.3-2 zeigt:

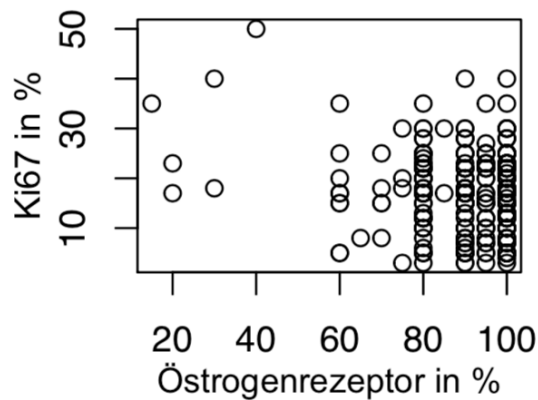


Abbildung 7.3-2 Pearson's Produkt-Moment-Korrelation des Östrogenrezeptors in % und Ki-67 in %

$r=-0,164$, $t=-2,87$, $df=299$, $p\text{-Wert}=0,0044$, $95\%\text{-KI: }(-0,27)\text{-}(-0,052)$

7.3.5. Ki-67 und Progesteronrezeptor

Ki-67 und der Progesteronrezeptor zeigen nach Pearson's Korrelation eine minimale negative bis keine Korrelation (Abbildung 7.3-3 links, $r=-0,169$; $p\text{-Wert}=0,003$). Der Welch-Test zeigt einen knapp statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,047$) zwischen den Medianen der Gruppen „Progesteronrezeptor niedrig“ und „Progesteronrezeptor hoch“ (Abbildung 7.3-3, rechts).

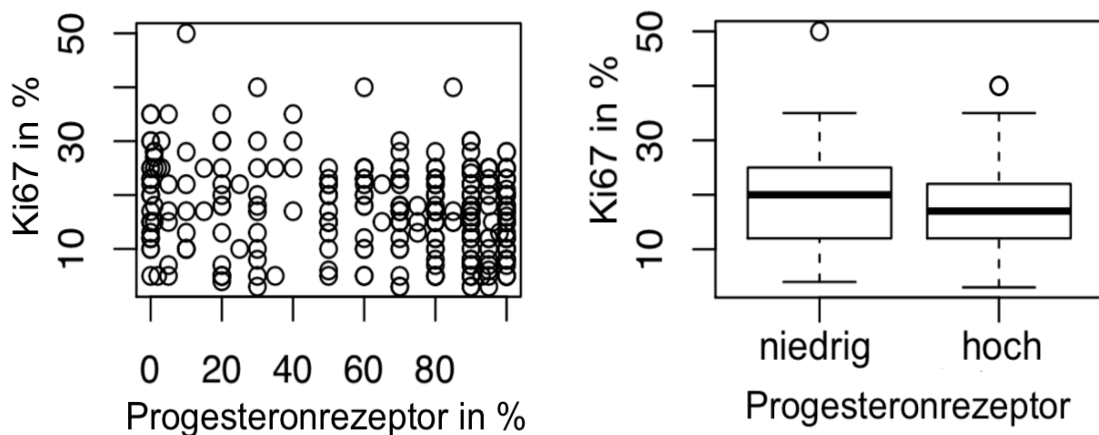


Abbildung 7.3-3 Korrelation Progesteronrezeptor und Ki-67

Links: Pearson's Produkt-Moment-Korrelation des Progesteronrezeptors in % und Ki-67 in %
 $r=-0,169$, $t=-2,99$, $df=305$, $p\text{-Wert}=0,003$, $95\%\text{-KI: }(-0,28)\text{-}(-0,058)$

Rechts: Welch's T-Test des Progesteronrezeptors in % und Ki-67 in % (Y-Achse), $t=2,02$,
 $df=73,2$, $p\text{-Wert}=0,047$, $95\%\text{-KI}=0,038\text{-}5,32$, Mittelwert Progesteronrezeptor niedrig=19,4,
 hoch=16,72

Der Wilcoxon-Rank-Sum-Test, welcher beim Vergleich von Verteilungen unterschiedlicher Parameter Verwendung findet, wurde ebenfalls zur Detektion einer Korrelation zwischen Ki-67 und dem Progesteronrezeptor verwendet (Abbildung 7.3-4): Aufgrund eines zu hohen P-Werts von 0,29 kann die Nullhypothese, „die Mediane von Ki-67 seien gleich sowohl bei Progesteron-niedrig-positiven, als auch -positiven Patientinnen“, statistisch nicht verworfen werden, auch wenn sich ein Unterschied in den Medianen findet.

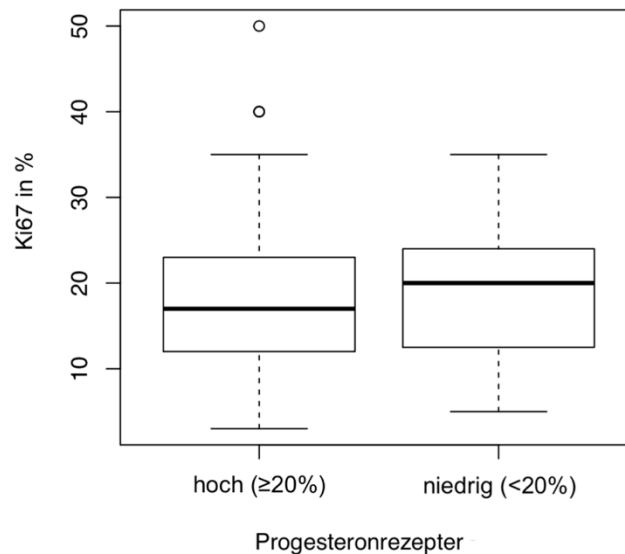


Abbildung 7.3-4 Wilcoxon-Rank-Sum-Test von Ki-67 in % und dem Progesteronrezeptor in hoch ($\geq 20\%$) und niedrig ($< 20\%$)
 $W = 2836$, $p\text{-value} = 0.2921$

7.3.6. Proteasen

Bei 181 Patientinnen (48,5% der Gesamtkohorte) wurden kurz nach Diagnosestellung die Konzentrationen der Eiweiße Plasminogenaktivator vom

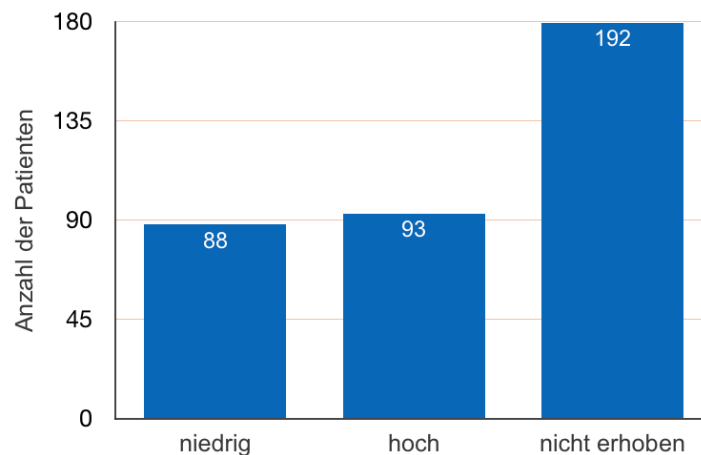


Abbildung 7.3-5 Anzahl der hohen, niedrigen und nicht-erhobenen Proteasen (uPA/PAI1)

Urokinase-Typ „uPA“ und sein Inhibitor „PAI-1“ ermittelt, welche im Laufe der Etablierung des EndoPredict-Tests zunehmend an Bedeutung verloren[2]. Die Anzahl der Patientinnen mit hohen und niedrigen Proteasen zeigt die Abbildung 7.3-5.

7.3.7. Proteasen nach EP/EPclin Score

Die Gegenüberstellung der Proteasen zum EPclin Ergebnis in der Abbildung 7.3-6 demonstriert, dass Patientinnen mit hohen Proteasewerten und demnach einem potentiell schlechteren Outcome auch eher der EP High Risk Gruppe zugeordnet werden.

