

Aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
(Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
Chefarzt Professor Dr. W. Simon

Bedeutung der Steroidrezeptoren beim primären Mammakarzinom

*Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin*

*der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen*

vorgelegt von
Slavica Bönning, geb. Grkinic
aus
Zagreb
2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Simon
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. F. Solomayer

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Verzeichnis der Abkürzungen</i>	<i>VII</i>
1 Einleitung	1
1.1 Prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom	3
2 Östrogen- und Progesteronrezeptor	9
2.1 Biologie des Östrogenrezeptors	9
2.2 Biologie des Progesteronrezeptors.....	12
2.3 Östrogen- und Progesteronrezeptoren als prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom	14
3 Fragestellung der vorliegenden medizinischen Dissertation	16
4 Material und Methodik	17
4.1 Verwendete Datenbank	17
4.2 Patientengut.....	17
4.3 Aufarbeitung des Datenmaterials.....	19
4.4 Histopathologische Diagnosen	21
4.5 Bestimmungsmethoden des Östrogen- und Progesteronrezeptors.....	25
4.5.1 Immunhistochemische Bestimmungsmethode.....	26
4.5.1.1 ABC-Technik	26
4.5.1.2 EnVisio-Detektionssystem	27
4.5.2 Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors mit der DCC-Methode	28
4.6 Immunhistochemische Auswerteverfahren	29
4.6.1 Auswertungsmethode nach Remmele und Stegner.....	30
4.6.2 Der Allred Score.....	31
4.7 Methodenvergleich.....	32
4.8 Statistische Verfahren	33
4.9 Qualitätskontrolle	36
4.9.1 Tissue Microarray Auswertung	36
4.9.2 Zweitauswertung an archivierten Paraffinschnitten für den Östrogen- und Progesteronrezeptor	36
5 Ergebnisse	37
5.1 Das Patientenkollektiv	37
5.1.1 Alter der Patientinnen	37
5.1.2 Menopausenstatus zum Diagnosezeitpunkt	38
5.1.3 TNM-Status	40
5.1.4 Tumorgrading und Histologie der Karzinome	41
5.1.5 Postdiagnostische Nachbeobachtung	42
5.1.6 Hormonrezeptorstatus.....	46
5.1.7 Übereinstimmung zwischen den biochemisch und immunhistochemisch ermittelten Steroidrezeptoren	47

5.1.7.1	Östrogenrezeptor	48
5.1.7.2	Progesteronrezeptor	49
5.1.7.3	Östrogen- und Progesteronrezeptor.....	50
5.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle.....	51
5.2.1	Mikrotissue Auswertung.....	51
5.2.2	Zweitauswertung des Östrogen- und Progesteronrezeptors.....	52
5.3	Prognose der Studienpatientinnen in Abhängigkeit von konventionellen Prognosefaktoren	55
5.4	Steroidrezeptor als Prognosefaktor, Cut-off Punkt und alternative Einteilungsmöglichkeiten	60
5.4.1	Das Kollektiv der biochemisch ermittelten Steroidrezeptoren	60
5.4.1.1	Östrogenrezeptor	60
5.4.1.2	Progesteronrezeptor	63
5.4.2	Das Kollektiv der immunhistochemisch ermittelten Steroidrezeptoren	65
5.4.2.1	Östrogenrezeptor als Prognosefaktor bei binärer versus Feinunterteilung.....	65
5.4.2.2	Östrogenrezeptor als prognostischer Faktor bei einer 3-Gruppen-Einteilung.....	69
5.4.2.3	Progesteronrezeptor als Prognosefaktor bei binärer versus Feinunterteilung	71
5.4.2.4	Progesteronrezeptor als prognostischer Faktor bei einer 3-Gruppen-Einteilung.....	75
5.4.2.5	Kombinationsanalyse zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptor.....	77
5.5	Steroidrezeptor als Therapieprädiktor.....	80
5.5.1	Östrogenrezeptor als Therapieprädiktor bei einer binären Einteilung	80
5.5.2	Östrogenrezeptor als prädiktiver Faktor bei einer 3-Gruppen-Einteilung	86
5.5.3	Progesteronrezeptoren als Therapieprädiktor bei einer binären Einteilung	88
5.5.4	Progesteronrezeptor als prädiktiver Faktor bei einer 3-Gruppen-Einteilung.....	92
5.5.5	Kombinationsanalyse zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptor als Prädiktoren einer Tamoxifentherapie.....	94
5.6	Kollinearität des Östrogenrezeptors	97
5.7	Kollinearität des Progesteronrezeptors	98
5.8	Univariate Modelle des Überlebens.....	99
5.9	Multivariate Modelle des Überlebens unter Berücksichtigung aller Prognosefaktoren	101
6	Diskussion.....	104
6.1	Verlässlichkeit des Datenmaterials	104
6.1.1	Charakteristik der Studienpatientinnen und Nachbeobachtungszeit.....	104
6.1.2	Reproduzierbarkeit der immunhistochemischen Bestimmungsmethode	106
6.2	Univariate Analyse des Überlebens in Abhängigkeit von klassischen Prognoseparametern	108
6.3	Vergleich der beiden Verfahren zum Steroidrezeptornachweis.....	113
6.4	Steroidrezeptoren als Prognosefaktoren.....	116
6.4.1	Östrogenrezeptor als Prognosefaktor bei Anwendung der DCC-Methode.....	118
6.4.2	Östrogenrezeptor als Prognosefaktor bei Anwendung der immunhistochemischen Methode.....	120
6.4.3	Progesteronrezeptor als Prognosefaktor, Bestimmung mit der DCC-Methode	123
6.4.4	Progesteronrezeptor als Prognosefaktor, Bestimmung mit der immunhistochemischen Methode.....	125
6.4.5	Prognose bei der Kombinationsanalyse beider Steroidrezeptoren.....	127
6.5	Steroidrezeptoren als Therapieprädiktoren.....	131
6.5.1	Östrogenrezeptor als prädiktiver Faktor	132
6.5.2	Progesteronrezeptor als prädiktiver Faktor.....	135

6.6	Kombinationsanalyse zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptor als Therapieprädiktoren	138
6.7	Kollinearität der Steroidrezeptoren.....	142
6.8	Multivariate Modelle des Überlebens	144
6.9	Klinische Konsequenzen der vorgelegten Ergebnisse.....	146
6.10	Neu aufgeworfene Fragestellungen	147
7	<i>Zusammenfassung.....</i>	<i>149</i>
8	<i>Abbildungen und Tabellen.....</i>	<i>151</i>
8.1	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>151</i>
8.2	<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>152</i>
9	<i>Anhang.....</i>	<i>154</i>
10	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	<i>156</i>
	<i>Danksagung.....</i>	<i>171</i>
	<i>Lebenslauf.....</i>	<i>172</i>

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC-Technik	Avidin-Biotin-Peroxidase Verfahren
AF-1	Aktivierungsfunktion 1
AGO	Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie
AP-1	Activating protein 1
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATAC	Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA	BR east CA ncer
CT	Chemotherapie
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCC	Dextran-Coated-Charcoal
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
DFS	Disease free survival
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFS	Event free survival
EIA	Enzym Immuno Assay
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Estrogen Response Element
ET	Endokrine Therapie
et al.	und andere
EU	Europäische Union
GF	growth factor
HER	Human epidermal growth factor receptor
HER2/neu	Human epidermal growth receptor 2
HR	Hormonrezeptor

HSP	Heat Shock Protein
ICA	Immuno Cytochemical Assay
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
ISO	International Organisation for Standardization
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LJ	Lebensjahr
MRD	Minimal residual disease
NNBC	Node Negative Breast Cancer
OS	Overall survival
OSP	Onkologischer Schwerpunkt
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor
PP	Prozent der positiven Zellen
PR	Progesteronrezeptor
PRE	Progesterone Response Element
RBK	Robert Bosch Krankenhaus
SI	Staining Intensity
Sn	Sentinel Node
SPF	S-Phase-Fraktion
SRC-1	Steroid receptor cactivator
Tab.	Tabelle
TLI	Thymidine Labelling Index
TNM	Tumor/Nodes/Metastasen
UICC	Union internationale contre le cancer
uPA	Plasminogenaktivator von Urokinase-Typ
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Brustkrebs stellt heutzutage die häufigste Krebserkrankung bei Frauen, mit einem Anteil von 3,9% an der Gesamtsterblichkeit, dar. Waren es im Jahre 2003 noch 17.173 Frauen die in der Bundesrepublik Deutschland an Brustkrebs starben¹, so erhöhte sich im Jahr 2005 die vom statistischen Bundesamt erfasste Anzahl der Sterbefälle auf 17.455.² Bei Frauen unter 60 Jahren macht der Brustkrebs 26,8% aller Krebsneuerkrankungsfälle und 40% der Neuerkrankungen aus. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwas über 62 Jahren, was somit knapp 7 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen liegt.³ Der Altersanstieg der Inzidenzraten ist in der Altersgruppe zwischen 30 und 50 Jahren besonders auffallend. Seit 1984 ist die Anzahl der durch Brustkrebs verursachten Todesfälle in Deutschland um 9% gestiegen. Dieser Anstieg ist auch durch den stetig wachsenden Anteil der älteren Bevölkerung zu erklären. Rechnet man diesen Effekt heraus (Altersstandardisierung), so zeigt sich, dass im Jahr 1984 40 von 100.000 Frauen an Brustkrebs starben, 1994 waren es 44, die Zahl sank bis zum Jahre 2003 jedoch auf 37.⁴

In der Europäischen Union erkranken jährlich ca. 275.000 Frauen an Brustkrebs. Im gleichen Zeitraum starben 79.000 der an Brustkrebs erkrankten Frauen in der EU.⁵ Brustkrebs ist für mehr als 4% aller Todesfälle unter der weiblichen europäischen Bevölkerung verantwortlich und macht mehr als 12% der Todesfälle in der Altersgruppe zwischen 45 und 64 Jahren aus.⁶

Die Erkrankungsraten für Deutschland liegen im europäischen Vergleich im Mittelfeld. In Belgien, Frankreich und Dänemark ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit höher, in den baltischen Ländern wie Estland, Lettland und Litauen sowie den südeuropäischen Ländern wie Spanien, Griechenland und Portugal teilweise deutlich niedriger.⁷

Das mittlere Lebenszeitrisiko von Frauen, irgendwann in ihrem Leben an Brustkrebs zu erkranken, beträgt acht bis zehn Prozent. Jedoch bei Frauen die Trägerinnen bestimmter Mutationen sind, kann dieses Risiko bei mehr als 80

Prozent liegen.⁸ In den Jahren 1994 und 1995 wurden die Gene BRCA1 und BRCA2 entdeckt, die in rund 50 Prozent der erblichen Fälle Mutationen aufweisen.⁹⁻¹⁰ Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht nur die genetische Ausstattung, sondern auch Umwelteinflüsse bestimmen, ob eine Frau an Brustkrebs erkrankt. Aus diesem Grund gibt es bei genetisch vorbelasteten Frauen hinsichtlich ihres Risikos große Schwankungsbreiten von etwa 25 bis 80 Prozent. Trägerinnen einer Mutation im BRCA1 oder BRCA2 Gen haben ein stark erhöhtes Risiko für Brustkrebs, wobei Trägerinnen einer BRCA1-Mutation im Durchschnitt früher erkranken und ein höheres Risiko als Trägerinnen einer BRCA2-Mutation (bis 50. LJ 50% vs. 30%, bis 80. LJ 80-90% vs. 80%) aufweisen. Für Trägerinnen einer BRCA1-Mutation liegt das kumulative Risiko für Eierstockkrebs höher (bis 50 LJ 20% vs. 0,4%, bis 80 LJ 30% vs. 60%) und das mittlere Erkrankungsalter niedriger, als für Trägerinnen einer BRCA2-Mutation.¹¹⁻¹²⁻¹³⁻¹⁴

Die Brustkrebsinzidenz nimmt in Europa und den USA weiter zu bei gleichzeitiger Abnahme der Mortalität. Die Brustkrebsmortalität nahm in den USA zwischen 1989 und 1995 im Durchschnitt 1,6% pro Jahr ab. Währenddessen war die Brustkrebsmortalitätsreduktion in der gesamten Europäischen Union niedriger ausgeprägt und lag bei etwa 7% im Zeitraum 1988-1996 (0,86% pro Jahr).¹⁵ Voraussichtlich werden in den nächsten Jahren immer mehr Europäer an Krebs versterben. Der Grund hierfür ist in der zunehmenden Alterung der Bevölkerung zu finden. Denn zwischen den Jahren 2000 und 2015 wird die Zahl der Menschen über dem 80. Lebensjahr um 50 Prozent steigen.

Die Lebenserwartung von Frauen in hochentwickelten Volkswirtschaften liegt bei fast 90 Jahren. Als Folge daraus wird im Jahre 2030 jede vierte Frau über 65 Jahre alt sein, mit der Konsequenz, signifikanter Veränderung der Morbiditäts- und Mortalitätsraten in dieser Altersgruppe. Deshalb muss sich Europa in den kommenden Jahren generell auf eine wachsende Anzahl von Erkrankungs- und Sterbefällen einstellen, darunter auch viele Brustkrebspatienten.

Nach den Zahlen der Eurocare II-Studie aus dem Jahr 1999 lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei Brustkrebsdiagnose in Europa bei 74,3%. Auf der Basis dieser Daten lag Deutschland mit der 5-Jahres-Überlebensrate von 71,7% auf Platz 7 in Europa, nach Österreich, Dänemark, England, Estland, Finnland und Frankreich.¹⁶

1.1 Prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist als häufigstes Malignom der Frau in der westlichen Welt nach wie vor Gegenstand einer intensiven Forschung. Deren Aufgabe ist aber nicht nur die Risikobestimmung an Brustkrebs zu erkranken, sondern vor allem die Identifikation von prognostischen und prädiktiven Faktoren, die erlauben würden, die Therapie so individuell wie möglich zu gestalten, um die Überlebenschancen der Brustkrebserkrankten zu verbessern. Dabei wird vor allem ein Fortschritt in der Prognoseeinschätzung angestrebt. Die Begriffe Prognose und Prädiktion sind unterschiedlich definiert. Prognose bezeichnet die Wahrscheinlichkeit eines Krankheitsrezidives oder des krankheitsbedingten Todes. Prädiktion bezieht sich auf die Vorhersage des Effektes einer (adjuvanten oder palliativen) Therapie für die einzelne Patientin.¹⁷ Beide Begriffe beschreiben die Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses unter der Kenntnis bestimmter, einflussnehmender Faktoren. Sind die Einflussfaktoren unbekannt, so sind die Vorhersagen ungenau. Da jede Patientin Anspruch darauf hat, ihrem Risiko und ihrer vermutlichen Therapieansprache gemäß kuriert zu werden, kann mit Hilfe prognostischer und prädiktiver Faktoren den einzelnen Patientinnen eine optimale, individuell angepasste Behandlung angeboten werden. Bis heute sind weit mehr als 100 Faktoren hinsichtlich ihres potenziell prognostischen Wertes oder ihrer prädiktiven Vorhersagekraft des Therapieansprechens diskutiert worden. Nur für wenige dieser Faktoren besteht eine begründete Datenlage und Nachweis einer klinischen Relevanz. Um klinische Empfehlungen von gesichertem Wissen über solche Faktoren

abzuleiten, muss die Datenlage bewertet und die klinische Bedeutung evaluiert werden. Diese Empfehlungen werden in Leitlinien wie denen des National Cancer Institut, der St. Gallen-Konsensus-Konferenz, der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO-Leitlinien) und der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. („DKG-S3-Leitlinie“) niedergelegt.¹⁸

Für die prognostische Abschätzung des relativen Rezidivrisikos bei nodalnegativem Mammakarzinom werden Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus, Grading und Alter der Patientin herangezogen (Tab. 1).

Tab. 1: Empfehlungen von St. Gallen für die prognostische Einschätzung bei nodalnegativem Mammakarzinom (modifiziert nach St. Gallen, 2003)

Faktor	Minimales Rezidivrisiko	„Average risk“
Tumorgröße	≤ 2 cm	≥ 2 cm
Hormonrezeptorstatus	positiv	negativ
Grading	1	2 oder 3
Alter	≥ 35 Jahre	< 35 Jahre

Auf der im Januar 2005 in St. Gallen stattgefundenen „IX Internationalen Konferenz zur Primärtherapie des frühen Brustkrebs“ wurde diese Risikoeinstufung aus dem Jahre 2003 erweitert. Nach der Risikoklassifikation aus dem Jahr 2005 wird neben dem niedrigen und hohen Risiko auch eine Gruppe mit mittlerem Risiko definiert. Die Tab. 2 zeigt diese Risikoklassifikation. Nach den Leitlinien von St. Gallen 2005 unterscheidet man innerhalb der Gruppe mit nodalnegativem Mammakarzinom (N0) nun zwischen hormonsensiblen (HR+), unklar hormonsensiblen (HR+/-) und nicht hormonsensiblen Tumoren. Unter dieser Berücksichtigung wird auch den Patientinnen mit mittlerem Risiko und unklar hormonsensiblen Tumoren eine

chemoendokrine Therapie empfohlen. In Hinblick auf diese Einteilung kommt der verlässlichen Bestimmung der Hormonrezeptoren eine entscheidende Rolle zu. Eine Empfehlung wurde neben den etablierten und klinisch bestätigten Prognosefaktoren wie Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad, Tumorgöße und Alter der Patientin auch für zwei weitere, neue Faktoren ausgesprochen; die Expression des HER2/neu Rezeptors sowie die Invasion des Tumors in Blut- und Lymphgefäße.

Tab. 2: Die neue Risikoklassifikation nach der Konsensusdiskussion St. Gallen 2005 (modifiziert nach Gyn. Spektrum 01/2005)

Niedriges Risiko
<ul style="list-style-type: none"> ⇒ <i>N0, HR+ und alle der nachfolgenden Kriterien:</i> <i>pT < 2 cm + G1 (Diskussion um G2), >35 Jahre, Her2 neg, L0, V0</i> ⇒ <i>Bei T < 1 cm unabhängig von Grading</i>
Mittleres Risiko
<ul style="list-style-type: none"> ⇒ <i>N0, HR+, Her2 neg, L0, V0, mindestens einer der folgenden Kriterien</i> ⇒ <i>pT ≥ 2cm oder G 2-3 oder < 35 Jahre</i> ⇒ <i>N+ 1-3</i>
Hohes Risiko
<ul style="list-style-type: none"> ⇒ <i>N4+</i> ⇒ <i>Jedes N+ mit extensiver L1 und/oder V1 und /oder Her2 pos bei HR+</i> ⇒ <i>HR-</i>

Bei der St. Gallen-Konsensuskonferenz von 2007 wurde die Risikoeinteilung der Patientinnen im Vergleich zur Konferenz von 2005 ohne Änderungen übernommen. Grundsätzlich wird zwischen niedrigen, intermediären und hohen Risikokategorien unterschieden. Unter Berücksichtigung der Hormonsensitivität des Tumors wird weiterhin zwischen hormonsensiblen, hormonunsensiblen und Tumoren mit fraglicher Hormonsensitivität differenziert.

Neu hinzugekommen ist der Her2-Status als prädiktiver Faktor für eine zusätzliche Therapie mit Trastuzumab. Die Tab. 3 zeigt das therapeutische

Vorgehen beim primären Mammakarzinom orientierend an der Risikoabschätzung und der Hormonempfindlichkeit des Tumors.

Tab. 3: Therapeutisches Vorgehen laut Konsensus von St. Gallen 2007; ET- Endokrine Therapie, CT-Chemotherapie (modifiziert nach St. Gallen 2007, Quelle Frauenarzt 05/2007)

Risikokategorie	Hormonsensibel	Fraglich hormonsensibel	Nicht hormonsensibel
Niedriges Risiko	ET	ET	
Mittleres Risiko	ET CT→ET (CT + ET)	CT→ET (CT + ET)	CT
Her2 +	Trastuzumab	Trastuzumab	Trastuzumab
Hohes Risiko	CT→ET (CT + ET)	CT→ET (CT + ET)	CT
Her2 +	Trastuzumab	Trastuzumab	Trastuzumab

Die anstehenden Therapieentscheidungen (siehe Tab. 3) werden dabei direkt von den Ergebnissen dreier immunhistochemischer Farbreaktionen beeinflusst: des Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- sowie des c-erb B2 Nachweises. Methodische Untersuchungen zur Optimierung der Bewertung der Steroidrezeptoren sind Gegenstand dieser Doktorarbeit.

Die neueren Marker müssen, bevor sie in die tägliche prognostische oder prädiktive Einschätzung mit einbezogen werden, bestimmte Qualitätskriterien erfüllen und ihre klinische Relevanz muss nachgewiesen werden. Neben einer plausiblen biologischen Grundlage für die Anwendung des bestimmten Markers muss seine Nachweismethode robust, standardisiert und qualitätssicher sein. Sein klinischer Einfluss muss durch unabhängige klinische Studien validiert werden und schließlich muss der Marker einen klinischen Nutzen liefern, d. h. er muss in der Lage sein, die klinische Entscheidungsfindung unabhängig von bestehenden Markern zu unterstützen.¹⁹

Neue Prognosefaktoren sollten grundsätzlich gemäß den Kriterien für die Entwicklung neuer Prognosefaktoren²⁰, den Kriterien der evidenzbasierten Medizin (Oxford Levels of Evidence)²¹ und hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz²² validiert und beurteilt werden.

Für folgende Prognose- und Prädiktionsfaktoren existieren zuverlässige Studiendaten:

- die Invasionsfaktoren Plasminogenaktivator von Urokinase-Typ (uPA) und sein Inhibitor „PAI-1“,
- Thymidine Labeling Index als Indikator für die Proliferationsrate (TLI),
- das Zellzyklusprotein Cyclin E,
- Erhöhung der S-Phase-Fraktion (SPF),
- Heat-Shock-Protein BSP27,
- Östrogenreguliertes Protein pS2,
- Protein Ki-67,
- Polymorphismus Cytochrom P450 CYP2D6,
- disseminierte Tumorzellen („Mikrometastase“, MRD) sowie
- das genetische Expressionsprofil („genetic profiling“).

Einige der oben genannten Faktoren haben nur bedingt den Einzug in die klinische Praxis gefunden. Für nodalnegative Patientinnen ist die Bestimmung der Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 mittels ELISA im Primärtumorgewebe für den klinischen Einsatz validiert.²³ Die Ergebnisse einer Therapiestudie²⁴ haben gezeigt, dass im Primärtumor die adjuvante Chemotherapie bei hohen uPA/PAI Konzentrationen das Rückfallrisiko statistisch bedeutend reduziert im Vergleich zu den Patientinnen mit niedrigen uPA/PAI Konzentrationen. In der laufenden prospektiven NNBC 3-Europe-Studie wird diese Methode weiter optimiert. Die Studie verfolgt das Ziel, die Risikoabschätzung mittels traditionellen klinisch-pathologischen und anhand von tumorbiologischen Faktoren zu vergleichen. Niedrigrisikopatientinnen wird eine adjuvante Chemotherapie erspart, bei Hochrisikopatientinnen wird eine adjuvante Kombinationstherapie mit FE₁₀₀C*6 mit einer sequenziellen Therapie FE₁₀₀C*3 → Docetaxel*3 verglichen.²⁵

Obwohl die Proliferationsrate beim Mammakarzinom prognostisch relevant ist und ein signifikant besserer Effekt der adjuvanten Chemotherapie angenommen wird als bei niedriger Proliferation, hindern die methodischen Probleme der Bestimmung der S-Phase-Fraktion, des Proteins Ki-67 sowie des radioaktiv markierten Thymidins die Validierung zum etablierten prognostischen und prädiktiven Faktor.

Das mikrosomale Enzym Cytochrom P450 2D6 ist beteiligt an der Umwandlung des wenig aktiven Moleküls Tamoxifen in seine aktiven Metaboliten. Die DANN-Polymorphismen des CYP 2D6-Gens können zur Reduktion der Aktivität dieses Enzyms führen, wodurch die Wirkung von Tamoxifen vermindert wird. Einige Studien^{26,27} konnten den prädiktiven Charakter des CYP 2D6-Polymorphismus für die Wirkung der Tamoxifentherapie nachweisen.

Disseminierte Tumorzellen werden im Knochenmark oder im peripheren Blut gefunden. Einige Arbeitsgruppen^{28,29} sowie eine Metaanalyse³⁰ zeigten eine statistisch signifikant schlechtere Prognose bei den Patientinnen, bei denen zum Zeitpunkt der Primärtherapie disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden konnten. Der klinische Einsatz wird durch noch fehlende Standardisierung der Nachweismethoden gehindert.

Die klinische Relevanz und die Reproduzierbarkeit der Risikobestimmung mit Genexpressionsprofilen ist Gegenstand intensiver Forschung (MINDACT-Studie; Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy). Ein Einsatz für die klinische Praxis wird momentan noch nicht empfohlen.

Prognostische und prädiktive Faktoren lassen sich an einer Verbesserung der Überlebensaussichten messen. Für die Beobachtung der Überlebenstrends werden vor allem das Gesamtüberleben (engl.: overall survival; OS) sowie das rezidivfreie Überleben (engl.: event free survival; EFS) in Betracht gezogen.

2 Östrogen- und Progesteronrezeptor

Östrogen- und Progesteronrezeptoren werden seit Jahren umfangreich studiert und sind bis heute in der klinischen Praxis als prognostische und prädiktive Faktoren allgemein akzeptiert.^{31,32}

2.1 Biologie des Östrogenrezeptors

Die Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus beim Mammakarzinom ist seit vielen Jahren Bestandteil der pathologischen Routinediagnostik. Neben einer Einschätzung der Sensibilität des Tumors gegenüber einer antiöstrogenen Therapie lassen sich in begrenztem Rahmen durch Bestimmung des Östrogenrezeptors auch Aussagen über die Prognose der Tumorerkrankung machen.

Jensen und Jacobson³³ waren die ersten, die Östrogenrezeptoren beschrieben und den Vorschlag machten, den Östrogenrezeptor zu bestimmen um die Patientinnen zu identifizieren, die von einer endokrinen Therapie einen Nutzen haben könnten.³⁴ Anfang der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts zeigten Jensen und Jacobson, dass die biologischen Effekte von Östrogen über ein Rezeptorprotein vermittelt werden.³⁵ Im Jahr 1986 wurde das Gen für den Östrogenrezeptor kloniert. Während des Homogenisierungsschrittes, der damals benutzen Dextran-Coated-Charcoal-Methode (DCC) für den Rezeptornachweis, kam es zur Dissoziation des freien Östrogenrezeptors von dem Zellkern mit gleichzeitigem Nachweis des besetzten Rezeptors im Kern, was zur Theorie über das Vorhandensein des Östrogenrezeptors vor allem im Zytoplasma führte.

Mit Anwendung der monoklonalen Antikörper haben King und Greene³⁶ im Jahr 1984 den Östrogenrezeptor im Zellkern lokalisiert. Die Zellkernrezeptoren haben eine gemeinsame Grundstruktur, die aus drei unabhängigen aber interagierenden Domänen besteht; die A/B-Domäne enthält die AF-1 (Aktivierungsfunktion-1) mit welcher die Transkriptionsfaktoren interagieren, die C-Domäne (DNA-Bindungsdomäne; DBD) die zwei Zinkfinger-Motive zur

DNA-Bindung enthält und die E/F Domäne die Ligandenbindungsstelle (LBD) sowie Aktivierungsfunktion-2 enthält.³⁷

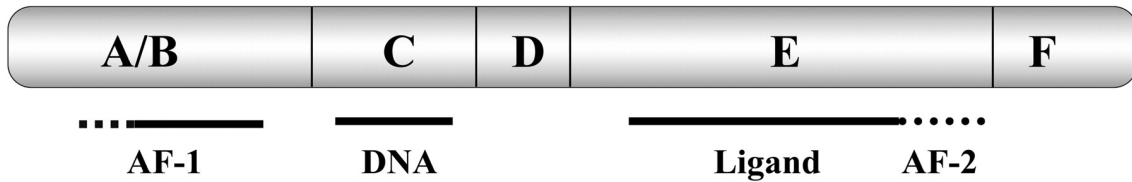


Abb. 1: Aufbau der Steroidhormone (nach Nilsson et al., *Physiological Reviews* 2001)³⁸

Zwischen C- und E/F-Domäne befindet sich die sog. hinge-Domäne (D). Diese ist sehr variabel und unterstützt somit die Flexibilität zwischen DBD und LBD. In Abwesenheit von Liganden, befindet sich der Östrogenrezeptor prädominant im Zytosol³⁶⁻³⁹, als Teil eines stabilen Komplexes mit dem Hitzeschockprotein HSP90⁴⁰⁻⁴¹. Es wird angenommen, dass die Ligandenbindung zu einer Dissoziation dieses Komplexes führt, mit anschließender Translokation des Östrogenrezeptors in den Zellkern, Dimerisierung des Rezeptors und Bindung an spezifische DNA Nukleotidsequenzen, die „estrogen response elements“ (ERE's), welche innerhalb der Promotorregion der Zielgene liegen.⁴² Gebunden an die ERE's beeinflusst der Östrogenrezeptor die Transkriptionsrate durch direkte oder indirekte Interaktion mit allgemeinen Transkriptionsfaktoren.⁴³⁻⁴⁴

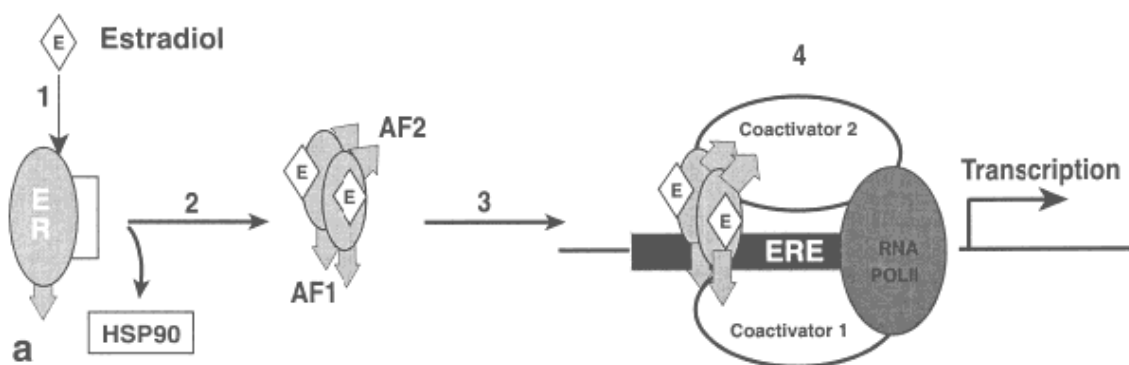


Abb. 2: Wirkmechanismus von Östradiol im klassischen Weg: 1 – Östradiol (E) bindet an ER und HSP90 dissoziiert; 2 – Rezeptor-Dimerisierung, AF1 und AF2 aktiv; 3 – Translokation in den Kern und Bindung an ERE; 4 – Anlagerung von Koaktivatoren und Transkription von Zielgenen (modifiziert nach Howell et al., *Cancer* 2000)⁴⁵

Neben diesem klassischen Modell werden Aktivierungen des Östrogenrezeptors, vermittelt durch andere Signalwege in der Literatur der letzten Jahre, heftig diskutiert. Das Meinungsbild erscheint hier nicht einheitlich. Der menschliche Östrogenrezeptor liegt in zwei Formen vor, als ER α und ER β , die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Das entsprechende Gen befindet sich auf dem Chromosom 6q25 für den ER α , bzw. auf dem 14q22-24 für den ER β . Der Östrogenrezeptor- α galt bis zum Jahr 1996 als einzige Form des Östrogenrezeptors, bis zur Isolierung des ER β durch Kuiper⁴⁶. Die beiden Rezeptoren sind in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers vertreten. ER α ist in signifikanten Mengen in der Brust, Arterien, Gebärmutter und in den Knochen zu finden. ER β dagegen ist in der Brust, Lunge, Gehirn, Ovarien und der Harnblase vertreten. Die Prozentzahl der ER β positiven Zellen ist im normalen, gesunden Brustgewebe und in nicht proliferativen benignen Brusterkrankungen hoch. In frühen Phasen der Brustkrebskarzinogenese wird das ER β Niveau beträchtlich niedrig, was zur Schlussfolgerung führt, dass der ER β gegen eine mitogene Östrogen-Aktivität in prämaligen Läsionen eine protektive Rolle spielen könnte. Der ER β hat nicht nur eine Schutzfunktion in der Mitogenese, sondern er scheint auch die Zellmotilität und Zellinvasion zu inhibieren.⁴⁷ Bezüglich ihrer DNA- und Liganden-Bindungsdomäne zeigen die Rezeptoren eine starke Homologie.⁴⁸ Die beiden Rezeptorformen signalisieren jedoch in unterschiedlicher Weise. Der ER α transaktiviert z.B. bei Komplexierung mit Östradiol den nuklearen Transkriptionsfaktor AP-1, während der ER β nicht dazu in der Lage ist. Daraus konnte geschlossen werden, dass ER α und ER β unterschiedliche Rollen bei der Genregulierung spielen und die relativen Gewebespiegel zelluläre Antworten auf Östrogene beeinflussen.⁴⁹ Eine Studie aus dem Jahr 2000⁵⁰ zeigte, dass der ER β eine entscheidende Rolle in der Sekretion von Wachstumsfaktoren als Antwort auf die Östradiolstimulation haben könnte, was bisher nur dem ER α zugeschrieben wurde. Nach der Entdeckung des ER β herrschte die Meinung, dass durch Bestimmung beider Rezeptoren, des ER α und des ER β , eine bessere diagnostische Präzision erzielt werden könne. Durch das sehr gute

Übereinstimmen zwischen den Messwerten der simultanen Rezeptorbestimmung mit der DCC-Methode (welche die Summe der beiden Rezeptorfractionen misst) und der EIA-Methode (mit Hilfe welcher nur die ER α -Fraktion gemessen wurde) beim invasiven Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der invasiven Brustkrebsarten ER α positiv ist und der Level von ER β im primären Brustkrebs eher niedrig ist.^{51,52}

In der klinischen Diagnostik des Mammakarzinoms wird derzeit nur die ER α -Fraktion des Östrogenrezeptors bestimmt. Die Anwesenheit von ER α korreliert mit einer insgesamt verbesserten Überlebensrate und einer besseren Ansprache auf die endokrine Therapie.⁵³ Der Östrogenrezeptorstatus lässt sich sowohl immunhistochemisch als auch biochemisch (EIA, Charcoal Dextran Methode) bestimmen. Auf dieses Thema wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

2.2 Biologie des Progesteronrezeptors

Sowohl der Progesteronrezeptor, als auch der Östrogenrezeptor sind Steroidrezeptoren und gehören zusammen mit ca. 150 anderen Hormonen der Familie der Kernrezeptoren an. Während der proliferative Effekt vom Östrogen auf das Brustgewebe sowie auf die Tumorgenese vielfach untersucht wurde, ist der Einfluss des Progesterons auf diese Prozesse weniger bekannt. Der Progesteronrezeptor vermittelt die physiologischen Effekte von Progesteron und ist im Zielgewebe in zwei Isoformen unterschiedlicher Funktionalität vertreten. Eine einzige Kopie des Progesteronrezeptorgens, lokalisiert auf dem Chromosom 11q22-23, produziert zwei unterschiedliche Protein-Isoformen.

Wie die meisten Steroidrezeptoren kann der Progesteronrezeptor in verschiedene funktionelle Domänen zergliedert werden. Beide Rezeptoren bestehen aus DNA-Bindungsdomäne (DBD), der Liganden-Bindungsdomäne (LBD) und zwei transkriptionellen Aktivierungsfunktionen; AF-1 die sich auf dem N-terminalen Ende befindet und die ligandenabhängige AF-2 auf dem C-terminalen Ende. Der transkriptionell potentere PR-B trägt an seinem N-terminalen Ende noch eine zusätzliche Aktivierungsfunktion (AF-3).⁵⁴ PR-A und

PR-B unterscheiden sich nur in 165 Aminosäuren, die der PR-B auf seinem N-terminalen Ende trägt.⁵⁵ Beide Rezeptorproteine sind phosphoryliert und hormonbindend.^{56,57} Während der Progesteronrezeptor-A die östrogen- und progesteroninduzierte Proliferation hemmt, wird diese durch den Progesteronrezeptor-B unterstützt.

Die in vitro Untersuchungen zeigen, dass der PR-B ein stärkerer Transaktivator und Regulator der Gen-Transkription ist.⁵⁸ Die in vivo Unterschiede hingegen sind noch eindeutiger; PR-A und PR-B regulieren unterschiedliche und nicht überlappende Gen-Domänen.⁵⁹ Im Gegensatz zum PR-A kann der PR-B allein über die Interaktion mit dem Östrogenrezeptor die Zellproliferation initiieren.⁶⁰ Die unterschiedliche Expression dieser zwei Progesteronrezeptor-Isoformen im humanen Mammakarzinom birgt ein unterschiedliches, Ratio-abhängiges klinisches Outcome.⁶¹ Die biologischen Effekte des Progesteronrezeptors werden über unterschiedliche Wirkmechanismen verübt. Das klassische Modell mit Aktivierung des Rezeptors nach der Ligandenbindung führt zu einer Homodimerisierung, Translokation in den Zellkern, Bindung an „progesterone response elements“ (PRE's) in der Promotorregion, Anlagerung von Koaktivatoren wie z.B. „steroid receptor coactivator 1“ (SRC-1) und anschließender Translation der Zielgene.⁶²⁻⁶³ Der durch die Ligandenbindung aktivierte Progesteronrezeptor kann auch die Translation der Gene regulieren deren Promotoren keine PRE's beinhalten, indem er wie eine Brücke zwischen Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren fungiert.⁶⁴⁻⁶⁵⁻⁶⁶ Neben diesem direkten, genomischen Effekt kann der Progesteronrezeptor die Expression der Gene indirekt, über die Modifikation der zytoplasmatischen Kinasekaskade regulieren.⁶⁷⁻⁶⁸

Neue epidemiologische Studien zeigen ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken bei postmenopausalen Frauen, welche die Hormonpräparate in der Kombination von Östrogen und Progesteron benutzt haben im Vergleich zu denen, die nur Östrogene eingenommen haben.⁶⁹⁻⁷⁰⁻⁷¹ Dies impliziert eine wichtige Rolle die das Progesteron in der Tumorgenese und in der Krankheitsentwicklung spielt.

2.3 Östrogen- und Progesteronrezeptoren als prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom

Um Therapieentscheidungen individuell treffen und das Überleben präziser vorhersagen zu können, bedarf es prädiktiver und prognostischer Faktoren. Das Mammakarzinom ist in seinem Wachstum einer hormonellen Kontrolle unterworfen.

Die Östrogene und Gestagene aktivieren über ihre Rezeptoren die Transkription, wobei verschiedene co-repressive und co-aktivierende Faktoren diesen Mechanismus regulieren und somit die Hormonwirkung beeinflussen.

In den letzten Jahren hat sich unser Verständnis der molekularen Mechanismen, die an der Entstehung und Progression von Brustkrebs beteiligt sind, deutlich verbessert.⁷² Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus werden seit 1974 in den klinischen Untersuchungen des humanen Mammakarzinoms angewendet, zunächst als Indikator eines endokrinen Ansprechens⁷³⁻⁷⁴, später auch als prognostischer Faktor des frühen Krankheitsrezidives⁷⁵.

Die Bestimmung sowohl des Östrogen- als auch des Progesteronrezeptorstatus ermöglicht eine Aussage darüber, ob bei Patientinnen mit Mammakarzinom eine endokrine Therapie indiziert ist. Zahlreiche Studien belegen die Korrelation zwischen der Rezeptorpositivität und dem Ansprechen auf eine Hormontherapie.⁷⁶⁻⁷⁷ Bei Frauen mit dem östrogenrezeptorpositiven, metastasierten Brustkrebs liegt die Ansprechrate auf eine endokrine Therapie mit Tamoxifen bei 50%, im Gegensatz dazu liegt die Ansprechrate bei östrogenrezeptornegativen Patientinnen nur bei 5%.⁷⁸ Die Ansprache auf eine Hormontherapie lässt sich um ca. 15 - 25% genauer vorhersagen, wenn sowohl der Östrogen- als auch der Progesteronrezeptor bestimmt werden; bei doppelter Positivität liegt die Wahrscheinlichkeit des Therapieansprechens zwischen 70 und 80 %.

Der ER-Status im Tumorgewebe ist nur in begrenztem Rahmen ein prädiktiver Faktor in der Erkrankungskontrolle. Da ein substantieller Teil der östrogenrezeptorpositiven Patientinnen kein Ansprechen auf eine

Hormontherapie zeigen, wurde nach zusätzlichen Faktoren gesucht, welche die Prädiktivität einer Hormontherapie erhöhen würden.

Schon seit Mitte der 70er Jahre wird postuliert, dass die PR-Positivität ein funktionell intaktes Östrogenrezeptor und Aktivierungssystem anzeigt, da der Progesteronrezeptor als Produkt des aktivierten Östrogenrezeptors gebildet wird.⁷⁹ In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Literatur, sind wir nicht immer auf einheitliche Ergebnisse der prädiktiven und prognostischen Rolle der Steroidrezeptoren gestoßen. Auf diese Problematik wird im Verlauf der Doktorarbeit noch intensiv eingegangen.

3 Fragestellung der vorliegenden medizinischen Dissertation

Die hier vorliegende Doktorarbeit versucht unter Berücksichtigung des heute bekannten, medizinischen und biologischen Kenntnisstandes sowie deren Zusammenhänge, auf die folgenden Fragestellungen eine Antwort zu finden:

- × Sind die Daten des ER- und PR-Status, die am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart erhoben wurden, mit den internationalen Datensätzen vergleichbar?
- × Haben Östrogen- und Progesteronrezeptor prognostische und/oder prädiktive Bedeutung beim Mammakarzinom?
- × Da in der Literatur postuliert wird, dass ein hoher Rezeptorstatus eine höhere Therapieansprechwahrscheinlichkeit und somit eine bessere Prädiktion nach sich zieht, wollten wir prüfen wie gut diese Hypothese belegbar ist.
- × Ist die Charcoal Dextran Methode, oder die heute übliche immunhistochemische Bestimmung besser geeignet um die Prognose des Mammakarzinoms vorherzusagen?
- × Wie korrelieren die beiden Methoden der ER- bzw. PR-Bestimmung miteinander?
- × Ist eine feine Abstimmung der ER/PR Bestimmung (sogenannter Remmele Score) besser geeignet eine Prognose und Prädiktion vorherzusagen als eine grobe Einteilung in rezeptorpositiv oder rezeptornegativ?
- × Welches ist der optimale Cut-off Punkt für eine solche Einteilung?

4 Material und Methodik

4.1 Verwendete Datenbank

Die hier verwendete Datenbank der primären Mammakarzinome stellt eine insgesamt über zehn Jahre fortführende Patientensammlung dar, welche naturgemäß verschiedene EDV Grundlagen aufwies. Neben Excel IV kam dabei das EDV-System des Onkologischen Schwerpunkts (OSP/Kratzdur) zur Anwendung.

Für die statistische Auswertung wurde zunächst SPSS 12.1 eingesetzt und später S+ (Version 6.1).

Die Datenbank dieser Arbeit wurde als Grkinic 17. Doktorarbeit Version 7 archiviert und ist am Pathologischen Institut des Robert Bosch Krankenhauses und dem Institut für klinische Pharmakologie hinterlegt.

4.2 Patientengut

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an einer Datenbank des Robert-Bosch-Krankenhaus durchgeführt, die als Grundlage zahlreicher medizinischer Doktorarbeiten fungierte (Roller, 1989; Lauinger, 1993; Voudouri, 1993; Göhring-Zwacka, 1995; Seizer-Schmidt 1997; Kierschke, 1999; Wachholz, 2000; Weißert, 2000; Wiedmann-Maier, 2004). Im Februar 2006 waren insgesamt 2406 Patientinnen erfasst. Als Auswahlkriterium für die vorliegende Doktorarbeit diente die Verfügbarkeit von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, die mit biochemischen Verfahren bestimmt wurden (N=343). Zum Vergleich wurde dann eine etwas größere Anzahl von Fällen analysiert, in denen eine immunhistochemische Bestimmung der Steroidrezeptoren erfolgte (N=783). In einer kleinen Schnittmenge lagen Doppelbestimmungen vor (N=13).

Eine weitere Untermenge die untersucht wurde sind Patientinnen, die mit Tamoxifen behandelt wurden. Hierbei wurde die Tamoxifengabe unabhängig

von der Therapiesituation, adjuvant oder palliativ, analysiert. Insgesamt wurden die Daten von 1139 Patientinnen mit Mammakarzinom erfasst. Die genauen Zahlen sind in einem Venn-Diagramm dargestellt.

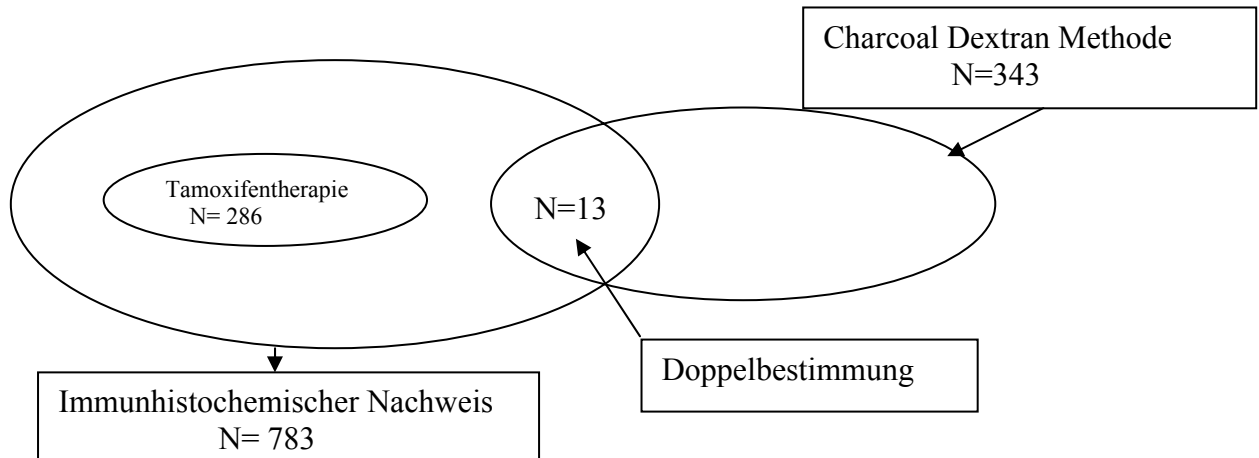


Abb. 3: Der Aufbau des Studienkollektivs (N=1139)

Der Erfassungszeitraum für den Studienteil mit biochemischen Rezeptornachweis lag zwischen 1986 und 1992, für den immunhistochemischen Rezeptornachweis zwischen 1990 und dem Jahr 2001. Alle Daten sind im Rahmen des Brustzentrums am RBK niedergelegt, wobei die hier vorgelegte Untersuchung Teil der Qualitätssicherung des Brustzentrums am RBK (Leiter: Prof. Dr. W. Simon) ist. Seit 1986 stimmen die Patientinnen einer Erfassung ihrer Daten zu. Des Weiteren ist die Datenerfassung standardisierte Pflicht der jeweiligen Brustzentren. Die hier erfassten Daten sind dem Onkologischen Schwerpunkt Stuttgart (OSP) gemeldet, wodurch ein regelmäßiger Abgleich mit den jeweiligen Einwohnermeldeämtern erfolgt. Das letzte Follow-up für die hier vorliegenden Daten erfolgte im September 2004 bzw. August 2005. Alle Daten wurden in anonymisierter Form analysiert. Eine Rückverfolgung der Daten zu einer Patientin ist nicht mehr möglich.

4.3 Aufarbeitung des Datenmaterials

Die Datenbank, welche für die vorliegende Arbeit benutzt wurde, ist im Rahmen des Brustzentrums am RBK niedergelegt. Die erhobenen Daten wurden anonymisiert und sind lediglich für den behandelnden Arzt und die Dokumentationsassistenten einsichtig. Für jede Patientin wurden sowohl für diese Arbeit obligate als auch fakultative patienten-, tumor- und therapiebezogene Parameter erhoben. Unter anderem wurden die folgenden Parameter dokumentiert:

- Persönliche Daten
- Angaben zu dem behandelnden Hausarzt/Frauenarzt
- Klinische Daten:

Anzahl der Kinder und Schwangerschaften; Alter beim ersten Kind; Stillzeit; Menarche; Menopause; hormonelle Antikonzeptiva; familiäre Karzinombelastung; Alter bei der Diagnose des Mammakarzinoms; Gewicht und Körpergröße; Zweitkarzinome.

