

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und
Radioonkologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wilfried Budach

Molekulargenetisches Grading bei Brustkrebs:
Entwicklung und Validierung eines prognostischen Markers

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Constanza Johanna Pagouras-Reichardt

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Edwin Bölke

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Hans Bojar

In Liebe und Dankbarkeit gewidmet meinem Mann

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit Hilfe der Microarray Technologie die histopathologische Grading-Einteilung von Brustkrebs um eine molekulargenetische Klassifikation zu erweitern. Mittels des statistischen Programms *PAM* wurde anhand von Genexpressionsdaten eines Kollektivs aus 168 Patientinnen eine Gensignatur erstellt, welche signifikant unterschiedliche Gene für die beiden Gradingklassen G1 und G3 ermittelte (*Classifier* CP44). Eine genontologische Analyse mittels *GOrilla*(1) wies den Genen der Liste überwiegend regulatorische Funktionen für die unterschiedlichen Phasen und Prozesse des Zellzyklus nach, sodass hier ein Zusammenhang zum histologischen Grading zu beobachten war. Mithilfe dieser Genliste CP44 konnten anschließend die G2-Tumore des Kollektivs in ein molekulargenetisches Niedrigrisikoprofil (wie G1-Tumore) und ein Hochrisikoprofil (wie G3-Tumore) eingeteilt werden. Der Classifier CP44 wurde folgend zur Validierung auf ein zweites Patientenkollektiv angewandt und seine Performance mit einem bereits etablierten molekulargenetischen Grading-Score GGI (*Gene Expression Grade Index* von Sotiriou et al.(2)) verglichen. Die prognostische Aussagekraft von CP44 wurde anhand von öffentlich zugänglichen Datensets getestet. Hierzu diente zum einen das Patientenkollektiv EXT1 inklusive Genexpressionsdaten von van de Vijer(3), auf welches wir den Score CP44 angewandten. Nach einer Korrelation zu anerkannten kliniko-pathologischen Merkmalen, wurde die prognostische Vorhersagekraft mittels Überlebenskurven (Gesamtüberleben sowie Krankheitsfreies Überleben) getestet. Dabei wurde die Leistung des Scores CP44 unmittelbar mit der des Score GGI von Sotiriou sowie der 70-Gensignatur von van't Veer(4) verglichen. In der Überlebensanalyse sowie Analyse des Krankheitsfreien Überlebens des Gesamtkollektivs erbrachten die beiden Scores CP44 und GGI ein annähernd identisches Ergebnis. Ebenso zeigten sich sehr ähnliche Ergebnisse in der Analyse geschichtet auf die drei Grading-Klassen. Bei den G2-Tumoren gelang durch den Score CP44 bei der Aufteilung in die Hoch- und Niedrigrisikoklasse eine deutliche Unterscheidung im Überleben, ebenso wie durch den Score GGI. Auch im Vergleich zur 70-Gensignatur, einer bereits kommerziell verfügbaren prognostischen Gensignatur, erbrachte die Analyse ähnliche Überlebensdaten. Diese Aufteilung der G2-Tumore in eine Hoch- und Niedrigrisikogruppe durch den Classifier CP44 mit entsprechender Unterscheidung im Überleben konnte auch an zwei weiteren externen Datensets nachgewiesen werden. Zusammenfassend stellt die Genliste CP44 einen prognostischen molekulargenetischen Marker in Ergänzung zum histologischen Grading dar, welcher im Vergleich zu zwei anerkannten Scores (GGI und 70-Gensignatur) eine vergleichbare prognostische Leistung erbringt.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATM	ataxia- teleangiectasia mutated gene
BRCA1/2	breast cancer gene 1/2
BUB1	budding uninhibited by benzimidazoles 1
CCNA2	cyclin-A2
CENPA	centromere protein A
cDNA	complimentary DNA
CHEK2	checkpoint kinase 2
DLG7	discs, large 7
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ER	Estrogen receptor
et al.	et alii (lat. und andere)
EXO1	exonuclease 1