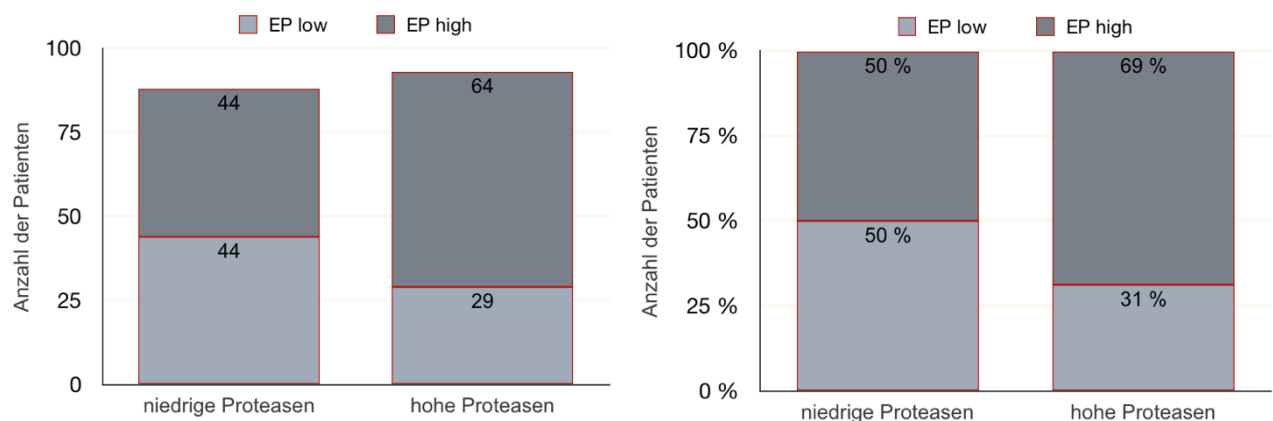


Abbildung 7.3-6 Proteasen (uPA/PAI-1) nach EP Score High und Low Risk, links absolut, rechts in Prozent

Sobald eine erhöhte Konzentration von jeweils PAI-1 oder uPA gemessen wurde, galten die Proteasen als erhöht. Bei den 93 Patientinnen mit hohen Proteasen waren bei 38 der Patientinnen sowohl die Konzentration von uPA, als auch von PAI-1, im Vergleich zum Normwert, gesteigert. Bei 54 der Patientinnen war nur einer der zwei Eiweiße in der Konzentration erhöht.

Die folgende Abbildung vergleicht die Risikoeinteilung von uPA/PAI-1 mit der von Ki-67 und dem EPclin Score:

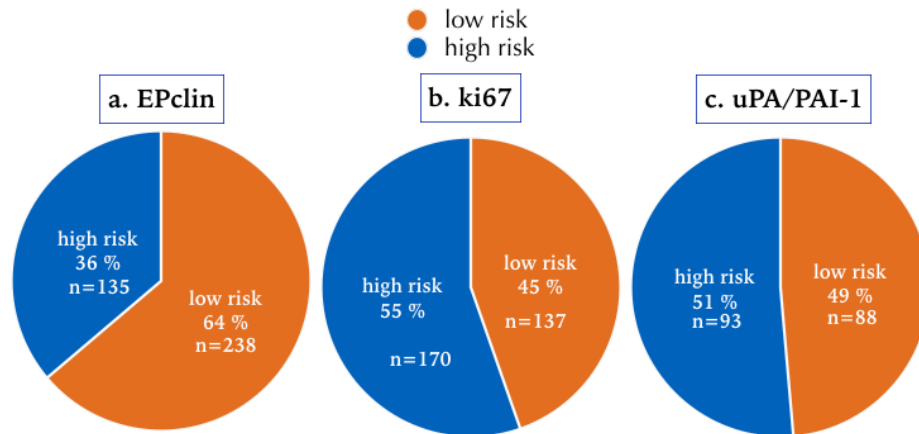


Abbildung 7.3-7 Risikoeinteilung in Hoch- und Niedrigrisiko nach EPclin, Ki67 und uPA/PAI-1
 a.) EPclin, b.) Ki-67 ($\leq 17\%$ / $> 17\%$, codiert nach Median (Bustreo S et al., 2016; Coates AS et al., 2015)) und c.) uPA/PAI-1

7.3.8. Todesfälle

Tabelle 7.3-3 11 Todesfälle in der Kohorte von 373 Patientinnen mit Aussage über Tumorassoziation und Tumorursache

Todesfälle	Tumorassoziiert?	Genauere Todesursache
Patient 1	tumorassoziiert	Pleura metastasen
Patient 2	tumorassoziiert	Leber-, Knochen-, Lungenmetastasen
Patient 3	therapieassoziiert	Leukämie
Patient 4	tumorunabhängig	Sepsis unbekanntes Fokus
Patient 5	tumorunabhängig	Fistelbildung, keine nähere Aussage
Patient 6	tumorunabhängig	Metastasiertes Merkelzellkarzinom
Patient 7	tumorunabhängig	Myokardinfarkt
Patient 8	tumorunabhängig	unbekannt
Patient 9	tumorunabhängig	unbekannt
Patient 10	Tumorunabhängig	unbekannt
Patient 11	unklar	unbekannt

7.3.9. Lokalrezidive

Tabelle 7.3-4 - 3 von 373 Patientinnen mit Lokalrezidiv im Verlauf
 (Abkürzungen: CTX=Chemotherapie, RTX= Strahlentherapie; ET= Endokrine Therapie; R=Resektionsstatus, T= Tumorgröße, N= Nodalstatus, G = Grading)

	T	G	N	Ki-67	R	EP	EPclin	Compliance
Patient 1	pT1c	G2	N0	25%	R0	High	Low	RTX: abgelehnt ET: keine Auskunft CTX: nicht empfohlen

Patient 2	pT1c	G2	N1	30%	R0	High	High	CTX: abgelehnt RTX: nicht empfohlen ET: erfolgt
Patient 3	pT2	G2	N0	3%	R0	Low	Low	CTX: nicht empfohlen RTX: nicht empfohlen ET: erfolgt

7.3.10. Metastasen

Tabelle 7.3-5 8 von 373 Patientinnen mit Metastasen im Verlauf
(CTX=Chemotherapie, RTX= Strahlentherapie; ET= Endokrine Therapie; R=Resektionsstatus, T= Tumorgröße, N= Nodalstatus, G = Grading, M = Metastase *=multimorbide)

	M	T	G	N	Ki-67	EP	EPclin	Compliance
Patient 1	Knochen	pT2	G2	N0	-	High	High	CTX: erfolgt RTX: nicht empfohlen ET: erfolgt
Patient 2	Knochen	pT1	G2	N0	-	High	High	CTX: erfolgt RTX: erfolgt ET: abgelehnt
Patient 3	Knochen	pT2	G2	N1	35	High	High	CTX: erfolgt RTX: erfolgt ET: erfolgt
Patient 4	Pleura	pT3	G2	N0	5	High	High	CTX: abgelehnt RTX: erfolgt ET: erfolgt
Patient 5	Leber	pT2	G3	N0	10	High	High	CTX:nicht empfohlen* RTX: erfolgt ET: erfolgt
Patient 6	Leber	pT1c	G2	N0	25	Low	Low	CTX: nicht empfohlen RTX: nicht empfohlen ET: erfolgt
Patient 7	Knochen	cT1	G3	cN0	-	High	High	CTX: erfolgt RTX: abgelehnt ET: erfolgt
Patient 8	Leber, Knochen, Lunge	pT2	G2	N0	16	Low	Low	CTX: nicht empfohlen RTX: nicht empfohlen ET: erfolgt

7.3.11. Zweittumore

An bekannten Zweittumoren erkrankten in der Kohorte 9 von 373 Patientinnen. Bei 4 Patientinnen wurde ein kontralaterales Mammakarzinom diagnostiziert, bei 5 Patientinnen jeweils eine unbekannte Leukämie, V.a. ein hepatozelluläres Karzinom, ein unbekanntes retinales Malignom, ein Merkelzellkarzinom und ein meningotheliales Meningeom.

7.3.12. Resektionsstatus

Der postoperative Resektionsstatus konnte bei 371 der 373 Patientinnen erhoben werden, bei 2 Patientinnen konnte keine pathologische Angabe ermittelt werden. Bei 98,1% konnte der Tumor im Gesunden entfernt werden. Bei 7 Patientinnen konnten mikroskopisch Tumoranteile im Resektionsrand nachgewiesen werden (R1), von diesen wurden 3 Patientinnen der EPclin Hochrisikogruppe zugeordnet.