- Pathomorphologische Daten:

Tumorlokalisierung; histologischer Typ (invasiv ductal, invasiv lobulär, inflammatorisch, sonstiges); Tumorgröße; Gesamtzahl der entfernten und Anteil der befallenen Lymphknoten; TNM-Klassifikation; Grading; Östrogen- und Progesteronrezeptor (biochemisch - Charcoal Dextran Methode und/oder immunhistochemisch - Remmele Score).

- Adjuvante Therapie:

Operative Therapie (Mastektomie, BET, Axilladisektion, sonstiges); Chemotherapie (Substanz, Dosis/Zahl der Zyklen, Therapiebeginn, Therapieende); Hormontherapie (Substanz, Dosis, Therapiebeginn, Therapieende).

- Palliative Therapie:

Chemotherapie (Substanz, Dosis/Zahl der Zyklen, Therapiebeginn, Therapieende, komplette/partielle Remission, keine Veränderung, Progression, Response unbekannt); Hormontherapie (Substanz, Dosis, Therapiebeginn, Therapieende, komplette/partielle Remission, keine Veränderung, Progression, Response unbekannt); Strahlentherapie.

- Krankheitsentwicklung:

Rezidiv (ja/nein/nicht bekannt); loko-regionales Rezidiv (ja/nein/nicht bekannt, Datum); Fernmetastasen (ja/nein/nicht bekannt, Lokalisation: Lunge/Leber/Knochen/ZNS/sonstige, Datum); Tod (ja/nein/nicht bekannt); Todesursache (Tumorleiden/sonstige Erkrankung/nicht bekannt).

4.4 Histopathologische Diagnosen

Anhand der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen der operativ entfernten Gewebeproben wurden, nach den Vorschriften der TNM-Klassifikation der UICC (International Union against Cancer, 1987) und in Anlehnung an die WHO-Klassifikation⁸⁰, die pathomorphologischen Diagnosen festgelegt. Die Einteilung der Tumorgröße, gemäß der TNM-Klassifikation, erfolgte in 4 Kategorien: T1 (< 2 cm), T2 (zwischen 2 und 5 cm), T3 (> 5cm) und T4 (Tumoren jeder Größe mit einer direkten Ausdehnung auf Brustwand oder Haut).

Nach brusterhaltender Therapie bzw. Mastektomie wurden entfernte Lymphknoten als regionär eingestuft, wenn sie folgende anatomischen Voraussetzungen erfüllten:

- Axilläre, ipsilaterale Lymphknoten: interpektorale Lymphknoten, Lymphknoten entlang der V. axillaris und ihrer Äste mit Unterteilung in Level I (untere Axilla, lateral des M. pectoralis minor), Level II (mittlere Axilla, mit der Lage zwischen dem medialen und laterale Rand des M. pectoralis minor), sowie der subclaviculären, infraclaviculären oder apical bezeichneten Lymphknoten.
- Intramammäre Lymphknoten wurden als axilläre Lymphknoten klassifiziert.
- Lymphknoten die an der ipsilateralen A. mammaria interna lokalisiert waren wurden ebenfalls als regionäre Lymphknoten eingestuft.

Jede andere Lymphknotenmetastasierung wurde in Anlehnung an die Einteilung als Fernmetastasierung angesehen. Der Metastasenstatus wurde als M0 oder M1 verschlüsselt. Auch hier erfolgte die Einteilung nach der TNM-Klassifikation⁸¹. Die inzwischen etablierte Einteilung nach Singletary⁸² wurde für

diese Arbeit nicht berücksichtigt, da unser Erfassungszeitraum lediglich bis zum Jahr 2001 reichte. Die Überarbeitung von Singletary basiert auf Fortschritten der Diagnostik und Veränderungen im klinischen Standard gemäß den Ergebnissen der großen Studien der letzten Jahre.⁸³ Wie aus der Tab. 4 hervorgeht sind die wichtigen Neuerungen:

- weitere T1-Stadium Aufteilung,
- die Untergliederung des Lymphknotenbefalls im pN0-Stadium. Hier werden nun immunhistologisch und molekularbiologisch nachgewiesene Veränderungen erfasst. Zur Kennzeichnung wurden die Suffixe **sn** (Sentinel-LK-Technik), **i** (immunhistochemisch) und **mol** (RT-PCR) eingeführt,
- die N-Klassifikation wurde entsprechend revidiert,
- weiterhin wird der Befall supraclavikulärer Lymphknoten nicht mehr als Fernmetastasierung, sondern als pN3c eingestuft.

Tab. 4: Postoperative histopathologische Klassifikation (pTNM) nach Singletary SE (2002)

T- Primärtumor	
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pTis	Carcinoma in situ
pTis (DCIS)	intraduktales Karzinom
pTis (LCIS)	lobuläres Carcinoma in situ
pTis (Paget)	M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor; ist der M. Paget kombiniert mit einem nachweisbaren Tumor, wird entsprechend der Größe des Tumors klassifiziert
pT1	Tumor \leq 2 cm in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion \geq 0,1 cm in größter Ausdehnung ¹⁾
pT1a	Tumor \geq 0,1 cm bis \leq 0,5 cm
pT1b	Tumor $>$ 0,5 cm bis \leq 1 cm
pT1c	Tumor $>$ 1 cm bis \leq 2 cm
pT2	Tumor $>$ 2 cm bis \leq 5 cm
pT3	Tumor $>$ 5 cm
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, soweit unter T4a bis T4d beschrieben
pT4a	mit Ausdehnung auf Brustwand, nicht aber den M. pectoralis
pT4b	mit Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut) oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
N - Regionäre Lymphknoten	
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen, keine zusätzliche Untersuchung nach isolierten Tumorzellen ²⁾
pNX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder bereits früher entfernt)
pN0(i+)	histologisch keine regionären Lymphknotenmetastasen, IHC ³⁾ positiv
pN0(mol-)	histologisch keine regionären Lymphknotenmetastasen, molekulargenetische Untersuchungen (RT-PCR ⁴⁾) negativ
pN0(mol+)	histologisch keine regionären Lymphknotenmetastasen, molekulargenetische Untersuchungen (RT-PCR) positiv
pN1a	Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten
pN1b	mikroskopischer Befall der durch Sentinel-Lymphknotenbiopsie entdeckten Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, wobei die Lymphknoten nicht klinisch nachweisbar sind
pN1c	Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten und mikroskopischer Befall der durch Sentinel-Lymphknotenbiopsie entdeckten klinisch inapparenten Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pN2	Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten oder Metastasen in klinisch apparenten Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne gleichzeitiges Vorhandensein klinisch nachweisbarer axillärer Lymphknoten
pN2a	Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten (mindestens eine größer als 2,0 mm)
pN2b	Metastasen in klinisch nachweisbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne gleichzeitiges Vorhandensein klinisch nachweisbarer axillärer Lymphknoten
pN3	Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten oder in infraklavikulären Lymphknoten oder in klinisch nachweisbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei gleichzeitig mindestens einem befallenen axillären Lymphknoten 1 oder bei mehr als 3 befallenen axillären Lymphknoten und klinisch inapparenten Lymphknoten entlang der A. mammaria interna 1 oder bei Metastasen in supraklavikulären Lymphknoten
pN3a	Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten oder Metastasen in infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in klinisch apparenten ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei gleichzeitig mindestens einem befallenen axillären Lymphknoten oder bei mehr als 3 befallenen axillären Lymphknoten und mikroskopischem Befall der durch Sentinel-Lymphknotenbiopsie entdeckten klinisch inapparenten A.-mammaria-interna-Lymphknoten
pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
¹⁾ Unter Mikroinvasion wird ein Eindringen von Karzinomzellen über die Basalmembran hinaus verstanden. Kein Invasionsherd darf $>$ 0,1 cm in größter Ausmessung messen.	
²⁾ Als isolierte Tumorzellen werden einzelne Tumorzellen oder Zellhaufen, die nicht größer als 0,2 mm sind, bezeichnet, unabhängig von der Detektionsmethode.	
³⁾ IHC = Immunhistochemie	
⁴⁾ RT-PCR = reverse transcriptase polymerase chain reaction	

Nach Bestimmung der Tumorgröße, des Lymphknoten- und Metastasenstatus erfolgte, entsprechend der TNM-Klassifikation, die 4-Stufen-Stadiengruppierung:

- Stadium I (T1 N0 M0),
- Stadium II A-B (T1 N1 M0, T2 N0 M0, T2 N1 M0, T3 N0 M0),
- Stadium III A-B (T1/T2 N2 M0, T3 N1/N2 M0, T4 N1/N2/N3 M0, T1/T2/T3/T4 N3 M0) und
- Stadium IV (T1/T2/T3/T4 N0/N1/N2/N3 M1).

Zur Beurteilung des Malignitätsgrades des Mammakarzinoms wurde neben dem histologischen Typ auch der histopathologische Differenzierungsgrad festgelegt. Die Differenzierungseinstufung (Grading) eines Tumors geschah in einer 3 Stufen Scalierung:

- G1 (gut differenziert),
- G2 (mäßig differenziert) sowie
- G3 (schlecht differenziert).

Die Unterteilung erfolgte unter Berücksichtigung der von Bloom und Richardson⁸⁴ vorgeschlagenen Kriterien nach der Ausprägung der Entwicklung tubulärer Strukturen, der Kernpolymorphie und der Mitoserate. In einigen Fällen erfolgte die Differenzierung entsprechend dem Summscore nach Elston und Ellis⁸⁵. Beide Scores sind weitgehend deckungsgleich.

4.5 Bestimmungsmethoden des Östrogen- und Progesteronrezeptors

Vor über 30 Jahren wurde der Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Gewebeproben menschlicher Mammakarzinome als Indikator für eine eventuell noch vorhandene Hormonabhängigkeit individueller Tumoren herangezogen.⁸⁶

Initial erfolgte die Rezeptorbestimmung biochemisch über Liganden-Bindungsassay. Inzwischen wurde die biochemische Methode durch die immunhistochemische Bestimmungsmethode weitgehend verdrängt. Dies gilt sowohl für den Östrogenrezeptor als auch für den Progesteronrezeptor. In allen Konsensusempfehlungen und Leitlinien gehört die immunhistochemische ER- und PR-Bestimmung obligatorisch in die Primärdiagnostik und, sofern Gewebe verfügbar ist, auch in die Rezidivdiagnostik.

Seit mehreren Jahren wurden am Institut für Pathologie des RBK zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Hormonrezeptoren an Mammakarzinomgewebe angewendet. Einerseits der immunhistologische Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren an Gefrier- oder Paraffinschnitten, andererseits die biochemische, quantitative Analyse der Rezeptoren an Homogenaten von Frischgewebe mit der Dextran-Coated Charcoal (DCC) Methode.

Die ersten verfügbaren monoklonalen Antikörper gegen die Hormonrezeptoren (ER-ICA und PR-ICA) ließen sich nur auf Frischgewebe einsetzen, doch zunehmend kamen auch Antikörper auf den Markt, die auf den Schnitten von Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe angewendet werden konnten. Die Eigenschaften sowie Vor- und Nachteile der jeweiligen Methoden werden in den folgenden Kapiteln kurz beschrieben.

4.5.1 Immunhistochemische Bestimmungsmethode

Mit der immunhistochemischen Methode erfolgt der direkte Nachweis des nuklearen Rezeptorproteins mittels monoklonalen Antikörpern. Diese Methode erfasst die in der Gewebeeinheit enthaltenen Rezeptorproteine unabhängig von der Menge des zur Verfügung stehenden Untersuchungsgutes.

Es kamen über die Jahre verschiedene immunhistochemische Verfahren zur Anwendung. Zwei von diesen werden nachfolgend beschrieben:

- a) ABC-Technik
- b) EnVision Verfahren .

4.5.1.1 ABC-Technik

Die ABC-Technik (Avidin-Biotin-Peroxidase Verfahren nach Hsu et al. 1980) ist eine 3-Schritt immunhistochemische Färbereaktion. Diese Methode ist an Paraffinschnitten, Kryoproben und Zytologie-Ausstrich-Präparaten anwendbar. Der Primärantikörper wird nach einer eigenen ISO 9000 Vorschrift entsprechend austitriert und dem biotinylierten Sekundärantikörper zugeführt. Nach dem Prinzip der Sandwichtechnik entsteht der ABC Komplex, der mit Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid detektiert wird. Zum Schluss erfolgt eine Hemalaun Gegenfärbung. Die Auswertung hat im Regelfall unter Berücksichtigung sowohl einer Positiv- (z.B. Cytokeratinnachweis) als auch den Negativkontrollen, d.h. Auslasskontrollen der einzelnen Schritte, zu erfolgen. Dem Datenblatt des Primärkörpers ist das Kontrollgewebe anzupassen. Die Auswertung erfolgt unter dem Lichtmikroskop in Anlehnung an Remmele Score mit Angabe eines semiquantitativen IRS-Wertes, welcher im Kapitel 4.6 ausführlich beschrieben wird. Für den immunzytochemischen Nachweis der Östrogenrezeptoren wird der monoklonale, Maus-anti humane Östrogen α Klon 1D5 angewendet und für den Nachweis der vorhandenen Progesteronrezeptoren der monoklonale Maus-anti humane Progesteronrezeptor Klon PgR 636.

4.5.1.2 EnVisio-Detektionssystem

EnVision ist ein 2-Schritt-Detektionssystem mit einer höheren Sensitivität im Vergleich zu den 3-Schritt-Färbemethoden. Der Nachweis von Antigenen in dem Gewebe sowie zytologischen Präparaten gelingt mittels einer Immunperoxidase Technik. Durch das gleichzeitige Vorhandensein von Sekundärantikörpern und eines Enzymmoleküls an einer gebrauchsfertigen Polymerkette (auf Dextranbasis) reduziert sich der Zeitaufwand, da ein Inkubationsschritt entfällt. Die Methode ist mit Primärantikörpern der Spezies Maus/Ratte und Kaninchen anwendbar. Als Enzym wird die Peroxidase oder die alkalische Phosphatase verwendet. Die Konjugate funktionieren auch ohne Avidin-Biotin-Brücke, wodurch endogenes Biotin als Möglichkeit einer falsch positiven Reaktion ausscheidet. Der Einsatzbereich dieser Methode ist an Paraffinschnitten und zytologischen Aufarbeitungen. Das Zielantigen in diesem Gewebe wird mit dem Primärantikörper markiert und mit Hilfe der Sekundärantikörper dargestellt. Die Grundlagen dieses Messprinzips sind wie folgt:

- 1) Entdeckglasung
(Xylol-absteigende Alkoholreihe-HCl Alkohol)
- 2) Entparaffinisierung
(in Neoclear sowie in 96% und 70% Ethanol und 100% Isopropanol)
- 3) Vorbehandlung
(Dako Target Retrieval Solution mit Aqua dest. 1:10 verdünnen und 20 Min. vorwärmen)
- 4) Antigendemaskierung
(Hitzedemaskierung, Proteolysevorbehandlung oder Hitzedemaskierung und Proteolyse)
- 5) Einsatz des Primärantikörpers
- 6) Envision Dextran Polymer Peroxidase Technik
- 7) Entwicklung des Farbsignals mit DAB/H₂O₂.

In Abhängigkeit des Materialtyps, welcher zu untersuchen ist, wird die Bestimmungsmethode modifiziert. Die Durchführung der Immunhistochemie erfolgt mit dem Dako Autostainer, einem automatischen Gerät zur Anfertigung von immunhistochemischen Schnitten. Alle Inkubationsschritte werden protokolliert. Nach dem Färbeabschluss erfolgt die Gegenfärbung am Leica Jung Autostainer, gefolgt vom Eindecken der Präparate im Neoclear. Sämtliche Färbeprotokolle werden auf Plausibilität geprüft.

4.5.2 Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors mit der DCC-Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde für den biochemischen Nachweis der Östrogen- und Progesteronrezeptoren die Dextran-Coated-Charcoal- Methode (DCC) angewendet. Die DCC-Methode wurde auch in einer Publikation von 1989 durch Tuzek und Mitarbeitern beschrieben.⁸⁷ Mit Hilfe dieser Methode wird die Kapazität freier Rezeptoren für Tritium-markiertes Steroid im Zytosol erfasst. Die für diese Arbeit benötigte DCC-Steroidrezeptorbestimmung wurde in einem externen Labor durchgeführt (Labor Limbach, Heidelberg). Für die biochemische Untersuchung wurde das Frischmaterial des Tumorgewebes von einer Mindestmenge von 0.2 - 0.5 g, ohne Binde- oder Fettgewebe, erforderlich. Zur Bestimmung der totalen Hormonbindung wird bei diesem Verfahren mit Tritium radioaktiv markiertes Steroidhormon in steigenden Konzentrationen von 0,4 nMol bis 8 nMol eingesetzt. Um die unspezifische Bindung zu ermitteln, wurden zur jeweiligen Konzentration des mit Tritium radioaktiv markierten Steroids Paralleluntersuchungen bewerkstelligt, die zusätzlich zum markierten Hormon einen mindestens 100-fachen Überschuss an unmarkiertem Steroid enthielten. Zur Abtrennung des freien Steroids wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mit Dextran beschichtete Kohle verwendet.

Nach dem Abzentrifugieren der Kohle wurde die Radioaktivität im Überstand gemessen. Im weiteren Ablauf wurden die Proben mit der Szintillatorlösung aufgefüllt und die Gesamtaktivität in einem β -Szintillationsmessgerät (Betazin) gemessen. Die „Spezifische Bindung“, welche Rezeptorenbindung genannt wird,

ist die Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung. Diese entspricht dem Steroidrezeptorgehalt im Tumorzytosol.

Aus der Bindung radioaktiv markierter Liganden wird auf den Östrogen- und Progesteronrezeptorgehalt geschlossen und dieser als fmol je mg Protein angegeben. Dieses Bestimmungsverfahren entspricht dem Standardprotokoll der European Organisation for Research and Treatment of Cancer⁸⁸. Ein Rezeptorgehalt von größer oder gleich 20 fmol/mg Protein wird als positiv angesehen.⁸⁷

4.6 Immunhistochemische Auswerteverfahren

Durch den Antikörper zeigen markierte Zellen ein nukleares Farbmuster. Positiv reagierende Zellkerne zeigen eine dunkelgelbe bis braune Anfärbung, die durch eine unterschiedliche Färbeintensität wie auch durch eine homogene oder heterogene Expression gekennzeichnet sein kann. Die rezeptornegativen Karzinome weisen nur schattenhaft sichtbare, blasse Kerne auf. Eine beobachtete zytoplasmatische Markierung wird als nicht spezifisch angesehen.

In Verbindung mit humanem Mammakarzinomgewebe wird in der Literatur eine Vielzahl von Färbungsskalen für die ER- und PR-Positivität beschrieben.

Die verschiedenen Histoscores bewerten die Anzahl der positiven (gefärbten) Zellen und ihre Färbeintensität. Für unsere Untersuchungen wurde der, in Deutschland übliche, Immunreaktive Score nach Remmele⁸⁹ angewendet. Eine der alternativen Scoremöglichkeiten ist der Allred Score. Im folgenden Text werden diese zwei Auswertemethoden detailliert dargestellt.

4.6.1 Auswertungsmethode nach Remmele und Stegner

Für eine einheitliche Formulierung des Untersuchungsbefundes wurden bei der Auswertungsmethode nach Remmele und Stegner⁸⁹ als Faktoren die Färbeintensität („staining intensity“; SI) und der Prozentsatz der positiven Zellen (PP) vorgeschlagen, deren in Punktwerte übertragenes Produkt, den Immunreaktiven Score (IRS) ergibt.

Abb. 4: *Semiquantitative Auswertungsmethode nach Remmele und Stegner*

Anzahl positiver Zellen (PP)	Score
Keine positiven Kerne nachweisbar	0
Weniger als 10% positive Zellen (Kernfärbung)	1
10-50% positive Zellen (Kernfärbung)	2
51-80% positive Zellen (Kernfärbung)	3
Mehr als 80% positive Zellen (Kernfärbung)	4
Färbeintensität (staining intensity = SI)	Score
Keine Färbung nachweisbar	0
Geringe Färbeintensität der Kerne	1
Mäßige Färbeintensität der Kerne	2
Starke Färbeintensität der Kerne	3

Bewertung des immunreaktiven Scores (IRS=SI * PP)-OSP Stuttgart	Score
Negativ	0
	1
	2
Positiv	3
	4
	6
	8
	9
	12

Bei diesem Histoscore werden die Werte für Färbeintensität (0-3) und Prozentsatz positiver Zellen (0-4) miteinander multipliziert, wobei für die Färbeintensität der vorherrschende Intensitätsgrad ausschlaggebend ist.

Der immunreaktive Score kann einen Wert von 0-12 betragen, wobei die Werte 5, 7, 10 und 11 rechnerisch nicht möglich sind. Der Score 0-1 gilt als negativ und der Score 2-12 als positiv. Diese Festlegung wurde vom OSP Stuttgart willkürlich festgelegt. Alternative Auswerteverfahren wurden beschrieben, fanden aber in der hier vorliegenden Arbeit keine Berücksichtigung, da sämtliche immunhistochemische Auswertungen auf dem Remmele Score beruhen. Eine dieser alternativen Auswertemethoden, der sog. Allred Score, wird im nächsten Kapitel kurz vorgestellt.

4.6.2 Der Allred Score

Dieser Score ist eine einfache, numerische Konstruktion welche aus der Summe zweier Variablen entsteht. Die Variablen sind die gleichen wie bei dem oben beschriebenen Score nach Remmele und Stegner: Anzahl der positiven Zellen und durchschnittliche Färbeintensivität.

Abb. 5: Auswerteverfahren nach Allred

Anzahl positiver Zellen	Score
<i>Keine positiven Kerne nachweisbar</i>	0
<i>Weniger als 1/100 positive Zellen</i>	1
<i>1/100 – 1/10 positive Zellen</i>	2
<i>1/10 – 1/3 positive Zellen</i>	3
<i>1/3 – 2/3 positive Zellen</i>	4
<i>Mehr als 2/3 positive Zellen</i>	5
Färbeintensität	Score
<i>Keine Färbung nachweisbar</i>	0
<i>Geringe Färbeintensität der Kerne</i>	1
<i>Mäßige Färbeintensität der Kerne</i>	2
<i>Starke Färbeintensität der Kerne</i>	3

Die erste Variable (die Anzahl der positiven Zellen) kann einen Wert zwischen 0 und 5 haben. Die zweite Variable (Färbeintensität) hat die Werte zwischen 0 und 3. Die detaillierte Darstellung ist Abb. 5 zu entnehmen.

Während beim Remmele Score die Prozentklasse mit der Intensitätsklasse multipliziert wird, werden beim Allred Score⁹⁰ die Prozentklasse und die Intensitätsklasse addiert. Somit ergibt sich ein Maximalwert von 12 beim Remmele Score und 8 beim Allred Score. Bei Allred-Score-Werten >2 werden die Tumoren als rezeptorpositiv eingestuft.

Eine Umrechnung beider Scores ist nur bedingt möglich. Da zudem in den OSP und RBK Datenbanken lediglich die Angaben des Remmele Scores oder die Angabe „Rezeptor positiv“ oder „Rezeptor negativ“ hinterlegt sind und nicht die Farbintensität oder der Prozentsatz gefärbter Zellen, muss für unsere Analysen allein auf den Remmele Score zurückgegriffen werden.

4.7 Methodenvergleich

Für die Gegenüberstellung beider Nachweismethoden (biochemische versus immunhistochemische Nachweismethode) standen 13 doppelt ausgewertete Gewebeproben zur Verfügung. Hier konnten die Werte des Remmele Scores mit den DCC- Werten verglichen werden. Zur Gegenüberstellung wurde eine lineare Regression durchgeführt.

4.8 Statistische Verfahren

Für die statistischen Auswertungen wurden folgende Verfahren eingesetzt:

- ❖ Student t-Test bei Normalverteilung
- ❖ Chi²-Test für ordinale Werte
- ❖ Kaplan- Meier-Test
- ❖ Log-rank-Test
- ❖ Breslow-Test
- ❖ Cox-Regressionsanalyse
- ❖ Binäre logistische Regression
- ❖ Lineare Regression
- ❖ Multiple Regression
- ❖ Kappa Statistik

Die Beurteilung der Kaplan-Meier-Kurven erfolgte mit dem Log-rank Wert. Nur gelegentlich wird zur besseren Erfassung früher Unterschiede auf den Breslow-Test zurückgegriffen.

In der Überlebenszeitanalyse wurden als Kerngrößen des Therapieerfolgs der OS (overall survival) und/oder der EFS (event-free-survival) berechnet.

Overall survival (OS), das Gesamtüberleben, ist die Überlebenszeit gerechnet vom Zeitpunkt der Diagnosestellung/Therapiebeginn bis zum Eintritt des Todes.

Event-free-survival (EFS), das krankheitsfreie Überleben, ist die Überlebenszeit vom Zeitpunkt der Diagnosestellung/Therapiebeginn bis zum Eintritt des Ereignisses (Lokalrezidiv, Fernmetastase oder Tod).

Für die statistische Auswertung müssen dabei die Todesfälle aus unbekannter Ursache als Tumortodesfälle gewertet werden. Lediglich die 2,3% der Todesfälle, die bei der Datenerhebung für diese Doktorarbeit sicher nicht dem Tumorleiden zuzurechnen waren, konnten für diese Arbeit als „censored“ gewertet werden. Da bei fehlenden Obduktionsberichten und einer insgesamt niedrigen Obduktionsfrequenz in Deutschland eine verlässliche Todesursache häufig nicht

anzugeben war, wurde jeder Todesfall aus unbekannter Ursache als tumorbedingt gewertet.

In der deskriptiven Statistik, die in der Medizin am meisten gebräuchlich ist, werden die Kennziffern der zentralen Tendenz sowie der Variabilität angewendet. Die Maße der zentralen Tendenz sind neben dem Mittelwert, dem Median und dem Modalwert die Kennziffern Skewness und Kurtosis. Wegen seiner Genauigkeit wird der Mittelwert (das arithmetische Mittel) üblicherweise bei statistischen Berechnungen bevorzugt, aber die Extremwerte fließen in seine Berechnung mit ein. Hingegen bestimmt der Median den „Mittelpunkt“ einer Verteilung und wird durch „Ausreißer“ weniger stark beeinflusst.

Der Modalwert ist der am häufigsten beobachtete Wert im Datenkollektiv und wird in der Praxis kaum verwendet.

Skewness (die Schiefe) ist ein Maß der symmetrischen Verteilung der beobachteten Werte (Daten) um den Mittelwert. Eine exakte Normalverteilung hat die Skewness von 0. Liegt der Gipfel einer Verteilung links oder rechts des Gipfels einer Normalverteilung, so wird diese Werteverteilung als schief gekennzeichnet. Ist das Maß der Skewness positiv, wird die Verteilung als rechtsschief (oder linkssteil) bezeichnet und der flache Teil der Verteilungskurve liegt rechts vom Modalwert. Dabei gilt: Modalwert > Median > arithmetisches Mittel. Ist das Maß der Skewness negativ, wird die Verteilung als linksschief (oder rechtssteil) bezeichnet und der flache Kurventeil liegt links vom Modalwert. Dabei gilt: arithmetisches Mittel < Median < Modalwert.

Kurtosis (die Wölbung) ist ein Maß für die Steilgipfligkeit einer Verteilung und zeigt, wie spitz oder flach die Verteilung (Kurve) der beobachteten Werte (Daten), im Vergleich zu einer Normalverteilung, ist. Eine Normalverteilung hat die Kurtosis von 0. Ist das Maß der Kurtosis positiv, ist die Verteilung schmalgipfliger als eine Normalverteilung, die Verteilungskurve ist steiler als die Kurve der Standardnormalverteilung. Ist das Maß der Kurtosis negativ, ist die Verteilung breitgipfliger (plateauartiger) als die Normalverteilung, die Verteilungskurve ist flacher als die Kurve der Standardnormalverteilung. Wie oben schon erwähnt, sind für die Beschreibung einer Verteilung neben den Kennziffern der Tendenz auch die Maße der Variabilität erforderlich.

Für die Einschätzung der Streubreite der Messwerte um den Mittelpunkt werden die Maßzahlen Range, Varianz und Standardabweichung angewendet.

Range bezeichnet den Streubereich und wird als Differenz des höchsten und des niedrigsten Wertes errechnet. Aufgrund der Beeinflussbarkeit durch die Extremwerte wird die Range selten in der Praxis verwendet.

Als ein Maß für die Streuung der Variablen um den Mittelwert sind die Varianz und die Standardabweichung gebräuchlicher.

Die Varianz entspricht der mittleren quadratischen Abweichung der Messdaten vom Mittelwert. Im Unterschied zu Varianz, die einer quadratischen Dimension entspricht, hat die Standardabweichung die gleiche Einheit wie die Ursprungsdaten und wird als Quadratwurzel der Varianz berechnet.

Der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Differenz zwischen zwei Gruppen zufallsbedingt gleich groß oder größer ist als beobachtet, in der Annahme, dass die Nullhypothese stimmt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ (signifikant) und $p \leq 0,001$ (hoch signifikant) festgelegt. Damit wäre im ersten Fall eine an sich richtige Nullhypothese nur in 5% der Fälle mit den angegebenen Werten vereinbar, im zweiten Fall liegt der Wert bei 0,1%.⁹¹

Zum Vergleich zweier angewendeter Untersuchungsmethoden bei numerischen Werten, wurde eine lineare Regression durchgeführt. Das Maß der Abhängigkeit beider Größen ist der R-Wert. Der Wert $R=1$ bedeutet eine perfekte Übereinstimmung.

Bei normalisierten Parametern wurde der Chi²-Test eingesetzt um die sog. „erwartete Häufigkeit“ und die „beobachtete Häufigkeit“ miteinander zu vergleichen.

Die Daten wurden teilweise als Excel Datenbanken bearbeitet. Weiterhin wurde auf die Datenbanken des OSP Stuttgart (Kratzdur) zurückgegriffen. Die Auswertungen erfolgten in S-Plus (Version 6.1) und R-Programmiersprache⁹².

Es ist noch zu bemerken, dass in einigen Analysen die Gesamtsummen kleinere Unstimmigkeiten aufweisen, die durch Fehlwerte bedingt waren.

4.9 Qualitätskontrolle

4.9.1 Tissue Microarray Auswertung

Als Teil der Qualitätskontrolle wurden Nachauswertungen von Originalschnitten als „tissue slices“ (Tissue Microarray) von Mammakarzinomen ermittelt. Mit dieser Methode werden bis zu mehrere hundert unterschiedliche Gewebeproben auf einem einzigen Glas-Objektträger aufgereiht ("arrayed"). Dadurch, dass Tissue Microarray die gleichzeitige Analyse von vielen Gewebeproben ermöglicht, wird der zeitliche sowie finanzielle Aufwand (z.B. für die Antikörper) reduziert. Gleichzeitig ist es mit Hilfe dieser Technik möglich, eine parallele Untersuchung der Gewebeproben unter gleichen Bedingungen und ohne Variabilität in der Färbung durchzuführen. Diese Methode wurde ursprünglich von Kallioniemi und Sauter⁹³ etabliert. Beim Gewebe-Array ist jede Position des Arrays eindeutig durch seine Koordinaten charakterisiert. Die Spotgröße der Gewebe auf dem Array beträgt gewöhnlich zwischen 0.6 und 1.2 mm.

4.9.2 Zweitauswertung an archivierten Paraffinschnitten für den Östrogen- und Progesteronrezeptor

Um die Verlässlichkeit der Ursprungsauswertung der Steroidrezeptoren zu überprüfen, wurden aus dem Studienkollektiv jeweils 60 Östrogen- und Progesteronfärbungen zufällig ausgesucht und neu ausgewertet. Mit Anwendung der linearen Regression, nach der Methode der kleinsten Quadrate für das Abstandsmaß, wurden die neuen Auswertungen mit den Ursprungsdaten verglichen. Es wurden die intraobserver (ER1 versus ER2 bzw. PR1 versus PR2) sowie zwei interobserver (ER2 versus ER3 bzw. PR1 versus PR2) Variabilitäten errechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Das Patientenkollektiv

Als Grundlage für die vorliegende Doktorarbeit wurden 1139 Patientinnen berücksichtigt, bei denen im Zeitraum 1986 bis 2001 ein histologisch gesichertes Mammakarzinom diagnostiziert wurde. Die Patientinnen sind teilweise auch am Marienhospital in Stuttgart behandelt worden. Die Mehrheit des Kollektivs entstammt jedoch dem Standort Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart. Die Patientenzusammensetzung zwischen den beiden Kliniken beläuft sich auf 1:6,55 (zugunsten des RBK). Eine ausführliche Betrachtung hinsichtlich der Charakteristika des Patientenkollektivs erfolgt in den nachgelagerten Kapiteln.

5.1.1 Alter der Patientinnen

Wie Tab. 5 zeigt, liegt das Durchschnittsalter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 59,83 Jahren. Die jüngste Patientin war 28,72 Jahre alt, die älteste 88,83 Jahre.

Tab. 5: Altersverteilung der Studienpatientinnen

Alter in Jahren	<i>Mittelwert</i>	59,83
	<i>SD</i>	12,99
	<i>Median</i>	59,27
	<i>Range</i>	60,6
	<i>Skewness</i>	-0,009
	<i>Kurtosis</i>	0,151

Wie man aus der Abb. 6 entnehmen kann, ist die Altersverteilung in unserem Patientenkollektiv eingipflig mit dem Erkrankungsgipfel um die 60 Jahre. Die Kennziffern einer Verteilungsform, Skewness und Kurtosis, liegen in unserem

Kollektiv bei -0,009 und 0,151. Die Kurve ist nahezu normal verteilt. Dies zeigt sich auch anschaulich in der geringen Differenz zwischen Mittelwert und Median.

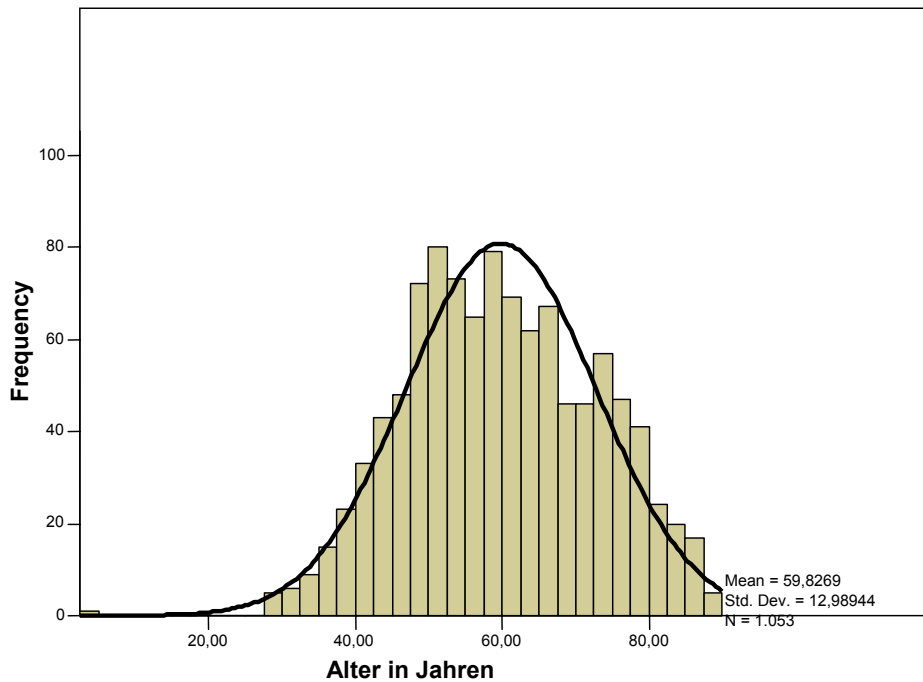


Abb. 6: Graphische Darstellung der Altersverteilung im Studienkollektiv

5.1.2 Menopausenstatus zum Diagnosezeitpunkt

Zum Zeitpunkt der Primärdiagnose befanden sich 255 Frauen in der Prämenopause, 798 waren postmenopausal. Bei insgesamt 86 Patientinnen fehlte die Information über den Menopausenstatus.

Tab. 6: Menopausenstatus zum Diagnosezeitpunkt

Menopausenstatus	N	%
<i>Prämenopausal</i>	255	24,2
<i>Postmenopausal</i>	798	75,8
<i>Fehlwerte</i>	86	

In Tab. 6 sind neben den absoluten Häufigkeiten auch prozentuale Werte gezeigt. Die Mehrzahl der untersuchten Patientinnen mit Mammakarzinom in unserem Kollektiv war postmenopausal.

Wir sind des Weiteren der Frage nachgegangen, wie sich, die Verteilung der Östrogenrezeptoren in Abhängigkeit des Menopausenstatus darstellt.

Tab. 7: Östrogenrezeptor prä- und postmenopausal (nur immunhistochemische Fälle)

	Menopausenstatus	
	<i>prämenopausal</i>	<i>postmenopausal</i>
ER negativ	51	103
%	32,9	19,07
ER positiv	104	437
%	67,1	80,93

Aus Betrachtung der Tab. 7 zeigt sich, dass bei der postmenopausalen Frau der Prozentsatz der ER positiven Fälle ansteigt.

Tab. 8: Progesteronrezeptor prä- und postmenopausal (nur immunhistochemische Fälle)

	Menopausenstatus	
	<i>prämenopausal</i>	<i>postmenopausal</i>
PR negativ	54	139
%	35,29	25,88
PR positiv	99	398
%	64,71	74,12

Ähnlich wie beim Östrogenrezeptor, zeigt sich in der Postmenopause eine Tendenz zur positiven Progesteronrezeptor-Expression. Die postmenopausale Patientin mit Mammakarzinom ist daher sehr häufig sowohl ER als auch PR positiv.

5.1.3 TNM-Status

Die einzelnen Verteilungen im Patientenkollektiv hinsichtlich des TNM-Status und Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Primärdiagnose ist Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 9: TNM-Klassifikation im Studienkollektiv

Variable	N	%
<i>Stadium I</i>	300	26,8
<i>II</i>	614	54,9
<i>III</i>	155	13,8
<i>IV</i>	50	4,5
<i>Fehlwerte</i>	20	-
<i>T</i> <i>1</i>	399	35,3
<i>2</i>	547	48,4
<i>3</i>	85	7,5
<i>4</i>	99	8,8
<i>Fehlwerte</i>	9	-
<i>N</i> <i>N0</i>	543	52,2
<i>N1</i>	441	42,4
<i>N2-N3</i>	56	5,4
<i>Fehlwerte</i>	99	-
<i>M</i> <i>M0</i>	931	93,9
<i>M1</i>	60	6,1
<i>Fehlwerte</i>	148	-

Wie Tab. 9 zeigt, dominieren im Kollektiv die Stadium II Patientinnen (T1 N1 M0, T2 N0 M0, T2 N1 M0, T3 N0 M0).

5.1.4 Tumorgrading und Histologie der Karzinome

Anhand von postoperativen histopathologischen Untersuchungen am entfernten Brustgewebe wurde der histologische Typ und Differenzierungsgrad des primären Mammakarzinoms bestimmt. Die folgenden Tabellen zeigen die Verteilung im Studienkollektiv diesbezüglich.

Tab. 10: Verteilung der Karzinome nach dem histologischen Typ

Histologischer Typ	N	%
<i>Invasiv-ductal</i>	480	70,1
<i>Invasiv-lobulär</i>	131	19,1
<i>Sonderformen</i>	74	10,8
<i>Fehlwerte</i>	686	

Die invasiv- ductalen Karzinome dominieren in unserem Kollektiv. Etwa 19,1% aller Fälle sind der Gruppe der lobulären Mammakarzinome und 10,8% den Sonderformen zuzuordnen.

In der Datenbank und den vorliegenden Unterlagen, die für diese Doktorarbeit benutzt wurden, konnte bei 686 Patientinnen keine Information über eine eindeutige Tumorphistologie und die Einteilung in invasiv-ductal oder invasiv-lobulär gefunden werden. Der relativ hohe Prozentsatz nicht histologisch definierter Fälle ergibt sich aus dem Umstand, dass von einem Teil der befundenden Pathologen nicht die WHO-Nomenklatur von 1986 benutzt wurde (etwa bis 1992).

Tab. 11: Verteilung der Karzinome nach dem Differenzierungsgrad

Differenzierungsgrad	N	%
<i>Grading G1</i>	82	7,3
<i>G2</i>	804	71,5
<i>G3</i>	239	21,2
<i>Fehlwerte</i>	14	

Die meisten Patientinnen sind in die Gruppe der mässig differenzierten (G2) Mammakarzinome einzustufen. Bei 14 Patientinnen konnten in den vorliegenden Unterlagen keine eindeutigen Angaben zum Differenzierungsgrad gefunden werden.

5.1.5 Postdiagnostische Nachbeobachtung

Nach erfolgter Diagnostik und Primärtherapie wurden die Patientinnen in der Klinik oder bei den niedergelassenen Gynäkologen bzw. Hausärzten nachbetreut. Die Abfrage über den weiteren Krankheitsverlauf erfolgte auf folgenden Ebenen:

- ❖ Jährliche Abfragen des OSP Stuttgart bei den Einwohnermeldeämtern
- ❖ Lokale Dokumentation der RBK Patientinnen am Brustzentrum des RBK
- ❖ Nachfrage bei behandelnden Hausärzten.

In der Nachbeobachtungszeit wurde der Verlauf der Mammakarzinompatientinnen hinsichtlich des Überlebens, des Auftretens von lokalen/lokoregionalen Rezidiven, der Metastasierung, des Auftretens von Zweitkarzinomen der Mammae oder sonstigen Zweitkarzinomen dokumentiert.

Die Follow-up Daten ergeben eine mittlere Beobachtungszeit von 65,93 Monaten (SD 43,76).

Tab. 12: Nachbeobachtungszeit

Follow-up Daten (in Monaten)	<i>Mittelwert</i>	65,93
	<i>SD</i>	43,76
	<i>Median</i>	53,85
	<i>Range</i>	209,16
	<i>Skewness</i>	0,762
	<i>Kurtosis</i>	-0,152

Die graphische Darstellung der in Tab. 12 präsentierten Daten stellt sich in Abb. 7 dar.

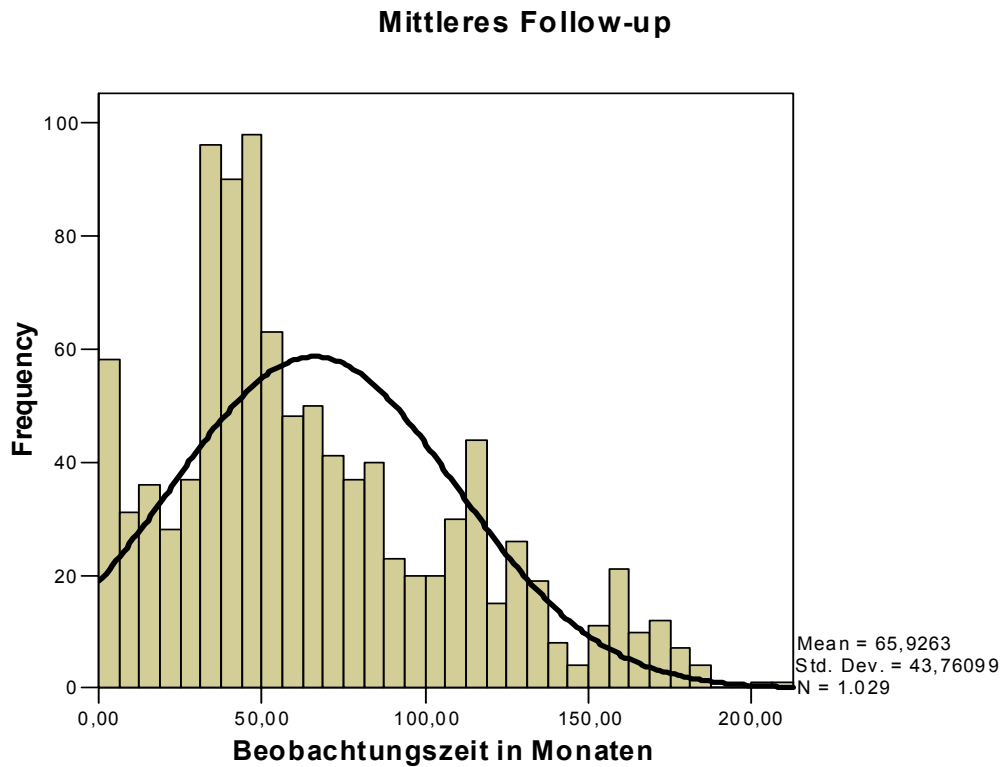


Abb. 7: *Das mittlere Follow-up*

Das mittlere Follow-up ist eine rechtsschiefe Verteilung mit relativ vielen frühzensierten Fällen. Die kürzesten Follow-up-Zeiten sind bei den Frauen zu verzeichnen, die kurz nach der Brustkrebsdiagnose aus unterschiedlichen Gründen aus der Nachbeobachtung ausschieden.

Tab. 13: *Zeitraum bis zum Event oder Censoring*

Zeitraum bis zum Event oder Censoring (in Monaten)	<i>Mittelwert</i>	58,75
	<i>SD</i>	45,82
	<i>Median</i>	47,15
	<i>Range</i>	202,03
	<i>Skewness</i>	0,878
	<i>Kurtosis</i>	0,067

Die längste Nachbeobachtungszeit belief sich auf fast 200 Monate. Für das Gesamtkollektiv beträgt der Median des Follow-up 53,85 Monate. Für die Charakterisierung eines Tumorkollektivs ist der Median besser geeignet als der Mittelwert. Als weitere Kerngröße für den Therapieerfolg kann das „event free survival“ gewertet werden. Das mittlere Follow-up des „overall survival“ beträgt etwas mehr als 60 Monate (Tab. 12) und der Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs oder Censoring erreicht nicht ganz 60 Monate (Tab. 13). Der Median liegt bei 47,15 Monaten.

Tab. 14: Das Auftreten der Rezidive, der Metastasen und der Zweitkarzinome im Krankheitsverlauf

Variable	N	%
<i>Lokale Rezidive</i>	138	14,97
<i>Fehlwerte</i>	217	
<i>Fernmetastasen</i>	209	21,77
<i>Fehlwerte</i>	179	
<i>Zweitkarzinom der Mammae</i>	40	-
<i>Sonstige Zweitkarzinome</i>	20	-

Lokale bzw. lokoregionale Rezidive und Fernmetastasen sind mit 15% und 21,7% angegeben. Diese Daten sind allerdings teilweise überlappend. Die Häufigkeit der Zweitkarzinome der Mammae sowie Karzinome anderer Organen sind in der Datenbank ebenfalls verschlüsselt. Diese Angaben erscheinen allerdings eher zu niedrig und werden daher nicht weiter analysiert, da von einer ungenügenden Dokumentation ausgegangen wurde. Für die Zweitkarzinome außerhalb der Brustdrüse wurden aus gleichem Grund keine Prozentwerte angegeben, da die Datenerfassung hier suboptimal erscheint. Die Fehlwerte sind nicht in den prozentualen Berechnungen enthalten.

Tab. 15: Die Überlebensdaten der Studienpatientinnen (N=1139)

Status	N	%
<i>Lebend</i>	741	70,4
<i>Tot aus unbekannter Ursache</i>	177	16,8
<i>Tod aus Tumorgründen</i>	111	10,5
<i>Tod aus nicht-Tumorgründen</i>	24	2,3
<i>Fehlwerte</i>	86	-

Wie aus der Tab. 15 hervorgeht, liegt der Prozentsatz verstorbener Patientinnen bei 29,6%. Die Todesfälle setzen sich aus drei Kategorien zusammen:

- Kategorie 1 – Mammakarzinom als Todesursache
- Kategorie 2 – Todesursache durch andere Verläufe
- Kategorie 3 – Todesursache nicht bekannt.