FDR	false discovery rate
FOXM1	forkhead box M1
G1/G2/G3	Malignitätsgrad 1/2/3
GGI	Genomic Grade Index
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1
Her2neu	human epidermal growth factor receptor 2
KI	Konfidenzintervall
KIF20A	kinesin family member 20A
KIF2C	kinesin family member 2C
MCM10	minichromosome maintenance complex component 10
MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase
Min.	Minuten
ml	Milliliter
µl	mikroliter
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MYLB2	V-Myb Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog-Like 2
NPV	negatie predictive value
PAM	prediction analysis of microarray
PLK1	polo-like kinase 1
POLQ	polymerase theta
PPV	positive predictive value
PR	progesterone receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
ROC	receiver operating characteristic
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide
SAM	significane analysis of microarray
Sek.	Sekunden
SLC7A5	solute carrier family 7
TIFF	tagged image file format
TNM	Tumor – Nodes – Metastasis (Classification of malignant tumors)
TP53	tumor protein p53
TTK	TTK protein kinase
u.a.	und andere
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
UICC	Union for International Cancer Control
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DEFINITION BRUSTKREBS	1
1.2	DAS HISTOPATHOLOGISCHE GRADING BEI BRUSTKREBS	3
1.3	GENEXPRESSIONSANALYSE DURCH DNA MICROARRAY TECHNOLOGIE UND BRUSTKREBS	5
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	6
2	ÜBERSICHT: ENTWICKLUNG UND VALIDIERUNG DER GENLISTE CP44	8
3	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1	PATIENTENKOLLEKTIV	10
3.1.1	<i>Verteilung Alter der Patienten</i>	10
3.1.2	<i>Verteilung histologischer Typ</i>	11
3.1.3	<i>Verteilung Tumorstadium</i>	12
3.1.4	<i>Verteilung Lymphknotenstatus</i>	13
3.1.5	<i>Verteilung Grading</i>	14
3.1.6	<i>Verteilung Östrogenrezeptorstatus</i>	15
3.2	MATERIAL UND APPARATUREN	16
3.3	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	16
3.3.1	<i>RNA-Extraktion aus Gefriergewebe</i>	17
3.4	MICROARRAY ANALYSE	18
3.4.1	<i>Probenzubereitung</i>	18
3.4.2	<i>Hybridisierung</i>	19
3.4.3	<i>Microarray Waschvorgang</i>	20
3.4.4	<i>Scan-Vorgang und Auswertung der Genexpressionsdaten</i>	21
3.5	IMMUNOHISTOCHEMISCHE ANALYSE DES ÖSTROGENREZEPTORSTATUS	22
3.6	STATISTISCHE ANALYSE	22
3.6.1	<i>Significance Analysis of Microarray (SAM)</i>	22
3.6.2	<i>Prediction Analysis of Microarray (PAM)</i>	22
3.6.3	<i>GOrilla Gene Ontology</i>	23
3.6.4	<i>Hierarchische Cluster-Analyse</i>	23
3.6.5	<i>SPSS – Programm</i>	24
4	ERGEBNISSE	25
4.1	SAM (SIGNIFICANCE ANALYSIS OF MICROARRAY) UND GRADING	25
4.1.1	<i>SAM und G1 vs. G2 vs. G3</i>	25
4.1.2	<i>SAM und G1 vs. G3</i>	26
4.1.3	<i>GOrilla Gene Ontology Analyse der Genliste SAM218</i>	27
4.2	PAM (PREDICTION ANALYSIS OF MICROARRAY): G1 VS. G3	28
4.2.1	<i>GOrilla Gene Ontology Analyse der Genliste CP44</i>	31
4.3	HIERARCHISCHE CLUSTER-ANALYSE DER GENLISTE CP44	32
4.4	VALIDATIONSSET V2: ANWENDUNG DER GENLISTE CP44 UND VERGLEICH MIT GGI	33
4.4.1	<i>Gegenüberstellung Score Con38 – Gradingklassen 1-3</i>	35
4.4.2	<i>Vergleich der Gensets Con38 – Sotiriou96</i>	36
4.5	ANWENDUNG CP44 AUF DAS EXTERNE DATENSET EXT1 (VAN DE VIJVER ET AL., „A GENE-EXPRESSION SIGNATURE AS A PREDICTOR OF SURVIVAL IN BREAST CANCER“, NEJM 2002)	37
4.5.1	<i>ROC-Kurve</i>	39
4.5.2	<i>Korrelation von Con44Rang zu anerkannten Prognosefaktoren</i>	40
4.6	VERGLEICH DER ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT DER SCORES CON44SUM VS. SOT68SUM	43
4.6.1	<i>ROC-Kurve</i>	44
4.6.2	<i>Gesamtüberleben: Con44sum vs. Sot68sum</i>	45
4.7	VERGLEICH DER ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT IN ABHÄNGIGKEIT DER SCORES CON44 VS. 70GENESCORE	49
4.7.1	<i>Gesamtüberleben: Con44 vs. 70GeneScore</i>	49