Tabelle 7.3-6 Resektionsstatus der Gesamtkohorte

Charakteristika	EPclin Low Risk (n=236)	EPclin High Risk (n=135)	Gesamtkohorte (n=371)
Resektionsrand *			
R0	232/236 (98,3)	132/135 (97,8)	364/371 (98,1)
R1	4/236 (1,7)	3/135 (2,2)	7/371 (1,9)

* keine Informationen verfügbar über den Resektionsstatus von zwei Patientinnen

7.3.13. Multizentrität und Multifokalität

329 der 373 Patientinnen wiesen einen einfachen unifokalen Tumor auf. 24 der Patientinnen zeigten mehrere Herde in einem Quadranten und damit einen multifokalen Tumor. 20 Patientinnen wiesen multizentrische Herde in mehreren Quadranten auf.

Bezüglich der Zuordnung zur EPclin Niedrig- und Hochrisikogruppe der multifokalen und multizentrischen Tumore ist kein eindeutiger Trend zu erkennen: So werden nicht signifikant mehr Patientinnen mit multifokalen oder multizentrischen Tumoren der Hochrisikogruppe zugeordnet.

7.4. Diskussion

7.4.1. Weitere vergleichende Studien der am häufigsten eingesetzten Genexpressionstests und des EndoPredicts

Die verfügbaren Tests unterscheiden sich in den verschiedenen Anwendungsspektren, wie Menopausen-, Nodal-, Hormonrezeptor- und HER2-Status, wie die Tabelle 1.3-1 demonstriert. Es muss daher betont werden, dass die bekannten Genexpressionstests aufgrund ihrer unterschiedlich angewandten Patientenkollektive nicht im Ganzen verglichen werden können.

Jahn et al. verglichen die Risikoeinteilung durch den EndoPredict Test mit der Einteilung durch MammaPrint und durch histopathologische Faktoren zur klinischen Risikostratifizierung[167]: Alle drei Einteilungen zeigten einen vergleichbaren Anteil an Hochrisikopatientinnen (MammaPrint 42,6%, EndoPredict 44,7%, klinische Risikostratifizierung 45,7%). Zwischen dem MammaPrint und EndoPredict-Test zeigte sich eine Diskordanz von 36%. Die klinische Risikostratifizierung zeigte keine Korrelation mit dem MammaPrint, korrelierte jedoch stark mit dem EndoPredict-Test ($p < 0.001$)[167].

Ein Vergleich zwischen EndoPredict und dem PAM50 Risk of Recurrence Score zeigte eine signifikante Korrelation und ähnliche prognostische Leistung zwischen den Tests[168]. Bei beiden Test verbesserte die Inklusion klinischer Parameter die prognostische Fähigkeit dieser Test (10-Jahres-MFS ROR-T 88%, ROR-PT 92%, EPclin 100%)[30], [168].

Varga et al. überprüften und fassten 2019 14 Studien mit 34 bis 1005 eingeschlossenen und insgesamt 5514 Patientinnen zusammen, welche unterschiedliche Genexpressionstest, mit dem weit verbreiteten Oncotype DX verglichen[155]. Trotz der ähnlichen Anwendungsbereiche konnte eine Diskordanz von 42 bis 66% der Ergebnisse zum Oncotype DX beobachtet werden.

Es lag jedoch zum Zeitpunkt der Arbeit nur eine Studie vor, welche den EndoPredict direkt mit dem Oncotype DX verglich[141], [155]: Diese zeigte in 18-21% der Fälle

eine große Diskordanz, welche zu einer gegenteiligen Einteilung in die Risikogruppen führte.

So konnte bestätigt werden, dass für jede Patientin unterschiedliche Risikoeinteilungen in Abhängigkeit vom durchgeführten Test erhoben werden können und damit divergente Empfehlungen für oder gegen eine Chemotherapie [30].

7.4.2. Männliche Patienten mit Therapieempfehlung mittels EndoPredict-Test

Die vorliegende Arbeit präsentiert die ersten prospektiven Ergebnisse von Männern mit Östrogenrezeptor-positiven, Her2-negativem Mammakarzinom, bei denen die Therapie ebenfalls mittels EndoPredict-Test entschieden wurde. Unter den eingeschlossenen 6 Männern wurden weder Lokalrezidive, Metastasen, noch ein Todesfall beobachtet. Auch wenn demnach eventuell angenommen werden kann, dass der EndoPredict-Test auch bei männlichen Patienten mit dem oben beschriebenen Karzinomtyp in der Therapieentscheidung helfen kann, werden weitere Studien mit deutlichen größerem männlichen Patientenkollektiv nötig sein, um den EndoPredict-Test in der Anwendung bei männlichen Patienten zu validieren.

IV. Literaturverzeichnis

- [1] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut, "Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2018," *Bericht zum Krebsgeschehen Deutschl.*, vol. 1., pp. 16–77, 2018.
- [2] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF), "S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.4; AWMF-Registernummer: 032-045OL," 2021.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, 2018.
- [4] F. B. M. Ervik, F. Lam, J. Ferlay, L. Mery, I. Soerjomataram, "Cancer Today," *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Cancer Today.*, 2016. [Online]. Available: <http://www.gco.iarc.fr>. [Accessed: 13-Jun-2018].
- [5] World Health Organization, "Breast Cancer: Prevention and Control," 2019, 2019. [Online]. Available: <https://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html>. [Accessed: 10-Oct-2019].
- [6] GLOBOCAN 2018; Cancer Today IARC, "No Title," 2018. [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/today/>. [Accessed: 10-Oct-2019].
- [7] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., "Krebs in Deutschland für 2013/2014," *Krebs Deutschl. 2013/2014*, no. 11, p. 154, 2017.
- [8] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., "Krebs in Deutschland für 2017/2018," vol. 13. Ausgab, 2021.
- [9] G. Carioli, M. Malvezzi, T. Rodriguez, P. Bertuccio, E. Negri, and C. La Vecchia, "Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe," *Breast*, 2017.
- [10] Brustkrebszentrale.de, "Metastasen bei Brustkrebs," 2019. [Online]. Available: <https://www.brustkrebszentrale.de/behandeln/metastasen/>. [Accessed: 10-Oct-2019].
- [11] R. Gätje *et al.*, *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. aktuali. Thieme, 2015.
- [12] J. L. Caswell-Jin *et al.*, "Change in Survival in Metastatic Breast Cancer with Treatment Advances: Meta-Analysis and Systematic Review," *JNCI Cancer Spectr. Oxford Acad.*, 2018.
- [13] B. Gerber, M. Freund, and T. Reimer, "Recurrent breast cancer: Treatment strategies for maintaining and prolonging good quality of life," *Deutsches Arzteblatt*. 2010.
- [14] P. Christiansen, N. Al-Suliman, K. Bjerre, and S. Møller, "Recurrence pattern and prognosis in Low-risk breast cancer patients - Data from the DBCG 89-A

- programme,” *Acta Oncol. (Madr)*., 2008.
- [15] Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, *MANUAL Mammakarzinome - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 16. überar. W. Zuckschwerdt Verlag München, 2017.
- [16] Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) Kommission Mamma, “Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome, Guidelines Breast Version 2010.1.0D,” 2010. .
- [17] Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) Kommission Mamma, “Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome: Prognostische und prädiktive Faktoren; Guideline Breast Version 2019.1D,” 2019. [Online]. Available: https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2019-03/DE/einzel/2019D_05_Prognostische_und_praediktive_Faktoren_Lit.pdf. [Accessed: 15-Oct-2019].
- [18] J. S. Michaelson *et al.*, “Why cancer at the primary site and in the lymph nodes contributes to the risk of cancer death,” *Cancer*, 2009.
- [19] E. Colzani *et al.*, “Prognosis of patients with breast cancer: Causes of death and effects of time since diagnosis, age, and tumor characteristics,” *J. Clin. Oncol.*, 2011.
- [20] J. D. Brierley, M. K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours - 8th edition*. 2017.
- [21] C. W. Elston and I. O. Ellis, “pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term Follow-up,” *Histopathology*, 1991.
- [22] John Hopkins University Department of Pathology, “Staging and Grade,” 2021. [Online]. Available: <https://pathology.jhu.edu/breast/staging-grade/>. [Accessed: 19-Apr-2021].
- [23] M. Inoue *et al.*, “Specific sites of metastases in invasive lobular carcinoma: a retrospective cohort study of metastatic breast cancer,” *Breast Cancer*, 2017.
- [24] N. Harbeck and Heywang-Köbrunner S, “Gynäkologie und Geburtshilfe,” in *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2007, p. S. 558.
- [25] R. Kreienberg, U. Albert, M. Follmann, I. Kopp, T. Kühn, and A. Wöckel, “Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms,” *Senol. - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*, 2013.
- [26] A. Lebeau, E. Burandt, M. Kriegsmann, and H. P. Sinn, “Invasive breast cancer: The current who classification,” *Pathologe*, 2014.
- [27] M. H. Galea, R. W. Blamey, C. E. Elston, and I. O. Ellis, “The Nottingham prognostic index in primary breast cancer,” *Breast Cancer Res. Treat.*, 1992.
- [28] P. R. B. Kitchen *et al.*, “Tubular carcinoma of the breast: Prognosis and response to adjuvant systemic therapy,” *Aust. N. Z. J. Surg.*, 2001.
- [29] I. Soerjomataram, M. W. J. Louwman, J. G. Ribot, J. A. Roukema, and J. W. W. Coebergh, “An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer,” *Breast Cancer Res. Treat.*, 2008.