Die durchgeführten Berechnungen wurden jeweils mit Zuordnung der Kategorie 2, Todesfälle als „event“ oder „censored“ gerechnet. Lediglich 2,3% der Todesfälle konnten als nicht tumorbedingt zugeordnet werden.

5.1.6 Hormonrezeptorstatus

Einer besonderen Beachtung bedarf die Untersuchung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, die nachfolgend ausführlich analysiert werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Östrogen- und Progesteronrezeptor Werte für die statistischen Auswertungen als 0 (Score 0 und 1; negativ) und 1 (Score ≥ 2 ; positiv) verschlüsselt. In unserem Untersuchungsgut war die Mehrheit der Patientinnen ER positiv (71,4% versus 28,6%). 63,7% aller Fälle wiesen einen positiven Progesteronrezeptorstatus auf. In etwa $\frac{2}{3}$ der Fälle waren die primären Mammakarzinome Östrogen- und Progesteronrezeptor positiv.

Wenn ein c-erbB2-Status vorliegt, und dies war nur in einer Minderheit aller Fälle gegeben (da es sich um eine retrospektive Studie handelt), so waren nur etwa 18,8% dieser Fälle im Sinne eines immunhistochemischen Nachweises einer deutlichen membranösen Proteinexpression positiv. Als positiv wurde ein c-erbB2-Status gewertet, wenn eine mäßige Expression von c-erbB2 in der Zellmembran vorlag (Score ≥ 2).

Tab. 16: *Der Hormonrezeptorstatus im Studienkollektiv, N=1139 (ohne Berücksichtigung der Bestimmungsmethode)*

Rezeptorstatus		N	%
<i>ER</i>	<i>ER –</i>	324	28,6
	<i>ER +</i>	808	71,4
	<i>Fehlwerte</i>	7	-
<i>PR</i>	<i>PR –</i>	410	36,3
	<i>PR +</i>	719	63,7
	<i>Fehlwerte</i>	10	-
<i>c-erbB2</i>	-	155	81,2
	+	36	18,8
	<i>Fehlwerte</i>	948	-

Die meisten Untersuchungen und Berechnungen die wir vorgenommen haben, wurden in dem immunhistochemischen Kollektiv durchgeführt.

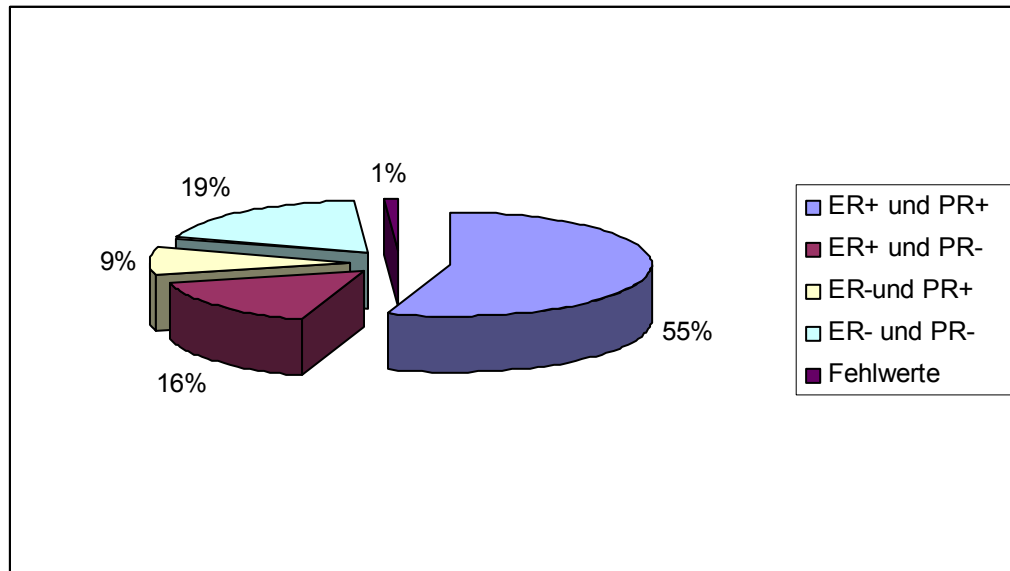


Abb. 8: Diagramm der Rezeptorverteilung im immunhistochemischen Kollektiv

5.1.7 Übereinstimmung zwischen den biochemisch und immunhistochemisch ermittelten Steroidrezeptoren

Von insgesamt 1139 Fällen, die in dieser Arbeit analysiert wurden, kam es bei 13 Fällen zu einer Doppelbestimmung der Steroidrezeptoren. Der Östrogen- sowie der Progesteronrezeptor wurden sowohl biochemisch (DCC-Methode) als auch immunhistochemisch bestimmt. Eine Korrelation zwischen beiden Nachweismethoden wird in den folgenden Kapiteln erläutert.

5.1.7.1 Östrogenrezeptor

Bei den 13 Fällen mit Doppelbestimmungen lagen jeweils der Remmele Score und der Charcoal Dextran Wert (biochemische Bestimmungsmethode) vor. Bei diesen Fällen ergab sich eine ausreichende Korrelation zwischen dem biochemisch bestimmten ER und dem immunhistochemisch ermittelten Score (Remmele Score). Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $R=0,586$ ($p<0,0001$). Des Weiteren zeigt sich in diesem Vergleich aber auch, dass sowohl Werte mit hohem biochemischen Östrogenrezeptorstatus und relativ niedrigem Remmele Score vorkommen, als auch umgekehrte Wertepaare. Es besteht somit eine mäßige Korrelation zwischen diesen zwei Bestimmungsmethoden des Östrogenrezeptors. Die graphische Darstellung dieser Korrelation ist in Abb. 9 demonstriert.

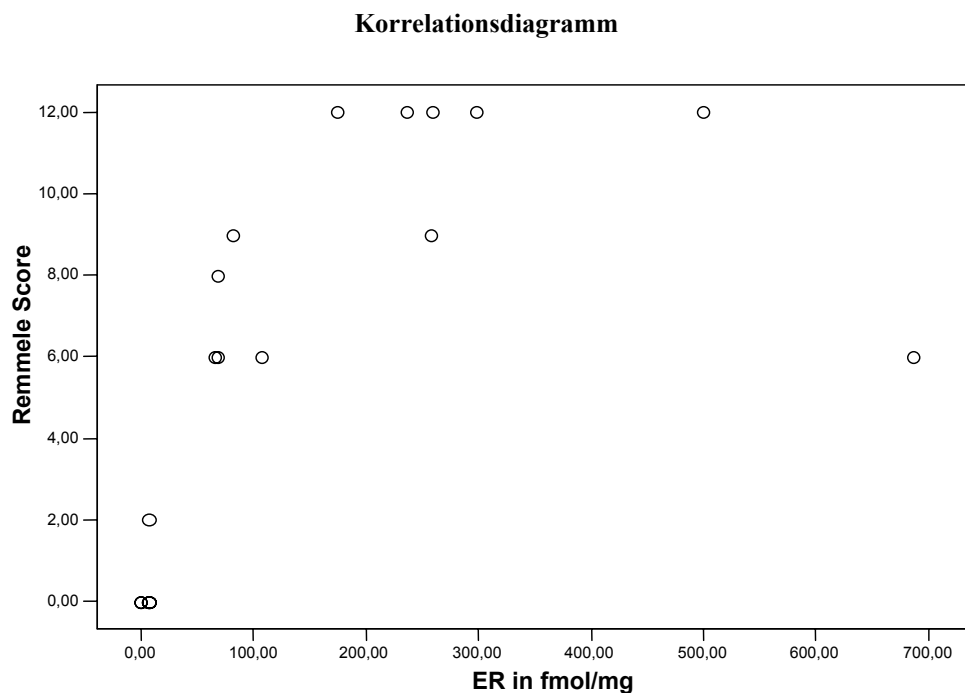


Abb. 9: Korrelation zwischen Remmele Score und ER in fmol/mg

5.1.7.2 Progesteronrezeptor

Auch hier ergibt sich eine Korrelation, die mit einem Korrelationskoeffizient R von 0,813 und einem p Wert von <0,0001 als gut zu bezeichnen ist. Desgleichen wie bereits beim Östrogenrezeptor wurden hier nur die Werte analysiert, bei denen sowohl die biochemischen als auch die immunhistochemischen Bestimmungen als genauer Messwert vorlagen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Östrogenrezeptor ist hier die Korrelation zwischen den beiden Bestimmungsmethoden deutlich besser. Die graphische Darstellung dieser Korrelation zeigt sich in Abb. 10.

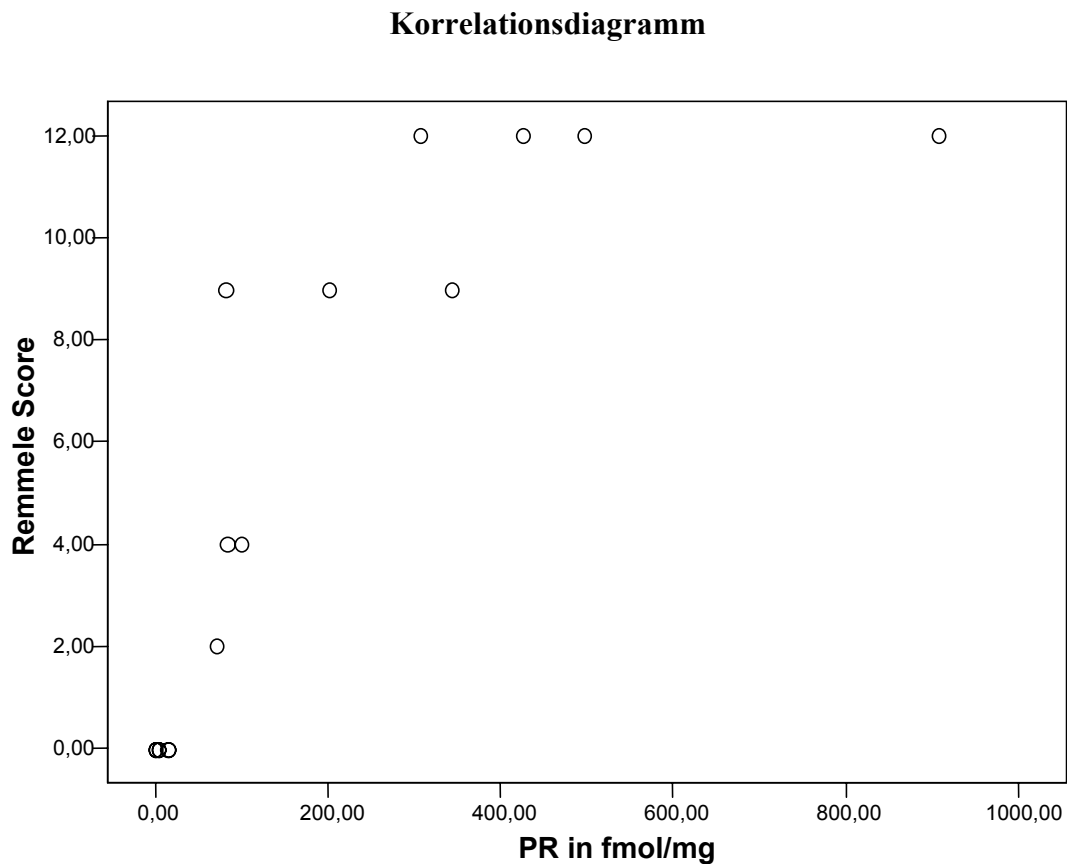


Abb. 10: Korrelation zwischen Remmele Score und PR in fmol/mg

5.1.7.3 Östrogen- und Progesteronrezeptor

Bezieht man die Analysen zusammenfassend nur auf die Übereinstimmung in einer positiv/negativ Matrix, so ergeben sich noch günstigere Übereinstimmungswerte.

Tab. 17: Übereinstimmung zwischen biochemisch und immunhistochemisch ermittelten ER-Werten

	ER biochemisch	
ER immunhistochemisch	< 15 fmol/mg	>15 fmol/mg
<i>Remmele score < 2</i>	3	0
<i>Remmele score ≥ 2</i>	0	10
	Chi²=1	

Tab. 18: Übereinstimmung zwischen biochemisch und immunhistochemisch ermittelten PR-Werten

	PR biochemisch	
PR immunhistochemisch	< 15 fmol/mg	>15 fmol/mg
<i>Remmele Score <2</i>	4	0
<i>Remmele Score ≥ 2</i>	0	9
	Chi²=1	

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die biochemischen und immunhistochemischen Verfahren bei der Feinanalyse (fmol/mg Protein versus Remmele Score) eine mäßige Übereinstimmung ergeben. Wenn man die Einteilung in positiv/negativ Entscheidungen zurückführt, ist die Übereinstimmung zwischen beiden Bestimmungsverfahren vollständig.

5.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle

5.2.1 Mikrotissue Auswertung

Als Teil der Qualitätskontrolle wurden dazu Nachauswertungen als „tissue slices“ (Tissue Microarray) von Mammakarzinomen ermittelt. Der Korrelationskoeffizient für die Mikrotissuauswertung des Östrogenrezeptors beträgt in unserer intraobserver Kontrolle 0.8398809. Die Korrelationskurve wird in folgender Grafik abgebildet.

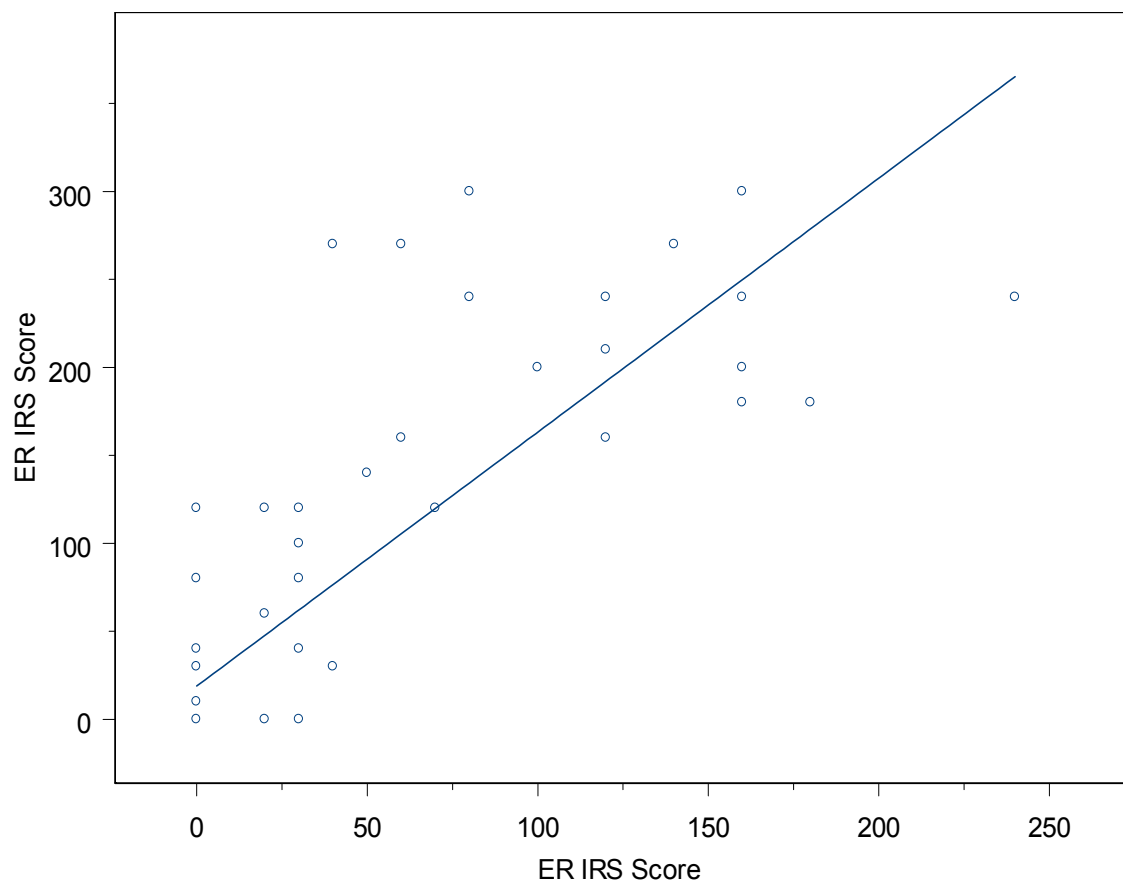


Abb. 11: Korrelationskurve der intraobserver Variabilität der ER-Bestimmung

Für die Korrelationskurve der Abb. 11 ergaben sich folgende statistische Werte:

- Residual standard error: 29.18 on 81 degrees of freedom,
- Multiple R-Squared: 0.7054,
- F-statistic: 193.9 on 1 and 81 degrees of freedom und
- p-Wert = 0.

Es kann somit von einer sehr guten Übereinstimmung bei wiederholter Bestimmung des Östrogenrezeptors durch einen erfahrenen Untersucher ausgegangen werden.

5.2.2 Zweitauswertung des Östrogen- und Progesteronrezeptors

Wie schon im Kapitel 4.9.2 beschrieben, wurde die Verlässlichkeit der Ursprungsauswertung in Bezug auf die Steroidrezeptoren überprüft, indem aus dem Studienkollektiv jeweils 60 Östrogen- und Progesteronfärbungen an archivierten Paraffinschnitten zufällig aufgesucht und neu ausgewertet wurden. Mit Anwendung der linearen Regression wurden die neuen Auswertungen mit den Ursprungsdaten verglichen und eine intraobserver (ER1 versus ER2 bzw. PR1 versus PR2) sowie zwei interobserver (ER2 versus ER3 bzw. PR1 versus PR2) Variabilitäten errechnet. Die entscheidende Aussage diesbezüglich ist die Formel der Regressionsgeraden, welche für den Östrogenrezeptor bei der intraobserver Auswertung wie folgt lautet:

$$\text{IRS-ER1} = 0,7545 \times \text{IRS-ER2} + 2,143 \text{ mit } R=0,7567.$$

Für den Progesteronrezeptor ergibt sich folgende Formel:

$$\text{IRS-PR1} = 0,6516 \times \text{IRS-PR} + 2,78 \text{ mit } R= 0,6809.$$

Für die interobserver Auswertung ergeben sich folgende Formeln der Regressionsgeraden für den Östrogenrezeptor mit entsprechenden R-Werten:

$$\text{IRS-ER1} = 0,7609 \times \text{IRS-ER3} + 1,0708 \text{ mit } R = 0,7802$$

sowie

$$\text{IRS-ER2} = 0,644 \times \text{IRS-ER3} - 0,2522 \text{ mit } R = 0,7801.$$

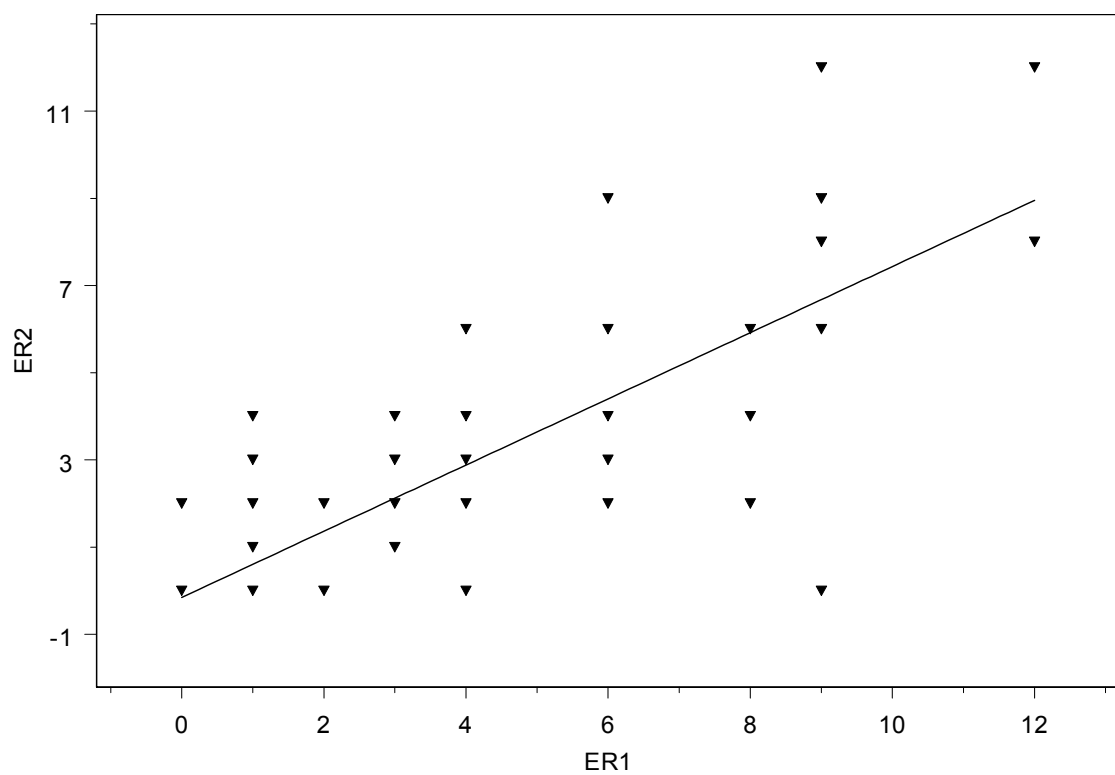


Abb. 12: Plot der interobserver Auswertung ER1 versus ER2

Für den Progesteronrezeptor ergeben sich folgende Formeln:

$$\text{IRS-PR1} = 0,8652 \times \text{IRS-PR3} + 0,830 \text{ mit } R = 0,8637$$

sowie

$$\text{IRS-PR2} = 0,7649 \times \text{IRS-PR3} + 0,0721 \text{ mit } R = 0,7307.$$

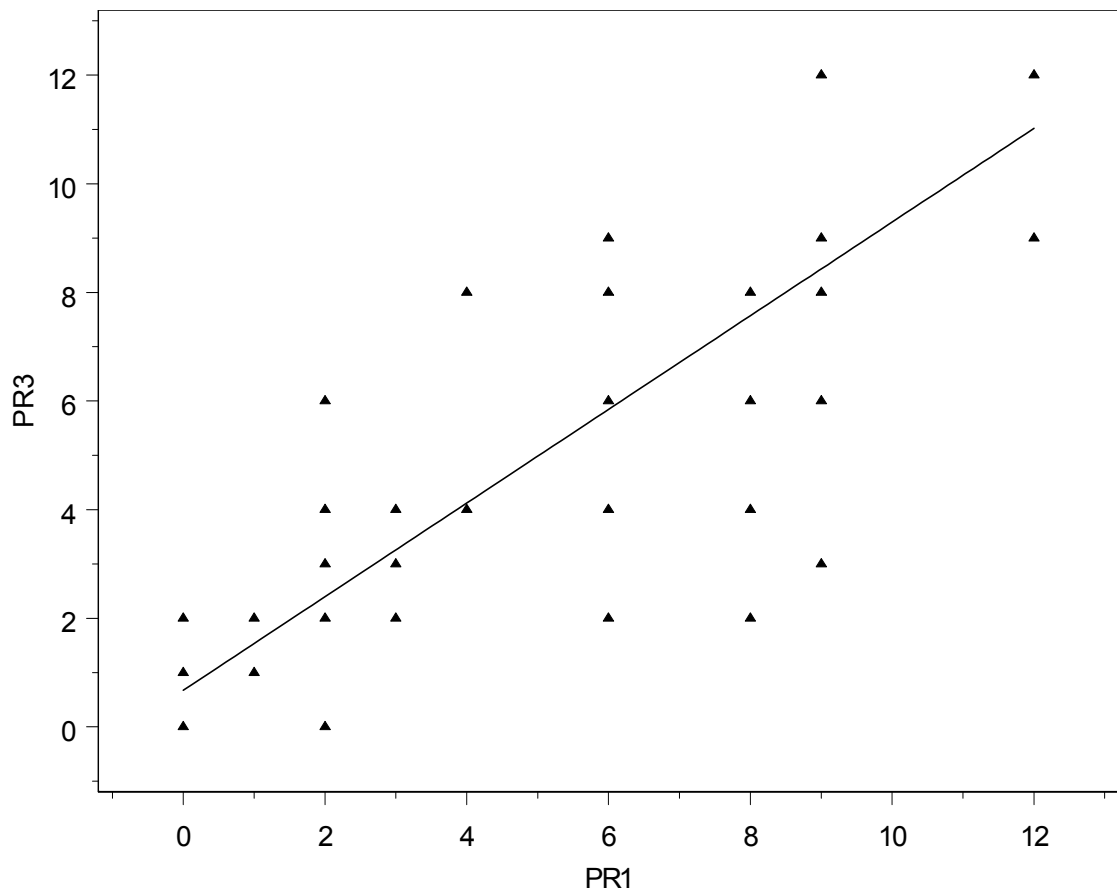


Abb. 13: *Plot der interobserver Auswertung PR1 versus PR3*

Bei den oben aufgeführten Auswertungen für den ER und PR lagen die R-Werte im Mittel bei 0.77 für den Östrogenrezeptor und bei 0.76 für den Progesteronrezeptor. Beide immunhistochemischen Nachweismethoden, sowohl die des Östrogen- als auch für die des Progesteronrezeptors, sind daher gut reproduzierbar, sowohl hinsichtlich der intra- als auch der interobserver Variabilität. Zusammenfassend kann man also davon ausgehen, dass die immunhistochemische Bestimmungsmethode gut reproduzierbar ist.

5.3 Prognose der Studienpatientinnen in Abhängigkeit von konventionellen Prognosefaktoren

Im Folgenden wird der Einfluss der im Studienkollektiv erhobenen Daten auf das Gesamtüberleben hin untersucht. Die histopathologischen Eigenschaften des Studienkollektivs und statistische Werte hinsichtlich des OS sind in der Tab. 19 zusammengefasst.

Tab. 19: Zusammenhang zwischen histopathologischen Daten und Gesamtüberleben (N=1139), ohne Berücksichtigung der Bestimmungsmethode

Variable	N	%	Log rank	p
Stadium I	300	26,8	269,16	<0,0001
II	614	54,9		
III	155	13,8		
IV	50	4,5		
Fehlwerte	20	-		
N N0	543	52,2	170,11	<0,0001
N1	441	42,4		
N2-N3	56	5,4		
Fehlwerte	99	-		
T T1	399	35,3	128,79	<0,0001
T2	547	48,4		
T3	85	7,5		
T4	99	8,8		
Fehlwerte	9	-		
M M0	931	93,9	207,74	<0,0001
M1	60	6,1		
Fehlwerte	148	-		
Grading G1	82	7,3	27,59	<0,0001
G2	804	71,5		
G3	239	21,2		
Fehlwerte	14	-		
invasiv ductal	480	70,1	1,55	0,67
invasiv lobulär	131	19,1		
Sonderformen	74	10,8		
Fehlwerte	686			

Aus den Log-rank Werten und berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten sind hoch signifikante Zusammenhänge zwischen dem Stadium, der Tumorgroße, dem nodalen Status, der M-Einteilung und dem Grading in Hinblick auf das Gesamtüberleben anzunehmen. Demnach sagen diese Parameter mit sehr hoher Signifikanz die Prognose eines Mammakarzinoms univariat voraus. Die Analyse des Überlebens in Hinblick auf den Nodalstatus ergab eine statistisch signifikant höhere Überlebenschance für nodalnegative Patientinnen. Hinsichtlich des Überlebens ergab sich aus den vorliegenden Daten für die Tumorgroße ein statistisch signifikanter Zusammenhang. Die in der folgenden Abb. 14 dargestellte Abhängigkeit des Überlebens vom Stadium ist hoch signifikant und geht mit einem Log-rank Wert von > 200 einher.

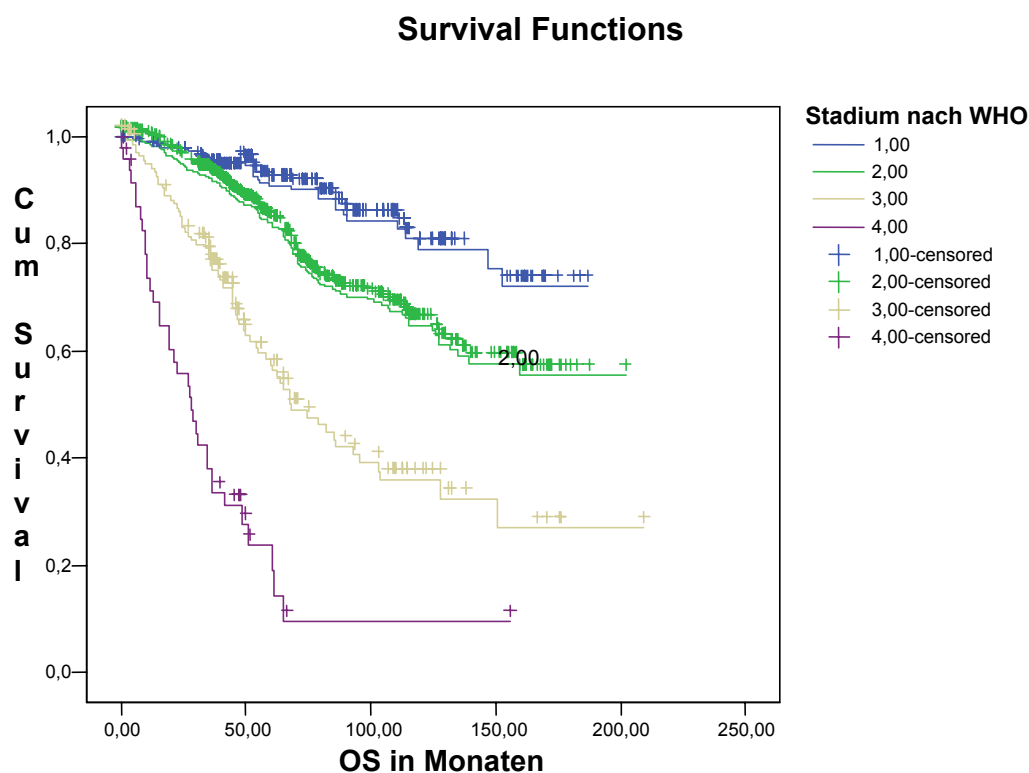


Abb. 14: *Abhängigkeit des Überlebens vom Stadium der Brustkrebskrankung*

Die Medianwerte des Überlebens, also die Punkte bei denen 50% der Patienten des Kollektivs das „event“ erreichen, werden nicht für die Stadien I und II erlangt und belaufen sich in Stadien III und IV auf die 68,22 und 27,81 Monate.

Ein weiteres Beispiel aus dieser Gruppe der Prognosefaktoren mit geringerem Log-rank Wert (27,59) ist der Differenzierungsgrad, welcher aber immer noch hoch signifikante Überlebensunterschiede zwischen den drei Gradingstufen aufweist. Dieses demonstriert die Kaplan-Meier-Analyse in Abb. 15.

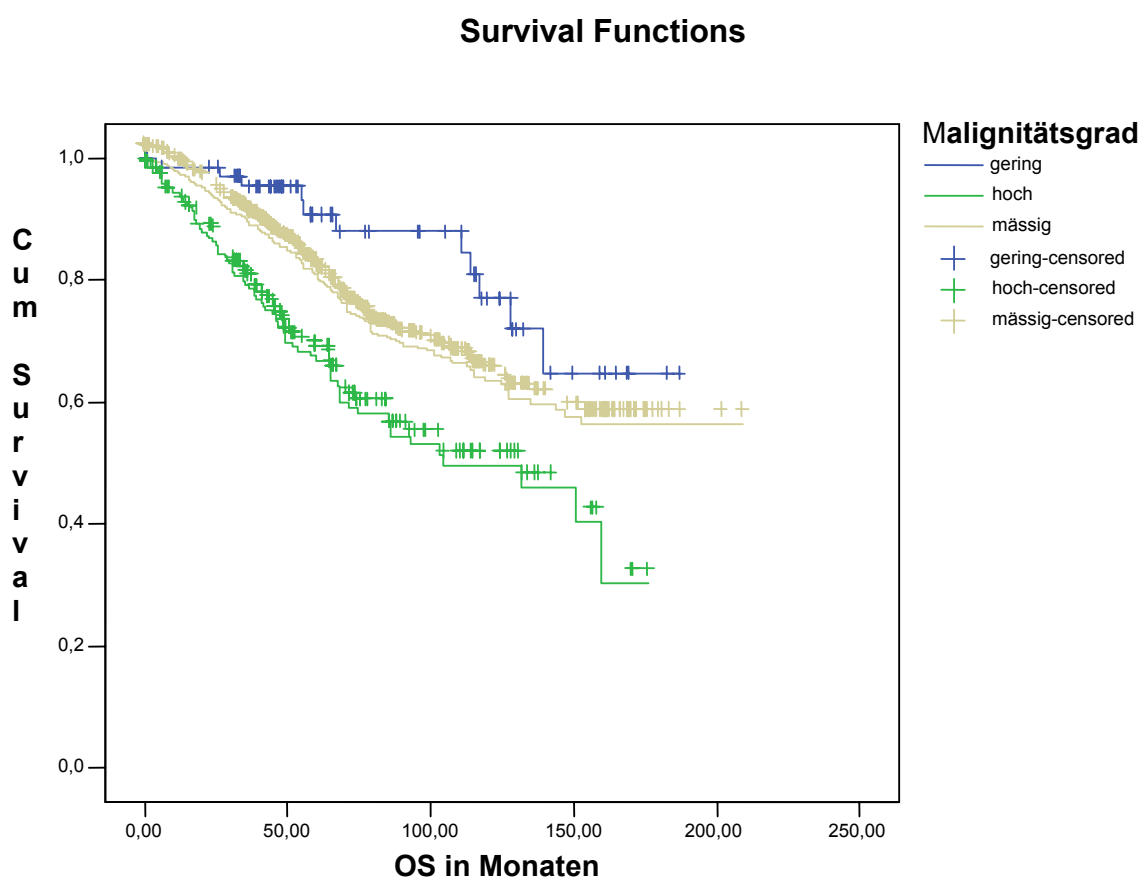


Abb. 15: Grading und Überleben nach der Kaplan-Meier-Analyse
(Chi²=26,4 on 2 degrees of freedom, p<0,001)

Für die klinische Bewertung der vorgelegten Ergebnisse ist das 1-, 3-, 5- und 10-Jahres Überleben von entscheidender Bedeutung.

Die aus unserem Datenmaterial nach der Methode von Kaplan und Meier berechneten Überlebenswahrscheinlichkeiten bezifferten sich in unserem Kollektiv mit:

- **1-Jahres OS: 96,78% (SD +/- 0,012)**
- **3-Jahres OS: 87,65% (SD +/- 0,022)**
- **5-Jahres OS: 78,67% (SD +/- 0,029)**
- **10-Jahres OS: 60,89% (SD +/- 0,044)**

Die klinischen und biologischen Eigenschaften des Studienkollektivs sowie deren prognostische Bedeutung in Hinblick auf das Gesamtüberleben werden in folgender Tabelle dargestellt.

Tab. 20: Zusammenhang zwischen klinischen und biologischen Eigenschaften des Studienkollektivs und Gesamtüberleben.

Variable	N	%	Log rank	p
ER				
<i>ER -</i>	324	28,6	1,35	0,2466
<i>ER+</i>	808	71,4	5,41 (Breslow)	0,02
<i>Fehlwerte</i>	7	-		
PR				
<i>PR -</i>	410	36,3	5,72	0,0168
<i>PR+</i>	719	63,7	9,12 (Breslow)	0,0025
<i>Fehlwerte</i>	10	-		
c-erbB2				
<i>-</i>	155	81,2	10,27	0,0013
<i>+</i>	36	18,8		
<i>Fehlwerte</i>	948	-		
Prämenopausal	255	24,2	2,73	0,099
Postmenopausal	798	75,8		
<i>Fehlwerte</i>	86	-		
Alter < Median			9,65	0,0019
>Median				

Nicht signifikant waren die Variablen: Östrogenrezeptorstatus (bei Zugrundelegung des Log-rank Wertes), der menopausale Status sowie die Histologie (invasiv-lobuläres oder ductales Karzinom). Dies gilt allerdings nur für die Langzeitfollow-up Betrachtung. Für die kurzen Überlebenszeiten des 3- und 5-Jahres OS weist der Breslow-Test signifikante Unterschiede zwischen ER positiven und ER negativen Gruppen aus.

In der Spalte für den Log-rank Wert sind bei den Steroidrezeptoren auch die Breslow Testwerte angegeben, da diese eine statistische Bewertung des frühen Kurvenverhaltens besser widerspiegeln. Für das langfristige OS zeigt sich dabei, dass dem ER im Gegensatz zum PR keine signifikante Bedeutung zukommt. Das kurzfristige 3- und 5-Jahres Überleben hängt sowohl vom ER als auch vom PR Status ab.

Bei der Analyse der Abhängigkeit des Überlebens vom Menopausenstatus zeigte der errechnete p-Wert von 0.099 in der Kaplan-Meier Statistik, dass der Menopausenstatus die Prognose des primären Mammakarzinoms in unserer Studiengruppe nicht beeinflusst.

5.4 Steroidrezeptor als Prognosefaktor, Cut-off Punkt und alternative Einteilungsmöglichkeiten

Bis jetzt wurde die auf die Steroidrezeptoren bezogene Überlebensauswertung nur unter der Berücksichtigung eines rezeptorpositiven oder rezeptornegativen Status durchgeführt. Dabei wurde der Cut-off Punkt der Empfehlung des OSP Stuttgart folgend bei $IRS \geq 2$ gewählt und im Charcoal Dextran Verfahren die Grenze positiv/negativ bei 15 bzw. 20 fmol/mg Protein angesetzt. Eine der Fragen die in dieser Doktorarbeit zu beantworten versucht wurde ist, ob es andere, für das Überleben der Patientinnen vorteilhaftere Einteilungsmöglichkeiten der Steroidrezeptoren gibt. Anders formuliert, wo sollte man den Cut-off Punkt bei einer binären Einordnung der Steroidrezeptoren (positiv oder negativ) setzen? Bringen andere Einteilungen mehr prognostische Vorteile als bisherige mit dem Cut-off Punkt, der für den immunhistochemischen Nachweis bei ≥ 2 liegt und im Charcoal Dextran Verfahren 15 bzw. 20 fmol/mg Protein beträgt?

5.4.1 Das Kollektiv der biochemisch ermittelten Steroidrezeptoren

5.4.1.1 Östrogenrezeptor

Das hier auftretende Problem ist, ob die biochemische Ermittlung des Östrogen- oder Progesteronrezeptors eine Vorhersage der Prognose erlaubt und wie der Cut-off Punkt zu wählen ist. Die Frage die sich stellt ist demnach, ob der biochemisch bestimmte Östrogenrezeptor eher eine klinische Bedeutung hat, wenn man den Cut-off Punkt bei 20 fmol/mg Protein setzt, als bei 40 fmol/mg Protein, oder ob man eine Einteilung in 9 Gruppen, wie nachfolgend dargestellt (Tab. 21), wählen sollte.

Tab. 21: Biochemisch ermittelte Steroidrezeptor, Einteilung in 9 Gruppen

Gruppe	Rezeptor in fmol/mg Protein
1	0-15
2	16-100
3	101-200
4	201-300
5	301-400
6	401-500
7	501-600
8	601-700
9	>701

Wenn man eine Einteilung des Östrogenrezeptors in 9 Gruppen vornimmt, so ist der errechnete $\chi^2=2,2$ mit $p=0,974$. Beim Cut-off Punkt von 40 fmol/mg Protein sind ebenfalls keine prognostischen Unterschiede zwischen ER positiven und ER negativen primären Mammakarzinomen zu bemerken. Die Verhältnisse bei 20 fmol/mg Protein sind in Abb. 16 dargestellt. Dabei zeigen sich kaum Überlebensunterschiede zwischen Patientinnen, deren Östrogenrezeptorgehalt kleiner 20 fmol/mg Protein ist zu Patientinnen mit einem Östrogenrezeptorgehalt größer 20 fmol/mg Protein. Erst nach mehr als 100 Monaten zeigen sich andeutungsweise Überlebensunterschiede zu Gunsten des höheren Östrogenrezeptorgehalts. Der χ^2 -Wert beträgt 0,4 mit $p=0.533$. Bei der Wahl eines Cut-off Punkts bei 15 fmol/mg Protein kamen wir zu ähnlichem Ergebnis ($\chi^2=0,05$; $p=0.8254$). Würde man keine Grenze für den ER festlegen, sondern ein kontinuierliches Spektrum von biochemisch bestimmten Werten zulassen, so würde der Zusammenhang zwischen dem Östrogenrezeptor in fmol/mg und der Prognose durchaus signifikant. Ein solches Vorgehen ist jedoch klinisch nicht umsetzbar.

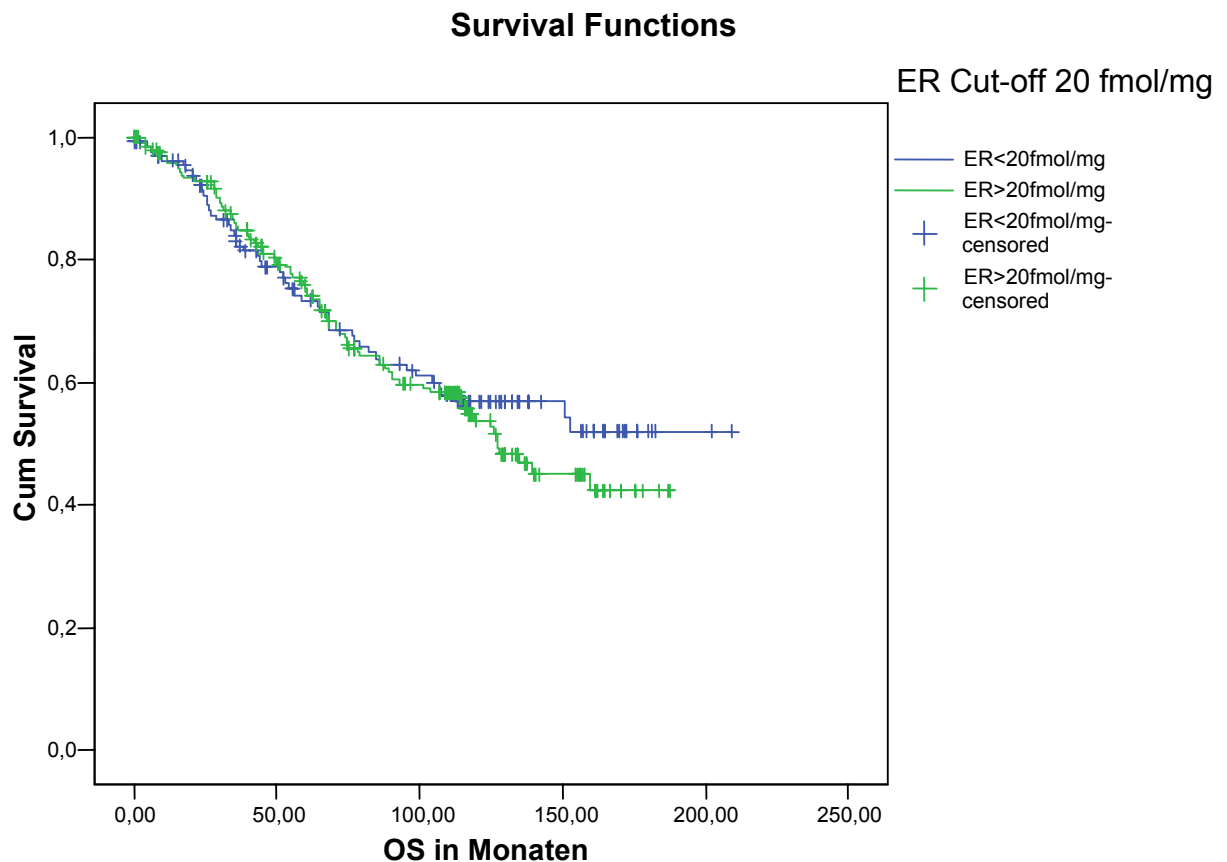


Abb. 16: *Überlebensverteilung beim Cut-off 20 fmol/mg für das ER*

Ob man den Cut-off Punkt bei 15, 20 fmol/mg Protein oder bei 40 fmol/mg Protein setzt, oder ob man eine Einteilung in 9 Klassen wählt, der biochemisch bestimmte Wert des Östrogenrezeptors ist in unserem Kollektiv ohne klinische Bedeutung hinsichtlich des Überlebens (OS). Eine log Transformation der Messwerte ergibt ebenfalls keine Verbesserung der klinischen Relevanz der biochemisch ermittelten ER-Werten ($\text{Chi}^2=4,9$, $p=0,773$). Der angegebene p-Wert gilt für eine Einteilung in 9 Untergruppen. Zusammenfassend ist eine biochemische Bestimmung des ER unabhängig vom Cut-off Punkt somit kein statistisch signifikanter Prognosefaktor. Lediglich bei einer Betrachtung des ER als diskrete Variable ergibt sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen hohem ER in fmol/mg Protein und langer Überlebenszeit ($p < 0.0001$).

5.4.1.2 Progesteronrezeptor

Wenn man die gleichen Berechnungen für den Progesteronrezeptor anstellt wie für den Östrogenrezeptor im Kap. 5.4.1.1, so ergibt sich bei einer Einteilung in 9 Gruppen ein $\text{Chi}^2=7,7$ mit einem p-Wert von 0,461.

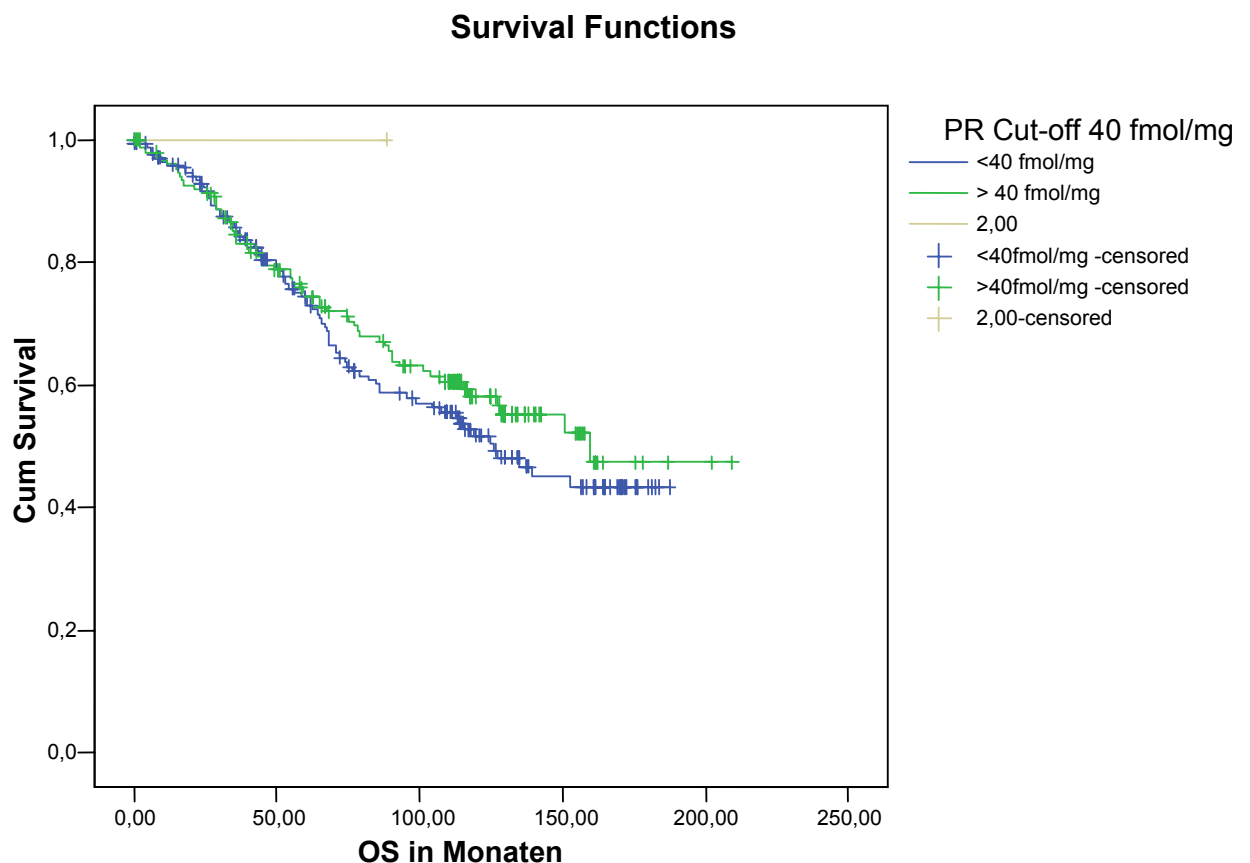


Abb. 17: Überlebensverteilung beim Cut-off 40 fmol/mg für den Progesteronrezeptor

Bei der Wahl des Cut-off Punkts bei 20 fmol/mg Protein für die Entscheidung progesteronrezeptornegativ oder progesteronrezeptorpositiv ergibt sich ein $\text{Chi}^2=2,0$ mit einem p-Wert von 0,159. Die Herabsetzung des Cut-off Punkts auf 15 fmol/mg Protein ändert an dieser Beurteilung nichts ($\text{Chi}^2=0,5$; $p=0,493$). Gleiches gilt bei Heraufsetzung des Cut-off Wertes auf 40 fmol/mg Protein. Bei einem Cut-off Punkt von 40 fmol/mg Protein ergibt sich ein $\text{Chi}^2= 0,9$ sowie ein p-Wert von 0,34. Lediglich bei der Auftragung des PR in fmol/mg Protein als

diskrete Variable gegen die Überlebenszeit ergibt sich ein hoch signifikanter p-Wert < 0.0001 .