- [30] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF), "S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, AWMF Registernummer: 032-045OL," vol. Langversio, no. Februar 2020, 2020.
- [31] N. Houssami, P. Macaskill, M. Luke Marinovich, and M. Morrow, "The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: A meta-analysis," *Ann. Surg. Oncol.*, 2014.
- [32] N. Houssami *et al.*, "Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy," *Eur. J. Cancer*, 2010.
- [33] S. E. Singletary, "Surgical margins in patients with early-stage breast cancer treated with breast conservation therapy," *Am. J. Surg.*, 2002.
- [34] D. R. G. Faverly, L. Burgers, P. Bult, and R. Holland, "Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma in situ: Clinical implications," *Semin. Diagn. Pathol.*, 1994.
- [35] N. Kroman, M. B. Jensen, J. Wohlfahrt, H. T. Mouridsen, P. K. Andersen, and M. Melbye, "Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: Population based study," *Br. Med. J.*, 2000.
- [36] K. S. Albain, D. C. Allred, *et al.*, "Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials?," *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1994.
- [37] Y. Remvikos, H. Magdelenat, and B. Dutrillaux, "Genetic evolution of breast cancers III: Age-dependent variations in the correlations between biological indicators of prognosis," *Breast Cancer Res. Treat.*, 1995.
- [38] R. Lauria *et al.*, "The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer," *Cancer*, 1995.
- [39] A. Scharl, "Mammakarzinom-Therapie: Der routinemäßige Einsatz von Gentests ist derzeit nicht sinnvoll," *Dtsch Arztebl Int.*, vol. 109, no. 42, p. A-2085-A-2086, Oct. 2012.
- [40] T. Iwamoto *et al.*, "Estrogen Receptor (ER) mRNA and ER-related gene expression in breast cancers that are 1% to 10% ER-positive by immunohistochemistry," *J. Clin. Oncol.*, 2012.
- [41] A. S. Coates *et al.*, "Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015," *Ann. Oncol.*, 2015.
- [42] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials," *Lancet*, vol. 365, no. 9472, pp. 1687–1717, 2005.
- [43] A. Vincent-Salomon *et al.*, "Long term outcome of small size invasive breast carcinomas independent from angiogenesis in a series of 685 cases," *Cancer*, 2001.
- [44] J. Preiß, W. Dornoff, A. Schmieder, F. Honecker, and J. Claßen, *Taschenbuch Onkologie. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2014/15*, 17. Auflage. W.

- Zuckschwerdt Verlag München, 2014.
- [45] E. Keyhani, A. Muhammadnejad, and M. Karimlou, "Prevalence of HER-2-positive invasive breast cancer: A systematic review from Iran," *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 2012.
- [46] M. J. Duffy, P. M. McGowan, N. Harbeck, C. Thomssen, and M. Schmitt, "uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: Validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies," *Breast Cancer Research*. 2014.
- [47] M. Schmidt, C. Thomssen, and M. Untch, "Intrinsic subtypes of primary breast cancer - Gene expression analysis," *Oncology Research and Treatment*. 2016.
- [48] N. Harbeck *et al.*, "Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients," *Eur. J. Cancer*, 2013.
- [49] Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), "Biomarker uPA/PAI-1 bei Mammakarzinom: Nutzen und Schaden des Tests unklar," 2014. [Online]. Available: <https://www.iqwig.de/de/presse/pressemitteilungen/2014/biomarker-upa-pai-1-bei-mammakarzinom-nutzen-und-schaden-des-tests-unklar.6359.html>. [Accessed: 19-Oct-2019].
- [50] M. Dowsett *et al.*, "Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group," *Journal of the National Cancer Institute*. 2011.
- [51] W. Jonat and N. Arnold, "Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use?," *Annals of Oncology*, 2011.
- [52] F. Petrelli, G. Viale, M. Cabiddu, and S. Barni, "Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients," *Breast Cancer Research and Treatment*. 2015.
- [53] O. Gluz *et al.*, "West German Study Group Phase III PlanB Trial: First prospective outcome data for the 21-gene recurrence score assay and concordance of prognostic markers by central and local pathology assessment," *J. Clin. Oncol.*, 2016.
- [54] U. Nitz *et al.*, "Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: Efficacy and predictive value of Ki67 expression," *Ann. Oncol.*, 2014.
- [55] G. Curigliano *et al.*, "De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: The St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017," *Ann. Oncol.*, 2017.
- [56] A. Goldhirsch, W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thürlimann, and H. J. Senn, "Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011," *Ann. Oncol.*, 2011.
- [57] M. C. U. Cheang *et al.*, "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer," *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009.

- [58] A. Goldhirsch, J. N. Ingle, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thürlimann, and H. J. Senn, "Thresholds for therapies: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009," in *Annals of Oncology*, 2009.
- [59] A. Goldhirsch *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.
- [60] S. Bustreo *et al.*, "Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term Follow-up," *Breast Cancer Res. Treat.*, 2016.
- [61] S. C. Y. Leung *et al.*, "Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: Phase 3 of an international multicenter collaboration," *npj Breast Cancer*, 2016.
- [62] R. Shui, B. Yu, R. Bi, F. Yang, and W. Yang, "An interobserver reproducibility analysis of Ki67 visual assessment in breast cancer," *PLoS One*, 2015.
- [63] A. I. Hida *et al.*, "Visual assessment of Ki67 using a 5-grade scale (Eye-5) is easy and practical to classify breast cancer subtypes with High reproducibility," *J. Clin. Pathol.*, 2015.
- [64] Z. Varga *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.
- [65] M. Mengel, R. Von Wasielewski, B. Wiese, T. Rüdiger, H. K. Müller-Hermelink, and H. Kreipe, "Inter-laboratory and inter-observer reproductibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial," *J. Pathol.*, 2002.
- [66] J. Bischoff and C. Thomssen, *Aktuelle Empfehlungen zur Prävention, Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome, Chemotherapie und zielgerichtete Therapie beim metastasierten Mammakarzinom*. 2013.
- [67] C. M. Perou *et al.*, "Molecular portraits of human breast tumours.," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–752, 2000.
- [68] T. Sørlie *et al.*, "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001.
- [69] I. Jatoi, W. F. Anderson, J. H. Jeong, and C. K. Redmond, "Breast cancer adjuvant therapy: Time to consider its time-dependent effects," *Journal of Clinical Oncology*. 2011.
- [70] O. Abe *et al.*, "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials," *Lancet*, 2005.
- [71] T. Saphner, D. C. Tormey, and R. Gray, "Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy," *J. Clin. Oncol.*, 1996.
- [72] P. Dubsy *et al.*, "The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2– breast cancer patients," *Br. J. Cancer*, vol. 109, no. 12, pp. 2959–2964, 2013.