So zeigt die Abb. 17, dass der biochemisch bestimmte PR-Wert bei einem Cut-off Punkt von 40 fmol/mg fast sechs Jahre keine prognostische Bedeutung hat. Zusammenfassend ergeben weder die biochemischen Auswerteverfahren des Östrogenrezeptors noch die des Progesteronrezeptors ein Zugewinn an Information hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit. Die biochemische Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors stratifiziert daher bei keinem der untersuchten Cut-off Werte zwischen Patienten mit gutem und schlechtem Überleben. Lediglich eine Betrachtung des Steroidrezeptors als diskrete Variable, die klinisch nicht aussagekräftig ist, ergibt einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen Östrogen- oder Progesteronrezeptor in fmol/mg Protein und der Überlebenszeit.

5.4.2 Das Kollektiv der immunhistochemisch ermittelten Steroidrezeptoren

5.4.2.1 Östrogenrezeptor als Prognosefaktor bei binärer versus Feinunterteilung

Es stellt sich hier die Frage, wo soll bei binärer Auswertung der Cut-off Punkt (Entscheidungspunkt) gesetzt werden, oder anders formuliert: Ab wann sollte ein primäres Mammakarzinom als östrogenrezeptorpositiv eingestuft werden? Die derzeit übliche Einteilung in einen Score mit den Elementen 0,1,2,3,4,6,8,9 und 12, ist die feinste Einteilung. Sie geht auf einen Vorschlag von Remmele und Stegner⁸⁹ zurück. Die IRS Werte 5, 7, 10 und 11 sind rechnerisch nicht möglich. Ein Histogramm der Score Verteilung in unserem Patientenkollektiv ist in Abb. 18 dargestellt. Es zeigt sich, dass der Anteil der östrogenrezeptorpositiven, primären Mammakarzinome sehr stark von dem Cut-off Wert abhängt. Die Häufigkeit von östrogenrezeptornegativen, primären Mammakarzinomen in unserem immunhistochemischen Kollektiv liegt bei 21,62%, wenn man den Cut-off Wert von ≥ 2 als Grenze zwischen Positivität und Negativität zugrunde legt.

Tab. 22: Östrogenrezeptorstatus im immunhistochemischen Kollektiv

ER-IRS	N	%	Cum. %
0	145	18,66	18,66
1	23	2,96	21,62
2	54	6,95	28,57
3	33	4,25	32,82
4	72	9,27	42,10
6	120	15,44	57,53
8	92	11,84	69,37
9	135	17,37	86,76
12	103	13,26	100,0

Graphische Darstellung der Östrogenverteilung in unserem immunhistochemischen Kollektiv wird in der Abb. 18 wiedergegeben.

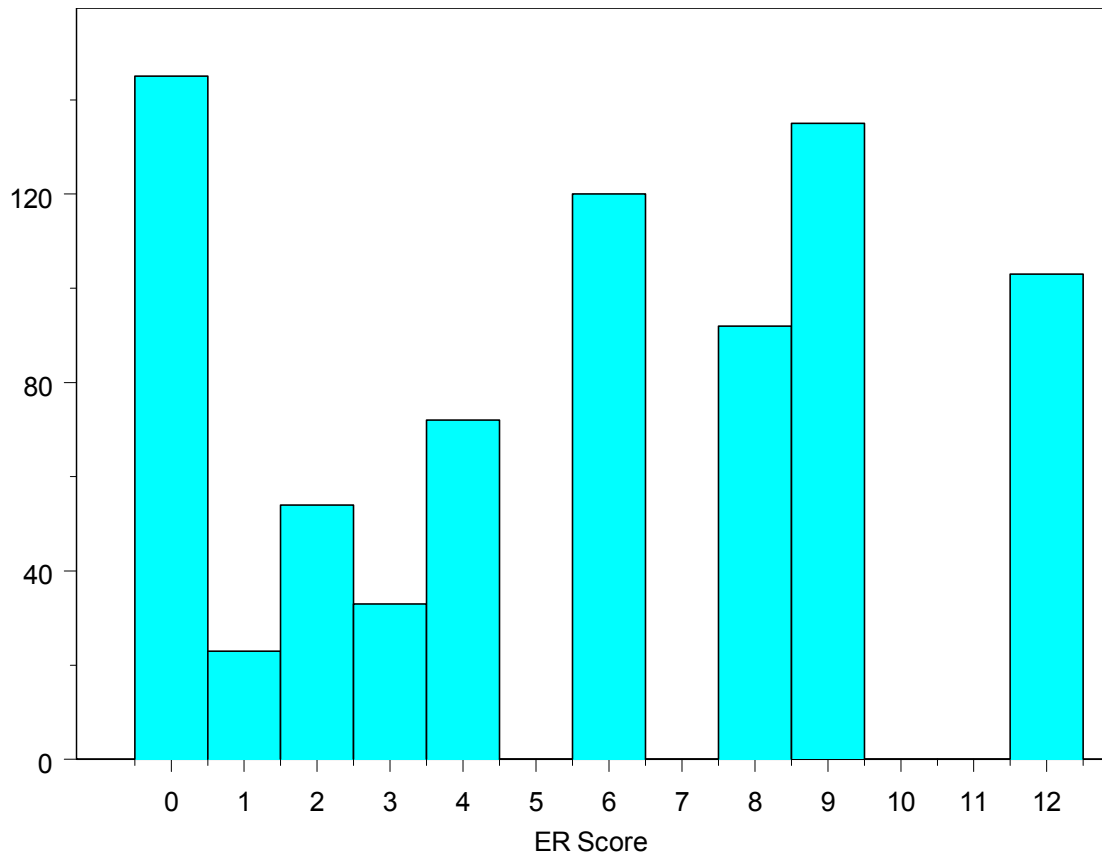


Abb. 18: Östrogenrezeptorstatus im Patientenkollektiv

Der Östrogenrezeptor scheint eine zweigipfelige Verteilung zu haben mit dem Maximum bei IRS 0 sowie bei 6 und 9.

Wenn man für alle möglichen Grenzziehungen die entsprechenden Kaplan Maier Kurven berechnet, so ergeben sich die Werte der

Tab. 23. In der folgenden Tabelle wird die prognostische Wertigkeit des ER bei variierenden Cut-off Punkten ausgewertet. In der ersten Spalte wurden alle neuen Kategorien zugelassen, bei allen restlichen wurden nur zwei Kategorien unterschieden.

Tab. 23: Vorhersage der Prognose bei Verwendung variabler Cut-off Punkte für den Östrogenrezeptor

Cut-off Wert Remmele Score	Negative Werte	Positive Werte	Chi ²	p	Breslow Test	p
	0-12		13,1	0,11	16,73	0,0330
1	0	1-12	8,2	0,004	11,84	0,006
2	0-1	2-12	4,2	0,04	7,12	0,0076
3	0-2	3-12	4,8	0,028	6,70	0,001
4	0-3	4-12	4,61	0,0329	5,92	0,015
6	0-4	6-12	3,8	0,05	5,86	0,016
8	0-6	8-12	1,7	0,193	3,05	0,081
9	0-8	9-12	0,3	0,608	0,56	0,456
12	0-9	12	0,9	0,348	0,63	0,426

Die Tab. 23 legt die Wahl des Cut-off Wertes bei IRS > 1 nahe, da hier der log-rank Wert ein Maximum und der p-Wert ein Minimum erreicht.

Die Empfehlung die Wahl des Cut-off Punktes bei 1, als Grenzwert für die Entscheidung zwischen ER- positivem und ER- negativem Mammakarzinom zu legen, steht im Einklang mit den Werten der Tab. 23, wobei nach diesen Werten auch noch Cut-off Punkte von 2 und 3 in Frage kommen.

Es zeigt sich in den beiden Kurven der Abb. 19, dass die primären Mammakarzinome mit positivem Östrogenrezeptorstatus zunächst deutlich besser laufen als die primären östrogenrezeptornegativen Mammakarzinome. Im Verlauf kommt es jedoch zu einer langsamen Angleichung der beiden Kurven, was sich wiederum sehr deutlich in den 10-Jahres-Überlebenszahlen dokumentieren lässt.

Survival Functions

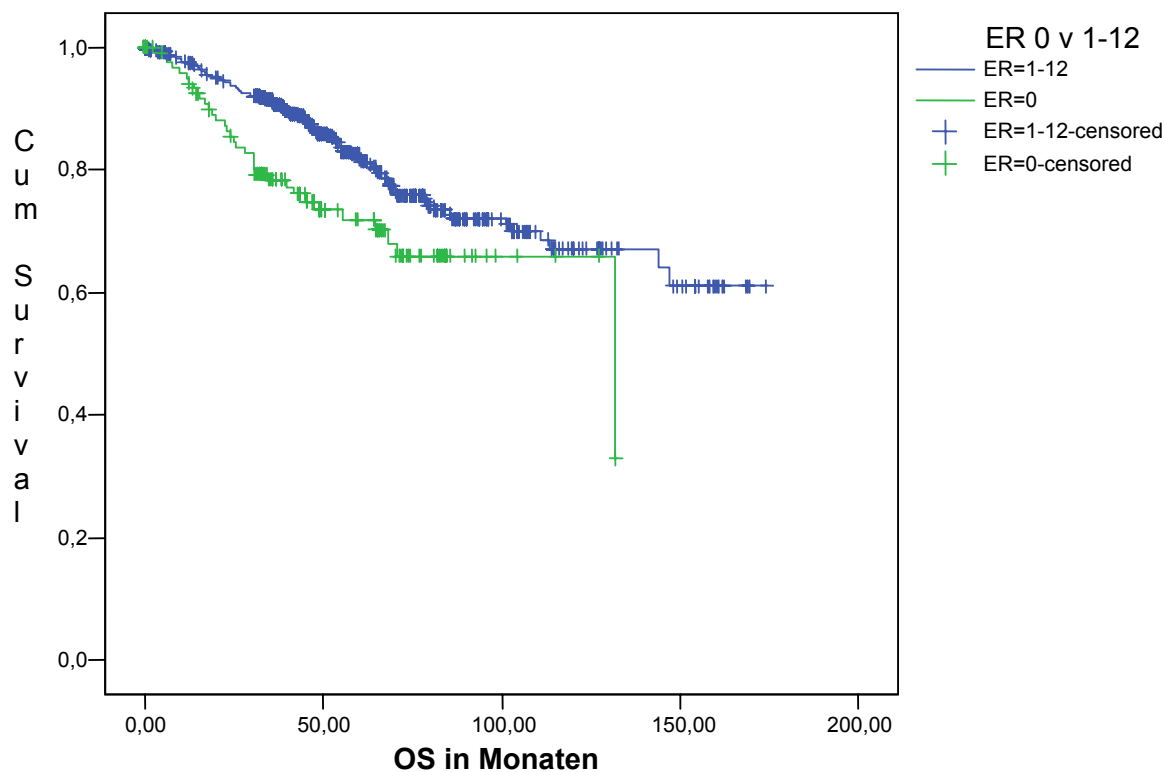


Abb. 19: Überlebensverteilung bei ER=0 versus ER=1-12

Die Tab. 24 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen dem Östrogenrezeptorstatus und der Überlebenswahrscheinlichkeit.

Tab. 24: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus

Nachbeobachtungszeit	Überlebenswahrscheinlichkeit in %		Differenz im Überleben (ER + zu ER-)
	ER – (Score 0-1)	ER+ (Score 2-12)	
1-Jahr	95,7	97,5	1,8
3-Jahre	81	91,3	10,3
5-Jahre	75,6	81,9	6,3
10-Jahre	67,1	65,1	-2,0

Der maximale prozentuale Vorteil bei Vergleich der östrogenrezeptornegativen und östrogenrezeptorpositiven primären, invasiven Mammakarzinome im Gesamtüberleben liegt bei 3 Jahren, wobei es nach 10 Jahren wieder zu einem Angleichen der Absterbekurven kommt. Demnach kann der Östrogenrezeptor, wenn er mit immunhistochemischen Methoden bestimmt wurde, als Prognosefaktor gewählt werden. Dies gilt jedoch nur bei bestimmten Cut-off Werten, sofern eine binäre Auswertung als negativ und positiv benutzt wird. Optimal wäre, soweit man den Östrogenrezeptor als Prognosefaktor betrachtet, ein Cut-off Punkt von 1, wobei auch der Cut-off Punkt von 2 (wie ihn der Stuttgarter OSP festgelegt hat) einen hohen Chi²-Wert ergibt.

5.4.2.2 Östrogenrezeptor als prognostischer Faktor bei einer 3-Gruppen-Einteilung

Da unsere Untersuchungen zeigen, dass eine Feinunterteilung des Östrogenrezeptors keinen informativen Zugewinn hinsichtlich der Prognose, in der Gegenüberstellung zu einer binären Einteilung erbringt, wurde auch der Fragestellung nachgegangen, ob eine Einteilung in 3 Gruppe eine bessere prognostische Vorhersage liefern würde. In Abb. 20 wird die Überlebensverteilung im Patientenkollektiv bei einer Unterteilung der Östrogenrezeptorexpression in folgende 3 Gruppen dargestellt:

- Gruppe mit niedriger oder fehlender Expression (IRS 0 - 1),
- Gruppe mit mäßiger Expression (IRS 2 - 6) und
- Gruppe mit hoher Expression (IRS 8 - 12).

So zeigt sich anhand der statistischen Parameter deutlich, dass hierdurch ein zusätzlicher Informationsgewinn nicht zu erzielen ist. Im Breslow-Test errechnet sich ein p-Wert von 0,023 und im Chi²-Test der p=0,105. Es sei hier nochmals darauf verwiesen, dass der über den Breslow Test errechnete p-Wert vor allem die frühen Unterschiede zwischen zwei Tumorphpopulationen erkennen lässt.

Survival Functions

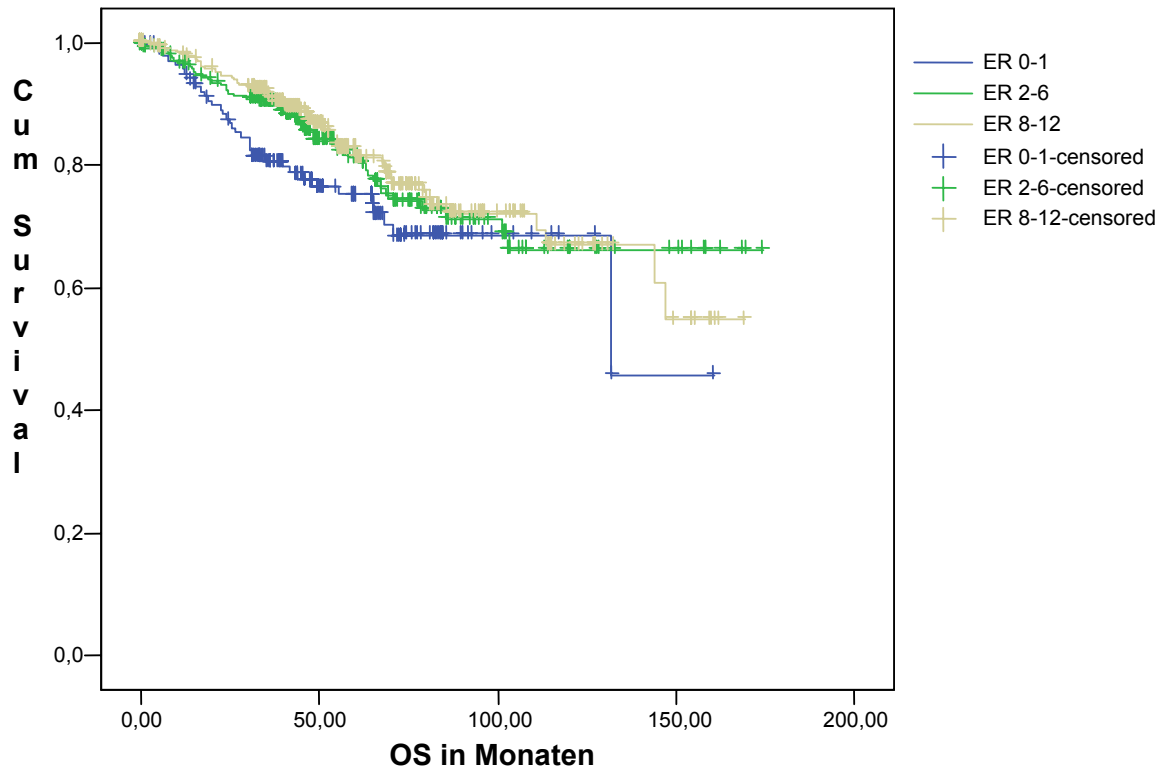


Abb. 20: Überlebensverteilung bei Unterteilung des ER in 3 Gruppen

Die Kurvenschar der Abb. 20 zeigt, dass die primären Mammakarzinome mit hoher und mäßiger Östrogenrezeptorexpression zunächst deutlich besser laufen, als die ER negativen Mammakarzinome. Ein Unterschied zwischen hoher und mittlerer Östrogenrezeptorexpression lässt sich dabei nicht feststellen. Im Verlauf der Beobachtung kommt es jedoch zu einer langsamen Angleichung der Kurven. Die Abnahme des Überlebensvorteils zu Gunsten der höheren Östrogenrezeptorexpression am Anfang der Erkrankung verliert sich am deutlichsten zwischen dem 70. und 100. Follow-up Monat.

5.4.2.3 Progesteronrezeptor als Prognosefaktor bei binärer versus Feinunterteilung

In gleicher Weise wie der Östrogenrezeptor, wurde auch der Progesteronrezeptor analysiert. Generell zeigte sich dabei eine wesentlich bessere Vorhersage der Prognose als bei dem Östrogenrezeptor. In Tab. 25 ist die IRS Verteilung des Progesteronrezeptors in unserem immunhistochemischen Kollektiv aufgeführt.

Tab. 25: Progesteronrezeptorstatus im immunhistochemischen Kollektiv

PR-IRS	N	%	Cum. %
<i>0</i>	179	23,22	23,22
<i>1</i>	31	4,02	27,24
<i>2</i>	67	8,69	35,98
<i>3</i>	32	4,15	40,08
<i>4</i>	85	11,02	51,10
<i>6</i>	127	16,47	67,70
<i>8</i>	41	5,32	72,89
<i>9</i>	108	14,01	86,90
<i>12</i>	101	13,90	100,0

Die graphische Darstellung der tabellarischen Werte wird im folgenden Histogramm wiedergegeben. Die Verteilung des Progesteronrezeptors in dem Studienkollektiv deckt sich gut mit der des Östrogenrezeptors. Auch hier ist eine zweipfelige Verteilung anzunehmen mit dem Minimum bei dem Progesteronscore von 1 und 3 sowie zwei Maxima, bei einem Score von 0 und 6 (siehe Abb. 21).

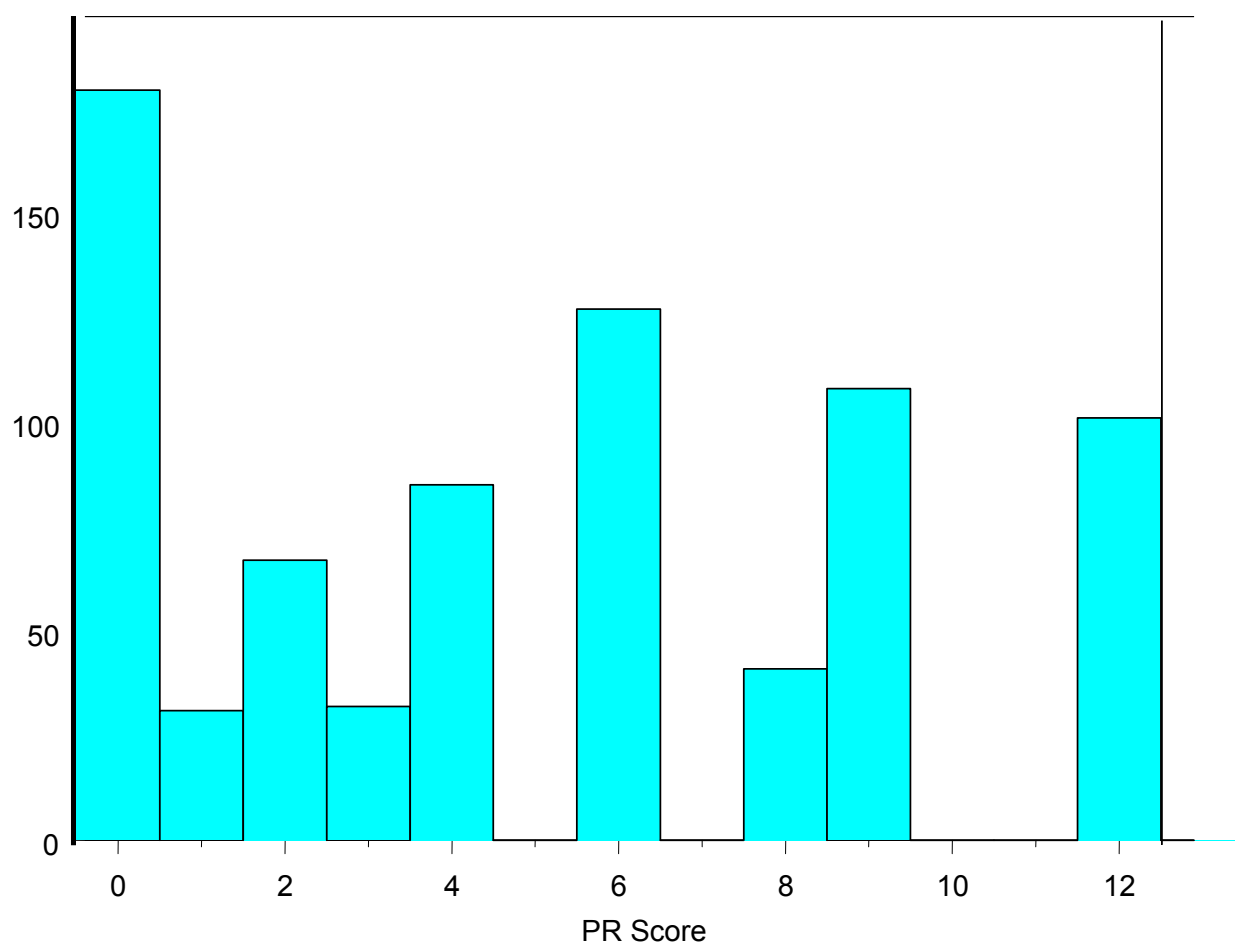


Abb. 21: Progesteronrezeptorstatus im immunhistochemischen Kollektiv

Die Häufigkeit von PR-positiven primären Mammakarzinomen in unserem immunhistochemischen Kollektiv liegt bei 72,76%, wenn man den Cut-off Wert von ≥ 2 zugrunde legt.

Berechnet man für alle möglichen Grenzziehungen die entsprechenden Kaplan-Meier Kurven, so ergeben sich die Werte der Tab. 26. In der ersten Spalte wurden alle neuen Kategorien zugelassen, bei allen restlichen wurden nur zwei Kategorien unterschieden. Den größten Chi²-Wert erreicht der Cut-off Punkt von 3 (Chi²=16,3), wobei auch die Cut-off Punkte 2, 4 und 6 mit hohen Chi²-Werten und niedrigen p-Werten günstige Eigenschaften als Trennwert zwischen PR-positiven und PR-negativen Mammakarzinomen aufweisen.

Tab. 26: Vorhersage der Prognose bei Verwendung variierender Cut-off Werte für den Progesteronrezeptor

Cut-off Wert Remmele Score	Negative Werte	Positive Werte	Chi²	p	Breslow Test	p
	0-12		31,3	0,00012	29,12	0,0003
1	0	1-12	3,5	0,062	7,83	0,0051
2	0-1	2-12	8,8	0,00302	15,78	0,0001
3	0-2	3-12	16,3	<0,0001	19,68	<0,0001
4	0-3	4-12	9,5	0,002	12,81	0,0003
6	0-4	6-12	10,4	0,0013	13,40	0,0003
8	0-6	8-12	3,1	0,077	6,26	0,0123
9	0-8	9-12	5,2	0,0212	8,37	0,0038
12	0-9	12	7,9	0,0049	6,46	0,0111

Unabhängig davon, wo man den Cut-off Punkt setzt, ist jeder denkbare Cut-off Punkt anhand des Breslow-Tests ein univariater Prognosefaktor für das kurzfristige Überleben. Für das langfristige Überleben sind anhand der Werte des Chi²-Tests, außer den Cut-off Punkten 1 und 8, alle anderen denkbaren Cut-off Punkte als univariate Prognosefaktoren anzusehen. Erneut zeigt sich, dass die Überlebensvorteile in den ersten Behandlungsjahren sehr viel deutlicher sind als im späteren Krankheitsverlauf. Dies spiegelt sich besonders im Breslow-Test wieder.

Anders als beim Östrogenrezeptor ist der Benefit eines PR positiven Status beim primären Mammakarzinom auch noch im Langzeit-Follow-up nachzuweisen. Jedoch ist auch hier eine Annäherung der Kurvenschar nach 10 Jahren zu beobachten.

Die 1-, 3-, 5- und 10-Jahreswahrscheinlichkeiten, die sich aus der Unterteilung PR negativ versus PR positiv ergeben, sind in der Tab. 27 zu einer Übersicht zusammengefasst.

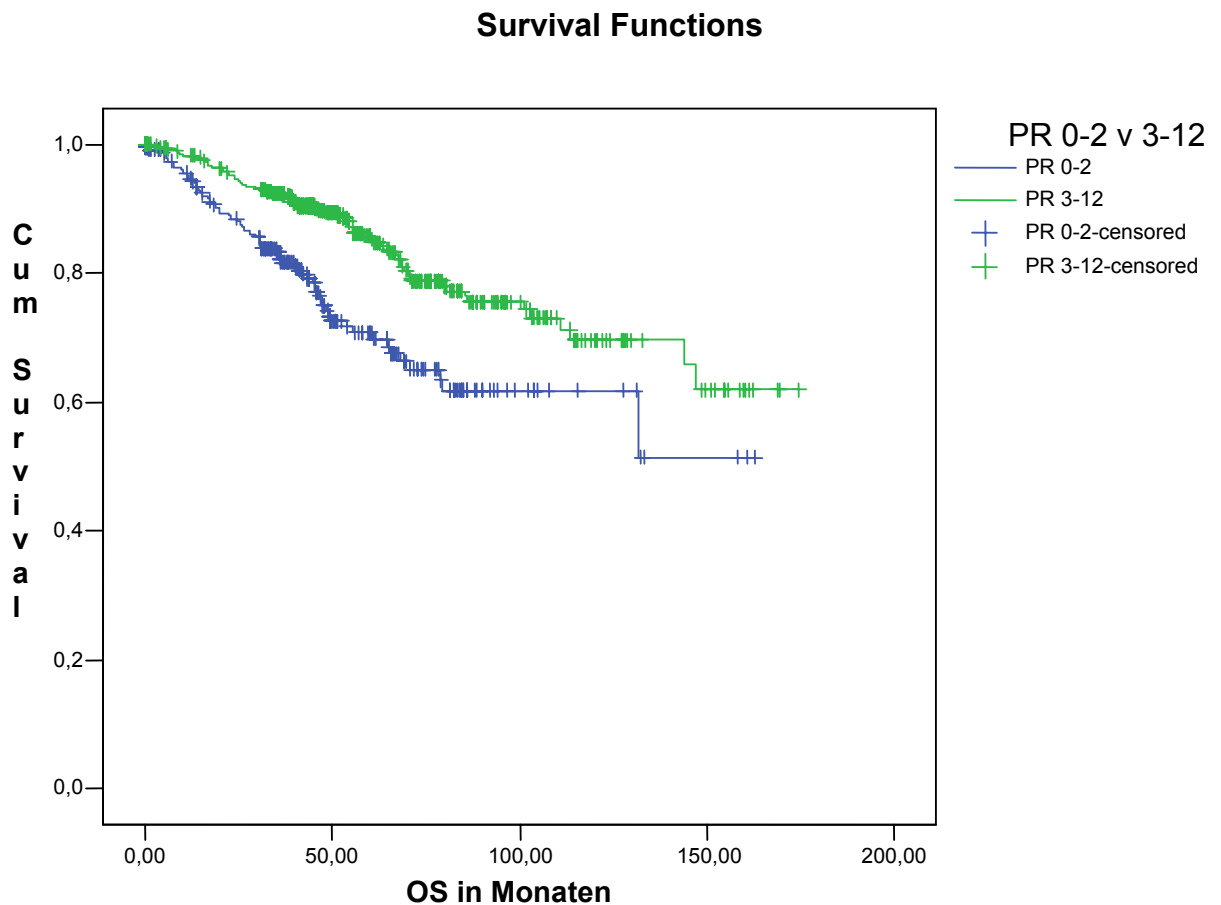


Abb. 22: Überlebensverteilung bei PR= 0-2 versus PR= 3-12

Der deutlichste Überlebensunterschied zwischen den PR positiven und PR negativen Primärtumoren zeigte sich bei der Wahl des Cut-off Punktes 3. Graphisch wird das in den Verlaufskurven der Abb. 22 wiedergegeben. Besonders bemerkenswert ist, wie die Werte der Tab. 27 zeigen, dass sich der Unterschied zwischen den Krankheitsverläufen mit zunehmender Krankheitsdauer nicht verliert, was wiederum für den Östrogenrezeptor der Fall ist. Daraus ergibt sich, dass der Progesteronrezeptor ein verlässlicher Prognosefaktor ist.

Tab. 27: Die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom PR-Status

Nachbeobachtungszeit	Überlebenswahrscheinlichkeit in %		Differenz im Überleben (PR + zu PR-)
	PR – (Score 0-1)	PR+ (Score 2-12)	
1-Jahr	95,4	97,9	2,5%
3-Jahre	81,1	92,1	11,0%
5-Jahre	71,8	83,6	11,8%
10-Jahre	65,7	66,7	1,0%

Auffallend an den Werten der Tab. 27 ist, dass sich der Unterschied zwischen den Krankheitsverläufen mit zunehmender Krankheitsdauer nicht verliert, was wiederum für den Östrogenrezeptor der Fall war. Auch daraus lässt sich ableiten, dass der Progesteronrezeptor ein verlässlicher Prognosefaktor ist.

An dieser Stelle soll noch hingewiesen werden, dass die Abb. 22 und Tab. 27 geringfügig unterschiedliche Cut-off Werte aufweisen, und somit eine direkte Vergleichbarkeit nicht möglich ist.

In der Gruppe der PR negativen Fälle ist die 10-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit nur eingeschränkt verwertbar, da die Patientinnen „at risk“ nach 70 Monaten „Follow-up“ sehr stark abfallen.

5.4.2.4 Progesteronrezeptor als prognostischer Faktor bei einer 3-Gruppen-Einteilung

In Analogie zu Kap. 5.4.2.2 wurde hier der Frage nachgegangen, ob eine Einteilung des Progesteronrezeptors in 3 Gruppen:

- Gruppe mit niedriger oder fehlender Expression (IRS 0 - 1),
- Gruppe mit mäßiger Expression (IRS 2 - 6) und
- Gruppe mit hoher Expression (IRS 8 - 12),

eine bessere prognostische Vorhersage erbringen würde.

Beim Progesteronrezeptor zeigt die Einteilung in 3 Gruppen eindeutig, sowohl im Breslow-Test als auch im Chi²-Test, dass ein signifikanter Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression besteht (p=0,0002 im Breslow-Test und p=0,0491 im Chi²-Test).

Die Betrachtung der Abb. 23 zeigt aber deutlich, dass die Unterscheidung in fehlende bis geringe Expression und eine mäßige Expression keinen zusätzlichen Informationswert erbringt.

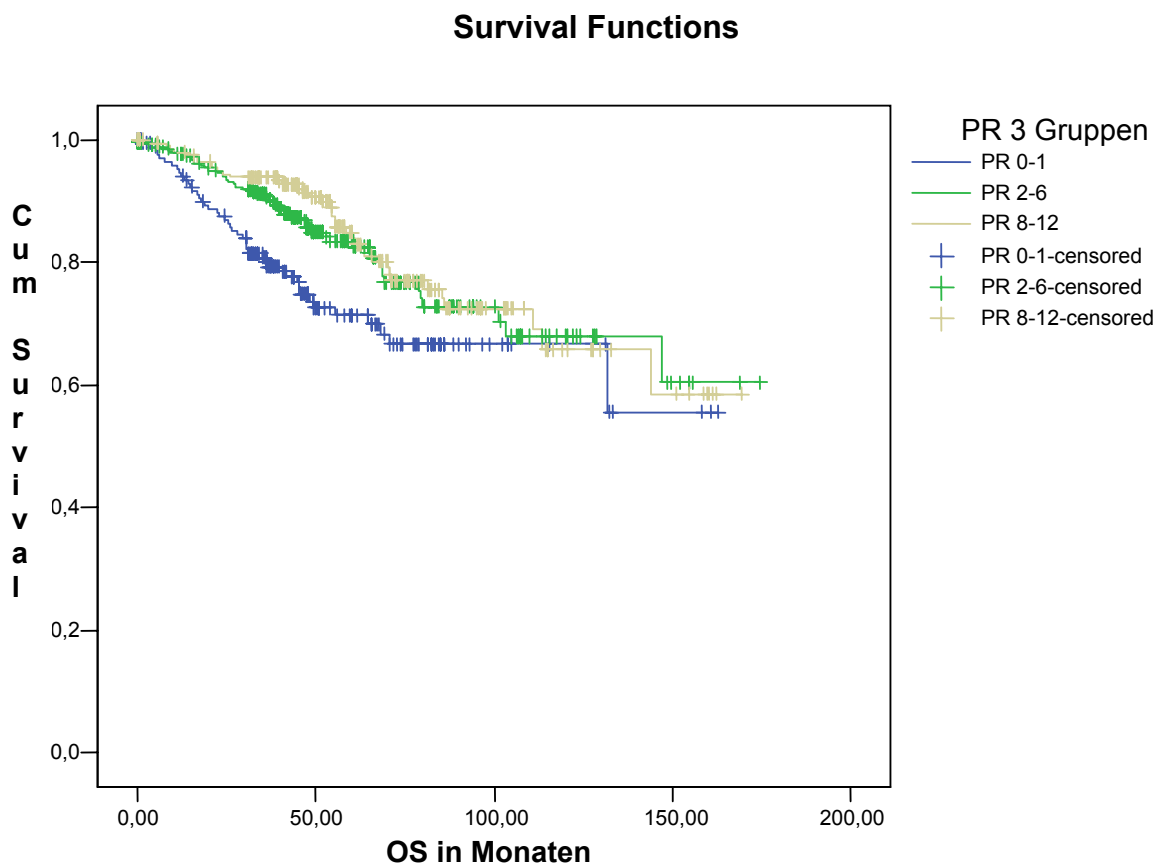


Abb. 23: Die Überlebensverteilung bei Unterteilung des PR in 3 Gruppen

Die Kurvenschar der Abb. 23 zeigt, dass die primären Mammakarzinome mit hoher und mäßiger Progesteronrezeptorexpression zunächst deutlich besser laufen als die primären PR negativen Mammakarzinome. Wie beim Östrogenrezeptor auch, kommt es beim Progesteronrezeptor im Verlauf der Erkrankung zu einer Annäherung der beiden Kurven, allerdings verlaufen PR

negativen Mammakarzinome auch nach 5 Jahren noch schlechter als die PR positiven.

5.4.2.5 Kombinationsanalyse zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptor

Wenn man zunächst die univariate Bedeutung analysiert, so ergibt sich bei einer 3-Gruppen-Einteilung:

- beide Rezeptoren negativ (ER-/PR-),
- einer der Rezeptoren negativ/positiv (ER+/PR- oder ER-/PR+) und
- beide Rezeptoren positiv (ER+/PR+),

dass eine eindeutige Vorhersage des Überlebens mit der Kombination beider Steroidrezeptoren möglich ist. Dieser Unterschied ist signifikant: Breslow-Wert 13,45 mit $p < 0,0012$; Chi²-Wert von 4,9 mit $p = 0,082$. Dennoch muss gesagt werden, dass dieser Signifikanzunterschied grenzwertig und nur im Breslow-Test zu zeigen ist.

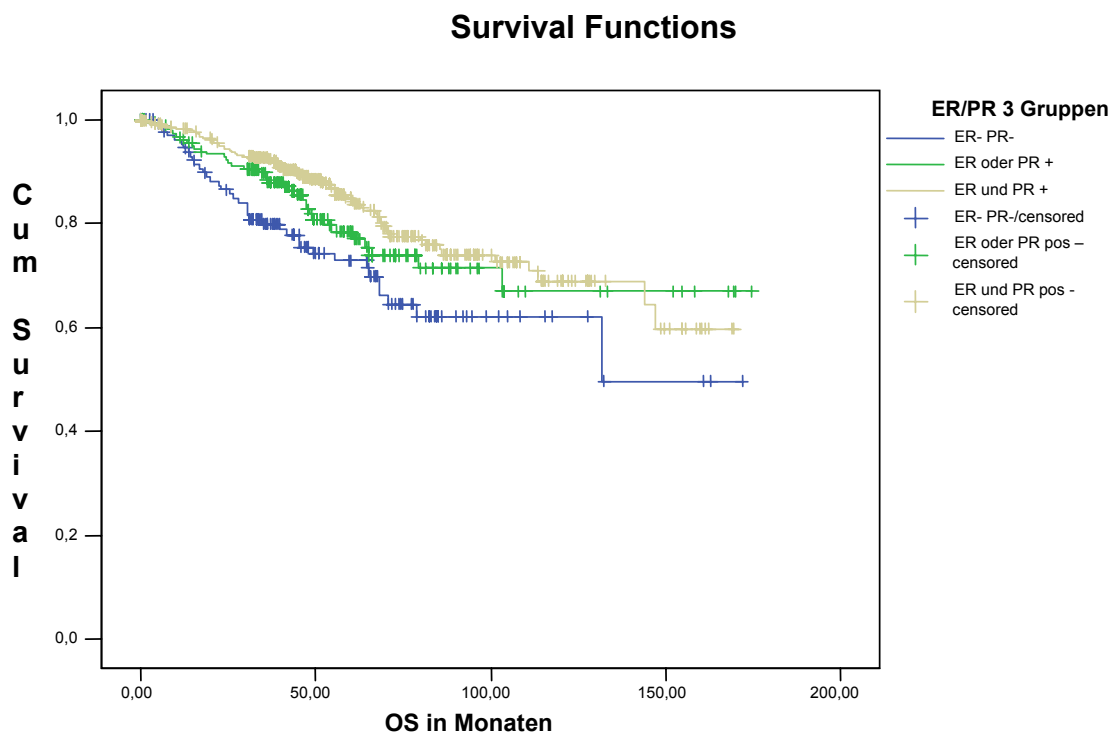


Abb. 24: OS bei Einteilung in 3 Gruppen mit Kombination beider Rezeptoren

Die Kurvenschar der Abb. 24 zeigt ein besseres Überleben in der Gruppe beider positiven Rezeptoren im Vergleich zur Gruppe beider negativen Rezeptoren. Die Überlebenskurve der beiden positiven Rezeptoren und die Überlebenskurve mit nur einem positiven Rezeptor verlaufen relativ dicht beieinander. Im Verlauf kommt es zur Angleichung beider Kurven.

Die Überlebensanalyse bei einer Einteilung in 4 Gruppen mit folgenden Rezeptorkombinationen:

- ER+/PR+
- ER+/PR-
- ER-/PR+
- ER-/PR-,

ergibt einen Chi²-Wert von 11 mit p=0,00115.

Die Hinzunahme beider Einteilungen in das Cox-Modell ergibt für die Einteilung in 3 Gruppen einen Wald-Test von 2,543 (p=0,011) und damit einen signifikanten Beitrag zur Vorhersage des Gesamtüberlebens. Bei einer Einteilung in 4 Gruppen beläuft sich der p-Wert auf 0,0072. Die Gruppe, welcher jeweils eine schlechte Prognose vorhergesagt wird, ist erwartungsgemäß die ER-/PR-Gruppe. Folgende Tabelle verdeutlicht diese Zusammenhänge.

Tab. 28: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus

	Überleben in %			
Gruppeneinteilung	1 Jahr	3 Jahre	5 Jahre	10 Jahre
<i>ER+/PR+</i>	97,4	90	81,5	62,7
<i>ER+/PR-</i>	96,2	90,4	76,6	54,7
<i>ER-/PR+</i>	97,7	86,8	84,5	66,6
<i>ER-/PR-</i>	95	79,5	70,3	58,8

Bei Betrachtung der Tab. 28 zeigen sich nach einem Jahr Follow-up so gut wie keine Überlebensunterschiede zwischen den 4 Gruppen. Nach drei Jahren liegt der Überlebensvorteil der Gruppe mit beiden positiven Rezeptoren gegenüber der Gruppe mit beiden negativen Rezeptoren bei 10,5%. Im gleichen Zeitraum hat die Gruppe mit positivem Östrogen- und negativem Progesteronrezeptor prozentual gesehen ein besseres Überleben als die vice versa Kombination (3,6%).

Nach 5 Jahren bleibt der Überlebensvorteil der Gruppe mit positiven Rezeptoren zur Gruppe mit negativen Rezeptoren stabil (11,2%). Auffallend ist jedoch, dass nach 5 Jahren die Gruppe mit negativem Östrogen- und positivem Progesteronrezeptor prozentual gesehen ein besseres Überleben hat als die Gruppe mit positivem Östrogen- und negativem Progesteronrezeptor. Dieser Vorteil liegt nach 5 Jahren bei 7,9% und wird nach 10 Beobachtungsjahren noch deutlicher mit einem Überlebensvorteil von 11,9% zu Gunsten der Gruppe mit der Kombination ER-/PR+.

Nach 10 Follow-up Jahren ist die Differenz im Überleben zwischen den Gruppen mit positiven und negativen Rezeptoren kleiner geworden. Während sie 5 Jahren zuvor 11,2% betrug, liegt sie nach 10 Beobachtungsjahren bei immerhin 3,9%.

5.5 Steroidrezeptor als Therapieprädiktor

Ein prädiktiver Faktor ist jeder Messwert, der mit dem Ansprechen auf eine verabreichte Therapie korreliert. Von dieser Definition ausgehend kann die Untersuchung so zusammenfasst werden: Wo muss der Cut-off Punkt am optimalsten liegen, um daraus die Information zu schöpfen, welche Patientinnen im Kollektiv einen Benefit von der endokrinen Therapie haben können? Da in dieser Studienarbeit die endokrine Therapie mit Tamoxifen durchgeführt wurde stellte sich somit die Frage, wem die Tamoxifentherapie hilft oder anders ausgedrückt, wie die Non-response Rate bei Tamoxifen in Abhängigkeit vom Remmele Score ist? Gleichzeitig kam die Frage auf, ob es bei der Tamoxifentherapie (adjuvant und palliativ) einen Unterschied in der Überlebensvorhersage gibt, wenn der Steroidrezeptorstatus als binäre Einteilung; positiv/negativ (bei einer Feinunterteilung IRS 0-12) bewertet wurde, im Vergleich zu einer 3 Gruppen Einteilung; Gruppe mit niedriger oder fehlender Expression, mit mäßiger Expression und mit hoher Steroidrezeptorexpression. Als Bezugskollektiv für die Berechnung der Prädiktion wurden die 286 Patientinnen des immunhistochemischen Kollektivs, welche eine Tamoxifentherapie bekommen haben (siehe den Aufbau des Studienkollektivs, Abb. 3), genommen.

5.5.1 Östrogenrezeptor als Therapieprädiktor bei einer binären Einteilung

Als Untersuchungsziel wollten wir zeigen, ob die Wahrscheinlichkeit des EFS (Event= lokales Rezidiv, Fernmetastase oder Tod) zwingend von der Höhe der Rezeptorexpression abhängt. Die wenigen Fälle der östrogenrezeptornegativen Mammakarzinome, die entgegen der Konsensusempfehlungen mit Tamoxifen behandelt wurden, sind auch in die Berechnung eingeschlossen worden. Der detaillierte Sachverhalt ist in Tab. 29 dargestellt. Nimmt man als „event“ die Metastase, das Rezidiv oder den Tod, so lag das Therapieversagen im Tamoxifenkollektiv im Mittel bei 29%.

Tab. 29: Häufigkeit des „events“ (Rezidiv, Metastase oder Tod) bei primärem Mammakarzinom unter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (N=286)

Remmele Score für den ER	Gesamtzahl	Absolute Häufigkeit des Events; E/NE (E= Event NE= kein Event)	Häufigkeit des Events	Kommentar
0	26	12/14	46,2%	Hätten nicht mit Tamoxifen behandelt werden sollen
1	8	1/7	12,5%	Hätten nicht mit Tamoxifen behandelt werden sollen
2	16	1/15	6,3%	
3	10	4/6	40,0%	
4	26	6/20	22,2%	
6	51	16/35	31,9%	
8	39	8/31	20,5%	
9	65	21/43	32,8%	
12	43	14/28	32,6%	

Wenn man die gleichen Zahlen gegen die Wahrscheinlichkeit des Todes aufträgt, ergeben sich ähnliche Werte. Für das Kollektiv lag die Häufigkeit des Todes bei einer Tamoxifentherapie bei 19,93%. Eine detaillierte Darstellung hierzu ist Tab. 30 zu entnehmen.

Die Score-Werte 0 und 1 sind auf Fehlindikationen einer Tamoxifentherapie zurückzuführen oder entsprachen dem Wunsch der Patientin zur Therapie bei fehlender Alternative. Zum Teil sind in dieser Subgruppe die Patientinnen vertreten, denen bei negativem Östrogenrezeptorstatus aber positivem Progesteronrezeptor eine endokrine Therapie empfohlen wurde.

Tab. 30: Häufigkeit des Todes bei primären Mammakarzinomen unter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (N=286)

Remmele Score für den ER	Gesamtzahl	Absolute Häufigkeit des Todes; T/NT (T= Tod NT= kein Tod)	Häufigkeit des Todes	Kommentar
0	26	10/16	38,5%	Hätten nicht mit Tamoxifen behandelt werden sollen
1	8	0/8	0%	Hätten nicht mit Tamoxifen behandelt werden sollen
2	16	0/16	0%	
3	10	1/9	10,0%	
4	26	5/21	19,2%	
6	51	9/42	17,7%	
8	39	5/34	12,8%	
9	65	15/50	23,1%	
12	43	12/30	28,6%	

Zusammenfassend ist die vergleichende tabellarische Darstellung (Tab. 29, Tab. 30) des „events“ oder des Todes in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus nicht gut geeignet, um einen eventuellen therapeutischen Nutzen einer Tamoxifentherapie in Abhängigkeit von der Höhe des Östrogenrezeptors zu belegen, soweit dieser nach dem Remmele Score gemessen wird.

Dagegen zeigt sich, dass eine binäre Einteilung mit einem Cut-off Punkt um 2 recht gut die Fälle mit geringer Sterbewahrscheinlichkeit aufdeckt. Etwas merkwürdig ist allerdings, dass bei hoher Östrogenrezeptorexpression die Sterbewahrscheinlichkeit wieder ansteigt (Tab. 30). Die Antwort, welche aus unseren Untersuchungen hervorgeht deutet daraufhin, dass die Wahrscheinlichkeit des EFS (Event= lokales Rezidiv, Fernmetastase oder Tod)

nicht unbedingt von der Höhe der Rezeptorexpression abhängt. Die wenigen Fälle der östrogenrezeptornegativen Mammakarzinome, die entgegen der Konsensusempfehlungen mit Tamoxifen behandelt wurden, weichen davon etwas nach oben ab. Das Signifikanzniveau wird aber nicht erreicht.

Tab. 31: Östrogenrezeptor als Therapieprädiktor gemessen am 5-Jahres EFS (Tod, Fernmetastase oder Lokalrezidiv) in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie

Cut-off Punkt (negativ versus positiv)	EFS im ER <u>negativen</u> Kollektiv	EFS im ER <u>positiven</u> Kollektiv	Chi²	p
0,1,2,3,4,6,8,9,12			15,8	0,045
1 (0 versus 1-12)	50,3%	77,5%	10,7	0,0011
2 (0-1 versus 2-12)	58,6%	77,3%	5,1	0,0241
3 (0-2 versus 3-12)	69,8%	76,1%	0,8	0,37
4 (0-3 versus 4-12)	69,3%	76,7%	2,1	0,15
6 (0-4 versus 6-12)	73,3%	75,8%	0,7	0,388
8 (0-6 versus 8-12)	73,8%	76,2%	0,6	0,451
9 (0-8 versus 9-12)	75,7%	74,3%	0	0,864
12 (0-9 versus 12)	74,7%	76,6%	0	0,816

Die Tab. 31 zeigt das prozentuale Gesamtüberleben unter einer Tamoxifentherapie in Abhängigkeit davon, wo die Cut-off Trenngrenze zwischen positiv und negativ gesetzt wurde. In der ersten Spalte der Tab. 31 wurden alle neuen Kategorien zugelassen, bei allen restlichen wurden nur zwei Kategorien unterschieden.

So zeigt sich der deutliche Überlebensunterschied im Tamoxifenkollektiv mit einem hohen Chi²-Wert bei dem Cut-off Punkt 1, mit einem prozentualen Vorteil

im EFS von 27,2% zu Gunsten der Gruppe mit $ER \geq 1$. Bei der Trenngrenze IRS 2 besteht immer noch ein relativ hoher Überlebensunterschied (18,7%) und das Signifikanzniveau wird auch hier erreicht ($p=0,0241$). Die Cut-off Punkte 3, 4, 6 und 8 erbringen keinen Überlebensvorteil hinsichtlich der Prädiktion einer Tamoxifentherapie. Bei den Cut-off Punkten 9 und 12 wird die statistische Relevanz ebenfalls nicht erreicht.

Tab. 32: ER und das 5-Jahres Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Wahl des Cut-off Punkts in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie

Cut-off Punkt (negativ versus positiv)	OS in ER <u>negativem</u> Kollektiv %	OS in ER <u>positivem</u> Kollektiv %	Chi²	p
0,1,2,3,4,6,8,9,12			17,2	0,028
1 (0 versus 1-12)	55,3	85,3	10,2	0,00142
2 (0-1 versus 2-12)	67,1	84,4	3,6	0,057
3 (0-2 versus 3-12)	77,7	83,8	0,3	0,583
4 (0-3 versus 4-12)	79,2	83,7	0,1	0,754
6 (0-4 versus 6-12)	82,2	82,9	0	0,861
8 (0-6 versus 8-12)	83,3	80,9	0	0,854
9 (0-8 versus 9-12)	84,1	77,3	0	0,415
12 (0-9 versus 12)	83,8	75,5	2,2	0,138

In der Tab. 32 wurde der Östrogenrezeptor als Prädiktor des Therapieerfolgs, gemessen an dem Gesamtüberleben nach 5 Jahren, dargelegt. Auch hier zeigt sich der Cut-off Punkt 1, mit höchstem Chi²-Wert und p Minimum, als optimale

Trennsetzung. Beim Cut-off Punkt 2 wird die statistische Relevanz im Gesamtüberleben knapp verpasst ($p=0,057$).

Es zeigt sich aus der Tab. 33, dass im Tamoxifenkollektiv die 3- und 5-Jahres Überlebensrate und damit das Therapieansprechen gut durch die Cut-off Punkte 1 und 2 vorhergesagt werden kann. Alle anderen Cut-off Punkte sind dafür nicht geeignet, wie die p-Werte der Tab. 31 zeigen.

Tab. 33: 3- und 5-Jahres Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Cut-off Punkt für den ER

Cut-off (negativ versus positiv)	3-Jahres Überleben		5-Jahres Überleben	
	<i>ER neg</i>	<i>ER pos</i>	<i>ER neg</i>	<i>ER pos</i>
1 <i>(0 versus 1-12)</i>	67,00%	93,40%	55,30%	85,3%
2 <i>(0-1 versus 2-12)</i>	75,20%	93,20%	67,1%	84,4%
3 <i>(0-2 versus 3-12)</i>	83,40%	92,70%	77,7%	83,8%
4 <i>(0-3 versus 4-12)</i>	86,3%	92,3%	79,2%	83,7%
6 <i>(0-4 versus 6-12)</i>	88,9%	91,9%	82,2%	82,9%
8 <i>(0-6 versus 8-12)</i>	90,0%	91,9%	83,3%	80,9%
9 <i>(0-8 versus 9-12)</i>	92,2%	88,9%	84,1%	77,3%
12 <i>(0-9 versus 12)</i>	91,6%	87,3%	83,8%	75,5%

Der höchste prozentuale Überlebensbenefit nach 3 und 5 Follow-up Jahren wird erzielt bei dem Cut-off Punkt von 1 mit 26,4% Überlebensvorteil nach 3, respektive 30,0% nach 5 Jahren. Die Trennsetzung zwischen Negativität und Positivität bei dem Cut-off Punkt 2 zeigt ebenfalls ein besseres Überleben (etwa 18%) der Gruppe mit ER-IRS: 2-12 im Vergleich zu Gruppe mit ER-IRS: 0-1. Somit zeigt sich, dass die Cut-off Werte von 1 und 2 als optimal für die Vorhersage eines möglichen Therapieversagens erscheinen.

5.5.2 Östrogenrezeptor als prädiktiver Faktor bei einer 3-Gruppen-Einteilung

Da unsere Untersuchungen gezeigt haben, dass die Feinunterteilung des Östrogenrezeptors keine zusätzliche prädiktive Information über eine binäre Einteilung des Östrogenrezeptors bringt, wurde der Fragestellung nachgegangen, ob eine Einteilung in 3 Gruppen eine bessere Vorhersage für die Tamoxifenprädiktion erbringen würde als eine rein binäre. Im Patientenkollektiv wurde die Unterteilung der Östrogenrezeptorexpression in 3 Gruppen wie folgt unternommen:

- Gruppe mit niedriger oder fehlender Expression (IRS 0 - 1),
- Gruppe mit mäßiger Expression (IRS 2 - 6) und
- Gruppe mit hoher Expression (IRS 8 - 12).

Auch die letztlich entscheidende Frage, ob die Prädiktion des Therapieversagens bzw. des Todes unter einer Tamoxifentherapie vorhergesagt werden kann, konnte in unserem Datensatz durch eine Einteilung in 3 anstatt in 2 Gruppen nicht verbessert werden. Bei einer Darstellung des „events“ (Tod und jede Art von Rezidiv) in Abhängigkeit der Östrogengruppeneinteilung sowie einer gesicherten Tamoxifentherapie (adjuvant oder palliativ), ergab sich das nachfolgende tabellarische Bild (Tab. 34).

Tab. 34: „Event“ bei gesicherter Tamoxifentherapie

ER Score	Event	Kein Event	Wahrscheinlichkeit eines Events in %	N
0,1	13	21	38,2	34
2,3,4,6	27	76	26,2	103
8,9,12	43	104	29,3	147

Es lässt sich mit Hilfe der Tab. 34 zeigen, dass eine signifikante Prädiktion des Therapieansprechens von Tamoxifen durch die Östrogenrezeptordichte nicht möglich ist, jedoch eine geringe, nicht signifikante Reduktion der

Rezidivwahrscheinlichkeit eintritt, wenn man die Gruppe mit mittlerer gegen die Gruppe mit hoher Östrogenrezeptorexpression vergleicht. Bei einem Chi²-Wert von 5,7521 wird die Signifikanzgrenze von p=0,05 knapp verfehlt (p=0,0711). Wenn als „event“ nur der Tod betrachtet wird, ergibt sich bei einer Einteilung des Östrogenrezeptors in 3 Gruppen der Chi²-Wert von 4,5 mit entsprechendem p-Wert von 0,105.

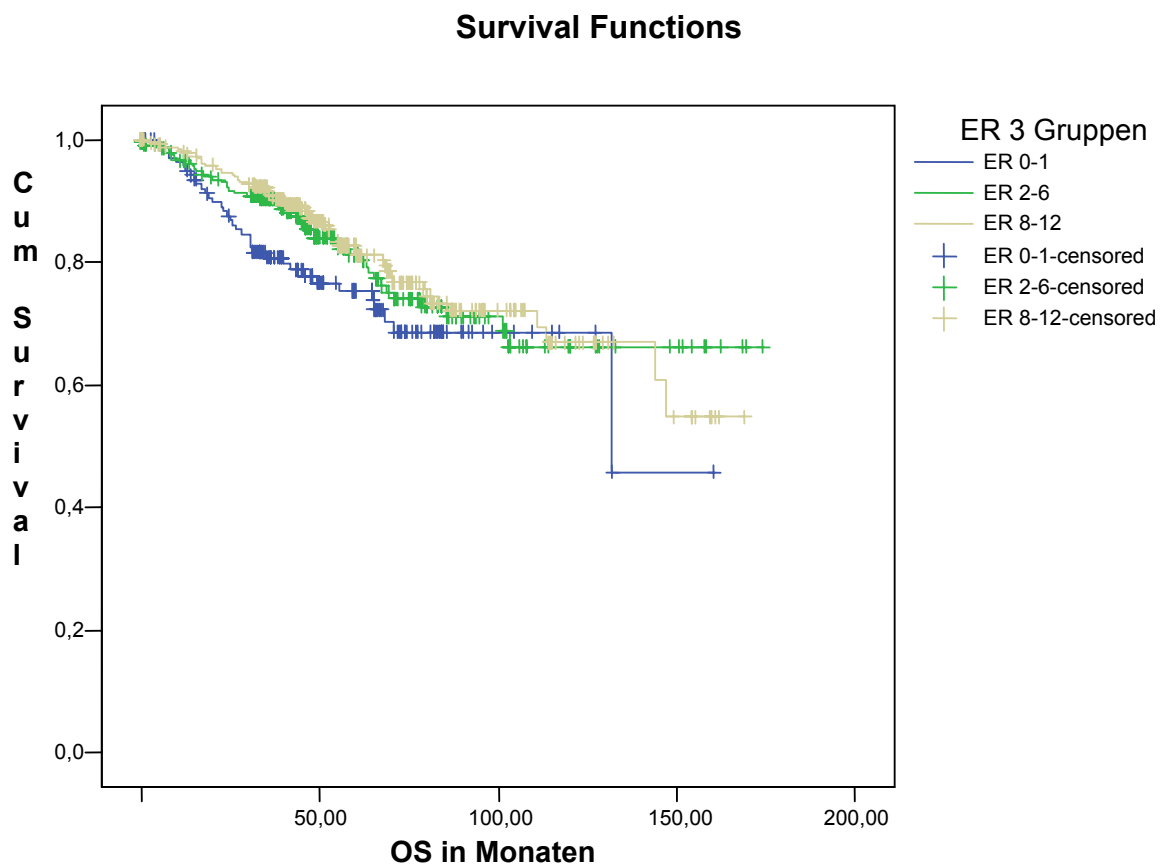


Abb. 25: Überlebensverteilung bei Unterteilung des ER in 3 Gruppen

In der Abb. 25 zeigt sich deutlich, dass eine Unterteilung des Östrogenrezeptors in 3 Gruppen keine wesentlichen Überlebensvorteile zwischen einzelnen Gruppen aufweist. Die Überlebenskurven der Gruppe mit hoher sowie der Gruppe mit mäßiger Östrogenrezeptorexpression verlaufen fast synchron und der Überlebensvorteil, den sie gegenüber der Gruppe mit niedriger bis fehlender Östrogenrezeptorexpression hatten, wird nach ca. 50 Monaten aufgeholt.

5.5.3 Progesteronrezeptoren als Therapieprädiktor bei einer binären Einteilung

In diesem Kapitel wird in Anlehnung an das Kapitel 5.5.1 der Fragestellung nachgegangen, ob die Wahrscheinlichkeit des EFS oder des OS von der Höhe der Progesteronrezeptorexpression abhängig ist. Die Häufigkeit des „events“ ist in Tab. 35 dargestellt.

Tab. 35: EFS bei primärem Mammakarzinom unter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit von PR in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie

Remmele Score für PR	Gesamtzahl	Absolute Häufigkeit des Events; E/NE	Prozentuale Häufigkeit des Events	Kommentar
<i>0</i>	46	17/29	37,0	Hätten nicht mit Tamoxifen behandelt werden sollen
<i>1</i>	6	3/3	50,0	Hätten nicht mit Tamoxifen behandelt werden sollen
<i>2</i>	25	8/17	36,0	
<i>3</i>	9	2/7	22,2	
<i>4</i>	31	10/21	32,3	
<i>6</i>	56	10/46	17,9	
<i>8</i>	15	3/12	25,0	
<i>9</i>	47	19/28	40,4	
<i>12</i>	40	9/31	22,5	

Wenn das „event“ als Maßstab des Therapieversagens in Betracht gezogen wird, dann hat die Tamoxifentherapie in 29,45% der Fälle nicht angeschlagen.

Die Häufigkeit des Todes bei primärem Mammakarzinom unter Tamoxifentherapie, in Abhängigkeit des Progesteronrezeptorstatus, ist in Tab. 36 dargestellt. Für das Progesteronkollektiv lag die Wahrscheinlichkeit des Todes

bei gesicherter Tamoxifentherapie bei 19,9%. Die Häufigkeit eines Rezidivs liegt ohne Berücksichtigung des Zeitraums bei 30,5%.

Tab. 36: „Overall survival“ bei primärem Mammakarzinom unter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit vom PR in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie

Remmele Score für den PR	Gesamtzahl	Absolute Häufigkeit des Tode	Prozentuale Häufigkeit des Todes	Kommentar
<i>0</i>	46	13/33	28,3	Hätten nicht mit Tamoxifen behandelt werden sollen
<i>1</i>	7	2/5	28,6	Hätten nicht mit Tamoxifen behandelt werden sollen
<i>2</i>	25	6/19	24,0	
<i>3</i>	9	1/8	11,1	
<i>4</i>	31	7/24	22,6	
<i>6</i>	57	4/53	7,0	
<i>8</i>	15	3/12	20,0	
<i>9</i>	49	15/34	30,6	
<i>12</i>	42	5/37	11,9	

Es zeigt sich, dass der Progesteronrezeptor das Therapieversagen einer Tamoxifentherapie tendenziell besser vorhersagt, als dieses der Östrogenrezeptor tut.

Wenn man die neun Klassen Einteilung zugrunde legt ergibt sich ein Chi²-Wert von 18,4 (p=0,018), bei einer binären Einteilung mit dem Cut-off Punkt von 1 ein Chi²-Wert von 4,4 (p=0,0359) und bei einem Cut-off Punkt von >1 ein Chi²-Wert von 5,3 (p=0,0218). Wurde der Cut-off Punkt >2 gewählt, ergab sich ein Chi²-Wert von 8,6 (p=0,00331), bei einem Cut-off Punkt >3 ein Chi²-Wert von 7,3

(0,00676) und bei einem Cut-off Punkt >4 lag der Chi²-Wert bei 5,3 (p=0,0216). Die verbleibenden Cut-off Punkte ergaben keine Erhöhung des Chi²-Wertes mit p>0,05.

In Tab. 37 wurden alle Patientinnen mit einer Tamoxifentherapie (adjuvant oder palliativ) und mit einem immunhistochemischen Nachweis des PR ausgewertet.

Tab. 37: Progesteronrezeptor als Therapieprädiktor gemessen am EFS in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie

Cut-off (negativ versus positiv)	5-Jahres EFS in PR <u>negativem</u> Kollektiv	5-Jahres EFS in PR <u>positivem</u> Kollektiv	Chi²	p
0,1,2,3,4,6,8,9,12			15,0	0,0595
1 (0 versus 1-12)	56,0%	73,8%	3,4	0,0648
2 (0-1 versus 2-12)	54,6%	74,6%	5,0	0,0249
3 (0-2 versus 3-12)	55,5%	76,2%	7,9	0,00495
4 (0-3 versus 4-12)	58,1%	76,2%	6,9	0,00867
6 (0-4 versus 6-12)	62,8%	77,0%	4,6	0,0319
8 (0-6 versus 8-12)	70,5%	71,9%	0	0,922
9 (0-8 versus 9-12)	71,4%	71,0%	0	0,982
12 (0-9 versus 12)	83,6%	68,5%	2,4	0,125

In der ersten Spalte der Tab. 37 wurden alle neuen Kategorien zugelassen, bei allen restlichen wurden nur zwei Kategorien unterschieden. Die Tab. 37 zeigt das prozentuale Gesamtüberleben unter einer Tamoxifentherapie in Abhängigkeit dessen, wo die Cut-off Trenngrenze zwischen positiv und negativ

für den Progesteronrezeptor gesetzt wurde. So zeigt sich der deutlichste Überlebensunterschied im Tamoxifenkollektiv, mit hohem Chi²-Wert und niedrigem p-Wert (0,0049), bei dem Cut-off Punkt 3, mit prozentualem Überlebensvorteil von 20,7% zu Gunsten der Gruppe mit ER≥3. Bei den Cut-off Punkten 2, 4 oder 6 bestehen ebenfalls relativ hohe, statistisch signifikante Überlebensunterschiede.

Tab. 38: *Abhängigkeit des OS im Tamoxifenkollektiv von der Höhe des PR Scores*

Cut-off (negativ versus positiv)	5 Jahres OS in PR <u>negativem</u> Kollektiv %	5 Jahres OS in PR <u>positivem</u> Kollektiv %	Chi²	p
0,1,2,3,4,6,8,9,12			18,2	0,0194
1 (0 versus 1-12)	66,8	85,8	4,2	0,0395
2 (0-1 versus 2-12)	65,8	86,5	5,1	0,0244
3 0(0-2 versus 3-12)	69,0	87,5	8,8	0,00303
4 (0-3 versus 4-12)	71,2	87,5	7,4	0,00637
6 (0-4 versus 6-12)	74,9	88,5	5,2	0,0232
8 (0-6 versus 8-12)	84,8	82,9	0	0,93
9 (0-8 versus 9-12)	81,9	85,3	0	0,892
12 (0-9 versus 12)	81,6	89,4	3,3	0,0679

Die Cut-off Punkte 8, 9 und 12 erbringen keinen Überlebensvorteil hinsichtlich der Tamoxifenprädiktion. Der höchste Chi²-Wert (8,8) mit niedrigstem p-Wert (0,00303) wird wie beim EFS in der Gesamtüberlebenssituation bei dem Cut-off

Punkt 3 erzielt, mit 18,5% Überlebensvorteil nach 5 Jahren. Wenn man den Informationsgewinn der beiden oben stehenden Tabellen zusammenfasst zeigt sich, dass die Cut-off Werte von 3 und 4 die Vorhersage eines möglichen Therapieversagens optimal ankündigen.

5.5.4 Progesteronrezeptor als prädiktiver Faktor bei einer 3-Gruppen-Einteilung

Da unsere Untersuchungen gezeigt haben, dass die Feinunterteilung des Progesteronrezeptors keine zusätzliche prädiktive Information über eine binäre Einteilung erbringt, wurde zusätzlich der Fragestellung nachgegangen, ob eine Einteilung in 3 Gruppen bessere Vorhersage hinsichtlich des Tamoxifenansprechens aufweisen würde. Im Patientenkollektiv wurde eine Unterteilung der Progesteronrezeptorexpression in 3 Gruppen wie folgt unternommen:

- Gruppe mit niedriger oder fehlender Expression (IRS 0 - 1),
- Gruppe mit mäßiger Expression (IRS 2 - 6) und
- Gruppe mit hoher Expression (IRS 8 - 12).

Wenn man die Auswertung in 3 Gruppen vornimmt, unter gesicherter Tamoxifentherapie, so ergeben sich für das Auftreten eines „events“ folgende Werte (Tab. 39):

Tab. 39: Todeshäufigkeit bei gesicherter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit von der Höhe der Progesteronexpression (ohne Berücksichtigung der Zeit)

PR Score	N	Event	Kein Event	Wahrscheinlichkeit des Events (%)
0,1	53	15	38	28,30
2,3,4,6	122	18	104	14,75
8,9,12	106	23	83	21,69

Für das Gesamtüberleben errechnet sich ein Chi²-Wert von 5,9 mit entsprechendem p-Wert von 0,0514. Wenn man das EFS anstelle des OS einsetzt, ergibt sich ein Chi²-Wert von 5 mit p=0,0819 (siehe Tab. 40). Eine Einteilung in 3 Gruppen ergibt somit beim Progesteronrezeptor keine bessere Trennschärfe als die binäre Einteilung.

Tab. 40: Inzidenz des Events (Lokalrezidiv, Fernmetastase oder Tod) bei der Einteilung des PR in 3 Gruppen

PR Score	N	Event	Kein Event	Wahrscheinlichkeit des Events (%)
0,1	52	20	32	38,46
2,3,4,6	121	30	91	24,78
8,9,12	102	31	71	30,39

Fasst man die Ergebnisse einer Einteilung in 3 Gruppen sowohl beim Östrogenrezeptor als auch beim Progesteronrezeptor zusammen, so ergibt sich eindeutig, dass die Rezidivhäufigkeit bzw. die Häufigkeit des Todesereignisses bei einer Hormontherapie nicht von der genauen Expressionshöhe abhängt.

Es lässt sich nicht überzeugend darlegen, dass eine 9-Gruppen-Einteilung (Score: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12) oder eine 3-Gruppen-Einteilung (Score: 0,1; 2-6; 8-12) eine bessere Vorhersage erlaubt, als eine rein binäre Einteilung, sofern man die Cut-off Punkte sehr niedrig setzt (Tab. 37, Tab. 38).

5.5.5 Kombinationsanalyse zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptor als Prädiktoren einer Tamoxifentherapie

Als eine weitere Möglichkeit einer verbesserten Prädiktion der Tamoxifenansprache, haben wir die Kombination beider Steroidrezeptoren herangezogen.

Bei dieser Berechnung wurden sowohl die immunhistochemischen wie auch die biochemischen Fälle berücksichtigt. Es ergeben sich folgende Wahrscheinlichkeiten für ein „event“ (siehe Tab. 41) bei Hinnahme einer Rezeptorpositivität ab IRS ≥ 2 oder 15 fmol/mg Protein.

Tab. 41: Wahrscheinlichkeit für ein „event“ in Abhängigkeit vom Steroidrezeptorstatus im Tamoxifenkollektiv

ER/PR Status	Event ja	Event nein	Event in %	Randsumme
<i>ER-/PR-</i>	11	12	47,82	23
<i>ER+/PR-</i>	19	39	32,76	58
<i>ER-/PR+</i>	4	25	13,79	29
<i>ER+/PR+</i>	51	120	29,82	171
<i>Randsumme</i>	85	196		281

Bei der Analyse der vier möglichen Steroidrezeptorkombinationen zeigt sich, dass lediglich die Information einer Negativität der Steroidrezeptoren, eine signifikant negative Aussagekraft hinsichtlich des Ansprechens auf Tamoxifen ergibt. Im univariaten Modell nach Kaplan-Meier ergibt sich ein Chi²-Wert von 7,2 mit einem p-Wert von 0,0664.

Bemerkenswert ist der Umstand, dass der prozentuale Anteil des Events in der ER+/PR+ Gruppe größer ist als der in der ER-/PR+ Gruppe. Es werden daher auch für diese 4 Gruppen die 3- und 5-Jahres Überlebenszeiten berechnet (siehe Tab. 42).

Sowohl die 3-Gruppen-Einteilung (ER+/PR+ versus ein Rezeptor positiv versus beide Rezeptoren negativ), als auch die Einteilung in 4 Gruppen ergeben statistisch signifikante Werte mit $\chi^2=10,9$ und $15,3$ sowie p-Werte von $0,0042$ und $0,0161$ in der univariaten Auswertung für das 3- und 5-Jahres Überleben.

Tab. 42: Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und Tamoxifentherapie

<i>Steroidrezeptoren</i>	<i>3-Jahres Überleben</i>	<i>Konfidenz-Intervall</i>	<i>5-Jahres Überleben</i>	<i>Konfidenz-Intervall</i>
<i>ER-/PR-</i>	70,80%	57,1 - 87,8	59,10%	43,9 - 79,6
<i>ER+/PR-</i>	91,80%	85,6 - 98,3	80,40%	70,8 - 91,3
<i>ER-/PR+</i>	91,20%	82,1 - 100	zu wenig Fälle (at risk)	
<i>ER+/PR+</i>	90,50%	87,1 - 94,0	81,60%	76,9 - 86,6

Somit ergibt sich, dass alle 3 Gruppen mit wenigstens einem positiven Steroidrezeptor bei gesicherter Tamoxifentherapie eine bessere 3- oder 5-Jahres Überlebenschance haben, als die Östrogen- und Progesteronrezeptor negativen Fälle.

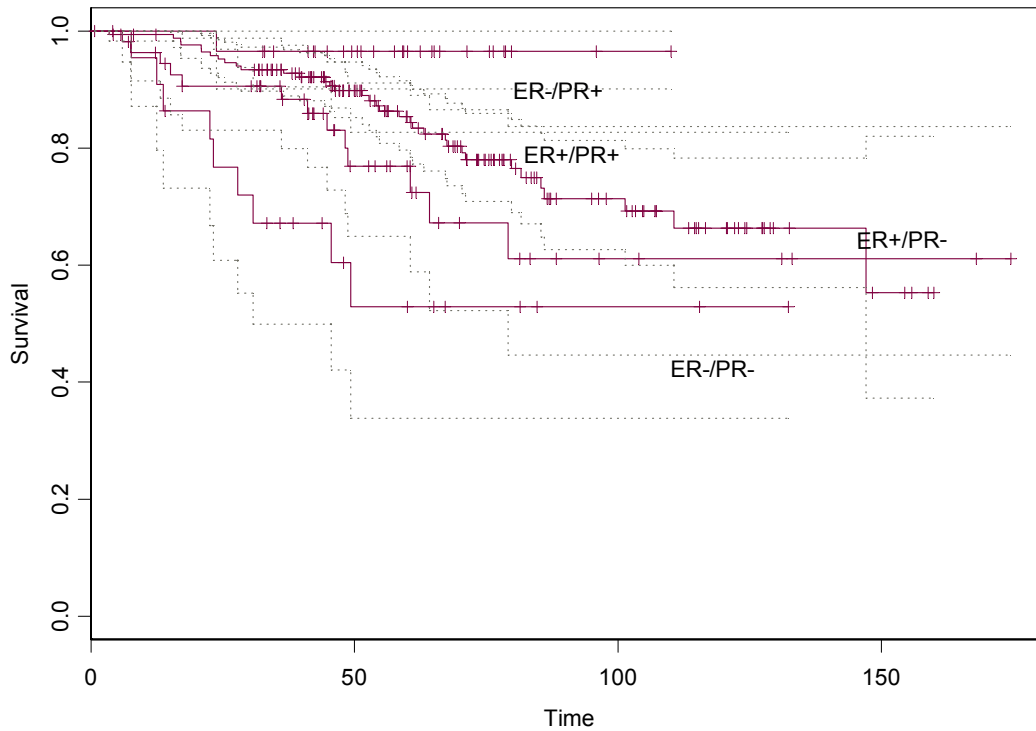


Abb. 26: *Abhängigkeit des Überlebens von der Steroidrezeptorkombination im Tamoxifenkollektiv*

Die geringste Häufigkeit eines Events (gemessen an dem Tod, lokalem Rezidiv oder Fernmetastase) ergibt sich erstaunlicherweise für die Rezeptorkonstellation ER-/PR+. Hier ist die Häufigkeit des Events noch geringer als in der Untermenge der Mammakarzinome mit der Konstellation ER+/PR-. In Abb. 26 ist das sehr deutlich an den Überlebenskurven der vier Rezeptorkombinationen zu erkennen.

5.6 Kollinearität des Östrogenrezeptors

Diesem Abschnitt kann man auch die Frage zu Grunde legen, ob die Expression des Östrogenrezeptors mit anderen klinischen oder histopathologisch erfassten Faktoren korreliert. Von den geprüften Variablen: dem Stadium, der Tumorgroße, dem nodalen Status, dem Grading, der Metastasierung, dem Progesteronrezeptor und der Histologie stand nur das Grading mit dem Östrogenrezeptor in signifikanter Korrelation ($p < 0,0001$, Chi^2 -Wert 157,2). Schlecht differenzierten G3 Tumoren zeigten eine hoch signifikant verminderte Östrogenrezeptorexpression. Bei der histologischen Einteilung in invasiv-ductales versus invasiv-lobuläres Mammakarzinom deutete sich ein leichtes Überwiegen der lobulären Karzinome in der Gruppe mit hoher Östrogenrezeptorexpression an, mit $\text{Chi}^2 = 8,374$ und $p = 0,039$. Weiter sind wir der Frage nachgegangen, ob es zwischen prämenopausalen und postmenopausalen Mammakarzinomen signifikante Unterschiede in der Expression der Steroidrezeptoren gibt. Aus der Betrachtung der Tab. 43 zeigt sich, dass bei der postmenopausalen Frau der Prozentsatz der ER positiven Fälle ansteigt.

Tab. 43: Zusammenhang zwischen Menopause und Östrogenrezeptorexpression

	Menopausenstatus			
	<i>prämenopausal</i>	<i>postmenopausal</i>		
<i>ER negativ</i>	51	103		
%	32,9	19,07		
<i>ER positiv</i>	104	437		
%	67,1	80,93		
			Chi²	p
			13,35314	0,00026

5.7 Kollinearität des Progesteronrezeptors

In Analogie zur Vorgehensweise im Abschnitt 5.6, werden hier die Variablen ermittelt, die mit der Expression des Progesteronrezeptors korrelieren. Es ergeben sich hierbei ähnliche Verhältnisse wie beim Östrogenrezeptor.

Das Grading korreliert mit sehr hoher Signifikanz mit der Expression des Progesteronrezeptors, jedoch in umgekehrter Relation ($p < 0,0001$; $\text{Chi}^2 = 123,49$). Bei der Histologie zeigt sich, im Gegensatz zum Östrogenrezeptor, keine Korrelation mit der Progesteronrezeptorexpression.

Wir sind weiter der Frage nachgegangen, ob es zwischen prämenopausalen und postmenopausalen Mammakarzinomen signifikante Unterschiede in der Expression des Progesteronrezeptors gibt.

Tab. 44: Zusammenhang zwischen Menopause und Progesteronrezeptorexpression

	Menopausenstatus			
	<i>prämenopausal</i>	<i>postmenopausal</i>		
PR negativ	51	139		
%	32,9	25,88		
PR positiv	104	398		
%	67,1	74,12		
			Chi²	p
			5,23288	0,02216

Ähnlich wie beim Östrogenrezeptor, zeigt sich in der Menopause eine Tendenz zur positiven Progesteronrezeptorexpression, jedoch ist diese beim Progesteronrezeptor geringfügiger ausgeprägt.

5.8 Univariate Modelle des Überlebens

Wie in der Tab. 45 aufgeführt, sind folgende Variablen univariat mit der Prognose verbunden: das Stadium, nodaler Status, Tumorgröße, Metastasierung, Grading, der Progesteronrezeptor, der c-erb-B2 und das Alter.

Tab. 45: Prognose in Abhängigkeit von klassischen Parametern

Variable	Log rank	p
Stadium I II III IV	269,16	<0,0001
N N0 N1 N2-N3	170,11	<0,0001
T T1 T2 T3 T4	128,79	<0,0001
M M0 M1	207,74	<0,0001
Grading G1 G2 G3	27,59	<0,0001
ER ER - ER+	1,35 5,41 (Breslow)	0,2466 0,02
PR PR - PR+	5,72 9,12 (Breslow)	0,0168 0,0025
c-erb-B2 - +	10,27	0,0013
invasiv ductal invasiv lobulär Sonderformen	1,55	0,67
Prämenopausal Postmenopausal	2,73	0,099
Alter < Median > Median	9,65	0,0019

Beim Östrogenrezeptor liegt lediglich eine grenzwertige Signifikanz vor, die sich im Breslow-Test zeigt. Von den zahlreich untersuchten Grenzwerten, sowohl bei denen des Östrogenrezeptors als auch bei denen des Progesteronrezeptors, zeigen sich folgende als signifikant:

- Östrogenrezeptor bei Zulassung eines kontinuierlichen Spektrums von biochemisch bestimmten Werten.
- Östrogenrezeptoren bei Einteilung bei niedrigen Cut-off Werten für eine binäre Einteilung. Die Entscheidung welchen Cut-off Wert man dann als optimal annimmt wäre ja mehr oder weniger willkürlich. Unsere Arbeit zeigt, dass der Cut-off von 1 ein ganz guter Prognosewert ist.
- Progesteronrezeptor als diskrete Variable bei Zulassung eines kontinuierlichen Spektrums von biochemisch bestimmten Werten.
- Progesteronrezeptor bei Einteilung mit jedem niedrigem Cut-off Wert für eine binäre Einteilung in positiv und negativ, obwohl der Cut-off Punkt 3 mit höchstem Chi²-Wert als optimal erscheint.
- Progesteronrezeptor bei Einteilung in 3 Gruppen.

Unsere Werte zeigen eine Reihe von Cut-off Punkten die sicherlich nicht geeignet sind eine Prognose vorherzusagen.

5.9 Multivariate Modelle des Überlebens unter Berücksichtigung aller Prognosefaktoren

Die entscheidende Frage ist hierbei allerdings nicht, wie sich eine Variable im univariaten, sondern im multivariaten Cox-Modell verhält. Wenn man mit den univariaten Prognosefaktoren ein multivariates Verfahren eingeht, so lässt sich ermitteln, welcher der untersuchten Faktoren am ehesten für die Vorhersage des Gesamtüberlebens geeignet ist. Die Strategie bei Erstellung des Modells war die Verwendung jeglicher univariater Prognosefaktoren. In das Cox-Modell wurden: T, N, M, Grading, ER (Remmele Score), PR (Remmele Score) und das Stadium eingegeben.

Die als multivariat noch bedeutungsvollen Variablen sind in Fettdruck hervorgehoben.

Tab. 46: Cox-Modell für das OS unter besonderer Berücksichtigung der Steroidrezeptoren

Variable	B	SD	Wald	p	RR	95% Konfidenzintervall	
<i>Stadium</i>	-0,195	0,238	-0,818	0,41	0,823	0,516	1,31
<u>T</u>	0,751	0,154	4,874	0,0000011	2,120	1,567	2,87
<u>N</u>	0,488	0,165	2,951	0,0032	1,629	1,178	2,25
<u>M</u>	2,375	0,435	5,462	0,000000047	10,752	4,58	25,21
<i>Grading</i>	0,283	0,217	1,302	0,19	1,327	0,867	2,03
<i>ER (0-12)</i>	-0,138	0,138	-1,001	0,32	0,871	0,665	1,14
<i>PR (0-12)</i>	-0,219	0,123	-1,788	0,074	0,803	0,631	1,02

Weder der Progesteronrezeptor noch der Östrogenrezeptor zeigen sich in dem multivariaten Cox-Modell als signifikante Prognosefaktoren.

Das vorgelegte Cox-Modell ergibt 3 multivariate Variablen für einen tödlichen Krankheitsausgang:

- der nodale Status,
- die Metastasierung und
- die Tumorgroße.

Der Östrogenrezeptor erreicht dabei den Status eines Trendfaktors für das gute Überleben nicht ($p=0,32$), wohingegen der PR eben das Signifikanzniveau knapp verpasst ($p=0,074$). Der Log-rank Test lag für dieses Modell bei 262 und der p-Wert erreichte 0. Das Modell konnte nicht verbessert werden, auch wenn man bei den ER und PR eine Einteilung in 3 Gruppen bzw. eine binäre Einteilung vornahm.

Das gleiche Modell wurde auch für das rezidivfreie Überleben errechnet.

Tab. 47: Cox Regressions-Model für das EFS

Variable	B	SD	Wald	p	RR	95% Konfidenzintervall	
<i>Stadium</i>	-0,0401	0,261	-0,154	0,88	0,961	0,576	1,60
<u><i>T</i></u>	0,7051	0,165	4,279	0,000019	2,024	1,465	2,80
<u><i>N</i></u>	0,4945	0,181	2,732	0,0063	1,640	1,150	2,34
<u><i>M</i></u>	1,3319	0,475	2,803	0,0051	3,788	1,493	9,61
<i>Grading</i>	0,3344	0,220	1,521	0,13	1,397	0,908	2,15
<i>ER</i> <i>(0-12)</i>	-0,2110	0,141	-1,502	0,13	0,810	0,615	1,07
<i>PR</i> <i>(0-12)</i>	-0,2001	0,124	-1,614	0,11	0,819	0,642	1,04

Für das EFS im vorgelegten Cox-Modell ergeben sich drei multivariate Faktoren für einen „event“ im Krankheitsverlauf: T, N und M. Der Log-rank Test lag für

dieses Modell bei 167 und der p-Wert erreichte 0. Der Austausch des Remmele Score gegen die Einteilung negativ (Score 0,1) versus positiv (Score>1) brachte keine Verbesserung des Modells, ebenso wenig wie die Analyse der 3-Gruppen-Einteilung. Das galt sowohl für den Östrogenrezeptor als auch für den Progesteronrezeptor.

6 Diskussion

6.1 Verlässlichkeit des Datenmaterials

6.1.1 Charakteristik der Studienpatientinnen und Nachbeobachtungszeit

Vor dem Vergleich unserer Studienergebnisse mit der internationalen Literatur, soll zunächst ein kurzer Überblick über die Patientencharakteristiken erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Gesamtkollektiv von 1139 Patientinnen in die statistischen Auswertungen einbezogen, die im Zeitraum von 1986 bis 2001 an einem Mammakarzinom erkrankten. Bei 783 Patientinnen wurden die Steroidrezeptoren immunhistochemisch nachgewiesen, bei 343 Patientinnen kam die biochemische Dextran-Coated-Charcoal Methode zur Anwendung. In einer kleinen Schnittmenge lagen Doppelbestimmungen vor (N=13). Der Altersmedian aller Patientinnen betrug 59,3 Jahre. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 28, die älteste 88 Jahre alt. Die Kurve der Altersverteilung in unserem Patientenkollektiv ist nahezu normal verteilt mit einem Erkrankungsgipfel um die 60 Jahre, was vergleichbar ist mit der Altersverteilung von anderen, für diese Arbeit berücksichtigten, repräsentativen und später zitierten Studien. Im Menopausenstatus war die Verteilung wie folgt: 24,2% (255) der Frauen waren prämenopausal, 75,8% (798) der Frauen befanden sich in der Postmenopause. Bei 86 Patientinnen gab es keine Angabe zum Menopausenstatus. Der höhere Anteil von postmenopausalen Patientinnen ist in den meisten Studien üblich.

In unserem Kollektiv dominieren die Stadium II Patientinnen (54,9%). Hinsichtlich Tumorgröße ergab sich folgende Verteilung: 35,3% pT1, 48,4% pT2, pT3 und pT4 Tumoren machen zusammen 16,3% aller Tumoren (7,5% bzw. 8,8%) aus. Die Mehrheit der Studienpatientinnen war zum Zeitpunkt der Primärdiagnose nodalnegativ (52,2%), 47,8% der Patientinnen wiesen befallene Lymphknoten (N1 42,4% bzw. N2-N3 5,4%) auf.

In der histopathologischen Differenzierung der entfernten Karzinome wurden die meisten Patientinnen in die Gruppe der mäßig differenzierten Mammakarzinome zugeordnet (G2). Die G1 Gruppe war mit 7,5%, die G2 mit 71,5% und die G3 Gruppe mit 21,2% vertreten. Bei 14 Patientinnen wurden keine Angaben zum Grading gefunden. Die invasiv-ductalen Karzinome dominieren im Studienkollektiv (70,1%). Etwa 19,1% aller Fälle sind der Gruppe der lobulären Mammakarzinome und 10,8% den Sonderformen zuzuordnen. In der Datenbank, sowie in den vorliegenden Unterlagen, die dieser Doktorarbeit zugrunde lagen, konnte bei 686 Patientinnen keine Information über eine eindeutige Tumorphistologie bzw. eine Einteilung invasiv-ductal oder invasiv-lobulär gefunden werden. Der relativ hohe Prozentsatz nicht histologisch definierter Fälle ergibt sich aus dem Umstand, dass von einem Teil der befundenden Pathologen nicht die WHO Nomenklatur von 1986 benutzt wurde (etwa bis 1992).

Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Daten mit der zitierten nationalen und internationalen Literatur zu erzielen, wurden beim Gesamtüberleben der Patientinnen die 3-, 5- und 10-Jahresüberlebensraten berechnet.

Die Follow-up Daten ergeben eine mittlere Beobachtungszeit von 65,93 Monaten (SD 43,76). Die längste Nachbeobachtungszeit belief sich auf fast 200 Monate. Für das Gesamtkollektiv beträgt das Mediane Follow-up 53,85 Monate. Die allgemeinen sowie klinisch-pathologischen Daten des untersuchten Kollektivs spiegeln die Zusammensetzung ähnlicher, für diese Arbeit berücksichtigter, Datensammlungen bei primären Mammakarzinomen in etwa wieder.

6.1.2 Reproduzierbarkeit der immunhistochemischen Bestimmungsmethode

Um die Verlässlichkeit der Ursprungsauswertung der Steroidrezeptoren zu überprüfen, wurden mit Anwendung der linearen Regression die Formel der Regressionsgeraden, wie schon im Kapitel 4.9.2 beschrieben, errechnet. Es wurde eine intraobserver und zwei interobserver Auswertungen durchgeführt. Für die intraobserver Auswertung des Östrogenrezeptors ergab sich eine hohe Signifikanz mit $R=0,7567$, $p=0$ und $F=96,47$.

Die Regression war auch bei der intraobserver Auswertung des Progesteronrezeptors hoch signifikant mit $R=0,68$, $p=0$ und $F=63,08$.

Die zwei interobserver Auswertungen des Östrogenrezeptors zeigten hohe Signifikanz der Regressionsgeraden mit $R=0,7802$, $p=0$ und $F=113,5$ sowie $R=0,7801$, $p=0$ und $F=111,9$.

Für den Progesteronrezeptor ergaben sich folgende Werte: $R=0,8637$, $p=0$ und $F=214,2$ für die erste interobserver Auswertung, sowie $R=0,7307$, $p=0$ und $F=83,62$ für die zweite interobserver Auswertung.

Die immunhistochemische Rezeptorbestimmung ist somit eine verlässliche und reproduzierbare Methode, mit R-Werten im Mittel von 0,77 für den Östrogenrezeptor und 0,76 für den Progesteronrezeptor. So ist offensichtlich die Qualität der Reproduzierbarkeit beider Rezeptoren fast identisch. Fischer et al.⁹⁴ fanden für den Östrogenrezeptor eine 87%-ige interobserver Konkordanz, sowohl für die Anzahl der positiven (gefärbten) Zellen als auch für die Intensität der Färbung. Für den Progesteronrezeptor ergaben sich 84%, respektive 86% übereinstimmende Werte. In gleicher Studie wurde bei der Dichotomisierung (positiv/negativ) der Befunde für den Östrogenrezeptor in der interobserver Auswertung eine 89%-ige und für den Progesteronrezeptor eine 79%-ige Übereinstimmung gefunden. Die schwedische Untersucherguppe von Chebil et al.⁹⁵ evaluierte die interobserver Reproduzierbarkeit der ER- und PR-Bestimmung mittels der immunhistochemischen Methode. Der Cut-off Wert für die Positivität wurde bei >10% der gefärbten Zellen, unabhängig von der Intensität der Färbung, gesetzt. Die Konkordanzrate war sehr hoch, mit dem

Kappa-Wert von 0,78 für den Östrogenrezeptor und 0,72 für den Progesteronrezeptor. In der Arbeit von Biesterfeld et al.⁹⁶ wurden 102 Fälle des primären Mammakarzinoms von zwei unabhängigen Pathologen mittels der immunhistochemischen Methode bestimmt. Die interobserver Übereinstimmung für die Dichotomisierung, Positivität versus Negativität, betrug für den Östrogenrezeptor 89% und für den Progesteronrezeptor 93%. Bei Betrachtung der Übereinstimmung des Remmele-Wertes, im Kollektiv der von zwei Untersuchern als positiv eingestuft Tumoren, fand sich eine 54%-ige Konkordanz für den Östrogen- und eine 57%-ige Konkordanz für den Progesteronrezeptor. Eine österreichische Arbeitsgruppe von Regitning et al.⁹⁷ untersuchte die interobserver Variabilität der Steroidrezeptorbestimmung mit einer Cut-off Grenze von <10%. So konnte für den Östrogen- sowie für den Progesteronrezeptor nur eine moderate Übereinstimmung beobachtet werden (Kappa-Wert für ER 0,57 und für den PR 0,53). Rhodes et al.⁹⁸ überprüften in 200 teilnehmenden Laboratorien die Varianz der ER-Bestimmung mittels Immunhistochemie. Eine hohe interobserver Übereinstimmungsrate konnte bei starker sowie mäßiger Östrogenrezeptorexpression demonstriert werden, jedoch bei niedriger Expression verzeichneten sich 30-60% falsch negative Ergebnisse. Ausgehend vom heutigen Kenntnisstand, dass sogar Tumoren mit niedrigen Östrogenrezeptorlevels von einer endokrinen Therapie profitieren können, wird die Wichtigkeit der verbesserten Sensitivität einer immunhistochemischen Bestimmungsmethode deutlich. Die Faktoren wie z.B. Gewebsfixation (der Typ der Fixation sowie die Länge der Fixation), Antikörperauswahl sowie die Trennsetzung der Grenze für die Interpretation der Positivität können maßgeblich die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der immunhistochemischen Methode beeinflussen.⁹⁹ Zusammenfassend ergeben unsere Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des immunhistochemischen Rezeptornachweises, dass es sich um eine verlässliche Methode handelt.

6.2 Univariate Analyse des Überlebens in Abhängigkeit von klassischen Prognoseparametern

Prognosefaktoren sollen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung helfen, eine Vorhersage über das zu erwartende, individuelle krankheitsfreie Überleben sowie über das Gesamtüberleben in Abwesenheit jeglicher Therapie treffen zu können. Diese individuelle Prognose hängt von der Interaktion verschiedener tumorbezogener Faktoren ab. Für die klinische Routine werden folgende, klassische Prognoseparameter einbezogen: die Tumorgroße, der Lymphknotenstatus, das Grading, das Alter bzw. der Menopausenstatus, der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie, laut der St. Gallen-Konferenz von 2005, der HER-2/neu-Status und die peritumorale Lymph- und Blutgefäßinvasion. Diese Einschätzung des Krankheitsrisikos erlaubt eine risikoadaptierte Therapie des Mammakarzinoms.

Berücksichtigt man das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Menopausenstatus, so ergab sich zwischen prä/perimenopausalen und postmenopausalen Frauen in unserer Datenlage kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben.

Der errechnete p-Wert von 0,099 in der Kaplan-Meier Statistik zeigt, dass der Menopausenstatus die Prognose des primären Mammakarzinoms in unserer Studiensituation nicht beeinflusst. Im vorliegenden Fall war demnach die Nullhypothese gültig.