- [73] N. Harbeck, O. Gluz, and U. Nitz, "Prädiktive Gensignaturen - Wie valide sind sie?," 2015.
- [74] U. Veronesi *et al.*, "Twenty-year Follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer," *N. Engl. J. Med.*, 2002.
- [75] I. H. Kunkler, L. J. Williams, W. J. L. Jack, D. A. Cameron, and J. M. Dixon, "Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): A randomised controlled trial," *Lancet Oncol.*, 2015.
- [76] P. McGale *et al.*, "Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials," *Lancet*, 2014.
- [77] C. Davies *et al.*, "Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial," *Lancet*, 2013.
- [78] Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) Kommission Mamma, "Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome Empfehlungen 2020," 2020. [Online]. Available: https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2020/PDF_DE/2020D10_Adjuvante_endokrine_Therapie_mit_Literatur.pdf. [Accessed: 05-Mar-2021].
- [79] V. von Bodungen *et al.*, "Duktales Carcinoma in situ (DCIS): Zeit für einen Wandel?," *Dtsch Arztebl Int.*, vol. 113, no. 6, p. [22], Feb. 2016.
- [80] H. Eggemann *et al.*, "Adjuvant therapy with tamoxifen compared to aromatase inhibitors for 257 male breast cancer patients," *Breast Cancer Res. Treat.*, 2013.
- [81] M. Gnant and G. G. Steger, "Fighting overtreatment in adjuvant breast cancer therapy," *The Lancet*. 2009.
- [82] Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen, "Biomarkerbasierte Tests zur Entscheidung für oder gegen eine adjuvante systemische Chemotherapie beim primären Mammakarzinom - Abschlussbericht," Köln, 2016.
- [83] R. Wolters, A. Wöckel, M. Wischnewsky, and R. Kreienberg, "Auswirkungen leitlinienkonformer Therapie auf das Überleben von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom - Ergebnisse einer retrospektiven Kohortenstudie," *Z. Evid. Fortbild. Qual. Gesundheitswes.*, 2011.
- [84] K. Albain *et al.*, "Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials," *Lancet*, 2012.
- [85] C. Thomssen, M. Balic, N. Harbeck, and M. Gnant, "St. Gallen/Vienna 2021: A brief summary of the consensus discussion on customizing therapies for women with early breast cancer," *Breast Care*. 2021.
- [86] Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) Kommission Mamma, "Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und

- metastasiertem Brustkrebs,” 2018. [Online]. Available: https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2018-03/Gesamt_deutsch/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2018.pdf. [Accessed: 23-Oct-2019].
- [87] U. Nitz, O. Gluz, D. Hofmann, and N. Harbeck, “Genexpressionstests bei Brustkrebs: Pro,” *Dtsch Arztebl Int.*, vol. 111, no. 45, p. [12], Nov. 2014.
- [88] K. S. Albain *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.
- [89] M. Filipits *et al.*, “The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer,” *Clin. Cancer Res.*, 2014.
- [90] M. Gnant *et al.*, “Identifying clinically relevant prognostic subgroups of postmenopausal women with node-positive hormone receptor-positive early-stage breast cancer treated with endocrine therapy: A combined analysis of ABCSG- 8 and ATAC using the PAM50 risk of recurrence,” *Ann. Oncol.*, 2015.
- [91] F. Cardoso *et al.*, “70-Gene signature as an aid to treatment decisions in early-stage breast cancer,” *N. Engl. J. Med.*, 2016.
- [92] J. A. Sparano *et al.*, “Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer,” *N. Engl. J. Med.*, 2018.
- [93] Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) Kommission Mamma; DGGG e.V.; DKG e.V., “Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome Brustkrebs Nachsorge; Guidelines Breast Version 2021.1D,” 2021. [Online]. Available: https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2021/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2021.pdf. [Accessed: 22-Feb-2022].
- [94] M. Saghatchian *et al.*, “Additional prognostic value of the 70-gene signature (MammaPrint®) among breast cancer patients with 4-9 positive lymph nodes,” *Breast*, 2013.
- [95] T. Reimer *et al.*, “Prospektive Phase-III PlanB-Studie: 5 Jahres Daten zum prognostischen Stellenwert von 21-Gen Recurrence-Score, zentralpathologischem Grading, ER, PR, Ki-67 Review beim frühem Hochrisiko HR+/HER2-negativen Mammakarzinom,” *Senol. - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*, 2016.
- [96] Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen, “Biomarkerbasierte Tests zur Entscheidung für oder gegen eine adjuvante systemische Chemotherapie beim primären Mammakarzinom – Aktualisierung zum Auftrag D14-01 Rapid Report,” vol. IQWiG-Beri, 2020.
- [97] N. Wolmark *et al.*, “Prognostic impact of the combination of recurrence score and quantitative estrogen receptor expression (ESR1) on predicting late distant recurrence risk in estrogen receptor-positive breast cancer after 5 years of tamoxifen: Results from NRG oncology/nati,” *J. Clin. Oncol.*, 2016.

- [98] J. Ettl, W. Jonat, and M. Kiechle, "Genexpressionstests zur Prognose und Prädiktion," *Gynakologe*, vol. 48, pp. 871–875, 2015.
- [99] M. Filipits *et al.*, "A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors," *Clin. Cancer Res.*, 2011.
- [100] B. M. Muller *et al.*, "Comparison of the RNA-based EndoPredict multigene test between core biopsies and corresponding surgical breast cancer sections," *J Clin Pathol*, vol. 65, no. 7, pp. 660–2, 2012.
- [101] C. Poremba *et al.*, "Preanalytical variables and performance of diagnostic RNA-based gene expression analysis in breast cancer," *Virchows Arch.*, vol. 465, no. 4, pp. 409–417, 2014.
- [102] C. Denkert *et al.*, "Decentral gene expression analysis for ER+/Her2– breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay," *Virchows Arch.*, 2012.
- [103] I. Sestak *et al.*, "Prediction of chemotherapy benefit by EndoPredict in patients with breast cancer who received adjuvant endocrine therapy plus chemotherapy or endocrine therapy alone," *Breast Cancer Res. Treat.*, 2019.
- [104] Myriad Genetics Inc., "Was ist EndoPredict?," 2019. [Online]. Available: <https://endopredict.eu/de/was-ist-endopredict/>. [Accessed: 27-Oct-2019].
- [105] P. Dubsy *et al.*, "Endopredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer," *Ann. Oncol.*, vol. 24, no. 3, pp. 640–647, 2013.
- [106] J. Ettl *et al.*, "Decision impact and feasibility of different ASCO-recommended biomarkers in early breast cancer: Prospective comparison of molecular marker EndoPredict and protein marker uPA/PAI-1," *PLoS One*, 2017.
- [107] Sividon Diagnostics GmbH; Myriad GmbH, "Gebrauchsanweisung EndoPredict®," 2014.
- [108] Medac Diagnostika and Immunologic BV, "Ki-67 clone MIB-1 Instructions For Use, Log number: 111, Code issue: DS 111-1," vol. 13, no. 2. Duiven, The Netherlands, p. 6921, 2014.
- [109] La Roche Ltd. and Ventana Medical Systems Inc., "Prozedur Ventana Medical Systems Inc. BenchMark XT ultraView DAB v3 IHC MIB1 Ki67 Staining," 2019.
- [110] F. Hoffmann and La Roche Ltd., "Roche Tissue Diagnostics Reagent Catalog, EZ Prep (10x)," 27.07.2018, 2018. [Online]. Available: <http://reagent-catalog.roche.com/product/205?type=208>. [Accessed: 24-Jul-2019].
- [111] F. Hoffmann and La Roche Ltd., "Roche Tissue Diagnostics Reagent Catalog, ULTRA LCS (Predilute)," 27.07.2018, 2018. [Online]. Available: <http://reagent-catalog.roche.com/product/1360?type=1985>. [Accessed: 24-Jul-2019].
- [112] F. Hoffmann and La Roche Ltd., "Roche Tissue Diagnostics Reagent Catalog, Cell Conditioning 1 (CC1)," 27.07.2018, 2018. [Online]. Available: <http://reagent-catalog.roche.com/product/203?type=204>. [Accessed: 24-Jul-2019].

- [113] F. Hoffmann and La Roche Ltd., “Roche Tissue Diagnostics Reagent Catalog, Reaction Buffer (10x),” 27.07.2018, 2018. [Online]. Available: <http://reagent-catalog.roche.com/product/207?type=212>. [Accessed: 24-Jul-2019].
- [114] F. Hoffmann and La Roche Ltd., “Roche Tissue Diagnostics Reagent Catalog, SSC (10X),” 27.07.2018, 2018. [Online]. Available: <http://reagent-catalog.roche.com/product/1361?type=1733>. [Accessed: 24-Jul-2019].
- [115] Ventana Medical Systems Inc., “Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit Broschüre, Katalognummer 760-500, Bestellnummer 05269806001.” pp. 1–5, 2011.
- [116] F. Hoffmann and La Roche Ltd., “Roche Tissue Diagnostics Reagent Catalog, Bluing Reagent,” 27.07.2018, 2018. [Online]. Available: <http://reagent-catalog.roche.com/product/198?type=197>. [Accessed: 24-Jul-2019].
- [117] J. M. Elias *et al.*, “Special report: Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission,” *Am. J. Clin. Pathol.*, 1989.
- [118] Cohen J., “Statistical Power Analysis for the Behavioural Science (2nd Edition),” in *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 1988.
- [119] C. Duller, *Einführung in die nichtparametrische Statistik mit SAS, R und SPSS*. 2018.
- [120] I. Zwiener, M. Blettner, and G. Hommel, “Teil 15: Überlebenszeitanalyse,” *Dtsch. Arztebl.*, 2011.
- [121] M. Zweig and G. Campbell, “Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine.,” *Clin Chem.*, vol. 39(4): 561, 1993.
- [122] Myriad International GmbH, “Endopredict Test,” *Myriad International GmbH*, 2017. [Online]. Available: <http://www.endopredict.com/de/endopredict/funktionsprinzip.html>. [Accessed: 12-Dec-2017].
- [123] A. S. Coates *et al.*, “Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015,” *Ann. Oncol.*, 2015.
- [124] R. Kronenwett *et al.*, “Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test,” *BMC Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 456, 2012.
- [125] F. M. *et al.*, “Impact of the EndoPredict-clin score on risk stratification in ER-positive, HER2-negative breast cancer after considering clinical guidelines,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 15, 2012.
- [126] M. Martin *et al.*, “Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: Results from the GEICAM 9906 trial,” *Breast Cancer Res.*, 2014.
- [127] R. L. Camp, L. A. Charette, and D. L. Rimm, “Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma,” *Lab. Investig.*, 2000.
- [128] G. Cattoretti *et al.*, “Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections,” *J. Pathol.*, 1992.