Es besteht aber ein gewisser Trend für eine schlechte Prognose im höheren Alter. In Gesamtbetrachtung der berücksichtigten Studien zum Thema Überlebensprognose in Abhängigkeit vom Alter, kommen die verschiedenen Autoren zum Teil doch zu deutlichen Unterschieden in ihren jeweiligen Beobachtungen. Während einige Untersucher, wie z.B. Bonnier et al.¹⁰⁰, Kurtz et al.¹⁰¹ sowie Recht et al.¹⁰² eine schlechtere Prognose für jüngere Patientinnen voraussagten, zeigten Holli et al.¹⁰³ einen signifikanten Zusammenhang zwischen höherem Alter und Prognoseverschlechterung. Crowe et al.¹⁰⁴ wiederum, konnten keine Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit vom Alter

bestätigen. Wir konnten den negativen Einfluss des Alters auf den Krankheitsverlauf demonstrieren. Für die Bewertung des Alters als Prognosefaktor muss man berücksichtigen, dass die Sterblichkeit unter Betrachtung aller anderen Todesursachen, die nicht mit einem Mammakarzinom zusammenhängen, mit dem Lebensalter zunimmt. Es sind daher verbesserte statistische Methoden erforderlich, um die „natürliche Sterblichkeit“ von der tumorbedingter Mortalität abzutrennen.

Ein Grund für die diskrepanten Ergebnisse könnte dadurch erklärt werden, dass bei unseren Patienten in der Mehrzahl keine exakte Ermittlung der Todesursache erfolgte. Da bei fehlenden Obduktionsberichten und einer insgesamt niedrigen Obduktionsfrequenz in Deutschland eine verlässliche Todesursache häufig nicht anzugeben war, wurde jeder Todesfall aus unbekannter Ursache als tumorbedingt gewertet. Lediglich die 2,3% der Todesfälle, die sicher nicht dem Tumorleiden zuzurechnen sind, können als „censored“ gewertet werden.

Ein Teil der Differenz bei den Ergebnissen kann auch durch die in den jeweiligen Studien unterschiedlichen Patientenkollektive erklärt werden, vor allem wenn der Anteil an Patientinnen die unter 40 bzw. 35 Jahre alt sind niedrig ist.

Aus unserem Datenmaterial konnte ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Gesamtüberleben gezeigt werden, mit deutlicher Verschlechterung des Überlebens mit zunehmender Tumorgröße (Log-rank Wert von 128,79 und p-Wert<0,0001), was in Analogie zur vorliegenden Literatur¹⁰⁵ steht. Nicht nur, dass zwischen Tumorgröße und der Anzahl befallener Lymphknoten eine Korrelation besteht, sondern auch für Patientinnen ohne Lymphknotenbefall ist die Tumorgröße einer der wichtigsten Prognosefaktoren. So zeigte die Studie von Carter und Mitarbeitern¹⁰⁶, dass bei nodalnegativen Patientinnen und Tumorgröße <1 cm das 5-Jahres Gesamtüberleben fast 99% betrug, verglichen mit 89% Gesamtüberleben bei einer Tumorgröße von 1-3 cm und 86% Gesamtüberleben bei einer Tumorgröße von 3-5 cm. Diese Korrelation ist nach 20 Jahren fortwährend, wie es in der Arbeit von Rosen et al.¹⁰⁷ dargelegt wird. Dass die Überlebensrate mit zunehmender Tumorgröße und unabhängig vom Lymphknotenstatus sinkt, zeigte auch die Arbeit von Gamet et al.¹⁰⁸.

Neben dem Einfluss der Tumorgröße auf das Überleben, wird die mediane Zeit bis zur Entwicklung von Metastasen mit zunehmender Tumorgröße deutlich verkürzt.^{106,109} So entsprechen unsere Ergebnisse in vielfacher Hinsicht den Erkenntnissen aus zahlreichen, national und international publizierten und für diese Arbeit berücksichtigten Studien, die zunehmende Tumorgröße wirkt sich signifikant negativ auf die Überlebenschancen der Patientinnen aus.

Beim Lymphknotenstatus zeigte sich in unserer Studie eine signifikante Prognoseverschlechterung hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei steigender Anzahl der befallenen Lymphknoten. Die Mehrheit der durchgeführten klinischen Studien^{110,111,112,113} kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass das Ausmaß des axillären Lymphknotenbefalls umgekehrt proportional zu der Überlebenszeit korreliert. So konnten Fischer et al.¹¹⁴ die 5-Jahres Überlebensrate von 82,8% bei der N0 Situation zeigen, verglichen mit 73% bei 1-3 befallenen LK, 45,7% bei 4-12 positiven LK und 28,4% bei Befall von mehr als 12 LK. Die Wertigkeit des Lymphknotenstatus als sichere und unabhängige Variable in Hinblick auf das Überleben bleibt unumstritten.

Ein weiteres Beispiel aus der Gruppe der klassischen und unabhängigen Prognosefaktoren ist die histologische Differenzierung, welche in unserem Untersuchungsgut univariat hoch signifikante Überlebensunterschiede zwischen den drei Gradingstufen ergibt. In der Literatur^{115,116,117} wird eine starke Korrelation zwischen Tumordifferenzierungsgrad und Gesamtüberleben beschrieben. Beispielsweise zeigten nodalpositive G3-Tumoren im Vergleich zu einem nodalnegativen G1-Tumor eine ca. 9-fach höhere Mortalität.^{118,119} In unserem Kollektiv nahm die Überlebenschance beim schlechteren Differenzierungsgrad ab, was sich als statistisch signifikant ($p < 0,0001$) erwies und im Einklang mit zitierter Literatur steht.

Bei der univariaten Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Histologie konnte, anders als bei einigen Veröffentlichungen^{120,121} der letzten Jahrzehnte, in unserer Datenlage keine signifikante Korrelation bestätigt werden. So zeigte z.B. die Arbeit von Fisher et al.¹²², dass die Histologie, neben dem Alter und der Anzahl der befallenen Lymphknoten sowie dem Grading, die

prognostische Diskriminante für das Überleben 8, 10 oder 15 Jahren nach Diagnosestellung ist. Es bedarf der nochmaligen Erwähnung, dass in unserer Arbeit die hohe Fehlzahl der Angaben zur Histologie, eher als ungünstig zu berücksichtigen ist, sodass man bei retrospektiver Analyse eigentlich keine verlässlichen Aussagen zum Einfluss der Histologie machen kann.

Ohne hier tiefer auf die kontrovers diskutierte Frage einzugehen, ob Östrogen- und Progesteronrezeptor als gute univariate Prognosefaktoren anzusehen sind, und falls ja, ab welchem Cut-off Punkt, wurde des Weiteren der Zusammenhang zwischen Steroidrezeptoren und dem Gesamtüberleben untersucht, unabhängig davon welche Steroidrezeptor-Bestimmungsmethode zur Anwendung kam. In unserem Gesamtkollektiv war bei 71,4% der Fälle der Östrogenrezeptor als positiv angegeben. Eine Positivität des Progesteronrezeptors lag in 63,7% der Fälle vor. In der Arbeit von McGuire¹²³ beispielsweise waren 73% der Karzinome ER positiv und 58% zeigten einen positiven PR-Status. 79% der Patientinnen in der Arbeit von Harvey et al.¹²⁴ waren ER positiv. In der noch oft zitierten Arbeit von Dowsett¹²⁵ waren 76% der Karzinome ER positiv und 58% PR positiv. Somit ist unser Kollektiv, angesichts der Steroidrezeptorverteilung, mit großen Studien vergleichbar. Anhand der Log-rank- sowie Breslow-Werte ließ sich für das langfristige OS im unseren Gesamtkollektiv zeigen, dass dem ER im Gegensatz zum PR keine signifikante Bedeutung zukam. Das kurzfristige 3- und 5-Jahres Überleben hängt sowohl vom ER als auch vom PR Status ab, was sich im Breslow-Test gut darstellen lies. Dies gilt bei einer binären Analyse beider Rezeptoren mit dem Cut-off Punkt, der für den immunhistochemischen Nachweis bei 2 lag und im Charcoal-Dextran Verfahren 15 bzw. 20 fmol/mg Protein betrug. Die Ergebnisse aus unserem Datenmaterial sind vergleichbar mit Angaben in der internationalen Literatur. Die Untersuchungsergebnisse der Early Breast Cancer Trialists` Collaborative Group¹²⁶ zeigten, dass ER positive Tumoren eine bessere Prognose in den ersten Jahren nach der Diagnosestellung haben, was zum Teil durch die langsamere Proliferation dieser Tumoren erklärt werden konnte. Beim Vergleich des rezidivfreien Überlebens zeigte die gleiche Untersucherguppe eine Annäherung der Überlebenskurven nach 15 Jahren, was sich in unserer Studie bereits nach 10 Jahren andeutete. Hier stellt sich die Frage nach der Rolle

des Östrogenrezeptors für die Entstehung der Mikrometastasen vor dem Zeitpunkt der Diagnosestellung. Hilsenbeck et al.¹²⁷ demonstrierten nur in den ersten drei Follow-up Jahren eine bessere Prognose bei einem positiven Östrogenrezeptorstatus. Um nur die prognostische Rolle der Steroidrezeptoren zu beurteilen, dürfte eigentlich in der Studiensituation keine endokrine Therapie erlaubt werden, was zugegebenermaßen bei gleichzeitiger Kenntnis der positiven therapeutischen Konsequenz des Tamoxifens, aus unserem heutigen Erfahrungsgegenstand ethisch nicht umsetzbar ist. Eine solche, bereits vor mehreren Jahren initiierte Arbeit, ist die NSABP B-06 Studie¹²⁸. In diese Studie wurden Patientinnen eingeschlossen, bei denen entweder die Mastektomie, die Lumpektomie oder die Lumpektomie mit anschließender Bestrahlung und jeweils ohne Verabreichung jeglicher systemischer adjuvanter Therapie durchgeführt wurde. Frauen mit Östrogenrezeptor positivem Tumor hatten 5-Jahres DFS von 74% und OS von 92%, während in der Gruppe mit negativem Östrogenrezeptor diese Werte 66% und 82% betragen. Dowsett et al.¹²⁵ zeigten die prognostische Wertigkeit der Steroidrezeptoren, neben der Tumorgröße und nodalem Status. Alter und Menopause hatten in der univariaten Analyse keine statistisch relevante prognostische Bedeutung.

Zusammenfassend kommt unsere Untersuchung im Gesamtkollektiv, ohne Berücksichtigung der Bestimmungsmethode der Steroidrezeptoren, zu folgendem Ergebnis: Betrachtet man unter Berücksichtigung des Gesamtüberlebens das gesamte Kollektiv (Patientinnen bei denen Steroidrezeptoren biochemisch und Patientinnen bei denen diese immunhistochemisch bestimmt wurden), so zeigen sich als prognostisch univariat signifikant nur die Variablen: Stadium, T, N, M, Grading, PR und Alter. Nicht signifikant waren die Variablen: der menopausale Status sowie die Histologie (invasiv-lobuläres oder ductales Karzinom). Bei den Steroidrezeptoren muss hier aber auf die nachfolgende Diskussion des Cut-off Punktes verwiesen werden.

6.3 Vergleich der beiden Verfahren zum Steroidrezeptornachweis

Eine der Fragen dieser Arbeit war, welche Steroidrezeptorbestimmungsmethode, die heute übliche immunhistochemische oder die biochemische Charcoal Dextran Methode, besser geeignet ist, um eine Prognose des Mammakarzinoms vorherzusagen und wo der Trennwert zwischen Positivität und Negativität der Rezeptoren gesetzt werden soll. Die Übereinstimmung zwischen diesen beiden Methoden war auch von Interesse bei dieser Arbeit und wird in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

Schon vor 30 Jahren wurde der Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in menschlichen Mammakarzinomen als Indikator für eine eventuell vorhandene Hormonabhängigkeit herangezogen.¹²⁹ Der Hormonrezeptorstatus zählt zu den wichtigsten unabhängigen Parametern für die Prognose des Mammakarzinoms und stellt zugleich ein Selektionskriterium für die Planung einer endokrinen Therapie dar, obwohl, wie schon oben diskutiert, sich diese prognostische Rolle während des Krankheitsverlaufs verliert. Während mehrerer Jahre wurden am Institut für Pathologie des RBK zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Hormonrezeptoren an Mammakarzinomgewebe angewendet. Der immunhistologische Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren an Gefrier- oder Paraffinschnitten sowie die biochemische, quantitative Analyse der Rezeptoren an Homogenaten von Frischgewebe mit der Dextran–Coated Charcoal (DCC) Methode. Die meisten Daten über die klinische Wertigkeit der Steroidrezeptoren wurden mit der Anwendung der biochemischen Methoden gesammelt.⁷⁵ Die in der Literatur zumeist angeführten Nachteile der DCC-Methode sind einerseits die hohe technische Aufwändigkeit und die damit verbundenen Kosten und andererseits die Anwendung von radioaktivem Reagens als auch die größere Menge an benötigtem frischem Gewebe. Bei letzterem Mangel ist ein weiterer Kritikpunkt angeknüpft. Da das Gewebe homogenisiert wird, ist dadurch die Möglichkeit der Zelldifferenzierung in der Probe nicht mehr vorhanden und somit ist die

Kontamination mit steroidrezeptorpositiven, aber benignen Zellen, nicht auszuschließen. Mit der Entwicklung von spezifischen monoklonalen Antikörpern und der immunhistochemischen Bestimmungsmethode konnten die Nachteile der biochemischen Methode zum Teil überwunden werden. Die immunhistochemische Methode hat einige Vorteile, vor allem die einfachere technische Durchführung, geringere Kosten, höhere Sicherheit, Anwendbarkeit an unterschiedlichen Proben sowie höhere Sensitivität und Spezifität in den Proben wo nur wenige Tumorzellen vorhanden. Gleichzeitig können durch die Visualisierung die falsch positiven Befunde bei der Kontamination durch benigne rezeptorpositive Zellen vermieden werden.

Bei den 13 Fällen mit Doppelbestimmungen in unserer Studie lagen sowohl der immunhistochemisch als auch der biochemisch bestimmte Steroidrezeptor-Wert vor. Aus den linearen Regressionsanalysen zwischen immunhistochemischen und biochemischen Verfahren in unserer Analyse ergab sich eine Übereinstimmung mit den Korrelationskoeffizienten von 0,586 ($p < 0,0001$) für den Östrogenrezeptor und 0,813 ($p < 0,0001$) für den Progesteronrezeptor. Somit zeigt sich eine mäßige Korrelation diesen zwei Bestimmungsmethoden des Östrogenrezeptors. Im Gegensatz zum Sachverhalt beim Östrogenrezeptor ist die Korrelation der beiden Bestimmungsmethoden des Progesteronrezeptors deutlich besser. Wenn man die Analysen der Steroidrezeptoren mit beiden Bestimmungsverfahren nur auf Übereinstimmung positiv/negativ zusammenfasste, so war die Korrelation vollständig. Trotz einigen Beschränkungen der DCC-Methode haben zahlreiche Studien eine gute Korrelation zwischen den beiden Methoden gezeigt.¹³⁰⁻¹³¹⁻¹³² In der Literatur⁹⁵ wird eine Diskonkordanzrate im Durchschnitt von 10-30%, sowohl für Östrogen- als auch für den Progesteronrezeptor, angegeben. In einer Studie von Allred et al.¹³³ konnte sogar 91% Konkordanz erreicht werden. In der Arbeit von Louis P. Pertschuk und Mitarbeitern¹³⁴ wurden beide Methoden verglichen, 600 Fälle des Östrogenrezeptors und 449 des Progesteronrezeptors. Bei der DCC-Methode wurde die Trenngrenze zwischen negativ und positiv im Falle des ER bei 10 fmol/mg Protein und bei PR bei 5 fmol/mg Protein gesetzt. Die Rezeptorpositivität bei der IHC-Methode wurde bei >10% Färbung definiert. So zeigten sich in dieser

Studie ähnliche Ergebnisse wie in unserer Arbeit, wobei der Korrelationskoeffizient für den Östrogenrezeptor 0.565 ($p < 0.001$) und für den Progesteronrezeptor 0.423 ($p < 0.001$) betrug. Der Unterschied war jedoch, dass in der zitierten Studie die Übereinstimmung zwischen beiden Methoden für den Östrogenrezeptor besser war als für den Progesteronrezeptor. Ein Studie mit 299 Patientinnen aus dem Hanusch Medical Center Wien¹³¹ demonstrierte eine statistisch signifikante Korrelation der beiden Methoden mit 84,2% Konkordanz für den Östrogenrezeptor und 61,3% für den Progesteronrezeptor, bei der Trenngrenze >10 fmol/mg Protein für die biochemische DCC-Methode und bei $IRS > 1$ für die immunhistochemische Methode. Molino et al.¹³⁵ fanden 81,5% Konkordanz zwischen beiden Methoden, wobei die Cut-off Grenze für die IHC-Methode bei 45% Färbung und für die DCC-Methode bei ≥ 10 fmol/mg Protein für den Östrogenrezeptor und bei ≥ 15 fmol/mg Protein für den Progesteronrezeptor gesetzt wurde. Die angeführten Beispiele veranschaulichen die Problematik der Cut-off Punkte. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen einer Vielzahl von Studien, die sich mit dem Thema der Bestimmungsmethoden der Steroidrezeptoren befasst haben, ist aufgrund der unterschiedlich gesetzten Cut-off Kriterien für die Trennung zwischen Positivität und Negativität erschwert. In einer Studie von Layfield¹³⁶ wurden 45 Pathologieinstitute über die angewendeten Kriterien der Bestimmung von Steroidrezeptoren mit der immunhistochemischen Methode befragt. 62% der befragten Institute hat die Tumorpositivität bei 5-10% der positiven (gefärbten) Zellen ohne Berücksichtigung der Intensität der Färbung definiert. Einige Institute haben bei jeglichem Nachweis der Färbung den Tumor als rezeptorpositiv eingestuft, während andere Institute die Kombination aus der Anzahl der positiven Zellen und der Färbeintensität umgerechnet in verschiedene Scores angewendet haben. Um die Übereinstimmung der Methoden überprüfen zu können, bedarf es eine einheitliche Definition der Rezeptorpositivität oder deren Negativität. Laut der St. Gallen Empfehlung ist bei 10% der positiven Zellen der Tumor als Steroidrezeptor positiv einzustufen.¹³⁷ Sogar wenn alle diese Empfehlung übernehmen würden, bliebe trotzdem eine gewisse Dosis Subjektivität bei der Präparatbeurteilung. Sowohl unsere Untersuchungen, als auch die angeführten

anderen Arbeiten, haben insgesamt eine gute Korrelation zwischen der immunhistochemischen und der DCC-Methode bestätigt, jedoch konnte eine perfekte Übereinstimmung nicht gefunden werden. Dies lässt sich zum Teil durch die unterschiedlichen Charaktere beider Methoden erklären. Während mit der DCC-Methode der monomerisierte zytosolische Rezeptor bestimmt wird, erfasst die IHC-Methode den dimerisierten Kernrezeptor. Ein wesentlicher Grund für die unvollkommene Übereinstimmung beider Methoden dürfte sein, dass bei der DCC-Methode auch die Steroidrezeptoren aus gesundem Brustdrüsengewebe miterfasst werden. Zusammenfassend kann man aus unseren Ergebnissen ableiten, dass in Übereinstimmung mit zahlreichen früheren Arbeiten die immunhistochemische und biochemische Methode gut korrelieren.

6.4 Steroidrezeptoren als Prognosefaktoren

Während die prädiktive Bedeutung der Steroidrezeptoren in der Mehrheit der durchgeführten Studien bestätigt zu sein scheint¹³⁸, wird die Frage der prognostischen Aussage kontrovers diskutiert^{139,140}. Hiermit werden wir uns zu einem späteren Zeitpunkt befassen. Hunderte durchgeführter Studien haben sich die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Östrogenrezeptorstatus und dessen prognostischer Rolle als Untersuchungsziel gesetzt. Während einige Untersucher diesen Zusammenhang demonstrierten^{141,142}, kamen andere Studien zu einem eher negativen Ergebnis^{143,144}, vor allem in der Langzeitbeobachtung. Die Mehrheit der Untersucher ist der Meinung, dass die Anwesenheit des Östrogenrezeptors als vorteilhafter Prognosefaktor angenommen werden kann, obwohl die prognostische Stärke niedrig ist und sich im Krankheitsverlauf verliert. In der bereits diskutierten Frage der prognostischen Bedeutung der Steroidrezeptoren in der univariaten Analyse einer binären Einteilung (positiv ≥ 20 fmol/mg Protein), konnten wir eine mäßige und nur kurzfristige Rolle des Östrogenrezeptors, und eine deutlich bessere und für das Langzeitüberleben bedeutendere Rolle des Progesteronrezeptors, demonstrieren. In der multivariaten Analyse zeigten weder der Östrogen- noch der Progesteronrezeptor signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Diese

Ergebnisse bezogen sich auf das Gesamtkollektiv. Wir sind weiter der Frage nachgegangen, welche Bestimmungsmethode mehr Information für die Beurteilung der Prognose ergibt, die biochemische oder die immunhistochemische Methode. Gleichzeitig gingen wir das Problem der Kriterien, wo der Trennwert gesetzt werden soll, an. Bei der biochemischen DCC-Methode haben wir die 9-Gruppen-Einteilung einer 2-Gruppen-Einteilung bei variierendem Cut-off Punkt gegenübergestellt und gleichzeitig den Vergleich der binären Einteilung mit der 3-Gruppen-Einteilung vorgenommen.

Bei der immunhistochemischen Methode wurde die Feinunterteilung nach Remmele mit binärer Einteilung und unterschiedlichen Cut-off Punkten verglichen, um diese danach der 3-Gruppen-Einteilung (niedrige oder fehlende Expression/mäßige Expression/ hohe Expression) gegenüberzustellen.

Sowohl der Vergleich unserer Ergebnisse mit der Literatur, als auch der Vergleich einzelner Literaturangaben untereinander, ist aufgrund verschiedener Ursachen problematisch. In internationalen Studien werden Überlebensdaten oft in absoluten Häufigkeiten aufgeführt, während oftmals keine kumulativen Inzidenzen angegeben werden. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Bezugskollektive, Ungleichheiten in den Nachbeobachtungszeiträumen und vor allem uneinheitlich definierten Cut-off Punkten, ist eine definitive Vergleichbarkeit nicht möglich.

Auf eine vergleichende tabellarische Darstellung wurde daher verzichtet. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der verschiedenen Studien einzeln aufgeführt.

6.4.1 Östrogenrezeptor als Prognosefaktor bei Anwendung der DCC-Methode

Wir haben gesehen, dass im Gesamtkollektiv der prognostische Informationsgehalt des Östrogenrezeptors mäßig ausfällt und die Überlebensunterschiede zwischen Patientinnen mit positivem und Patientinnen mit negativem Östrogenrezeptor nur im kurzfristigen Überleben statistische Relevanz erreichen. Für die weitere Diskussion der prognostischen bzw. prädiktiven Bedeutung der Steroidrezeptoren wurden diese separat für die jeweilige Methode betrachtet. Das hier auftretende Problem ist, ob die biochemische Ermittlung des Östrogenrezeptors eine Vorhersage der Prognose erlaubt und wie der Cut-off Punkt zu wählen ist. Die Frage die sich hier stellt lautet also, ob der biochemisch bestimmte Östrogenrezeptor eher eine klinische Bedeutung hat, wenn man den Cut-off Punkt bei 20 fmol/mg Protein setzt, als bei 40 fmol/mg Protein, oder ob eine Einteilung in 9-Gruppen (siehe Tab. 21), gewählt werden sollte.

Bei der Einteilung des Östrogenrezeptors in 9-Gruppen ergab sich der χ^2 -Wert von 2,2 mit dem p-Wert 0,974, womit keine relevante Signifikanz im Überleben zwischen 9 Patientengruppen nachgewiesen werden konnte. Bei einer binären Einteilung in positiv/negativ und einem Cut-off Punkt von 40 fmol/mg Protein, konnte ebenfalls kein prognostischer Unterschied zwischen ER positiven und ER negativen primären Mammakarzinomen bestätigt werden. Bei der Wahl eines Cut-off Punktes bei 15 fmol/mg Protein kamen wir zu einem ähnlichen Ergebnis ($\chi^2=0,05$; $p=0.8254$). Bei der Übertragung der Daten zum Gesamtüberleben in die Überlebenskurven und einer Trennung zwischen Rezeptorpositivität- und negativität bei 20 fmol/mg Protein (Abb. 16), konnte fast 100 Monate kein Überlebensunterschied beobachtet werden. Erst nach dieser Zeit kam es zur Divergenz der Kurvenschar und überraschender Weise zu einem leicht besseren Überleben der Gruppe mit negativem Östrogenrezeptor (<20 fmol/mg Protein). Zusammenfassend kamen wir zu dem Ergebnis, dass es keinen Unterschied macht ob der Cut-off Punkt bei 15, 20 oder bei 40 fmol/mg Protein gesetzt ist, oder eine Einteilung in 9 Klassen gewählt wird. Der biochemisch bestimmte Wert des Östrogenrezeptors in unserem Kollektiv ist ohne klinische Bedeutung

hinsichtlich des Gesamtüberlebens (OS). Eine log Transformation der Messwerte ergab bei einer Einteilung in 9 Untergruppen ebenfalls keine Verbesserung der klinischen Relevanz der biochemisch ermittelten Östrogenrezeptor-Werte ($\text{Chi}^2=4,9$, $p=0,773$). Lediglich bei der Betrachtung des Östrogenrezeptors als diskrete Variable, also als kontinuierliches Spektrum von biochemisch bestimmten Werten, wird der Zusammenhang zwischen dem Östrogenrezeptor in fmol/mg Protein und Länge der Überlebenszeit statistisch signifikant ($p<0,0001$). Ein solches Vorgehen ist jedoch klinisch nicht umsetzbar. In Zusammenschau der berücksichtigten Studien kommen die verschiedenen Autoren zum Teil zu deutlichen Unterschieden in den jeweiligen Beobachtungen. Die Dänische Untersuchungsgruppe¹⁴⁵ konnte nach 3 Beobachtungsjahren ein statistisch signifikant besseres DFS und OS der ER-DCC positiven Gruppe im Vergleich zur negativen Gruppe feststellen (Cut-off 10 fmol/mg Protein). In prognostischer Stärke haben sich biochemische und immunhistochemische Methode nicht unterschieden. Fischer et al.⁹⁴ konnten beim Cut-off Punkt >11 fmol/mg Protein beste und statistisch signifikante Überlebensunterschiede zwischen Östrogenrezeptor positiver und negativer Patientengruppe demonstrieren, jedoch nur hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Für das rezidivfreie Überleben konnte keine statistische Relevanz erzielt werden. Zu ähnlichem Ergebnis ist die Arbeitsgruppe um Chrapusta¹⁴⁶ gekommen. Um den optimalen Cut-off Punkt für eine Definition der Positivität zu eruieren, haben die Untersucher das OS in Relation zum Östrogenlevel, gemessen mit der DCC-Methode (aber auch IHC-Methode, sowohl für ER als auch für PR, siehe später) gesetzt. Aufgrund des größten Unterschieds im Überleben und kleinstem p-Wert wurde der optimale Cut-off Punkt für den ER-DCC bei 10 fmol/mg Protein postuliert. Die mehrfach zitierte Untersuchung von Coradini et al.¹²⁰ zeigte keine prognostische Bedeutung des Östrogenrezeptors in den ersten 36 Monaten bei einer Cut-off Grenze von 1 fmol/mg Protein. Nach 72 Monaten konnte wiederum ein erhöhtes Rezidivrisiko bei Östrogenrezeptor-Positivität beobachtet werden. Diese Aussage korreliert mit einem angedeutet besseren Überleben der ER negativen im Vergleich zur ER positiven Subgruppe unserer Studienlage nach ca. 100 Follow-up Monaten.

6.4.2 Östrogenrezeptor als Prognosefaktor bei Anwendung der immunhistochemischen Methode

Die gleiche Vorgehensweise wie im biochemischen Kollektiv wurde für die Betrachtung des immunhistochemischen Kollektivs herangezogen. Welcher Cut-off Punkt soll bei der immunhistochemischen Bestimmung des ER gewählt werden oder anders ausgedrückt: Ab wann sollte ein primäres Mammakarzinom als östrogenrezeptorpositiv eingestuft werden? Um diese Frage beantworten zu können, wurde die Feinunterteilung nach Remmele einer binären Unterteilung bei variierendem Cut-off Punkt gegenübergestellt und ein direkter Vergleich dieser mit einer 3-Gruppen-Einteilung angestellt.

Die derzeitig übliche Einteilung in einen Score mit den Elementen 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 12, ist die feinste Unterteilung.

Bei Vergleich der östrogenrezeptorpositiven und östrogenrezeptornegativen primären invasiven Mammakarzinomen bei einem Cut-off Punkt von 2, betrug in unserem Kollektiv der maximale prozentuale Vorteil im Gesamtüberleben 10,3% und wurde nach 3 Follow-up Jahren beobachtet, wobei es nach 10 Jahren wieder zu einem Angleichen der Absterbekurven kam. Nach 10 Jahren hatte das rezeptornegative Kollektiv ein ca. 2% besseres Überleben. Für die Abhängigkeit des Überlebens vom positiven Nachweis am Östrogenrezeptor konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang eruiert werden. Demnach kann der Östrogenrezeptor, wenn dieser mit der immunhistochemischen Methode bestimmt wurde, als Prognosefaktor gewählt werden. Dies gilt jedoch nur bei bestimmten Cut-off Werten, sofern eine binäre Auswertung als negativ und positiv benutzt wurde. Dies lässt sich mit Hilfe der

Tab. 23 demonstrieren. Wenn die entsprechenden Kaplan-Meier Kurven für alle möglichen Cut-off Grenzziehungen berechnet wurden, zeigten sich signifikante Überlebensunterschiede zwischen positiven und negativen Fälle bei der Wahl der Cut-off Punkte von 1, 2 oder 3. Dabei wurde der höchste Chi^2 -Wert beim Cut-off Punkt von 1 erreicht. Somit zeigt der Cut-off Punkt 1 die optimalen Eigenschaften für eine prognostische Trennung zwischen positivem und negativem Rezeptorstatus. Aber auch der Cut-off Punkt von 2, wie ihn der OSP Stuttgart festgelegt hat, ergibt einen hohen Chi^2 -Wert mit $p=0,04$. Bei dem Cut-off

Punkt 1 haben wir die Überlebenskurven des rezeptornegativen Kollektivs denen des rezeptorpositiven Kollektivs gegenübergestellt (Abb. 19). So zeigte sich, dass Patientinnen mit ER-IRS: 0 ein deutlich schlechteres Überleben hatten als Patientinnen mit ER-IRS: 1-12. Dieser Überlebensvorteil hielt ca. 10 Jahre an, und war in den Folgejahren zunehmend unwesentlich. In der schon zitierten Studie von Chrapusta¹⁴⁶ wurde die Relation zwischen Östrogenlevel und Gesamtüberleben betrachtet und der optimale Cut-off Punkt für die Definition der Östrogenrezeptor-Positivität bei $IRS \geq 2$ statistisch berechnet (Score=PP+SI; 0-6). Da unsere Untersuchungen zeigten, dass die Feinunterteilung des Östrogenrezeptors keine zusätzliche Information über eine binäre erbringen konnte, wurde auch der Fragestellung nachgegangen, ob die 3-Gruppen-Einteilung eine bessere Vorhersage erbringen würde, als die rein binäre. So zeigt sich anhand $p=0,023$ im Breslow-Test und $p=0,105$ im Chi²-Test deutlich, dass bei einer Unterteilung der Östrogenrezeptorexpression in 3 Gruppen:

- Gruppe mit niedriger oder fehlender Expression (IRS 0 - 1),
- Gruppe mit mäßiger Expression (IRS 2 - 6),
- Gruppe mit hoher Expression (IRS 8 - 12)

ein zusätzlicher Informationsgewinn nicht zu erzielen war. Nur im Breslow-Test konnte die Signifikanz erreicht werden, was sich auch im Verlauf der Überlebenskurven der 3 Subgruppen demonstrieren ließ (Abb. 20). Zwischen dem 70. und 100. Follow-up Monat kam es jedoch zur Angleichung der Kurvenschar und für den weiteren Krankheitsverlauf blieb die 3-Gruppen-Einteilung ohne statistische Relevanz. In der Zusammenschau der Ergebnisse der Vielzahl von durchgeführten Studien zum Thema der prognostischen Rolle des Östrogenrezeptors konnte ein eher mäßiger Vorteil des positiven Östrogenrezeptorstatus, im Durchschnitt ein ca. 10%-iger Benefit im DFS und/oder OS im Kollektiv ohne jegliche Systemtherapie, verzeichnet werden.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸ Um eine Aussage über den prospektiven Krankheitsverlauf zu treffen, wird der Östrogenrezeptor herangezogen, wobei für das langfristige Überleben andere Prognosefaktoren mehr Einfluss haben. Kinsel et al.¹⁴⁹ zeigten

nach 5 Follow-up Jahren ein besseres Überleben für östrogenrezeptorpositive Patientinnen, gleichgültig ob die Bestimmung biochemisch oder immunhistochemisch durchgeführt wurde. Nach 10 Jahren konnte die prognostische Rolle der DCC-Methode für den Östrogenrezeptor nicht mehr statistisch nachgewiesen werden, wenngleich die Vorhersage der besseren Prognose mit der immunhistochemischen Methode noch möglich war. Robertson et al.¹⁵⁰ sowie Querzoli et al.¹⁵¹ demonstrierten eine Tendenz zur besseren Prognosevorhersage mit der IHC-Methode im Vergleich zur DCC-Methode der Östrogenrezeptorbestimmung. Reiner et al.¹⁵² sowie Beck et al.¹⁵³ zeigten eine statistisch signifikant bessere prognostische Aussagekraft der immunhistochemischen Methode der Östrogenbestimmung. Dabei wurde der Remmele Score mit dem DCC-Score bei einem Cut-off von 20 fmol/mg Protein verglichen. In der schon zitierten Arbeit von Fischer et al.⁹⁴ wurde ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben bei dem Cut-off Punkt ≥ 1 und für das DFS bei dem Cut-off Punkt > 2 berechnet. Die gleiche Studie konnte mit der DCC-Methode bei der ER-Bestimmung eine gute Prognose für das Gesamtüberleben zeigen, jedoch nicht für das rezidivfreie Überleben. Dass die immunhistochemische ER-Bestimmungsmethode besser für die prognostische Einschätzung des Gesamt- sowie rezidivfreien Überlebens ist als die biochemische Methode, wird ebenfalls von Allred et al.⁹⁰, Hanna et al.¹⁵⁴ und Fernö et al.¹⁵⁵ bestätigt. Die Ergebnisse aus unserer Datenanalyse und den zitierten Studien zeigen somit, dass die wissenschaftliche Entwicklung von der DCC-Methode zum immunhistochemischen Bestimmungsverfahren, richtig war. Ebenso zeigen unsere Ergebnisse, in Übereinstimmung mit der Literatur, die Richtigkeit der Cut-off Festlegung für die Trennung zwischen positiv und negativ bei IRS 1 oder 2. Weiterhin bestätigen unsere Untersuchungen, dass die Wahl des Cut-off Punktes bei 2 im Remmele Score durch den Stuttgarter OSP eine richtige Entscheidung war.

6.4.3 Progesteronrezeptor als Prognosefaktor, Bestimmung mit der DCC-Methode

Bei der univariaten Analyse des Gesamtüberlebens im Studienkollektiv konnten wir zeigen, dass der Progesteronrezeptor im Gegensatz zum Östrogenrezeptor als univariater Prognosefaktor die statistische Relevanz erreichen konnte. Weiterhin wurde die gleiche Frage wie im vorgehenden Kapitel angegangen, nämlich ob der biochemisch bestimmte Progesteronrezeptor eine klinische Bedeutung hat und ob der prognostische Informationsgewinn höher ist, wenn der Cut-off Punkt bei 20 fmol/mg Protein gesetzt wird als bei 40 fmol/mg Protein, oder bringt eine Einteilung in 9 Untergruppen eine bessere Unterscheidung zwischen Patienten mit gutem Überleben.

Wenn die gleichen Berechnungen für den Progesteronrezeptor angestellt wurden, so ergab sich bei einer Einteilung in 9 Gruppen ein $\chi^2=7,7$ mit einem p-Wert von 0,461. Diese Werte deuten auf eine fehlende Signifikanz hin.

Bei der Wahl des Cut-off Punkts bei 20 fmol/mg Protein für die Entscheidung progesteronrezeptornegativ oder progesteronrezeptorpositiv ergab sich $\chi^2=0,4$ mit einem p-Wert von 0,159. Die Herabsetzung des Cut-off Punktes auf 15 fmol/mg Protein änderte an dieser Beurteilung nichts ($\chi^2=0,5$; $p=0,493$). Gleiches gilt bei einer Heraufsetzung des Cut-off Wertes auf 40 fmol/mg Protein. Bei einem Cut-off Punkt von 40 fmol/mg Protein wurde ein $\chi^2= 0,9$ sowie ein p-Wert von 0,34 errechnet. Bei der Betrachtung der Überlebenskurven zweier Patientengruppen mit dem Cut-off Punkt 40 fmol/mg Protein (Abb. 17) konnte fast 6 Jahre kein Überlebensvorteil registriert werden. Erst danach divergieren die Kurven auseinander mit einem geringfügig besseren Überleben der Gruppe mit PR>40 fmol/mg Protein. Lediglich bei der Auftragung des PR in fmol/mg Protein als diskrete Variable gegen die Überlebenszeit ergab sich ein hoch signifikanter Wert von $p<0.0001$, in ganz ähnlicher Weise wie beim ER.

Zusammenfassend ergaben weder die biochemischen Auswerteverfahren des Östrogen- noch die des Progesteronrezeptors eine zusätzliche Information hinsichtlich des Überlebens. Die biochemische Bestimmung der Steroidrezeptoren stratifiziert daher bei keinem der untersuchten Cut-off Werte zwischen Patienten mit gutem und schlechtem Überleben.

Während der letzten zwei Dekaden wurde die prognostische Rolle der Steroidrezeptoren Thematik vieler Publikationen. Die Unklarheit bzw. Uneinheitlichkeit über den prognostischen Wert, vor allem in der Langzeitbeobachtung, leitet sich vor allem aus der Problematik der Vergleichbarkeit der Ergebnisse ab. Die Arbeit von Fischer et al.⁹⁴ ist zu einem anderen Ergebnis gekommen als wir; bei dem Cut-off Punkt 41 fmol/mg Protein fanden sich statistisch signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben zwischen PR positiver und PR negativer Patientengruppe. Für das DFS wurde die Signifikanz bei Cut-off >8 fmol/mg Protein angegeben. In der schon zitierten Studie von Chrapusta¹⁴⁶ wurde der optimale Cut-off Punkt für die Definition der PR-Positivität bei 5 fmol/mg Protein gesetzt (für ER 10 fmol/mg Protein). Während sich der prognostische Vorteil des positiven Östrogenrezeptors nach 5 Jahren minimierte, hatte die PR-positive Patientengruppe sogar nach 10 Jahren ein statistisch besseres Gesamtüberleben. Die Östrogenrezeptor- sowie Progesteronrezeptor-Positivität, bestimmt durch die biochemische DCC-Methode in der schon genannten Arbeit von Biesterfeld⁹⁶, hat einen positiven Einfluss auf das Überleben, wobei nur für den Progesteronrezeptor die statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Costa et al.¹⁵⁶ untersuchten die prognostische, zeitabhängige Wertigkeit der Steroidrezeptoren im Patientenkollektiv ohne adjuvante Therapie. In der univariaten Analyse hatten sowohl der Progesteronrezeptor als auch der Östrogenrezeptor eine signifikante Prognoseaussagekraft hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei Cut-off Werten von 10, 20 oder 100 fmol/mg Protein. Der signifikante Überlebensunterschied konnte in den ersten 5 Jahren verzeichnet werden und blieb über die restliche Follow-up Zeit unverändert. In der multivariaten Analyse hatte wiederum nur der Progesteronrezeptor statistische Bedeutung für das Gesamtüberleben (PR \geq 20 fmol/mg Protein p=0,036; PR \geq 100 fmol/mg Protein p=0,01). In dem nodalnegativen Kollektiv, im Unterschied zum Östrogenrezeptor, war der Progesteronrezeptor bei dem Cut-off Punkt \geq 100 fmol/mg Protein ein unabhängiger Prognosefaktor in der Langzeitbeobachtung. Wenn aber das untersuchte Kollektiv in Altersgruppen \leq 50 oder >50 Jahre unterteilt wurde, erreichte der Progesteronrezeptor nur bei Patientinnen die jünger als 51 Jahre

waren und bei einem Cut-off Punkt ≥ 100 fmol/mg Protein statistisch relevante prognostische Bedeutung, die nur während der ersten 5 Follow-up Jahre anhielt. Obwohl unsere Ergebnisse dies nicht bestätigen, wird die prognostische Rolle des Progesteronrezeptors, bestimmt mit der DCC-Methode, von der Mehrheit der Untersucher als positiv angenommen, jedoch bleibt die Frage der Langzeitwertigkeit sowie des optimalen Cut-off Wertes ungeklärt. Weiterhin ergeben sich weder aus der Literatur noch aus unseren eigenen Untersuchungen Hinweise darauf, dass die biochemische Bestimmung des PR der immunhistochemischen Bestimmungsmethode vorzuziehen wäre.

6.4.4 Progesteronrezeptor als Prognosefaktor, Bestimmung mit der immunhistochemischen Methode

In gleicher Weise wie für den Östrogenrezeptor wurde der Progesteronrezeptor analysiert. Auch hier wurde die Frage gestellt, ab wann ein primäres Mammakarzinom als progesteronrezeptorpositiv einzustufen ist.

Wieder zeigt sich bei Betrachtung der Überlebenskurven, dass die Unterschiede in den ersten Behandlungsjahren sehr viel deutlicher sind als im späteren Krankheitsverlauf. Dies spiegelt sich im Breslow-Wert wieder, aber anders als beim Östrogenrezeptor, ist der Benefit eines progesteronrezeptorpositiven Status beim primären Mammakarzinom auch noch im Langzeit-Follow-up nachzuweisen. Jedoch auch hier ist eine Annäherung der Kurvenscharen nach 10 Jahren zu beobachten. Generell ist dabei eine wesentlich bessere Vorhersage der Prognose als beim Östrogenrezeptor zu verzeichnen. Es zeigt sich in den Verlaufskurven mit und ohne Progesteronrezeptor, und einem Cut-off Punkt von 3, der deutlichste Unterschied zwischen PR positiven und PR negativen Primärtumoren. Diese Aussage belegt auch Tab. 26. Berechnet man für alle möglichen Grenzziehungen entsprechende Kaplan-Meier Kurven, so zeigten die Werte der Tab. 26 die höchsten Chi²- und Breslow-Werte bei dem Cut-off Punkt 3 mit gleichzeitig niedrigsten p-Werten ($p < 0,001$). Besonders bemerkenswert ist, dass sich der Unterschied zwischen den Krankheitsverläufen mit zunehmender Krankheitsdauer nicht verliert, wie das für den Östrogenrezeptor der Fall ist.

Der maximale prozentuale Vorteil im Gesamtüberleben bei Vergleich der PR negativen und PR positiven primären invasiven Mammakarzinomen (mit einem Cut-off Punkt von 2) lag im unseren Kollektiv bei 5 Jahren mit 11,8% Überlebensdifferenz zu Gunsten der PR positiven Fälle. Der Progesteronrezeptor ist somit ein verlässlicherer (aber univariater) Prognosefaktor als der Östrogenrezeptor. Bei einer binären Einteilung mit variierenden Cut-off Punkten zeigte der Cut-off Punkt 3 die günstigsten Eigenschaften als Trennwert zwischen positivem und negativem Rezeptorstatus, zwischen guter und schlechter Überlebensprognose, obwohl die Cut-off Punkte 2, 4 und 6 ebenfalls gute prognostische Qualitäten besitzen. Beim Progesteronrezeptor zeigt die Einteilung in 3 Gruppen eindeutig, sowohl im Breslow-Test mit $p=0,0002$ als auch im Chi²-Test mit $p=0,0491$, dass ein signifikanter Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Rezeptorexpression besteht. Die Betrachtung der Überlebenskurven in Abb. 23 zeigt jedoch deutlich, dass die Unterscheidung in fehlende bis geringe, mäßige und hohe Expression keinen zusätzlichen Informationswert erbrachte und eher geringere Signifikanzniveaus erreichte, als eine rein binäre Einteilung. Die Überlebenskurven der Gruppe mit hoher Progesteronrezeptorexpression (PR-IRS: 8-12) und der Gruppe mit mäßiger Rezeptorexpression (PR-IRS: 2-6) fast synchron verlaufen. Die Angleichung der Überlebenskurve der Gruppe mit negativem Rezeptorstatus (PR-IRS 0-1) an die mit positivem Progesteronrezeptor geschieht hier, gewissermaßen wie beim Östrogenrezeptor, nur zu einem deutlich späteren Zeitpunkt. In der bereits erwähnten Studie¹⁵³ der Universität Mainz konnte zwischen beiden Methoden der Rezeptorbestimmung eine fast 72%-ige Übereinstimmung gezeigt werden. Gleichzeitig zeigte die immunhistochemische Methode eine bessere Diskriminierung für eine gute Prognose als die biochemische, obwohl in unserer Studie die Zuordnung in eine der 9 Remmele Subgruppen keinen zusätzlichen prognostischen Informationsgewinn einbrachte. Die gleiche Studie zeigte auch, dass der Nachweis des Progesteronrezeptors, wenn er immunhistochemisch bestimmt wurde, eine bessere Prognose leisten konnte als der Östrogenrezeptor. Reiner et al.¹⁵² haben in ihrer Studie eine statistisch höhere prognostische (univariate) Bedeutung der IHC-Methode (für

PR als auch für ER), im Vergleich zur DCC-Methode zeigen können, ohne dass die Anzahl der gefärbten Zellen oder die Intensität der Färbung Einfluss auf die Prognose hatten. Fischer et al.⁹⁴ fanden es für die Vorhersage des Gesamtüberlebens optimal den Cut-off Punkt für den Progesteronrezeptor bei >1 zu wählen. Für die Vorhersage des DFS hatte die immunhistochemische Bestimmungsmethode des Progesteronrezeptors, im Gegensatz zum Östrogenrezeptor, keinen prognostischen Einfluss.

Die Ergebnisse aus unserer Datenanalyse und den bereits zitierten Studien zeigen, dass die immunhistochemische PR-Bestimmungsmethode besser für die prognostische Einschätzung des Gesamt- sowie rezidivfreien Überlebens geeignet ist als die biochemische Methode und somit die Entscheidung, den Progesteronrezeptor bevorzugt immunhistochemisch zu bestimmen, richtig war. Ebenso zeigen unsere Ergebnisse in Übereinstimmung mit der Literatur die Richtigkeit der Cut-off Festlegung für die Trennung zwischen positiv und negativ bei niedrigen IRS Werten (1, 2 oder 3).

6.4.5 Prognose bei der Kombinationsanalyse beider Steroidrezeptoren

Etwa 75% der primären Mammakarzinome sind östrogenrezeptorpositiv, und mehr als die Hälfte von diesen sind auch progesteronrezeptorpositiv.¹⁵⁷ In unserem Gesamtkollektiv wurde bei 71,4% der Fälle ein positiver Östrogenrezeptorstatus nachgewiesen, 63,7% der Patientinnen waren Progesteronrezeptor positiv. Etwa $\frac{2}{3}$ der für unsere Studie untersuchten Fälle primärer Mammakarzinome waren Östrogen- und Progesteronrezeptor positiv. Für die Kombinationsanalyse beider Steroidrezeptoren wurde das immunhistochemische Kollektiv als Basis benutzt. Bei einem Cut-off Punkt ≥ 2 waren 55% der Tumoren für beide Rezeptoren positiv, 19% hatten einen negativen Rezeptorstatus, 16% waren ER+/PR- und bei 9% der Fälle waren ER-/PR+. Die Tatsache, dass die ER+/PR+ Fälle stärker vertreten sind als die ER+/PR- entspricht der Verteilung in der angewendeten Literatur. Beim Vergleich

der Rezeptorkombinationen wird in der Literatur¹⁵⁸ eine höhere Inzidenz der ER+/PR- als der ER+/PR+ Mammakarzinome bei älteren Frauen angegeben.