- [129] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF), “S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Konsultationsfassung 0.4.1,” 2017.
- [130] A. I. Neugut *et al.*, “A prospective cohort study of early discontinuation of adjuvant chemotherapy in women with breast cancer: the breast cancer quality of care study (BQUAL),” *Breast Cancer Res. Treat.*, 2016.
- [131] A. Noske *et al.*, “Risk stratification in luminal-type breast cancer: Comparison of Ki-67 with EndoPredict test results,” *Breast*, vol. 49, 2020.
- [132] I. Sestak *et al.*, “Comparison of the performance of 6 prognostic signatures for estrogen receptor-positive breast cancer a secondary analysis of a randomized clinical trial,” *JAMA Oncol.*, 2018.
- [133] F. Fitzal *et al.*, “The genomic expression test EndoPredict is a prognostic tool for identifying risk of local recurrence in postmenopausal endocrine receptor-positive, her2neu-negative breast cancer patients randomised within the prospective ABCSG 8 trial,” *Br. J. Cancer*, 2015.
- [134] Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), “Abschlussbericht IQWiG - [D14-01] Biomarkerbasierte Tests zur Entscheidung für oder gegen eine adjuvante systemische Chemotherapie beim primären Mamma-Karzinom,” 2016. [Online]. Available: <https://www.iqwig.de/de/projekte-ergebnisse/projekte/nichtmedikamentoese-verfahren/d14-01-biomarkerbasierte-tests-zur-entscheidung-fur-oder-gegen-eine-adjuvante-systemische-chemotherapie-beim-primaren-mamma-karzinom.6097.html>. [Accessed: 22-Oct-2019].
- [135] Gemeinsamer Bundesausschuss, “Unterstützung der Therapieentscheidung bei Brustkrebs im Frühstadium: Biomarker-Test künftig Kassenleistung Pressemitteilung Methodenbewertung,” 2019. [Online]. Available: <https://www.g-ba.de/presse/pressemitteilungen-meldungen/800/>. [Accessed: 24-Apr-2021].
- [136] F. Penault-Llorca *et al.*, “Decision of adjuvant chemotherapy in intermediate risk luminal breast cancer patients: A prospective multicenter trial assessing the clinical and psychological impact of EndoPredict® (EpClin) use (UCBG 2–14),” *Breast*, 2020.
- [137] G. Schlake *et al.*, “P238 EndoPredict-based treatment decision can reduce chemotherapy usage in ER+, HER2– breast cancer,” *The Breast*, 2015.
- [138] M. Kiechle, “Multigentest als sinnvolle Entscheidungshilfe bei Brustkrebs-Multigentest ermöglicht gezielten Einsatz von Chemotherapien bei Brustkrebs,” 2018. [Online]. Available: <https://www.tum.de/nc/die-tum/aktuelles/pressemitteilungen/details/35125/>. [Accessed: 24-May-2020].
- [139] R. Buus *et al.*, “Comparison of endopredict and epclin with oncotype dx recurrence score for prediction of risk of distant recurrence after endocrine therapy,” in *Journal of the National Cancer Institute*, 2016.
- [140] I. Sestak *et al.*, “Abstract S6-05: Comprehensive comparison of prognostic signatures for breast cancer in TransATAC,” 2017.

- [141] Z. Varga *et al.*, “Comparison of EndoPredict and Oncotype DX Test Results in Hormone Receptor Positive Invasive Breast Cancer,” *PLoS One*, 2013.
- [142] E. C. Inwald *et al.*, “Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry,” *Breast Cancer Res. Treat.*, 2013.
- [143] A. H. Partridge, A. LaFountain, E. Mayer, B. S. Taylor, E. Winer, and A. Asnis-Alibozek, “Adherence to initial adjuvant anastrozole therapy among women with early-stage breast cancer,” *J. Clin. Oncol.*, 2008.
- [144] C. C. Murphy, L. K. Bartholomew, M. Y. Carpentier, S. M. Bluethmann, and S. W. Vernon, “Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: A systematic review,” *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012.
- [145] R. T. Chlebowski, J. Kim, and R. Haque, “Adherence to endocrine therapy in breast cancer adjuvant and prevention settings,” *Cancer Prevention Research*. 2014.
- [146] J. Ettl *et al.*, “First prospective outcome data for the second-generation multigene test Endopredict in ER-positive/HER2-negative breast cancer,” *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2020.
- [147] L. Huiart, S. Dell’Aniello, and S. Suissa, “Use of tamoxifen and aromatase inhibitors in a large population-based cohort of women with breast cancer,” *Br. J. Cancer*, 2011.
- [148] L. Schwentner *et al.*, “Exploring patient- and physician-related factors preventing breast cancer patients from guideline-adherent adjuvant chemotherapy—results from the prospective multi-center study BRENDA II,” *Support. Care Cancer*, 2016.
- [149] M. Filipits *et al.*, “Prediction of distant recurrence using EndoPredict among women with ER+, HER2-node-positive and node-negative breast cancer treated with endocrine therapy only,” *Clin. Cancer Res.*, 2019.
- [150] S. Paik *et al.*, “A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer,” *N. Engl. J. Med.*, 2004.
- [151] S. Paik *et al.*, “Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer,” *J. Clin. Oncol.*, 2006.
- [152] D. C. Sgroi *et al.*, “Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: A prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population,” *Lancet Oncol.*, 2013.
- [153] M. Martín *et al.*, “PAM50 proliferation score as a predictor of weekly paclitaxel benefit in breast cancer,” *Breast Cancer Res. Treat.*, 2013.
- [154] M. Gnant *et al.*, “Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: Using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone,” *Ann. Oncol.*, 2014.
- [155] Z. Varga, P. Sinn, and A. D. Seidman, “Summary of head-to-head comparisons of patient risk classifications by the 21-gene Recurrence Score® (RS) assay

- and other genomic assays for early breast cancer,” *International Journal of Cancer*. 2019.
- [156] J. Backe, “Brustkrebs beim Mann,” *Dtsch Arztebl* 2002; 99: A 1168–1172, 2002. [Online]. Available: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/31359/Brustkrebs-beim-Mann>. [Accessed: 11-Oct-2019].
- [157] Y. S. Sun *et al.*, “Risk factors and preventions of breast cancer,” *International Journal of Biological Sciences*. 2017.
- [158] M. M. Bilimoria and M. Morrow, “The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies,” *CA. Cancer J. Clin.*, 1995.
- [159] The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, “Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women: Reanalysis of Nine Prospective Studies,” *CancerSpectrum Knowl. Environ.*, 2002.
- [160] “Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence,” *Lancet*, 2019.
- [161] N. Hamajima *et al.*, “Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies,” *Lancet Oncol.*, vol. 13, no. 11, pp. 1141–1151, 2012.
- [162] H. R. Brewer, M. E. Jones, M. J. Schoemaker, A. Ashworth, and A. J. SwerdLow, “Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure,” *Breast Cancer Res. Treat.*, 2017.
- [163] Labor Lademannbogen MVZ GmbH, “Humangenetik: Brustkrebs, erblicher (erweiterte Diagnostik),” 2018. [Online]. Available: [https://www.labor-lademannbogen.de/analysen/analysen-spektrum/analysenverzeichnis/analysis/show/humangenetik/brustkrebs-erblicher-\(erweiterte-diagnostik\)/](https://www.labor-lademannbogen.de/analysen/analysen-spektrum/analysenverzeichnis/analysis/show/humangenetik/brustkrebs-erblicher-(erweiterte-diagnostik)/). [Accessed: 25-Apr-2021].
- [164] K. B. Kuchenbaecker *et al.*, “Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, 2017.
- [165] T. J. Key, N. E. Allen, P. K. Verkasalo, and E. Banks, “Energy balance and cancer: the role of sex hormones.,” *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 60, no. 1, pp. 81–89, 2001.
- [166] N. Hamajima *et al.*, “Alcohol, tobacco and breast cancer - Collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease,” *Br. J. Cancer*, 2002.
- [167] S. W. Jahn *et al.*, “Clinically High-risk breast cancer displays markedly discordant molecular risk predictions between the MammaPrint and EndoPredict tests,” *Br. J. Cancer*, 2020.
- [168] M. Martin *et al.*, “Prognostic ability of EndoPredict compared to research-based versions of the PAM50 risk of recurrence (ROR) scores in node-positive, estrogen receptor-positive, and HER2-negative breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study,” *Breast Cancer Res. Treat.*, 2016.