Die Möglichkeit, dass die Kombination des ER und PR mehr Information liefert als die alleinige Analyse des einzelnen Steroidrezeptors, wird bereits in Ansätzen durch das Cox-Modell für EFS und OS nahe gelegt (Tab. 46, Tab. 47). Hinsichtlich der Überlebenszeitberechnung in Abhängigkeit einer Kombination der Steroidrezeptoren wurden zuerst in der 3-Gruppen-Einteilung:

- Beide Rezeptoren positiv
- Einer der Rezeptoren positiv
- Beide Rezeptoren negativ

und danach in der 4-Gruppen-Einteilung:

- ER-/PR-
- ER+/PR-
- ER-/PR+
- ER+/PR+,

univariate und anschließend multivariate Analysen durchgeführt.

Bei der univariaten Analyse der 3-Gruppen-Einteilung konnte nur im Breslow-Test ein Signifikanzunterschied im Überleben gezeigt werden. Bei Hinzunahme beider Einteilungen in das Cox-Modell ergab für die Einteilung in 3 Gruppen einen Wald-Test von 2,543 ($p=0,011$) und damit einen signifikanten Beitrag zur Vorhersage des OS. Bei einer Einteilung in 4 Gruppen wurde der p -Wert von 0,0072 errechnet, wobei man eigentlich erwartet hätte, dass ER+/PR+ Gruppe eine gute Prognose, die Gruppen ER+/PR- und ER-/PR+ eine mäßige Prognose und die Gruppe ER-/PR- eine schlechte Prognose hat.

Die Überlebensunterschiede sind signifikant, aber eben nicht so eindeutig wie angenommen, wie in Tab. 28 verdeutlicht wird. Die Gruppe mit beiden positiven Rezeptoren hat eine 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 62,7%, die Gruppe mit beiden negativen Rezeptoren von 58,8%. Es zeigt sich ein Überlebensvorteil von „nur“ 3,9%. Nach 5 Jahren lag der Überlebensvorteil der Gruppe beider positiven Rezeptoren zur rezeptornegativen Gruppe noch bei 11,2%. Auffallend ist, dass nach 5 oder 10 Jahren die Patientinnen bessere Überlebensaussichten haben, die Progesteronrezeptor positiv sind gegenüber

denen, die einen negativen Progesteronrezeptor aufweisen, unabhängig davon ob der Östrogenrezeptor positiv oder negativ ist. Was auch auffällt ist, dass nach 5 Jahren die Gruppe mit negativem Östrogenrezeptor und positivem Progesteronrezeptor ein prozentual besseres Überleben hat, als die Gruppe mit positivem Östrogenrezeptor und negativem Progesteronrezeptor. Dieser Vorteil liegt nach 5 Jahren bei 7,9% und wird nach 10 Beobachtungsjahren noch deutlicher mit einem Überlebensvorteil von 11,9% zu Gunsten der Gruppe mit der ER-/PR+ Kombination. Zu ähnlichem Ergebnis ist die Untersucherguppe um Alexieva-Figusch¹⁵⁹ gekommen, deren bestes Überleben, ausgedrückt in relativen Sterberaten, die ER+/PR+ Gruppe hatte (relative Sterberate 0,42), gefolgt von ER-/PR+ (0,66) und ER+/PR- (0,79) verglichen mit ER-/PR- (relative Sterberate per Definition 1).

Unbeantwortet bleibt die Frage, welcher biologische Grund hier vorliegt.

Bei der Literaturrecherche sind wir auf das Problem der Vergleichbarkeit von Studienergebnissen zum Thema Prognose der Steroidrezeptoren aufgestoßen, da häufig, so wie in unserer Studie, in die statistische Analyse auch das Kollektiv mit endokriner Therapie eingelassen wurde. So ist eine scharfe Trennung zwischen prognostischer und prädiktiver Rolle der Steroidrezeptoren nicht gegeben. Bardou et al.¹⁶⁰ haben in einem Kollektiv der Mammakarzinompatientinnen ohne systemische Therapie die Kombinationsanalyse beider Rezeptoren durchgeführt und gezeigt, dass Patientinnen mit ER+/PR+, ER+/PR- und ER-/PR+ Kombination eine statistisch signifikant bessere Prognose in Anbetracht des Rezidivrisikos und des Gesamtüberlebens haben, als die Patientinnen mit ER-/PR- Status.

Die Steroidrezeptorkombination ER+/PR- hat die Tendenz zu einer schlechteren Prognose als die des ER+/PR+, ohne dass die statistische Relevanz erreicht werden konnte. Thorpe et al.¹⁶¹ zeigten in einem ähnlichen Kollektiv ohne systemische adjuvante Therapie, dass ER+/PR- Patientinnen ein niedrigeres Rezidivrisiko haben als die ER-/PR-. Die prognostische Relevanz wurde bei der Cut-off Grenze 5 für den Östrogenrezeptor, bzw. bei 10 fmol/mg Protein für den Progesteronrezeptor erreicht. In der univariaten Analyse hat der positive Östrogenrezeptorstatus eine tendenzielle aber statistisch nicht signifikante

prognostische Wertigkeit, während der positive PR-Status mit $p=0,02$ die Signifikanz erreichte (in der multivariaten Analyse wurde die Signifikanz knapp verpasst $p=0,065$).

Zusammenfassend ergibt sich somit, dass die Gruppe der Mammakarzinome mit der Rezeptorkombination ER-/PR+ ein relativ günstiges Überleben aufweist, welches in unseren eigenen Untersuchungen sogar das der ER+/PR+ Mammakarzinome leicht übertrifft. Zugleich muss diese Aussage relativiert werden, da der Einfluss einer adjuvanten Chemotherapie bzw. unterschiedlicher Therapieansätze in unseren Untersuchungen nicht herausgerechnet wurde.

6.5 Steroidrezeptoren als Therapieprädiktoren

Prädiktive Faktoren verweisen auf Beeinflussungsmöglichkeiten des Krankheitsverlaufes durch therapeutische Maßnahmen. Die Weiterentwicklung des Rezeptornachweises zur Routineanalyse erbrachte den Ansatzpunkt, die Steroidrezeptoren als prädiktive Parameter im Rahmen der Therapieplanung mit einzubeziehen.¹⁶² Seit Beginn der siebziger Jahre wurde der Östrogenrezeptor als unmittelbares Ziel einer antiöstrogenen Therapie genutzt. Dieser Behandlungsansatz bezog sich anfangs auf das metastasierte Mammakarzinom, ließ sich jedoch später erfolgreich im kurativen, adjuvanten Therapiefeld einsetzen. Zirka 60-75% der primären Mammakarzinome sind Östrogenrezeptor positiv und ca. $\frac{2}{3}$ der positiven Mammakarzinome sprechen auf die antiöstrogene Therapie an.¹⁶³ Wie auch immer, der positive Östrogenrezeptorstatus ist kein Garant für einen Therapieerfolg, bei einem Drittel der Patientinnen wird ein Versagen der endokrinen Therapie beobachtet. Ziel der Forschung ist es, die Marker zu identifizieren welche ein gutes bzw. ein schlechtes Therapieansprechen vorhersagen können. So wurde von uns die Hypothese überprüft, ob die Höhe der Rezeptordichte ein Hinweis in dem Sinne ist, dass eine hohe Expression ein besseres Ansprechen der Tamoxifentherapie vorhersagen könnte. Des Weiteren wollten wir wissen, ob eine Feinunterteilung der Steroidrezeptoren einer binären oder einer 3-Gruppen-Einteilung der Steroidrezeptorexpression:

- Gruppe mit niedriger oder fehlender Expression (IRS 0 – 1)
- Gruppe mit mäßiger Expression (IRS 2 - 6)
- Gruppe mit hoher Expression (IRS 8 - 12)

in Prädiktion überlegen ist. Für die zusätzliche Prädiktion des Tamoxifenansprechens haben wir in dieser Studie die Kombination beider Steroidrezeptoren herangezogen.

Schwierigkeiten macht beim Vergleich der Ergebnisse die Tatsache, dass für die Bestimmung der Steroidrezeptoren unterschiedliche Methoden verwendet

werden. Ferner variieren einerseits die semiquantitativen Scoresysteme und andererseits wird nicht immer einheitlich innerhalb eines Systems von einem rezeptorpositiven Befund ausgegangen, wobei wiederum die Problematik der Cut-off Punkte deutlich wird. Auf eine vergleichende tabellarische Darstellung wurde daher verzichtet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen Studien einzeln aufgeführt.

6.5.1 Östrogenrezeptor als prädiktiver Faktor

Die Wirksamkeit einer Tamoxifentherapie kann entweder am EFS (Tod und jede Art von Rezidiv; Fernmetastase oder lokales Rezidiv) oder nur am Todesereignis gemessen werden. Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurde die Untermenge von Mammakarzinomen untersucht, bei denen eine Tamoxifentherapie zur Anwendung kam. Es wurde dabei sowohl die adjuvante wie auch die palliative Tamoxifentherapie als Einschlusskriterium zugelassen. Der Anteil von Sterbefällen in dieser Gruppe betrug 19,93%. Bei den 34 Patienten, welchen entgegen der Konsensusempfehlung oder bei Wunsch der Patientin im Zuge einer fehlenden Alternative Tamoxifen bei negativem Nachweis des Östrogenrezeptors gegeben wurde, lag der Prozentsatz von Sterbefällen bei 29,4% und im übrigen Kollektiv bei 18,9%.

Für die Feineinteilung des ER im Remmele Score errechneten wir einen Chi²-Wert von 17,2 und einen p-Wert von 0,028 für den Zusammenhang zwischen dem Überleben und der Höhe der Östrogenrezeptorexpression. Bei einer rein binären Einteilung mit variierendem Cut-off Punkt wird der deutlichste Unterschied im 5-Jahres Überleben von 30% zu Gunsten der rezeptorpositiven Gruppe bei einem Cut-off Punkt von 1 beobachtet (p=0,00142). Die Einteilung in negativ und positiv mit einem Cut-off Punkt von 2 (ER 0-1=negativ; ER 2-12=positiv) ergibt Chi²=3,6 mit p=0,057 und hat somit das Signifikanzniveau knapp verpasst. Deutlicher wird der Zusammenhang zwischen Überleben und Cut-off Punkt in der Gegenüberstellung der 3- und 5-Jahresüberlebenszeiten (siehe Tab. 33). Der höchste prozentuale Überlebensbenefit nach 3 und 5

Follow-up Jahren wird erzielt bei dem Cut-off Punkt 1 mit 26,4% Überlebensvorteil nach 3, respektive 30% nach 5 Jahren. Die Trennsetzung zwischen Negativität und Positivität bei dem Cut-off Punkt 2 zeigt ebenfalls ein besseres Überleben (etwa 18%) der Gruppe mit ER-IRS: 2-12 im Vergleich zu Gruppe mit ER-IRS: 0-1. Somit zeigt sich, dass die Cut-off Werte von 1 und 2 als optimal für die Vorhersage eines möglichen Therapieversagens erscheinen.

Wenn man das EFS anstelle des OS einsetzte, ergaben sich für eine Feineinteilung im Remmele Score von 1-12 ein Chi²-Wert von 15,8 mit p=0,0452.

In unserer Untersuchung war eine signifikante Prädiktion des Tamoxifenansprechens durch die Östrogenrezeptordichte bei 3-Gruppen-Einteilung nicht möglich, jedoch eine geringe, nicht signifikante Reduktion der Rezidivwahrscheinlichkeit ist eingetreten, wenn man die Gruppe mit mittlerer gegen die Gruppe mit hoher ER Expression verglich. Bei einem Chi²-Wert von 5,7521 wird die Signifikanzgrenze von p=0,05 knapp verfehlt (p=0,0711).

Wenn als „event“ nur der Tod betrachtet wurde, ergab sich bei einer Einteilung des Östrogenrezeptors in 3 Gruppen der Chi²-Wert von 4,5 mit entsprechendem p-Wert von 0,105.

Harvey und Mitarbeiter¹²⁴ kamen zu einem vergleichbaren Ergebnis. In der Patientengruppe mit adjuvanter endokriner Therapie, sowohl mit als auch ohne Chemotherapie, bestand eine statistisch hohe Signifikanz zwischen ER-Status und DFS. In dieser Studie kam das folgende Scoresystem zur Anwendung:

IRS entstand als Summenscore des Prozent der positiven Zellen (0=keine Färbung, 1= <1%, 2= 1-10%, 3= 11-33%, 4= 34-66%, 5= mehr als 2/3 positiven Zellen) sowie der Intensität der Färbung (0=keine, 1= schwache, 2= mäßige, 3= starke) und konnte somit Werte zwischen 0-8 annehmen. Für die Berechnung des optimalen Cut-off Punktes für die prädiktive Wertigkeit des ER wurden die Überlebenskurven für alle möglichen Grenzziehungen überprüft. Die optimale Trennsetzung lag bei Cut-off >2.

Ogawa et al.¹⁶⁴ kamen zu einem ähnlichen Befund; die signifikantesten Unterschiede im DFS wurden beim Cut-off Punkt 10%-1/3 der positiven Zellen sowohl für den Östrogen- als auch für den Progesteronrezeptor (PS 3 Allred-Score) verzeichnet.

Eine Feinunterteilung in Remmele Score oder eine Einteilung in 3 Gruppen konnte die Prädiktion im Vergleich zur binären Einteilung in unserer Studie nicht verbessern und zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit des „events“ nicht zwingend von der Höhe der Östrogenrezeptorexpression abhängt. In der Literatur überwiegt die Meinung, dass die Anwesenheit des Östrogenrezeptors einen prädiktiven Charakter hat, jedoch finden sich im Hinblick auf die Bedeutung der Höhe einer Östrogenexpression für die Effektivität der Tamoxifentherapie widersprüchliche Angaben. Während Elledge et al.¹⁶⁵, Shek et al.¹⁶⁶, Floiras et al.¹⁶⁷ in ihren Studien zu statistisch signifikanten Zusammenhängen zwischen hoher Östrogenexpression und besserem Tamoxifenansprechen kamen, konnten dies Dowsett et al.¹⁶⁸ sowie Osborne et al.¹⁶⁹ wiederum nicht bestätigen. In der im April 2008 veröffentlichten Arbeit von Kennecke et al.¹⁷⁰ wurde das rezidivfreie Überleben der Patientinnen untersucht die bei der Diagnosestellung des frühen Mammakarzinoms:

- ≥50 Jahre alt waren,
- Östrogenrezeptor positiv waren und
- 5 Jahre mit Tamoxifen behandelt wurden.

Das hohe Risiko für ein frühes Rezidiv (innerhalb der ersten 2,5 Jahre nach der Diagnose) hatten nodalpositive oder Patientinnen mit entdifferenziertem Grading. Niedrige aber immer noch positive Östrogenrezeptorlevels (10-20% der gefärbten Zellen gemessen mit der IHC-Methode sowie 10-49 fmol/mg Protein mit der DCC-Methode) wiesen in der univariaten Analyse auf ein höheres Rezidivrisiko hin. In der multivariaten Analyse waren niedrige Östrogenrezeptorlevels sowie der positive Nodalstatus mit dem Risiko für ein frühes Rezidiv (innerhalb der ersten 2,5 Jahre nach der Diagnose) verbunden. Zusammenfassend und im Einklang mit der Literatur sprechen unsere Werte dafür, dass die Bestimmung des Östrogenrezeptors ein Prädiktor des Tamoxifenansprechens ist, bei einer binären Einteilung mit Cut-off Punkt 1 oder 2. Eine Korrelation mit der Höhe der Östrogenrezeptorausprägung konnte nicht nachgewiesen werden.

6.5.2 Progesteronrezeptor als prädiktiver Faktor

In gleicher Weise wie bei Punkt 0 wurde die Wertigkeit der Progesteronrezeptor-Bestimmung für die Vorhersage der Tamoxifenwirksamkeit beurteilt.

Um Rückschlüsse darüber ziehen zu können, wurde die Untermenge der Mammakarzinome untersucht, bei denen eine Tamoxifentherapie zur Anwendung kam. Es wurde dabei sowohl die adjuvante wie auch die palliative Tamoxifentherapie als Einschlusskriterium zugelassen. Der Anteil von Sterbefällen in dieser Gruppe betrug 19,9%.

Betrachtet man zunächst das Überleben als „event“ (OS), so ergeben sich für den Zusammenhang zwischen Remmele Feinscore und Überleben ein χ^2 -Wert von 18,2 mit p-Wert von 0,0194 und für eine Einteilung in 3 Gruppen ein χ^2 -Wert von 5,9 mit p-Wert von 0,0514. Den höchsten χ^2 -Wert von 8,8 mit entsprechendem p-Minimum von 0,003 für eine Einteilung in zwei Gruppen zeigte der Cut-off von 3. Für das EFS ergeben sich dagegen Werte von $\chi^2=15,0$ mit $p=0,0595$ für die Feineinteilung des Progesteronrezeptors, sowie ein χ^2 -Wert von 5 mit $p=0,0819$ für eine Einteilung in 3 Gruppen. Bei einer binären Einteilung zeigt der Cut-off Punkt von 3 mit $\chi^2=7,9$ und $p=0,00495$ optimalen Vorhersagecharakter für eine Tamoxifentherapie. Für die Cut-off Punkte 2, 4 und 6 wurden ebenfalls statistisch hoch signifikante Vorteile sowie im EFS als auch im OS errechnet. Zusammenfassend ist es beim Progesteron-, wie beim Östrogenrezeptor so, dass dessen Vorkommen ein Tamoxifenansprechen vorhersagt, sogar tendenziell besser als der Östrogenrezeptor, aber die Feineinteilung in den Remmele Score oder in 3 Gruppen ist nicht besser als eine einfache binäre Einteilung. Wenn man den Informationsgewinn durch Betrachtung der 5-Jahres EFS- und OS-Überlebensraten sowie des Gesamtüberlebens zusammenfasst (Tab. 37 und Tab. 38) so zeigt sich, dass die Cut-off Werte von 3 und 4 die Vorhersage eines möglichen Therapieversagens optimal ankündigen. Es scheint sich auch hier zu bewahrheiten, ähnlich wie beim Östrogenrezeptor, dass die Steroidrezeptoren als Marker für das Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie geeignet sind, jedoch die Wahrscheinlichkeit des

Tamoxifenversagens nicht unbedingt von der Höhe der Rezeptorexpression abhängig ist.

In einer Studie von Regan et al.¹⁷¹ aus dem Jahr 2006 mit einer rein endokrinen Therapiesituation, konnte dem Progesteronrezeptor eine gute, statistisch signifikante Vorhersage für das rezidivfreie Überleben zugeschrieben werden. Lamy et al.¹⁷² untersuchten die prädiktive Bedeutung des Progesteronrezeptors im Tamoxifenkollektiv. Bei der 3-Gruppen-Progesteronrezeptoreinteilung und 8-Follow up Jahren betrug das EFS 39%, 66% respektive 81%. Eine bessere Effektivität der Tamoxifentherapie, bei höheren Progesteronlevels, konnte auch in der multivariaten Analyse eine statistische Bedeutsamkeit erreichen. In der Arbeit von Panzone et al.¹⁷³ wurde besonderes Augenmerk auf die Charakteristika und Überlebensunterschiede zwischen ER+/PR+ und ER+/PR- Steroidrezeptorkombination unter Einfluss einer endokrinen Therapie mit Tamoxifen oder Aromatasehemmer gelegt. Für diese Arbeit kam die immunhistochemische Bestimmungsmethode, mit Definition der Positivität bei > 1% der gefärbten Zellen, zur Anwendung. So erwies sich der negative Progesteronrezeptorstatus, sowohl univariat als auch multivariat, als unabhängiger Prädiktor für das Rezidivgeschehen. MacGrogan et al.¹⁷⁴ kamen zu dem Ergebnis, dass der Progesteronrezeptor, bestimmt mit der IHC-Methode, signifikanter und alleiniger Prädiktor für das Gesamtüberleben in der multivariaten Analyse ist. Gleichzeitig korrelierte die Höhe der Rezeptorexpression mit dem Überleben. Dowsett et al.¹⁷⁵ zeigten wiederum in der im Jahr 2008 veröffentlichten Arbeit, dass die Höhe der Progesteronrezeptorausprägung nicht unbedingt den Einfluss auf das Gesamtüberleben hat. Wurde aber die Expression des Progesteronrezeptors in Subgruppen untersucht, so zeigte sich eine deutlich niedrigere Rezidivrate nach 5 Jahren endokriner Therapie in der Gruppe mit hoher, im Vergleich zur Gruppe mit niedriger Progesteronexpression (2,6% vs. 13,2%). Für die Arbeit von Dowsett wurden die Überlebensdaten aus der ATAC-Studie (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) übernommen, aber die Tumorblöcke wurden retrospektiv gesammelt und die Steroidrezeptoren in einem Zentrallabor neu bestimmt. Nach der Neuauswertung konnte kein Überlebensunterschied

zwischen dem Kollektiv mit Tamoxifentherapie im Vergleich zum Kollektiv mit Anastrozoltherapie identifiziert werden, was aus den vorherigen Auswertungen der gleichen Studie (ohne Neubestimmung der Steroidrezeptoren) nachgewiesen worden war.

In der Zusammenschau der Literaturangaben und unserer eigenen Untersuchung kann bei geeigneter Wahl eines Cut-off Wertes (von etwa 2) davon ausgegangen werden, dass die Fälle von Mammakarzinomen mit hoher Ansprechwahrscheinlichkeit für Tamoxifen ausgewählt werden. Bisher lässt sich weder an unseren eigenen Ergebnissen noch an denen der Literatur zweifelsfrei belegen, dass die Häufigkeit des Therapieversagens mit der Höhe der Rezeptorexpression abnimmt.

6.6 Kombinationsanalyse zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptor als Therapieprädiktoren

Eine weitere Überlegung war, ob eine Verbesserung der Prädiktion des Tamoxifenansprechens durch die Kombination beider Steroidrezeptoren zu erzielen wäre. Die Ergebnisse, zusammengestellt in Form des 3- und 5-Jahres Überleben beim Bezugskollektiv der Patientinnen mit Tamoxifentherapie zeigen, sowohl bei der Einteilung in 3 Gruppen (ER+/PR+ versus ein Rezeptor positiv versus beide Rezeptoren negativ) als auch bei der Einteilung in 4 Gruppen (siehe Tab. 42), statistisch signifikante Werte mit $\text{Chi}^2=10,9$ und $15,3$ sowie p-Werte von $0,0042$ und $0,0161$ in der univariaten Auswertung.

Wenn bei der Analyse der 4 möglichen Kombinationen der Steroidrezeptoren nicht die 3- und 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeiten, sondern die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des „events“ (Rezidiv, Metastase oder Tod) berechnet wurde zeigte sich, dass lediglich die Information, dass die Steroidrezeptoren negativ sind, eine signifikant negative Aussagekraft hinsichtlich des Ansprechens auf Tamoxifen ergibt (Chi^2 -Wert von $7,2$ mit einem p-Wert von $0,0664$). Das Vorhandensein der Steroidrezeptoren im Tumorgewebe bedeutete für die Patientinnen eine geringere Gefahr an den Folgen des Tumorleidens zu versterben.

Bemerkenswert ist der Umstand, dass die Wahrscheinlichkeit des Events in der ER+/PR+ Gruppe größer ist als in der ER-/PR+ Gruppe. Die Feststellung dass Patientinnen mit ER+/PR+ bessere Überlebenschancen als Patientinnen mit ER-/PR- Rezeptorkombination haben, sowie ein Anzeichen der Tendenz für ein besseres Ansprechen auf eine Hormontherapie bei Patientinnen mit der Konstellation ER+/PR+ in Vergleich zu Patientinnen mit ER+/PR- (welche aber keine signifikante Relevanz erreichen konnte), ist mit vorhandenen Literaturangaben konkordant.

Einige Studien haben gezeigt, dass sich der Östrogen- und Progesteronstatus im Verlauf der Erkrankung sowie unter einer Therapie ändern kann. So wurde in der Studie von Hull und Mitarbeitern¹⁷⁶ eine leichte Minderung des

Östrogenrezeptorlevels in den sequentiellen Stanzbiopsien des Mammakarzinoms während einer endokrinen Therapie demonstriert. Eine Alteration von ER positiv zu ER negativ war in der Studie nicht zu beobachten. Die ähnlich aufgebaute Studie um Gross¹⁷⁷ zeigte eine stärker ausgeprägte Änderung des Progesteronrezeptorlevels unter der Tamoxifentherapie mit einem bis zu 50%-igen Übergang von PR positiv zu PR negativ bei Entwicklung einer Tamoxifenresistenz. Diese Entwicklung stellt eine aggressivere Erkrankung mit schlechterem „overall survival“ dar.¹⁷⁸

Klinische Daten haben ein besseres Tamoxifenansprechen in der Gruppe ER positiv/PR positiv als in der Gruppe ER positiv/PR negativ bestätigt, unabhängig davon, ob eine adjuvante oder palliative Therapiesituation vorhanden war.¹⁷⁹⁻¹⁸⁰

Die ATAC-Studie zeigt, dass ER positive/ PR-negative Karzinome, ähnlich wie Karzinome mit Her-2/neu Überexpression, auf Aromatasehemmer besser ansprechen als auf Tamoxifen.¹⁸¹ Die bereits zitierte und bei ASCO 2008 präsentierte Arbeit von Dowsett¹⁷⁵ konnte, nach Neuauswertung der Steroidrezeptoren, diesen therapeutischen Vorteil der Aromatasehemmer aber nicht bestätigen. Einige klinische Studien¹⁸²⁻¹⁸³⁻¹⁸⁴ postulierten einen Zusammenhang zwischen der aktivierten GF (growth factor)-Signalkaskade und inhibierter Expression des Progesteronrezeptors. Einige Arbeitsgruppen¹⁸⁵⁻¹⁸⁶ stellten fest, dass ER+/PR- Mammakarzinome sich besonders proliferativ mit ausgeprägter Tamoxifenresistenz verhalten. Diese Tumoren zeichnen sich zudem durch eine starke Überexpression an GF-Rezeptoren wie HER-1 oder HER-2 aus. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Studie um Arpino et al.¹⁸⁷. Laut der zitierten Studien könnte die fehlende Progesteronexpression in östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen, welche gleichzeitig mit einer Her-2/neu Überexpression einhergeht, als Surrogat-Marker für eine evtl. Tamoxifenresistenz herangezogen werden. Dies unterstreicht nochmals die Rolle des Progesteronrezeptors für die klinische Praxis.

In der Literatur¹⁸⁸⁻¹⁸⁹ wird daher mehrfach die Kombinationsanalyse der Steroidrezeptoren als Faktor für eine bessere Prädiktion vorgeschlagen. Während bei konkordantem Rezeptorstatus (ER+/PR+, ER-/PR-) eine generelle Übereinstimmung hinsichtlich der Überlebensunterschiede besteht, ist dies bei

diskonkordanter Kombination nicht der Fall. Wenger et al.¹⁹⁰ zeigten eine steigende S-Phase-Fraktion (die mit schlechterer Prognose einhergeht) in der Reihenfolge ER+/PR+, ER+/PR-, ER-/PR+, ER-/PR-. Die „Early Breast Cancer Trialists' Collaborativ Group“⁷⁶ beobachtete eine Verschlechterung des Überlebens im adjuvanten Tamoxifenkollektiv in gleicher Abfolge.

Den gleichen biologischen Gradient, ER+/PR+ → ER+/PR- → ER-/PR+ → ER-/PR-, demonstrierten Anderson et al.¹⁹¹. In unserer Datensammlung nach 5 Follow-up Jahren gab es nicht genügend ER positive/PR negativ Fälle um eine fundierte Statistik durchzuführen. Eine zunehmende Verschlechterung des Überlebens wurde in der Reihenfolge ER+/PR+ → ER+/PR- → ER-/PR- beobachtet.

In der im Jahr 2006 veröffentlichten Arbeit von Dowsett et al.¹²⁵ wurden die Daten aus zwei großen randomisierten Studien zum Teil neu ausgewertet und die Steroidrezeptoren mit der immunhistochemischen Methode neu bestimmt. Die Datensammlung der „Nolvadex Adjuvant Trials Organisation“ sowie des „CRC Adjuvant Breast Trial“ sind für die statistische Berechnung ideal, da sie als Vergleich zum behandeltem Kollektiv auch ein entsprechendes, nicht behandeltes Kollektiv beinhalten. So konnte bei der Kombinationsanalyse der Steroidrezeptoren gezeigt werden, dass im ER positivem Kollektiv mit Tamoxifentherapie, der Progesteronstatus keinen Einfluss auf den Tamoxifeneffekt hatte. Im ER negativen Tamoxifenkollektiv hingegen, hatte der Progesteronrezeptorstatus Einfluss auf das Überleben. Während die ER-/PR- Gruppe keinen Benefit der Tamoxifentherapie hatte, zeigte die ER-/PR+ Gruppe eine Tendenz zur Reduktion des Rezidivrisikos. Bei Vergleich des Überlebens zwischen dem Tamoxifenkollektiv und den unbehandelten Patientinnen mit der Rezeptorkombination ER+ und/oder PR+ zeigte sich ein Benefit einer Tamoxifentherapie. Die „overview“ Analyse der „Early Breast Cancer Trialists' Collaborativ Group“ aus dem Jahr 2005¹²⁶ zeigte in der ER schwach positiven Subgruppe nach 1-2 Jahren Tamoxifentherapie eine Rezidivrisikoreduktion von ca. 11%. Nach 5 Jahren konnte keine statistische Signifikanz mehr nachgewiesen werden (ca. 4%). Nachdem die Untersucher diese Subgruppe in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptor weiter untergliedert haben, zeigte sich

die Präsenz des Progesteronrezeptors als wichtiger Zusatzmarker für ein besseres Ansprechen auf die Tamoxifentherapie.

In unserer Studie hatten die Patientinnen mit dem ER+/PR+ Brustkrebs bessere Überlebenschancen als Patientinnen mit dem ER-/PR- Rezeptorstatus. Weiterhin zeigte sich die Tendenz für ein besseres Ansprechen auf eine Hormontherapie bei Patientinnen mit dem ER+/PR+ in Vergleich zu Patientinnen mit dem ER+/PR- Tumor. Diese Beobachtung findet Übereinstimmung in der zitierten Literatur. Hier wird die Wichtigkeit und Wertigkeit der Bestimmung beider Rezeptoren, des Progesteron- und Östrogenrezeptors (was leider nicht in allen Ländern der EU Standard ist) noch deutlicher.

6.7 Kollinearität der Steroidrezeptoren

Bei der Ermittlung der Variablen, die mit der Expression des Steroidrezeptors korrelieren, wurde Folgendes geprüft: das Grading, der nodale Status, die Tumorgröße, Metastasierung, Histologie und der Menopausenstatus. Es ergab sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen Grading und Expression des Östrogenrezeptors. Die schlecht differenzierten G3 Tumoren zeigten eine signifikant verminderte Ausprägung des Östrogenrezeptors. Gleichzeitig bestand die gleiche Relation zwischen Expression des Progesteronrezeptors und dem Grading. Stierer¹³¹ kam zu ähnlichem Ergebnis. Goluh et al.¹⁹² fanden eine stark negative Korrelation zwischen Steroidrezeptor-Positivität und Tumorgrading heraus, unabhängig davon ob die biochemische DCC-Methode oder die immunhistochemische Methode zur Anwendung kam. Wir konnten keine Kollinearität der Steroidrezeptoren, weder zur Tumorgröße noch zum Nodalstatus herausfinden. Zu diesem Thema stellen sich widersprüchliche Literaturangaben ein. Während Neumann¹⁹³ über niedrigere PR-Werte bei steigender Tumorgröße berichten konnte, kam Thorpe¹⁶¹ zum Befund einer Korrelation zwischen ER (mit Anwendung der DCC-Methode) und Tumorgröße. Die Untersuchungsgruppe um Reiner¹⁹⁵ fand eine statistisch signifikante, negative Korrelation zwischen Tumorgröße und positivem Östrogenrezeptorstatus (mit Anwendung der IHC-Methode) heraus. Die Untersuchung von Berger et al.¹⁹⁴ konnte wiederum keine statistisch signifikante Korrelation der Steroidrezeptoren und Tumorgröße demonstrieren. Bei der Histologie zeigte sich in unserer Untersuchung ein leichtes Überwiegen der lobulären Karzinome in der Gruppe der östrogenrezeptorpositiven Tumoren. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen anderer Untersucher¹⁹⁵⁻¹⁹⁶. Diese Korrelation konnte jedoch im Gegensatz zum Östrogenrezeptor beim Progesteronrezeptor nicht demonstriert werden. Golouh et al.¹⁹² zeigten ein Überwiegen der PR+ Fälle in der Gruppe der lobulären sowie mucinösen Tumoren. Die österreichische Arbeitsgruppe um Stierer¹³¹ hat keine statistisch signifikante Assoziation zwischen Steroidrezeptoren und Histologie gefunden, unabhängig davon, ob die biochemische oder immunhistochemische Methode angewendet wurde.

Die gleiche Gruppe sowie Clark et al.¹⁹⁷, Alexieva-Figusch et al.¹⁹⁸ haben keine Korrelation zwischen Menopause und Progesteronrezeptor zeigen können bei gleichzeitigem Befund einer Korrelation zwischen Menopause und Östrogenrezeptorstatus. Aus unserer Datenlage geht hervor, dass bei der postmenopausalen Frau der Prozentsatz der ER positiven Fälle ansteigt ($\text{Chi}^2=13,35$ und $p=0,00026$). Coradini et al.¹²⁰ berichten über niedrige bis mäßige Östrogenrezeptorexpression bei jüngeren Frauen sowie höhere Levels bei älteren Frauen. Golouh et al.¹⁹² zeigten eine Konkordanz zwischen der Östrogenrezeptorexpression und dem Alter. Das Überwiegen der ER positiven Fälle bei älteren Frauen konnte gleichermaßen mit DCC sowie mit der immunhistochemischen Methode demonstriert werden. Ähnlich wie beim Östrogenrezeptor zeigt sich in unserer Studie eine Tendenz zur positiven Progesteronrezeptorexpression in der Menopause ($\text{Chi}^2=5,23$ und $p=0,022$). Clark et al.¹⁹⁷ konnten wiederum höhere Progesteronlevels bei prämenopausalen Frauen messen. Rhodes et al.¹⁹⁹ zeigten die höchste Proportion der ER positiven Tumoren in der Patientengruppe >65 Jahre und für den PR in der Altersgruppe zwischen 41-50 Lebensjahr. Die Ergebnisse der Mehrzahl der hier zitierten internationalen Studien sind im Einklang mit unseren Ergebnissen. Man kann demnach sagen, dass die Inzidenz der Östrogen- und Progesteronrezeptor positiven Mammakarzinome mit dem Alter ansteigt.

6.8 Multivariate Modelle des Überlebens

Die univariaten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom wurden bereits diskutiert. Die entscheidende Frage ist allerdings ob die Variable im multivariaten Cox-Modell ihre Bedeutung beibehält. Wenn man mit den univariaten Prognosefaktoren in ein multivariates Verfahren eingeht, so lässt sich ermitteln, welcher der untersuchten Faktoren am ehesten für die Vorhersage des OS geeignet ist. In das Cox Modell wurden eingegeben: T, N, M, Grading, ER (Feinunterteilung nach Remmele), PR (Feinunterteilung nach Remmele) und das Stadium. Weder der Progesteronrezeptor noch der Östrogenrezeptor zeigen sich in dem multivariaten Cox-Modell als Prognosefaktoren. Das vorgelegte Cox-Modell ergab 3 multivariate Prädiktoren für einen tödlichen Krankheitsausgang: M, T und N. Der Östrogenrezeptor erreicht dabei den Status eines Trendfaktors für das gute Überleben nicht ($p=0,32$), wohingegen der PR eben das Signifikanzniveau knapp verpasst ($p=0,074$). Das Modell konnte nicht verbessert werden, auch wenn man bei den ER und PR eine Einteilung in 3 Gruppen bzw. eine binäre Einteilung vorgenommen wurde. Für das EFS erwiesen sich dieselben Variablen als signifikant wie im Cox'schen Regressionsmodell. Der Austausch des Remmele Score gegen die Einteilung negativ (Score 0,1) gegen positiv (Score >1) brachte keine Verbesserung des Modells, ebenso wenig wie die Analyse in 3 Gruppen. Das galt sowohl für den Östrogenrezeptor sowie für den Progesteronrezeptor. Die Arbeitsgruppe um Banerjee²⁰⁰ an der University of Michigan hat bei 1055 Patientinnen 15 prognostische Parameter in Bezug auf ein rezidivfreies Überleben untersucht. In der univariaten Analyse zeigten acht Parameter statistisch signifikante Überlebensvorteile: das Alter, die Rassenzugehörigkeit, der sozioökonomische Status, die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus, der Tumordifferenzierungsgrad sowie der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. In dem multivariaten Cox-Modell hatten nur noch der Lymphknotenstatus ($p<0,0001$), die Tumorgröße ($p=0,005$) und das Grading ($p=0,01$) eine prognostische Signifikanz. Der Steroidrezeptorstatus hatte keine prognostische Bedeutung im multivariaten Modell. Die gleiche Gruppe untersuchte weiterhin den Zusammenhang der einzelnen Parameter.

So zeigte sich in der Gruppe mit mindestens 4 befallenen LK ein deutlich besseres Überleben wenn gleichzeitig der Progesteronrezeptor positiv war. In der bereits zitierten Studie von Stierer et al.¹³¹ erwiesen sich in der univariaten Analyse des Gesamtüberlebens die Tumorgroße, der nodale Status, das Grading, der Östrogenrezeptor immunhistochemisch sowie biochemisch ermittelt als prognostisch signifikant. In der multivariaten Analyse verblieben nur die Tumorgroße und der nodale Status. Bei der Evaluation des Zusammenhangs zwischen Östrogenrezeptorstatus und klinischem Outcome der Patientinnen mit Mammakarzinom, konnten nur wenige Studien¹⁵³⁻¹⁵⁴ in der multivariaten Analyse die statistische Signifikanz nachweisen. In der bereits erwähnten Arbeit von Panzone et al.¹⁷³ erwiesen sich als signifikante Einflussgrößen im Hinblick auf das tumorspezifische Überleben in der univariaten Analyse die Abwesenheit des Progesteronrezeptors, der nodale Status, die Tumorgroße, die Her-2/neu Überexpression sowie das Grading. In der multivariaten Analyse des Überlebens hingegen, behielten nur noch der negative Progesteronrezeptorstatus, die Tumorgroße sowie der nodale Status die prognostische Signifikanz. In der multivariaten Analyse von Coradini et al.¹²⁰ zeigten eine prognostische Wertigkeit der Östrogen- und der Progesteronrezeptor, das Alter, die Tumorgroße sowie die Histologie. Debled²⁰¹ hat in der im Jahr 2007 veröffentlichten Arbeit nur das postmenopausale, hormonrezeptorpositive und mit Tamoxifen behandelte Kollektiv eingeschlossen. So zeigte sich in der univariaten Analyse als Prädiktor für das frühe Rezidiv die Tumorgroße, der positive Lymphknoten-Status, das Grading die peritumorale Lymphgefäßinvasion sowie der Mitoseindex. In der multivariaten Analyse verblieb nur das Grading als statistisch signifikanter Prädiktor. Zusammenfassend zeigt sich deutlich, dass die an unserem Tamoxifenkollektiv ermittelten multivariaten Prognosefaktoren weitgehend im Einklang mit den Literaturangaben sind. Der Östrogen- sowie der Progesteronrezeptor sind beide keine oder nur grenzwertige Prognosefaktoren. Vor allem liegen zahlreiche Literaturbeobachtungen vor, die eine Kurvenangleichung des Überlebens der ER positiven und ER negativen Mammakarzinome, die wir demonstrieren konnten, bestätigen.

6.9 Klinische Konsequenzen der vorgelegten Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war unter anderem zu zeigen, ob eine feine Abstimmung des Steroidrezeptorgehalts einen prognostischen und prädiktiven Informationsgewinn erbringen würde, was somit zu einem besseren Krankheitsmanagement beitragen könnte.

Unsere Ergebnisse haben folgende praktische klinische Konsequenzen, sofern sie verallgemeinert werden können:

- Östrogen- und Progesteronrezeptorbestimmung ist immunhistochemisch durchzuführen. Die DCC-Methode ist der immunhistochemischen Methode unterlegen, obwohl beide Bestimmungsmethoden korrelieren ($R=0,586$ für den Östrogenrezeptor und $R=0,813$ für den Progesteronrezeptor).
- Eine Einteilung in Rezeptor negativ und positiv ist für die klinischen Belange ausreichend. Eine feinere Einteilung in 3 Gruppen oder 9 Remmelegruppen bringt keinen oder nur einen sehr geringen zusätzlichen Informationsgewinn im Vergleich zu einer binären Einordnung.
- Der immunhistochemische Nachweis des Östrogen- und Progesteronrezeptors ist ein prädiktiver Faktor für die Tamoxifentherapie, wobei auch hier eine binäre Unterscheidung in positiv oder negativ ausreichen ist.
- Der optimale Cut-off Punkt bei einer binären Einteilung in positiv und negativ liegt, sowohl beim Östrogenrezeptor wie auch beim Progesteronrezeptor, im Bereich des Remmele Score von 1, 2 oder 3.
- In der Kernaussage stimmen unsere Untersuchungen mit den meisten Veröffentlichungen überein, wonach die prognostische Rolle der Steroidrezeptoren zumindest in der Langzeitbeobachtung zweifelhaft ist.

6.10 Neu aufgeworfene Fragestellungen

In der klinischen Praxis, um die Entscheidungsfindung zu vereinfachen, ist die Dichotomie des Rezeptorstatus erwünscht. Die Positivität oder Negativität dieser Variablen trägt die Mitentscheidung über das therapeutische Vorgehen. Diese Arbeit konnte keinen zusätzlichen Informationsgewinn einer Feinunterteilung des Rezeptorstatus zu binären Unterteilung, angesichts des Überlebens, zeigen. Allerdings lässt das Informationsergebnis dieser Doktorarbeit zur Rolle der Steroidrezeptoren in Prognose und Prädiktion des Mammakarzinoms noch eine Vielzahl an Fragen offen, unter anderem die Frage der Auswertemodalitäten.

Können wir die Klassifikation des Rezeptorstatus soweit vereinfachen, dass nur die Information positiv oder negativ übrig bleibt ohne zu divergieren, wie viele Neoplas mazellen und mit welcher Ausprägung die Steroidrezeptoren exprimieren?

Mit Weiterentwicklung unserer Kenntnis über die Biologie der Steroidrezeptoren sowie dem Verständnis komplexer Interaktionen zwischen biologischen Targets (uns bis jetzt bekannten und unbekanntes) ist zu erwarten, dass der Cut-off Wert sowie einzelne Variablen der Auswertungs-Scores (Anzahl der positiven Zellen sowie Färbeintensität) bei Hinzunahme einer weiteren Therapieentwicklung, mehr Informationsgehalt in sich birgt, als dies heute der Fall ist.

Wie hoch ist die Fraktion der rezeptorpositiven Mammakarzinome in der Gruppe der Mammakarzinome bei denen es zum Versagen einer endokrinen Therapie kommt, die im Verlauf der Erkrankung ihre Rezeptorexpression verlieren, sowie die Frage welche therapeutische Konsequenz das nach sich zieht, bleibt noch zu beantworten.

Die Höhe der ER- und PR-Ausprägung ist offenkundig, wenn eine Mindestexpression beider Steroidrezeptoren erreicht ist, ohne weitere Bedeutung für den Therapieerfolg. Die naheliegende Annahme, dass sehr hohe ER und/oder PR Expressionen ein besonders günstiges Tamoxifenansprechen vorhersagen, konnte durch unsere Untersuchungsergebnisse nicht bestätigt werden. Es scheint sogar so, dass die Remmele Score Werte von 8, 9 und 12 eher ein etwas schlechteres Ansprechen auf Tamoxifen vorhersagen als die mittleren Score

Werte von 2-6. Ähnliche Untersuchungsergebnisse fanden wir auch für den Zusammenhang zwischen der PR-Expression und dem Tamoxifenansprechen. Erstaunlicherweise fanden wir auch, dass Mammakarzinome mit dem Steroidrezeptorprofil ER-/PR+ etwas besser laufen als die Mammakarzinome mit dem Rezeptorprofil ER+/PR+. Insgesamt ist die Bedeutung ER+/PR- und ER-/PR+ weiter unklar.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Verläufe von 1139 Patientinnen untersucht, die an einem Mammakarzinom erkrankten. Das Auswahlkriterium war die Verfügbarkeit von Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Bei 343 Patientinnen wurden die Steroidrezeptoren mit der biochemischen DCC-Nachweismethode (Dextran-Coated-Charcol Methode) bestimmt. In einer größeren Anzahl der Fälle (N=783) erfolgte die Steroidrezeptorbestimmung mit der immunhistochemischen Methode. In einer kleinen Schnittmenge lagen Doppelbestimmungen vor (N=13).

Die DCC-Methode ist der immunhistochemischen Methode unterlegen, obwohl beide Bestimmungsmethoden korrelieren ($R=0,586$ für den Östrogenrezeptor und $R=0,813$ für den Progesteronrezeptor) sind Östrogen- und Progesteronrezeptor immunhistochemisch durchzuführen.

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass es richtig ist, den Cut-off Punkt für die binäre Einteilung rezeptorpositiv oder rezeptornegativ, sowohl bei dem Östrogenrezeptor wie auch beim Progesteronrezeptor im Bereich des Remmele Score 1, 2 oder 3 zu setzen.

Bei der univariaten Analyse erwiesen sich im Hinblick auf das Gesamtüberleben das Stadium, der Lymphknotenstatus, die Tumorgröße, die Metastasierung, das Grading, der Progesteronrezeptor, das Her-2/neu Onkogen und das Alter als signifikante Einflussgrößen. Beim Östrogenrezeptor lag lediglich eine grenzwertige Signifikanz vor, die sich im Breslow-Test darlegte. Ein positiver Östrogenrezeptorstatus signalisierte vor allem für die ersten Beobachtungsjahre eine günstige Prognose. Er verliert aber seine prognostische Aussagekraft mit fortschreitendem Zeitabstand. Ein positiver Progesteronrezeptorstatus geht wesentlich enger mit einer günstigen Prognose einher. Von den zahlreich untersuchten Grenzwerten, sowohl denen des Östrogenrezeptors als auch denen des Progesteronrezeptors, zeigten sich nachfolgende als prognostisch signifikant:

- Östrogen- und Progesteronrezeptor bei Zulassung eines kontinuierlichen Spektrums von biochemisch bestimmten Werten.
- Östrogenrezeptoren bei Einteilung bei niedrigen Cut-off Werten für eine binäre Einteilung. Die Entscheidung welchen Cut-off Wert man dann als optimal annimmt wäre ja mehr oder weniger willkürlich. Unsere Arbeit zeigt, dass der Cut-off von 1 ein ganz guter Prognosewert ist.
- Progesteronrezeptor bei Einteilung mit jedem niedrigem Cut-off Wert für eine binäre Einteilung in positiv und negativ, obwohl der Cut-off Punkt 3 mit höchstem Chi²-Wert als optimal erscheint.
- Progesteronrezeptor bei Einteilung in 3 Gruppen.

Zusammenfassend ist die Einteilung in Rezeptor negativ oder positiv für die klinischen Belange ausreichend. Eine feinere Einteilung in 3 Gruppen oder 9 Remmelegruppen bringt keinen oder nur einen sehr geringen zusätzlichen Informationsgewinn. Der immunhistochemische Nachweis des Östrogen- und Progesteronrezeptors ist ein prädiktiver Faktor für die Tamoxifentherapie, wobei auch hier eine binäre Unterscheidung in negativ oder positiv ausreichen ist.

In der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse aller berücksichtigten Studien und im Vergleich mit unseren Daten, kann die Trennsetzung des Cut-off Punktes sowohl für den Östrogenrezeptor als auch für den Progesteronrezeptor bei niedrig positiven Werten (Cut-off 1, 2 oder 3) als optimal für die prädiktive Aussage des Erfolgs der endokrinen Therapie bezeichnet werden.

Die Höhe der Rezeptordichte ist aber derzeit kein Hinweis in dem Sinne, dass eine hohe Expression ein besseres Ansprechen vorhersagen würde.