V. Bildquellen

- (1) *In Anlehnung der Abbildung von:* GLOBOCAN 2018; Cancer Today IARC, “Krebsinzidenz in Deutschland, Frauen,” 2018. [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/today/>. [Accessed: 10-Oct-2019].
- (2) Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität; CCC München, “MANUAL Mammakarzinome - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Abbildung Relatives Überleben ab Progression nach Progressionstyp“, Kapitel Epidemiologie von S. Schrodi et al., Seite 11, Abbildung 11, 16. überar., Zuckschwerdt Verlag, 2017. – *mit freundlicher Genehmigung des Verlages*
- (3) Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität; CCC München, “MANUAL Mammakarzinome - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Abbildung Relatives Überleben in Abhängigkeit vom Grading“, Kapitel Epidemiologie von S. Schrodi et al., Seite 9, Abbildung 7, 16. überar., Zuckschwerdt Verlag, 2017. – *mit freundlicher Genehmigung des Verlages*
- (4) M. Dowsett *et al.*, “Assessment of Ki-67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki-67 in breast cancer working Group,” Figure 3, *Journal of the National Cancer Institute*. 2011. – *Erlaubnis erworben über RightsLink*
- (5) Hida AI, Bando K, Sugita A, et al. Visual assessment of Ki-67 using a 5-grade scale (Eye-5) is easy and practical to classify breast cancer subtypes with High reproducibility. Figure 2, *J Clin Pathol* 2015 – *Erlaubnis erworben über RightsLink*
- (6) Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität; CCC München, “MANUAL Mammakarzinome - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Abbildung Relatives Überleben in Abhängigkeit von molekularen Subtypen“, Kapitel Epidemiologie von S. Schrodi et al., Seite 10, Abbildung 10,

16. überar., Zuckschwerdt Verlag, 2017. – *mit freundlicher Genehmigung des Verlages*
- (7) Jatoi I, Anderson WF, Jeong JH, Redmond CK. Breast cancer adjuvant therapy: Time to consider its time-dependent effects. Figure 1, J. Clin. Oncol. 2011 – *Erlaubnis erworben über RightsLink*
- (8) Myriad Genetics Inc., “Was ist EndoPredict - Abbildung: Molekularer 12-Gen-Score für frühe und späte Metastasen,” 2019. [Online]. Available: <https://EndoPredict.eu/de/was-ist-EndoPredict/#12molecule>. [Accessed: 27-Oct-2019]. – *mit freundlicher Genehmigung von Myriad Genetics, Inc.*
- (9) *In Anlehnung der Abbildung von:* Ventana Medical Systems Inc., “Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit Broschüre, Katalognummer 760-500, Bestellnummer 05269806001.” pp. 1–5, 2011.
- (10) Myriad Genetics Inc., “Abbildung EP Score - Der molekulare ‘Fingerabdruck,’” 2017. [Online]. Available: <http://www.EndoPredict.com/de/EndoPredict/funktionsprinzip.html>. [Accessed: 12-Dec-2017]. – *mit freundlicher Genehmigung von Myriad Genetics, Inc.*
- (11) Myriad Genetics Inc., “Abbildung 10-Jahres-Risiko für Fernmetastasen entsprechend des EPclin Scores unter Endokriner Therapie (ET) versus Endokriner- und Chemotherapie (ET+C).” [Online]. Available: <https://EndoPredict.eu/chemotherapy-benefit/>. [Accessed: 08-Apr-2020]. – *mit freundlicher Genehmigung von Myriad Genetics, Inc.*
- (12) Myriad Genetics Inc., “Abbildung EPclin Risk Score.” [Online]. Available: <https://EndoPredict.eu/de/was-ist-EndoPredict/#12molecule>. [Accessed: 27-Oct-2019]. – *mit freundlicher Genehmigung von Myriad Genetics, Inc.*
- (13) Myriad Genetics Inc., “Abbildung: Test Report Sample [Online]. Available: <https://EndoPredict.eu/Low-test-report-sample/>. [Accessed: 08-Apr-2020]. – *mit freundlicher Genehmigung von Myriad Genetics, Inc.*

VI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1-1	Krebsinzidenz in Deutschland, Frauen	12
Abbildung 1.1-2	Relatives Überleben ab Progression nach Progressionstyp	14
Abbildung 1.2-1	Überleben in Abhängigkeit vom Grading	17
Abbildung 1.2-2	Auswertung eines MIB1-gefärbten Gewebes nach Ki-67	23
Abbildung 1.2-3	Auswertung der immunhistochemischen Ki67- Färbung mit MIB1	23
Abbildung 1.3-1	Relatives Überleben in Abhängigkeit von molekularen Subtypen	25
Abbildung 1.3-2	Jährliche Hazard Rate für Brustkrebsassoziierte Todesfälle nach Östrogenrezeptor-negativ und -positiv,	26
Abbildung 1.3-3	Molekularer 12-Gen-Score	33
Abbildung 1.3-4	Erläuterung des EP Scores	34
Abbildung 1.3-5	EPclin Risk Score	35
Abbildung 1.3-6	10-Jahres-Risiko für Fernmetastasen entsprechend des EPclin Scores unter Endokriner Therapie (ET) versus Endokriner- und Chemotherapie (ET+C)	35
Abbildung 3.3-1	ultraView Universal DAB Detection; adaptiert von (9)	47
Abbildung 4.1-1	Verteilung der EPclin Scores in der Gesamtkohorte	57
Abbildung 4.1-2	Anzahl aller Patientinnen der Gesamtkohorte in EP (links) und EPclin (rechts) High und Low Risk	58
Abbildung 4.1-3	McNemar-Chi-Quadrat-Test des EP- (12-Gen-Score) und EPclin-Score mit Stetigkeitskorrektur	58
Abbildung 4.1-4	Menopausenstatus nach EPclin Score	59
Abbildung 4.1-5	Tumorgößen nach EP Score(links) und EPclin Score(rechts)	60
Abbildung 4.1-6	Histologische Tumortypen nach EPclin- Score in Prozent	61
Abbildung 4.1-7	Grading nach EPclin Score in Prozent	61
Abbildung 4.1-8	Nodalstatus nach EP (links) und EPclin (rechts) in Prozent	62
Abbildung 4.1-9	Korrelation von Östrogenrezeptorstatus und EndoPredict	63
Abbildung 4.1-10	McNemar Chi-Quadrat-Test von Progesteronrezeptorstatus und EndoPredict	64
Abbildung 4.1-11	Korrelation von Progesteronrezeptorstatus und EP Score	65
Abbildung 4.1-12	Korrelation von Progesteronrezeptor und EPclin Score	65
Abbildung 4.2-1	Verteilung der Ki-67-Ergebnisse	66