Für die zusätzliche Prädiktion des Tamoxifenansprechens haben wir in dieser Studie die Kombination beider Steroidrezeptoren herangezogen. Es zeigte sich bei der Analyse der 4 Kombinationsmöglichkeiten der Steroidrezeptoren (ER-/PR-, ER+/PR-, ER-/PR+, ER+/PR+), dass lediglich die Information über die Negativität der Steroidrezeptoren, eine Vorhersage des Versagens einer Tamoxifentherapie in sich birgt.

8 Abbildungen und Tabellen

8.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Aufbau der Steroidhormone (nach Nilsson et al., Physiological Reviews 2001)</i>	10
<i>Abb. 2: Wirkmechanismus von Östradiol im klassischen Weg</i>	10
<i>Abb. 3: Der Aufbau des Studienkollektivs (N=1139)</i>	18
<i>Abb. 4: Semiquantitative Auswertungsmethode nach Remmele und Stegner</i>	30
<i>Abb. 5: Auswerteverfahren nach Allred</i>	31
<i>Abb. 6: Graphische Darstellung der Altersverteilung im Studienkollektiv</i>	38
<i>Abb. 7: Das mittlere Follow-up</i>	43
<i>Abb. 8: Diagramm der Rezeptorverteilung im immunhistochemischen Kollektiv</i>	47
<i>Abb. 9: Korrelation zwischen Remmele Score und ER in fmol/mg</i>	48
<i>Abb. 10: Korrelation zwischen Remmele Score und PR in fmol/mg</i>	49
<i>Abb. 11: Korrelationskurve der intraobserver Variabilität der ER-Bestimmung</i>	51
<i>Abb. 12: Plot der interobserver Auswertung ER1 versus ER2</i>	53
<i>Abb. 13: Plot der interobserver Auswertung PR1 versus PR3</i>	54
<i>Abb. 14: Abhängigkeit des Überlebens vom Stadium der Brustkrebserkrankung</i>	56
<i>Abb. 15: Grading und Überleben nach der Kaplan-Meier-Analyse</i>	57
<i>Abb. 16: Überlebensverteilung beim Cut-off 20 fmol/mg für das ER</i>	62
<i>Abb. 17: Überlebensverteilung beim Cut-off 40 fmol/mg für den Progesteronrezeptor</i>	63
<i>Abb. 18: Östrogenrezeptorstatus im Patientenkollektiv</i>	66
<i>Abb. 19: Überlebensverteilung bei ER=0 versus ER=1-12</i>	68
<i>Abb. 20: Überlebensverteilung bei Unterteilung des ER in 3 Gruppen</i>	70
<i>Abb. 21: Progesteronrezeptorstatus im immunhistochemischen Kollektiv</i>	72
<i>Abb. 22: Überlebensverteilung bei PR= 0-2 versus PR= 3-12</i>	74
<i>Abb. 23: Die Überlebensverteilung bei Unterteilung des PR in 3 Gruppen</i>	76
<i>Abb. 24: OS bei Einteilung in 3 Gruppen mit Kombination beider Rezeptoren</i>	77
<i>Abb. 25: Überlebensverteilung bei Unterteilung des ER in 3 Gruppen</i>	87
<i>Abb. 26: Abhängigkeit des Überlebens von der Steroidrezeptorkombination im Tamoxifenkollektiv</i>	96

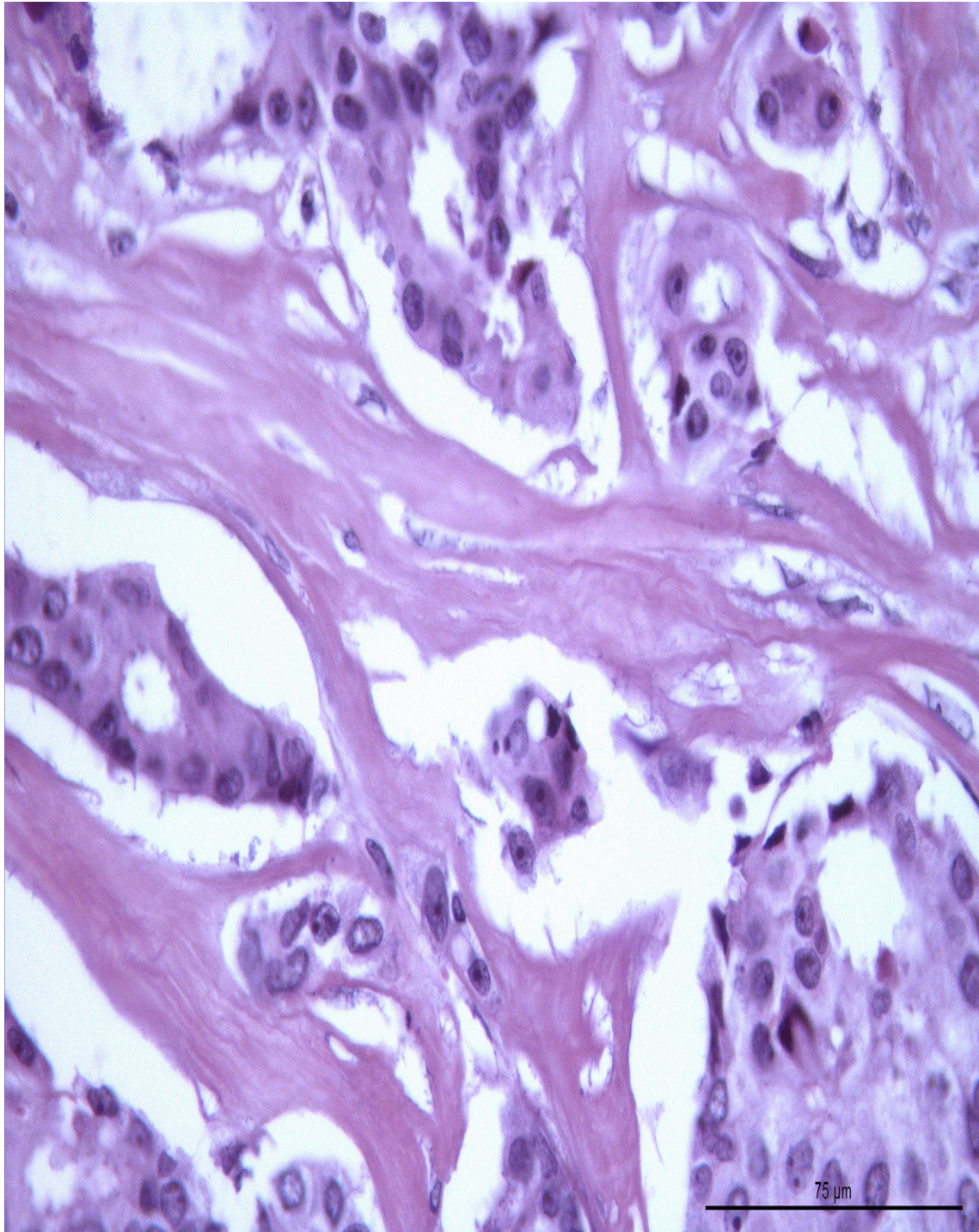
8.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Empfehlungen von St. Gallen für die prognostische Einschätzung</i>	4
<i>Tab. 2: Die neue Risikoklassifikation nach der Konsensdiskussion St. Gallen 2005</i>	5
<i>Tab. 3: Therapeutisches Vorgehen laut Konsensus von St. Gallen 2007</i>	6
<i>Tab. 4: Postoperative histopathologische Klassifikation (pTNM) nach Singletary SE (2002)</i>	23
<i>Tab. 5: Altersverteilung der Studienpatientinnen</i>	37
<i>Tab. 6: Menopausenstatus zum Diagnosezeitpunkt</i>	38
<i>Tab. 7: Östrogenrezeptor prä- und postmenopausal (nur immunhistochemische Fälle)</i>	39
<i>Tab. 8: Progesteronrezeptor prä- und postmenopausal (nur immunhistochemische Fälle)</i>	39
<i>Tab. 9: TNM-Klassifikation im Studienkollektiv</i>	40
<i>Tab. 10: Verteilung der Karzinome nach dem histologischen Typ</i>	41
<i>Tab. 11: Verteilung der Karzinome nach dem Differenzierungsgrad</i>	41
<i>Tab. 12: Nachbeobachtungszeit</i>	42
<i>Tab. 13: Zeitraum bis zum Event oder Censoring</i>	43
<i>Tab. 14: Das Auftreten der Rezidive, der Metastasen und der Zweitkarzinome im Krankheitsverlauf</i>	44
<i>Tab. 15: Die Überlebensdaten der Studienpatientinnen (N=1139)</i>	45
<i>Tab. 16: Der Hormonrezeptorstatus im Studienkollektiv, N=1139</i>	46
<i>Tab. 17: Übereinstimmung zwischen biochemisch und immunhistochemisch ermittelten ER-Werten</i>	50
<i>Tab. 18: Übereinstimmung zwischen biochemisch und immunhistochemisch ermittelten PR-Werten</i>	50
<i>Tab. 19: Zusammenhang zwischen histopathologischen Daten und Gesamtüberleben (N=1139), ohne Berücksichtigung der Bestimmungsmethode</i>	55
<i>Tab. 20: Zusammenhang zwischen klinischen und biologischen Eigenschaften des Studienkollektivs und Gesamtüberleben</i>	58
<i>Tab. 21: Biochemisch ermittelte Steroidrezeptor, Einteilung in 9 Gruppen</i>	61
<i>Tab. 22: Östrogenrezeptorstatus im immunhistochemischen Kollektiv</i>	65
<i>Tab. 23: Vorhersage der Prognose bei Verwendung variabler Cut-off Punkte für den Östrogenrezeptor</i>	67
<i>Tab. 24: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus</i>	68
<i>Tab. 25: Progesteronrezeptorstatus im immunhistochemischen Kollektiv</i>	71
<i>Tab. 26: Vorhersage der Prognose bei Verwendung variierender Cut-off Werte für den Progesteronrezeptor</i>	73
<i>Tab. 27: Die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom PR-Status</i>	75
<i>Tab. 28: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus</i>	78
<i>Tab. 29: Häufigkeit des „events“ (Rezidiv, Metastase oder Tod) bei primärem Mammakarzinom unter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (N=286)</i>	81

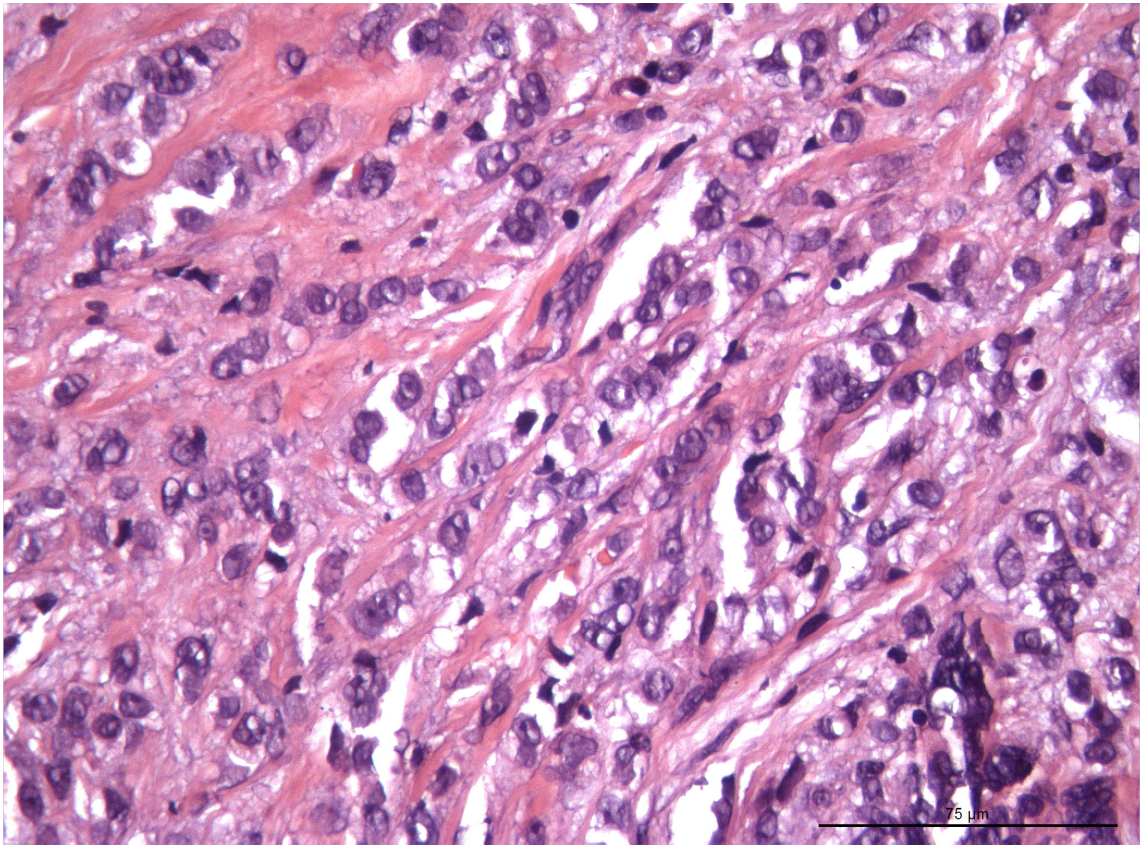
<i>Tab. 30: Häufigkeit des Todes bei primären Mammakarzinomen unter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (N=286)</i>	<i>82</i>
<i>Tab. 31: Östrogenrezeptor als Therapieprädiktor gemessen am 5-Jahres EFS (Tod, Fernmetastase oder Lokalrezidiv) in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie.....</i>	<i>83</i>
<i>Tab. 32: ER und das 5-Jahres Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Wahl des Cut-off Punkts in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie.....</i>	<i>84</i>
<i>Tab. 33: 3- und 5-Jahres Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Cut-off Punkt für den ER.....</i>	<i>85</i>
<i>Tab. 34: „Event“ bei gesicherter Tamoxifentherapie</i>	<i>86</i>
<i>Tab. 35: EFS bei primärem Mammakarzinom unter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit von PR in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie</i>	<i>88</i>
<i>Tab. 36: „Overall survival“ bei primärem Mammakarzinom unter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit vom PR in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie</i>	<i>89</i>
<i>Tab. 37: Progesteronrezeptor als Therapieprädiktor gemessen am EFS in der Untermenge von Patienten mit Tamoxifentherapie.....</i>	<i>90</i>
<i>Tab. 38: Abhängigkeit des OS im Tamoxifenkollektiv von der Höhe des PR Scores</i>	<i>91</i>
<i>Tab. 39: Todeshäufigkeit bei gesicherter Tamoxifentherapie in Abhängigkeit von der Höhe der Progesteronexpression (ohne Berücksichtigung der Zeit).....</i>	<i>92</i>
<i>Tab. 40: Inzidenz des Events (Lokalrezidiv, Fernmetastase oder Tod) bei der Einteilung des PR in 3 Gruppen.....</i>	<i>93</i>
<i>Tab. 41: Wahrscheinlichkeit für ein „event“ in Abhängigkeit vom Steroidrezeptorstatus im Tamoxifenkollektiv.....</i>	<i>94</i>
<i>Tab. 42: Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und Tamoxifentherapie.....</i>	<i>95</i>
<i>Tab. 43: Zusammenhang zwischen Menopause und Östrogenrezeptorexpression.....</i>	<i>97</i>
<i>Tab. 44: Zusammenhang zwischen Menopause und Progesteronrezeptorexpression.....</i>	<i>98</i>
<i>Tab. 45: Prognose in Abhängigkeit von klassischen Parametern.....</i>	<i>99</i>
<i>Tab. 46: Cox-Modell für das OS unter besonderer Berücksichtigung der Steroidrezeptoren... </i>	<i>101</i>
<i>Tab. 47: Cox Regressions-Model für das EFS.....</i>	<i>102</i>

9 Anhang

Invasiv duktales Mammakarzinom



Invasiv lobuläres Mammakarzinom



10 Literaturverzeichnis

- ¹Statistisches Bundesamt (Wiesbaden)- Pressemitteilung vom 22. März 2005
- ²Statistisches Bundesamt- Pressemitteilung vom 15. September 2006
- ³Krebs in Deutschland, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem RKI. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2006
- ⁴Statistisches Bundesamt (Wiesbaden)- Pressemitteilung vom 22. März 2005
- ⁵Europäisches Parlament, Bericht über Brustkrebs in der Europäischen Union, (2002/2279 (INI)), Ausschuss für die Rechte der Frau und Chancengleichheit
- ⁶Mortalität in der EU, Statistik kurz gefasst 2, 2004, ISSN 1024-4379.
- ⁷Krebs in Deutschland, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem RKI. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2006
- ⁸<http://www.enccr.com/fr/breast-factsheets.pdf>
Tyczynski JE, Breast Cancer in Europe; Fact Sheet, European Network of Cancer Registries ENCR
- ⁹Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
- ¹⁰Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2088-2090.
- ¹¹Kiechle M, Schmutzler RK, Beckmann MW. Prävention: Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: A 1372-1378.
- ¹²Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 265-271.
- ¹³Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, McManus R, Neuhausen SL, Ford D, Wooster R, Cannon-Albright LA, Stratton MR, Goldgar DE. Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 120-128.
- ¹⁴Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 676-689.
- ¹⁵Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. The fall in breast cancer mortality in Europe. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1409-1412.
- ¹⁶Berrino E, Gatta G, Chessa E, Valente F, Capocaccia R. Survival of adult cancer patients in Europe diagnosed from 1978-1989: The Eurocare II Study, *Eur J Cancer*, 1998; 34: 2139-2153.
- ¹⁷Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellmans S. Diseases of the breast (Prognostic and predictive factors). Lippincott-Raven Verlag, 1. Auflage 1996: 461-485.

¹⁸Untsch M, Sittek H, Bauerfeind I, Reiser M, Hepp H. Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms; Zuckschwerdt Verlag, 4. Auflage 2004: 309-336.

¹⁹Janni W, Fehm T, Rack B, Müller V, Solomayer E, Pantel K, Sommer H, Schindlbeck C, Jückstock J, Friese K. Isolierte Tumorzellen in Knochenmark und Blut von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom- Klinische Relevanz. Gynäkologe 2007; 40: 431-439.

²⁰McGuier WL, Tendon AK, Alred DC, Chamness GC, Clark GM. How to use prognostic Factors in axillary node-negative breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1006-1015.

²¹Oxford Centre for Evidence-based Medicine levels of Evidence
www.cebm.net/levels_of_evidence.asp

²²Hayes DF, Tock B, Harris A. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? Breast Cancer Res Treat 1998; 52: 305-319.

²³Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep F, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M. Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial in High-Risk, Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients Identified by Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 913-920.

²⁴Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JGM, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 ($n = 3424$). Cancer Res 2002; 62: 4617-4622.

²⁵www.germanbreastgroup.de/nnbc3

²⁶Goetz MP, Kamal A, Ames MM. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. Clin Pharmacol Ther 2008; 83: 160-166.

²⁷Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, Simon W, Eichelbaum M, Brauch H. Breast Cancer Treatment Outcome With Adjuvant Tamoxifen Relative to Patient CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes. J Clin Oncol 2007; 25: 5187-5193.

²⁸Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jäger W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. J Clin Oncol 2001; 19: 3669-3674.

²⁹Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. Lancet 1999; 354: 197-202.

³⁰Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, R. Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. NEJM 2002; 353: 793-802.

³¹Molino A, Turazza M, Bonetti A, Biondani P, Griso C, Adami L, Corgnati A, Nortilli R, Pollini GP, Modena S. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer: correlation with clinical and pathological features and with prognosis. Oncology 1992; 49: 82-88.

-
- ³²Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992; 339: 71-85.
- ³³Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 1962; 18: 387-414.
- ³⁴Jensen EV, Block GE, Smit S, Kyser K, DeSombre ER. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Natl Cancer Inst Monogr* 1971; 34: 55-70.
- ³⁵Jensen EV. On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* 1962; 6: 47-59.
- ³⁶King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 1984; 307: 745-747.
- ³⁷Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001; 81: 1535-1565.
- ³⁸Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol Rev* 2001; 81: 1535-1565.
- ³⁹Welshons W V, Lieberman M E, Gorski J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 1984; 307: 747-749.
- ⁴⁰Catelli M G, Binart N, Jung-Testas I, Renoir J M, Baulieu E E, Feramisco J R, Welch W J. The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J* 1985; 4: 3131-3135.
- ⁴¹Pratt W B, Toft D O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997; 18: 306-360.
- ⁴²Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988; 55: 145-156.
- ⁴³Elliston J F, Fawell SE, Klein-Hitpass L, Tsai SY, Tsai M-J, Parker MG, O'Malley B W. Mechanism of estrogen receptor-dependent transcription in a cell-free system. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6607-6612.
- ⁴⁴Ing NH, Beekman JM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem* 1992; 267: 17617-17623.
- ⁴⁵Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE. ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer* 2000; 89: 817-825.
- ⁴⁶Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5925-5930.
- ⁴⁷Lazzenec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 2001; 142: 4120-4130.
- ⁴⁸Shaw JA, Udokang K, Mosquera J-M, Chauhan H, Jones JL, Walker RA. Oestrogen receptor alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Pathol* 2002; 98: 450-457.

-
- ⁴⁹Marayama S, Fujimoto N, Asano K, Ito A. Suppression by oestrogen receptor beta of AP-1 mediated transactivation through estrogen receptor alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 178: 177-184.
- ⁵⁰Gustaffson JA, Warner M. Estrogen receptor beta in the breast; role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74: 245-248.
- ⁵¹Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res* 1997; 57: 4987-4991.
- ⁵²Balfe P, McCann A, McGoldrick A, McAllister K, Kennedy M, Dervan P, Kerin M. Estrogen receptor α and β profiling in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 469-474.
- ⁵³Barnes DM, Harris WH, Smith P, Millis RR, Rubens RD. Immunohistochemical determination of estrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Cancer* 1996;74:1445-1451.
- ⁵⁴Skildum A, Faivre E, Lange CA. Progesterone Receptors Induce Cell Cycle Progression via Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 327-339.
- ⁵⁵Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Toral L, Gronemeyer C, Chambon P. Two distinct estrogen- regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990; 9: 1603-1614.
- ⁵⁶Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement IV JP, Prendergast P, Yip TT, Hutchens TW, Edwards DP, Weigel NL. Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 823-832.
- ⁵⁷Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2001; 276: 8475-8483.
- ⁵⁸Richter JK, Jacobson BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene Regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 5209-5218.
- ⁵⁹Sartorius CA, Shen T, Horwitz HB. Progesterone receptor A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. *Breast Cancer Research and Treatment* 2003; 79: 287-299.
- ⁶⁰Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilanico A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F. Activation of the Src/p21 ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 1998; 17: 2008-2018.
- ⁶¹Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CC. Characterisation of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 1995; 55: 5063-5068.
- ⁶²Horwitz KB, Wei LL, Sedlacek SM, d'Arville CN. Progestin action and progesterone receptor structure in human breast cancer: a review. *Recent Prog Horm Res* 1985; 41: 249-316.

-
- ⁶³Chauchereau A, Georgiakaki M, Perrin-Wolff M, Milgrom E, Loosfelt H. JAB1 interacts with both the progesterone receptor and SRC-1. *J Biol Chem* 2000 ; 275: 8540-8548.
- ⁶⁴Bamberger AM, Bamberger CM, Gellersen B, Schulte HM. Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 6169-6174.
- ⁶⁵Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB. Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* 1998; 273: 10696-10701.
- ⁶⁶Wardell SE, Boonyaratankornkit V, Adelman JS, Aronheim A, Edwards DP. Dimerization protein 2 functions as a progesterone receptor N-terminal domain coactivator. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5451-5466.
- ⁶⁷Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 1998; 17: 2008-2018.
- ⁶⁸Boonyaratankornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* 2001; 8: 269-280.
- ⁶⁹Ross R, Paganini-Hill A, Wan P, Pike M. Effects of hormone replacement on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 328-332.
- ⁷⁰Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003; 289: 3243-3253.
- ⁷¹Colditz G, Rosner B. Cumulative Risk of breast cancer to age 70 years according to risk factors: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 950-964.
- ⁷²Sauer G, Deissler H, Kurzeder C, Kreienberg R. New Molecular targets of breast cancer therapy. *Strahlenther Onkol* 2002; 178: 123-133.
- ⁷³De Sombre ER, Smith S, Block GE, Ferguson DJ, Jensen EV. Prediction of breast cancer response to endocrine therapy. *Cancer Chemother Rep* 1974; 58: 5113-5119.
- ⁷⁴Horwitz HB, McGuire WL. Prediction response to endocrine Therapy in human breast cancer. *Science* 1975; 189: 726-727.
- ⁷⁵Knight WA, Livinston RB, Gregory EJ, McGuire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977; 37: 4669-4671.
- ⁷⁶Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998; 351: 1451-1467.
- ⁷⁷Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials

involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992; 339: 1-15.

⁷⁸Osborne CK, Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 1609-1618.

⁷⁹Horwitz KB, McGuire WL. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids* 1975; 25: 497-505.

⁸⁰WHO. International histological classification of tumors: Histological typing of breast tumors. 2nd edition. Geneva, World Health, Organisation.

⁸¹UICC. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 4. Aufl., 2. Revision; Springer Verlag 1992.

⁸²Singletary AC, Ashley P, Basset LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Join Committee on cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3628-3636.

⁸³Singletary SE, Allred C, Ashley P, Basset LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Join Committee on cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3628-3636.

⁸⁴Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*; 11: 359-377.

⁸⁵Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The Value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology* 1991; 19: 403-410.

⁸⁶Jensen EV, De Sombre ER, Jungblut PW. Estrogen receptors in hormone responsive tissues and tumors. *Wissler RW*; 1967: 15-30.

⁸⁷Tuczek HV, Fritz P, Oeffinger B, Limbach HJ, Mischlinski A, Klein C, Wegner G. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 1990; 50: 314-318.

⁸⁸" EORTC. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer. Report of the 2nd EORTC-workshop, held on 16-17 March 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer* 1980; 16: 1513-1515.

⁸⁹Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definierung eines immunreaktiven Scores (IR) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 8: 138-140.

⁹⁰Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11: 155-168.

⁹¹Lothar Sachs, *Angewandte Statistik*, 8 Auflage, Springer Verlag

⁹²R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing* R Foundation for Statistical Computing. Vienna Austria, 2007; ISBN 3-90061-07-0.

-
- ⁹³Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-847.
- ⁹⁴Fisher ER, Anderson S, Dean S, Dabbs D, Fisher B, Siderits R, Pritchard J, Pereira T, Geyer C, Wolmark N. Solving the dilemma of the immunohistochemical and other methods used for scoring estrogen receptor and progesterone receptor in patients with invasive breast carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 164-173.
- ⁹⁵Chebil G, Bendahl PO, Idvall I, Fernö M. Comparison of immunohistochemical and biochemical assay of steroid receptors in primary breast cancer-clinical associations and reasons for discrepancies. *Acta Oncol* 2003; 42: 719-725.
- ⁹⁶Biesterfeld S, Veuskens U, Schmitz FJ, Amo-Takyi B, Böcking A. Interobserver reproducibility of immunocytochemical estrogen- and progesterone receptor status assessment in breast cancer. *Anticancer Res* 1996; 16: 2497-2500.
- ⁹⁷Regitnig P, Reiner A, Dinges HP, Höfler G, Müller-Holzner E, Lax SF, Obrist P, Rudas M, Quehenberger F. Quality assurance for detection of estrogen and progesterone receptors by immunohistochemistry in Austrian pathology laboratories. *Virchows Arch* 2002; 441: 328-334.
- ⁹⁸Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 2000; 53: 125-130.
- ⁹⁹Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008; 21 Suppl 2: 8-15.
- ¹⁰⁰Bonnier P, Romain S, Charpin C, Lejune C. Age as a prognostic factor in breast cancer: relationship to pathologic and biological factors. *Int J Cancer* 1995; 62: 138-144.
- ¹⁰¹Kurtz JM, Jacquemier J, Amalric R, Brandone H, Ayme Y, Hans D, Bressac C, Spitalier JM. Why are local recurrences after breast-conserving therapy more frequent in younger patients? *J Clin Oncol* 1990; 8: 591-598.
- ¹⁰²Recht A, Connolly JL, Schnitt SJ, Silver B, Rose MA, Love S, Harris JR. The effect of young age on tumor recurrence in the treated breast after conservative surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 14: 3-10.
- ¹⁰³Holli K, Isola J. Effect of age on the survival of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 1997; 33: 425-428.
- ¹⁰⁴Crowe JP, Gordon NH, Shenk RR, Zollinger RM. Age does not predict breast cancer outcome. *Arch Surg* 1994; 129: 483-487.
- ¹⁰⁵Rauschecker HF, Sauerbrei W, Gatzemeier W, Sauer R, Schauer A, Schmoor C, Schumacher M. Eight-year results of a prospective non-randomised study on therapy of small breast cancer. The German Breast Cancer Study Group (GBSG). *Eur J Cancer* 1998; 34: 315-323.
- ¹⁰⁶Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24, 740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
- ¹⁰⁷Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11: 2090-2100.

¹⁰⁸Gamel JW, Meyer JS, Feuer E, Miller BA. The impact of stage and histology on the long-term clinical course of 163,808 patients with breast carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 1459-1464.

¹⁰⁹Koscielny S, Tubiana M, Lê MG, Valleron AJ, Mouriesse H, Contesso G, Sarrazin D. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984; 49: 709-715.

¹¹⁰Fischer B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fischer ER, Cruz AB, Foster R, Gardner B, Lerner H, Margolese R, Poisson R, Shibata H, Volk H. Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) update. *Cancer* 1983; 52: 1551-1557.

¹¹¹Gasparin G, Gullick WJ, Bevilacqua P, Sansbury JRC, Meli S, Boracci P, Testolin A, La Mafa G, Pozza F. Human breast cancer: prognostic significance of the c-erbB-2 oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor, DNA ploidy and conventional pathologic features. *J Clin Oncol* 1994; 12: 454-466.

¹¹²Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. *Kompendium internistische Onkologie*. 2. Auflage. Seite 1269. Berlin, Heidelberg, New York, Springer 1999.

¹¹³Dixon M. *ABC of breast diseases*. Edition 2. London, BMJ Books 2000.

¹¹⁴Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, Foster R, Gardner B, Lerner H, Margolese R. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52: 1551-1557.

¹¹⁵Veronesi U, Del Vecchio M, Greco M, Luini A, Muscolino G, Rasponi A. Local recurrences and distant metastases after conservative breast cancer treatments. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 19-27.

¹¹⁶Epstein AH, Connolly JL, Gelman R, Schnitt SJ, Silver B, Boyages J, Rose MA. Predictors of distant relapse following conservative surgery and radiotherapy for early breast cancer are similar to those following mastectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 747-753.

¹¹⁷Fischer B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fischer ER, Wolmark N. Twenty-five year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med* 2002; 347: 567-575.

¹¹⁸Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* 1987; 5: 1378-1386.

¹¹⁹Hopton DS, Thorogood J, Clayden AD, MacKinnon D. Histological grading of breast cancer; significance of grade on recurrence and mortality. *Eur J Surg Oncol* 1989; 15: 25-31.

¹²⁰Coradini D, Daidone MG, Boracchi P, Biganzoli E, Oriana S, Bresciani G, Pellizzaro C, Tomasic G, Di Fronzo G, Marubini E. Time-Dependent Relevance of Steroid Receptors in Breast Cancer. *Am J Clin Oncol* 2000; 18: 2702-2709.

¹²¹Hopperets PS, Volovics L, Schouten LJ, Jager JJ, Schouten HC, Hillen HF, Blijham GH. The prognostic significance of steroid receptor activity in tumor tissues of patients with primary breast cancer. *Am J Clin Oncol* 1997; 20: 546-551.

-
- ¹²²Fisher ER, Anderson S, Tan-Chiu E, Fisher B, Eaton L, Wolmark N. Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. *Cancer* 2001; 91(8 Suppl): 1679-1687.
- ¹²³McGuire WL. Steroid receptors and breast cancer. *Hosp Pract* 1980; 15: 83-88.
- ¹²⁴Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1474-1481.
- ¹²⁵Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, Sainsbury R, Baum M. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol* 2006; 17: 818-826.
- ¹²⁶Early Breast Cancer Trialists`Collaborative Group (EBCTCG): Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-yr survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365: 1687-1717.
- ¹²⁷Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 227-237.
- ¹²⁸Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1076-1087.
- ¹²⁹Horwitz KB, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. *J Bio Chem* 1978; 2223-2228.
- ¹³⁰Sondergaard G, Pedersen KO, Paulsen SM. Estrogen receptor analyses in breast cancer: comparison of monoclonal immunohistochemical and biochemical methods. *Eur J Cancer Clin Onc* 1989; 25: 1425-1429.
- ¹³¹Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tüchler H. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. *Ann Surg* 1993; 218: 13-21.
- ¹³²Gasparini G, Pozza F, Dittadi R, Meli S, Cazzavillan S, Bevilacqua P. Progesterone receptor determined by immunocytochemical and biochemical methods in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 118: 557-563.
- ¹³³Allred DC, Bustamante MA, Daniel CO, Gaskill HV, Cruz AB. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas: Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance. *Arch Surg* 1990; 125: 107-113.
- ¹³⁴Pertschuk LP, Kim DS, Nayer K, Feldman JG, Eisenberg KB, Carter AC, Rong ZT, Thelmo WL, Fleisher J, Greene GL. Immunocytochemical estrogen and progesterone receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies: Histopathologic, demographic and biochemical correlations and relationship to endocrine response and survival. *Cancer* 1990; 66: 1663-1670.

-
- ¹³⁵Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Corgnati A, Sperotto L, Recaldin E, Spagnolli P, Manfrin E, Bonetti A, Nortilli R, Tomezzoli A, Pollini GP, Modena S, Cetto GL. Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 45: 241-249.
- ¹³⁶Layfield GL, Guta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesterone receptor levels: a survey of current practice, techniques, and quantitation methods. *Breast J* 2000; 6: 189-196.
- ¹³⁷Goldhirsch H, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3817-3827.
- ¹³⁸Knight WA, Osborne CK, Yochmowitz MG, McGuire WL. Steroid hormone receptors in the management of human breast cancer. *Ann Clin Res* 1980; 12: 202-207.
- ¹³⁹Gelbfish GA, Davidson AL, Kopel S, Schreiberman B, Gelbfisch JS, Degensheim GA, Herz BL, Cunningham JN. Relationship of estrogen and progesterone receptors to prognosis in breast cancer. *Ann Surg* 1988; 207: 75-79.
- ¹⁴⁰Broet P, Pichon MF, Magdelenat H, Delarue JC, Spyrtos F, Basuyau JP, Saez S, Rallet A, Courrière P, Millon R, Asselain B. Long-term prognosis role of steroid receptors in cancer of breast. *Bull cancer* 1998; 85: 347-352.
- ¹⁴¹Parl FF, Wagner RK. The histopathological evaluation of human breast cancer in correlation with estrogen receptor values. *Cancer* 1980; 62: 362-367.
- ¹⁴²Walker KJ, Bouzubar N, Robertson J, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW, Wilson DW, Griffiths K, Nicholson RI. Immunocytochemical localisation of estrogen receptor in human breast tissue. *Cancer Res* 1988; 48: 6517-6522.
- ¹⁴³Lesser ML, Rosen PP, Senie RT, Duthie K, Mendendez-Botet C, Schwartz MK. Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma: correlation with epidemiology and pathology. *Cancer* 1981; 48: 299-309.
- ¹⁴⁴Aamdal S, Bormer O, Jorgensen O, Horst H, Eliassen G, Kaalhus O, Pihl A. Estrogen receptor and long-term prognosis in breast cancer. *Cancer* 1984; 53: 2525-2529.
- ¹⁴⁵Andersen J, Thorpe SM, King WJ, Rose C, Christensen I, Rasmussen BB, Poulsen HS. The prognostic value of immunohistochemical estrogen receptor analysis in paraffin-embedded and frozen sections versus that of steroid-binding assays. *Eur J Cancer* 1990; 26: 442-449.
- ¹⁴⁶Chrapusta SJ, Giermek J, Pieńkowski T. Long-term survival in primary breast cancer: correlation with estrogen and progesterone receptor assay results and adjuvant tamoxifen therapy. *Med Sci Monit* 2004; 10: 577-586.
- ¹⁴⁷Kommos F, Pfisterer J, Idris T, Giese E, Sauerbrei W, Schäfer W, Thome M, Pfeleiderer A. Steroid receptors in carcinoma of the breast. Results of immunocytochemical and biochemical determination and their effects on short-term prognosis. *Anal Quant Cytol Histol* 1994; 16: 203-210.
- ¹⁴⁸Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Auerbach L, Spona J, Tüchler H. A prospective analysis of immunohistochemically determined hormone receptors and nuclear features as predictors of early recurrence in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 11-21.

-
- ¹⁴⁹Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, Konrath J, Leight GS, McCarty KS Jr. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res*. 1989; 49: 1052-1056.
- ¹⁵⁰Robertson JF, Bates K, Pearson D, Blamey RW, Nicholson RI. Comparison of two oestrogen receptor assays in the prediction of the clinical course of patients with advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1992; 65: 727-730.
- ¹⁵¹Querzoli P, Ferretti S, Marzola A, Tassinari D, Indelli M, Marchetti E, Fabris G, Nenci I. Clinical usefulness of estrogen receptor immunocytochemistry in human breast cancer. *Tumori* 1992; 78: 287-290.
- ¹⁵²Reiner A, Neumeister B, Spona J, Reiner G, Schemper M, Jakesz R. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 7057-7061.
- ¹⁵³Beck T, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Pollow K, Knapstein PG. Immunohistochemical detection of hormone receptors in breast carcinomas (ER-ICA, PgR-ICA): prognostic usefulness and comparison with the biochemical radioactive-ligand-binding assay (DCC). *Gynecol Oncol* 1994 ; 53: 220-227.
- ¹⁵⁴Hanna W, McReady DR, Chapman JW, Mobbs BG, Trudeau ME. The predictive value of ERICA in breast cancer recurrence. A univariate and multivariate analysis. *Mod Pathol* 1993; 6: 748-754.
- ¹⁵⁵Fernö M, Andersson C, Fallén G, Idvall I. Oestrogen receptor analysis of paraffin sections and cytosol samples of primary breast cancer in relation to outcome after adjuvant tamoxifen treatment. The South Sweden Breast Cancer Group. *Acta Oncol* 1996; 35: 17-22
- ¹⁵⁶Costa SD, Lange S, Klinga K, Merkle E, Kaufmann M. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer--results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1329-1334.
- ¹⁵⁷McGuire WL. Hormone receptors: Their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. *Semin Oncol* 1978; 5: 428-433.
- ¹⁵⁸Colditz GA, Rosner BA, Chen WY, Holmes MD, Hankinson SE. Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 218-228.
- ¹⁵⁹Alexieva-Figusch J, Van Putten WL, Blankenstein MA, Blonk-Van Der Wijst J, Klijn JG. The prognostic value and relationships of patient characteristics, estrogen and progesterone receptors, and site of relapse in primary breast cancer. *Cancer* 1988; 61: 758-768.
- ¹⁶⁰Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark MC. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine Therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1973-1979.
- ¹⁶¹Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, Mouridsen HT, Bayer T, Keiding N. Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 6126-6133.
- ¹⁶²Buzdar AU. Endocrine therapy in the treatment of metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2001; 28: 291-304.

-
- ¹⁶³Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, Beckmann MW, Bender HG. Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 243-255.
- ¹⁶⁴Ogawa Y, Moriya T, Kato Y, Oguma M, Ikeda K, Takashima T, Nakata B, Ishikawa T, Hirakawa K. Immunohistochemical assessment for estrogen receptor and progesterone receptor status in breast cancer: analysis for a cut-off point as the predictor for endocrine therapy. *Breast Cancer* 2004; 11: 267-275.
- ¹⁶⁵Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM, et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 7-12.
- ¹⁶⁶Shek LL, Godolphin W. Survival with breast cancer: the importance of estrogen receptor quantity. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25: 243-250.
- ¹⁶⁷Floiras JL, Hacene K, Turpin F, Spyrtos F. Is adjuvant tamoxifen recommended in post-menopausal node-negative breast cancer patients with high estrogen receptor values? *Int J Biol Markers* 2000; 15: 135-138.
- ¹⁶⁸Dowsett M, Harper-Wynne C, Boeddinghaus I, Salter J, Hills M, Dixon M, et al. HER-2 amplification impedes the antiproliferative effects of hormone therapy in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8452-8458.
- ¹⁶⁹Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA III, McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980; 46: 2884-2888.
- ¹⁷⁰Kennecke H, McArthur H, Olivetto IA, Speers C, Bajdik C, Chia SK, Ellard S, Norris B, Hayes M, Barnett J, Gelmon KA. Risk of early recurrence among postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer* 2008; 112: 1437-1444.
- ¹⁷¹Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG, Maiorano E, Golouh R, Carbone A, Brown B, Suurkula M, Langman G, Mazzucchelli L, Braye S, Grigolato P, Gelber RD, Castiglione-Gertsch M, Price KN, Coates AS, Goldhirsch A, Gusterson B; International Breast Cancer Study Group. Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1571-1581.
- ¹⁷²Lamy PJ, Pujol P, Thezenas S, Kramar A, Rouanet P, Guilleux F, Grenier J. Progesterone receptor quantification as a strong prognostic determinant in postmenopausal breast cancer women under tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76: 65-71.
- ¹⁷³Ponzzone R, Maggiorotto F, Robba C, Fuso L, Sismondi P. Progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status: an independent influence on the efficacy of endocrine therapy in breast cancer? *J Clin Oncol* 2006; 24: 1481-482.
- ¹⁷⁴MacGrogan G, de Mascarel I, Sierankowski G, Mauriac L, Debled M, Durand M, De Lara CT, Avril A, Picot V, Mathoulin-Pélissier S. Time for reappraisal of progesterone-receptor testing in breast cancer management. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2870-2871.
- ¹⁷⁵Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C, Cuzick J, Houghton J, Williams N, Mallon E, Bishop H, Ellis I, Larsimont D, Sasano H, Carder P, Cussac AL, Knox F, Speirs V, Forbes J, Buzdar A. Relationship between

quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1059-1065.

¹⁷⁶Hull DF, Clark GM, Osborne CK, Chamness GC, Knight WA, McGuire WL. Multiple estrogen receptors assays in human breast cancer. *Can Res* 1983; 43: 413-416.

¹⁷⁷Gross GE, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. Multiple progesterone receptor assay in human breast cancer. *Cancer Res* 1984; 44: 836-840.

¹⁷⁸Balleine RL, Earl MJ, Greenberg ML, Clarke CL. Absence of progesterone receptor associated with secondary breast cancer in postmenopausal women. *Br J Cancer* 1999; 79: 1564-1571.

¹⁷⁹Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer* 2000; 89: 111-117.

¹⁸⁰De Placido S, Gallo C, Marinelli A, Perrone F, Pagliarulo C, Petrella G, et al. Steroid hormone receptor levels and adjuvant tamoxifen in early breast cancer. Ten year results of the Naples (GUN) Study. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 16: 111-117.

¹⁸¹Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hocht-Boes G, Houghton J, Locker GY, Tobias JS; ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 60-62.

¹⁸²Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 142-153.

¹⁸³Bamberger AM, Milde-Langosch K, Schulte HM, Loning T. Progesterone receptor isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm Res* 2000; 54: 32-37.

¹⁸⁴Arpino G, Green SJ, Allred DC, Lew D, Martino S, Osborne CK, et al. HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5670-5676.

¹⁸⁵Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 926-935.

¹⁸⁶Schafer JM, Bentrem DJ, Takei H, Gajdos C, Badve S, Jordan VC. A mechanism of drug resistance to tamoxifen in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83: 75-83.

¹⁸⁷Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer:

association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1254-1261.

¹⁸⁸Thorpe SM. Estrogen and progesterone receptor determinations in breast cancer. Technology, biology and clinical significance. *Acta Oncol* 1988; 27: 1-19.

¹⁸⁹Potter JD, Cerhan JR, Sellers TA, McGovern PG, Drinkard C, Kushi LR, Folsom AR. Progesterone and estrogen receptors and mammary neoplasia in the Iowa Women's Health Study: how many kinds of breast cancer are there? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 319-326.

¹⁹⁰Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Vendely P, Pandian MR, Harrington D, Clark GM, McGuire WL. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28: 9-20.

¹⁹¹Anderson WF, Chu KC, Chatterjee N, Brawley O, Brinton LA. Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Clin Oncol* 2001; 19: 18-27.

¹⁹²Golouh R, Vrhovec I, Bracko M, Frković-Grazio S. Comparison of standardized immunohistochemical and biochemical assays for estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 1997; 193: 543-549.

¹⁹³Neumann K, Rüschoff J, Horstmann A, Zwiorek L, Kalbfleisch H. The hormone receptor content of breast cancers. Comparison of morphologic and biochemical methods of determination. *Pathologe* 1989; 10: 160-164.

¹⁹⁴Berger U, McClelland RA, Wilson P, Greene GL, Haussler MR, Pike JW, Colston K, Easton D, Coombes RC. Immunocytochemical determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in breast cancer and relationship to prognosis. *Cancer Res* 1991; 51: 239-244.

¹⁹⁵Reiner A, Reiner G, Spona J, Schemper M, Holzner JH. Histopathologic characterization of human breast cancer in correlation with estrogen receptor status. A comparison of immunocytochemical and biochemical analysis. *Cancer* 1988; 61: 1149-1154.

¹⁹⁶Hupperets PS, Volovics L, Schouten LJ, Jager JJ, Schouten HC, Hillen HF, Blijham GH. The prognostic significance of steroid receptor activity in tumor tissues of patients with primary breast cancer. *Am J Clin Oncol* 1997; 20: 546-551.

¹⁹⁷Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between progesterone receptor and patients characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* 1984; 102: 1102-1109.

¹⁹⁸Alexieva-Figusch J, Van Putten WL, Blankenstein MA, Blonk-Van Der Wijst J, Klijn JG. The prognostic value and relationships of patient characteristics, estrogen and progestin receptors, and site of relapse in primary breast cancer. *Cancer* 1988; 61: 758-768.

¹⁹⁹Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Miller KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J Clin Pathol* 2000; 53: 688-696.

²⁰⁰Banerjee M, George J, Song EY, Roy A, Hryniuk W. Tree-Based Model for Breast Cancer Prognostication. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2567-2575.

²⁰¹Debled M, MacGrogan G, Brouste V, Mathoulin-Pelissier S, Durand M, Mauriac L. Prognostic factors of early distant recurrence in hormone receptor-positive, postmenopausal breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy: results of a retrospective analysis. *Cancer* 2007; 109: 2197-2204.

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Simon, Chefarzt der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart sowie Frau Prof. Dr. rer. nat. H. Brauch, Leiterin des Forschungsschwerpunktes Onkologie des IKP-Stuttgart, für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. P. Fritz, Chefarzt a.D. der Abteilung für Pathologie am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, möchte ich herzlich für die sehr intensive Betreuung und stets überaus freundliche und hilfsbereite Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses der vorliegenden Arbeit danken.

Weiterhin gilt mein Dank der Robert-Bosch-Stiftung, für die Bereitstellung der Forschungsmittel sowie dem Onkologischen Schwerpunkt Stuttgart für die gute Zusammenarbeit.

Ein ganz großer Dank geht an Frau Elisabeth Schroeder-Lüttgen, für ihren unschätzbaren Beitrag bei der Datenerhebung und Erstellung der Datenbank, ihre Hilfsbereitschaft und eine herzliche Archiv-Atmosphäre.

Meinem Mann danke ich für seine Nachsicht, Geduld und zahlreichen Korrekturvorschläge.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und meinem Bruder, der mir stets zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bönning, Slavica geb. Grkinic
Geburtsdatum: 28.06.1977
Geburtsort: Zagreb
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1996 Abitur, Gymnasium Belgrad

1996-2002 Studium der Humanmedizin, Universität Belgrad

10/2002-11/2005 Studium der Humanmedizin, Eberhad-Karls-Universität Tübingen

- Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 25.03.2003
- Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 09.09.2004
- Praktisches Jahr in Marienhospital Stuttgart
- Ärztliche Prüfung am 29.11.2005

Beruflicher Werdegang:

06/2006- 09/2007 Rems-Murr-Klinik Backnang, Assistenzärztin in der Frauenklinik

10/2007-jetzt Rems-Murr-Klinik Schorndorf, Assistenzärztin in der Frauenklinik