Abbildung 4.2-2	Ki-67-Ergebnisse nach EP Score (12-Gen-Score) in High und Low Risk in Prozent	67
Abbildung 4.2-3	Pearsons Produkt-Moment-Korrelation von Ki-67 und EP (12-Gen-) Score	67
Abbildung 4.2-4	Ki-67-Ergebnisse nach EPclin Score in High und Low Risk in Prozent	68
Abbildung 4.2-6	Pearsons Produkt-Moment-Korrelation von Ki-67 und EPclin Score	68
Abbildung 4.2-5	Ki-67 und EPclin Score	69
Abbildung 4.2-7	Ki-67 und Grading	70
Abbildung 4.2-8	Risikoeinteilung in Hoch- und Niedrigrisiko nach EPclin und Ki-67	70
Abbildung 4.3-1	Auskunft über die durchgeführte oder nicht durchgeführte empfohlene Therapie der gesamten Kohorte	73
Abbildung 4.3-2	Compliance zur Therapieempfehlung der gesamten Kohorte	74
Abbildung 4.3-3	Dauer des Follow-Ups der Gesamtkohorte	75
Abbildung 4.3-4	Gesamtüberleben (OS=Overall-Survival) der Gesamtkohorte in Jahren	75
Abbildung 4.3-5	Krankheitsfreies Überleben (Disease-free-Survival=DFS) der Gesamtkohorte	76
Abbildung 4.3-6	Gesamtüberleben (Overall Survival=OS) der Kohorte nach EPclin High und Low Risk Score	77
Abbildung 4.3-7	Krankheitsfreies Überleben (Disease-free-Survival=DFS) in % nach EP(12-Gen-) High und Low Risk Score	77
Abbildung 4.3-8	Krankheitsfreies Überleben (DFS= Disease-free-Survival) nach EPclin High und Low Risk in Jahren	78
Abbildung 4.3-9	Krankheitsfreies Überleben (DFS= Disease free survival) von EPclin High Risk Patienten mit durchgeführter CTX vs. EPclin High Risk mit nicht durchgeführter CTX	79
Abbildung 4.3-10	Krankheitsfreies Überleben (DFS= Disease free survival) von EPclin High/Low und CTX/keine CTX	79
Abbildung 4.3-11	Krankheitsfreies Überleben (Disease-free-Survival=DFS) in % nach Ki-67 <25%/≥25%	80
Abbildung 4.3-12	Krankheitsfreies Überleben (DFS=Disease free Survival) nach Grading	81

Abbildung 4.3-13	Fernmetastasenfreies Überleben (Distant metastasis free survival =DMFS) der Gesamtkohorte nach EPclin High und Low Risk	82
Abbildung 4.3-14	ROC-Analyse des Ki-67-Cut-Off nach EP Score	84
Abbildung 4.3-15	ROC-Analyse des Ki-67-Cut-Off nach EPclin Scores	84
Abbildung 4.3-16	LogRank-Statistik für das Cut-Off des Ki-67-Wertes nach krankheitsfreiem Überleben (Disease Free Survival=DFS) in der Gesamtkohorte	85
Abbildung 4.3-17	LogRank-Statistik für das Cut-Off des Ki-67-Wertes nach Gesamtüberleben (Overall Survival=OS) in der Gesamtkohorte	85
Abbildung 7.1-1	Beispiel eines Ergebnisberichts des EndoPredict Tests mit Erläuterungen Teil 1	110
Abbildung 7.1-2	Beispiel eines Ergebnisberichts des EndoPredict Tests mit Erläuterungen Teil 2	111
Abbildung 7.2-2	Follow-Up-Fragebogen Teil 1	117
Abbildung 7.2-3	Follow-Up Fragebogen Seite 2	118
Abbildung 7.3-1	Pearson's Chi-Quadrat-Test von Ki-67 und EP Score	121
Abbildung 7.3-2	Pearson's Produkt-Moment-Korrelation des Östrogenrezeptors in % und Ki-67 in %	122
Abbildung 7.3-3	Korrelation Progesteronrezeptor und Ki-67	122
Abbildung 7.3-4	Wilcoxon-Rank-Sum-Test von Ki-67 in % und dem Progesteronrezeptor in hoch ($\geq 20\%$) und niedrig ($< 20\%$)	123
Abbildung 7.3-5	Anzahl der hohen, niedrigen und nicht-erhobenen Proteasen (uPA/PAI1)	123
Abbildung 7.3-6	Proteasen (uPA/PAI-1) nach EP Score High und Low Risk, links absolut, rechts in Prozent	124
Abbildung 7.3-7	Risikoeinteilung in Hoch- und Niedrigrisiko nach EPclin, Ki67 und uPA/PAI-1	125

VII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.2-1	Vereinfachte TNM-Klassifikation des Mammakarzinom, 8.Auflage	16
Tabelle 1.3-1	Vergleich von vier Multigentests (MammaPrint®, OncotypeDX®, Prosigna®, EndoPredict®)	30
Tabelle 3.3-1	Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll	44
Tabelle 3.3-2	MIB1-Ki-67-Färbeprotokoll VENTANA ¹⁰³	46
Tabelle 3.3-3	Ki-67-Kohorte Erläuterungen für Ein- und Ausschluss von Patienten	49
Tabelle 3.4-1	Quelle des Follow-Ups	52
Tabelle 4.1-1	Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte nach EPclin High und Low Risk	55
Tabelle 4.3-1	Erläuterungen über Chemotherapie-Empfehlungen	72
Tabelle 7.2-1	(dreiteilig) TMN-Klassifikationen beim Mammakarzinom (8.Auflage);	107
Tabelle 7.3-1	UICC-Stadieneinteilung des Mammakarzinoms	109
Tabelle 7.2-1	Vollständiges detailliertes Färbeprotokoll des Ki-67-MIB1-Klon durch die VENTANA-Maschine	112
Tabelle 7.2-1	Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte nach EP High und Low Risk	119
Tabelle 7.2-2	Klinisch-pathologische Charakteristika der Ki-67-Kohorte	120
Tabelle 7.2-3	11 Todesfälle in der Kohorte von 373 Patientinnen mit Aussage über Tumorassoziiation und Tumorursache	125
Tabelle 7.2-4	3 von 373 Patientinnen mit Lokalrezidiv im Verlauf	125
Tabelle 7.2-5	8 von 373 Patientinnen mit Metastasen im Verlauf	126

VIII. Danksagung

Großer Dank gebührt zuerst meiner Doktormutter Prof. Dr. Marion Kiechle für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete, stets sehr motivierende Betreuung. Ich bin sehr dankbar und fühle mich geehrt, dass ich meine Dissertation zu diesem spannenden Thema an Ihrer Klinik habe schreiben dürfen.

Besonders hervorzuheben ist das großartige Mentoring von Dr. Evelyn Klein und Dr. Johannes Ettl. Ich bedanke mich überaus für die immerwährende Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit. Es hat sehr viel Freude bereitet.

Mein Dank gilt ebenfalls PD Dr. Aurelia Noske aus der Pathologie der TU München, mit deren Hilfe wir gemeinsam die Ki-67-Schnitte auswerten konnten und die mir noch über Ihren Umzug in die Schweiz hinweg eine große Unterstützung war.

Danken möchte ich ebenfalls Prof. Victor Magdolen und dem gesamten Team der Forschungsabteilung der Frauenklinik für die herzliche Aufnahme ins Laborteam, die Bereitstellung des Laborplatzes und die lehrreichen Seminare. Besonders hervorzuheben sind Daniela Hellmann, Rosaline Bräuer und Marion Mielke (Leitung Immunhistochemie der Klinik für Pathologie), die mich bei meinen experimentellen Arbeiten hervorragend angelernt haben und mit Ihrer Mithilfe sehr unterstützt haben. Auch PD Dr. Katja Steiger aus der experimentellen Pathologie gilt mein Dank für Ihre organisatorische Assistenz.

Großer Dank gilt Monica Vasilescu vom Qualitätsmanagement der Frauenklinik für ihre herausragende Hilfe bei der Erhebung des Follow-Ups.

Ohne die vielen Patientinnen und Patienten, die ihre Krankheitsverläufe mit uns teilten, wäre diese Studie nicht möglich gewesen. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Allen Mitarbeitern der Klinik für Frauenheilkunde, die mir in der Klinik geholfen haben, danke ich; besonders zu erwähnen ist Frau Annette Maier des Chefsekretariats von Prof. Kiechle für Ihre organisatorische Hilfe.

Ebenfalls danke ich PD Dr. Alexander Hapfelmeier für die Unterstützung mit der statistischen Auswertung der Daten.

Zu guter Letzt möchte ich meinen besonderen Dank gegenüber meinen Eltern, meiner Schwester Leandra und meinem Freund Paul aussprechen, die mich durch die Dissertation begleitet und mir den Rücken freigehalten haben. Ohne Eure motivierenden Worte und Euer Feedback wären diese abschließenden Worten wahrscheinlich noch nicht so bald geschrieben worden.

Vielen Dank.