4.8	VERGLEICH DES KRANKHEITSFREIEN ÜBERLEBENS DER SCORES CON44 UND 70GENEScore	56
4.8.1	<i>Allgemeines Krankheitsfreies Überleben.....</i>	56
4.8.2	<i>Krankheitsfreies Überleben, geschichtet auf die 3 Grading-Klassen.....</i>	57
4.9	DIE CP44-GENLISTE IN DER ÜBERLEBENSANALYSE AN WEITEREN DATENSETS.....	62
4.9.1	<i>Anwendung der Genliste CP44 auf das Testset GSE 1456.....</i>	62
4.9.2	<i>Anwendung der Genliste CP44 auf das Testset GSE 3494.....</i>	63
5	DISKUSSION.....	65
6	LITERATURVERZEICHNIS	77
7	ANHANG.....	82
7.1	OUTPUT GORILLA GENE ONTOLOGY ANALYSE DER 218-GENLISTE (SIEHE KAPITEL 4.1.3).....	82
7.2	GRAPHIK HIERARCHISCHE CLUSTER-ANALYSE (SIEHE KAPITEL 4.3).....	84

1 Einleitung

1.1 Definition Brustkrebs

Brustkrebs (Mammakarzinom) bezeichnet die maligne Tumorerkrankung der Brustdrüse. Man unterscheidet verschiedene histologische Formen des Brustkrebses in Abhängigkeit der Zellen, von denen der Tumor seinen Ursprung nimmt. Die häufigste Form stellt das invasiv-duktales Karzinom dar, das von den Milchgängen (Ductuli) der Brustdrüse ausgeht und mit 40-75% vorkommt. Das invasiv-lobuläre Mammakarzinom kommt mit 5-15% am zweithäufigsten vor und entsteht aus den Drüsenläppchen (Lobuli) der Brustdrüse. Weitaus seltenere Formen sind das medulläre, das tubuläre, das muzinöse und das papilläre Karzinom (je ca. 2%), welche häufiger mit einer besseren Prognose vergesellschaftet sind(5).

Die Metastasierungswege des Mammakarzinoms verlaufen sowohl lymphogen als auch hämatogen. Im Rahmen der lymphogenen Streuung finden sich die häufigsten Metastasen in den axillären, supra- und infraclaviculären Lymphknoten, aber auch in den parasternalen und zervikalen Lymphknoten können sich Tumorzellen absiedeln. Über den hämatogenen Verteilungsweg kann eine Absiedelung der Tumorzellen prinzipiell in sämtliche Organe erfolgen. Die am häufigsten betroffenen Organe sind die Lunge, die Leber, das Skelettsystem, das Gehirn und die Haut.

Das Mammakarzinom stellt die häufigste bösartige Erkrankung bei Frauen dar, sein Anteil belief sich im Jahr 2008 auf 32,5 Prozent aller Tumor-Neuerkrankungen bei Frauen. In Deutschland erkrankt im Durchschnitt jede 8. Frau im Verlauf ihres Lebens an einem Mammakarzinom(6). Bei Männern tritt dieser Tumor weitaus seltener auf, nach Berechnungen des Robert-Koch-Instituts erkrankten 2008 unter 1% der Männer an Brustkrebs.

Die Ätiologie von Brustkrebs ist nicht hinreichend geklärt, jedoch gibt es eine Reihe von Risikofaktoren, die die Entstehung eines Mammakarzinoms begünstigen können.

Den bedeutendsten Risikofaktor stellt das weibliche Geschlecht dar. Frauen erkranken im Durchschnitt ca. 120mal so häufig wie Männer. Der zweitwichtigste Risikofaktor für die Erkrankung an Brustkrebs ist das Alter. Das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen lag 2006 bei 65 Jahren(6). Ab dem 20. Lebensjahr steigt das Risiko stetig an und erreicht seinen Höhepunkt in der Altersklasse von 60-70 jährigen Frauen. Die Erkrankungsrate von 35-39-jährigen Frauen lag 2007/2008 bei 55/100.000, demgegenüber betrug sie bei Frauen zwischen 65-69 Jahren bei 410/100.000(6). Ab dem 70. Lebensjahr fällt die Erkrankungsrate wieder

leicht ab. Tritt Brustkrebs bei älteren Frauen zwar häufiger auf, verläuft er bei jüngeren Frauen jedoch tendenziell aggressiver(7)(8).

In der Entstehung des Mammakarzinoms wird dem Hormon Östrogen eine zentrale Rolle zugesprochen. Daher gelten Faktoren, die mit einem kumulativ erhöhten Östrogen-Spiegel auf Lebenszeit einhergehen als Risikofaktoren für Brustkrebs. Beispielsweise erhöht eine frühe Menarche und/oder eine späte Menopause das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken.

Ebenfalls gehen Kinderlosigkeit und ein höheres Alter bei der ersten Schwangerschaft mit einem erhöhten Risiko für das Mammakarzinom einher. Mehrere bzw. frühe Geburten können das Risiko verringern. Auch das Stillen soll einen protektiven Einfluss auf Brustkrebs haben(9). Die Einnahme von oralen Antikonzeptiva steht bis zum heutigen Tag in der Diskussion einen Risikofaktor für die Entstehung von Brustkrebs darzustellen(10).

Auch eine regelmäßige Einnahme einer Hormonersatztherapie in der Menopause ist mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs vergesellschaftet. Nachweislich höher lag das Risiko zusätzlich bei Einnahme eines Östrogen-Progestagen-Kombinationspräparates(11,12).

Der überwiegende Anteil an Mammakarzinomen tritt sporadisch auf. Eine genetische Ursache für die Entstehung von Brustkrebs liegt bei nur 5-10% der Fälle vor. Hier ist eine Keimbahnmutation im BRCA1- und/oder BRCA2-Gen Ursache für das Auftreten der Erkrankung. Ebenso ist diese Mutation verantwortlich für das Auftreten des familiären Ovarialkarzinoms.

Das BRCA1-Gen wurde 1990 von Hall entdeckt, es liegt auf Chromosom 17q21 und fungiert u.a. als ein Tumorsuppressor. Eine Mutation in diesem Gen ist für ca. 40% der erblichen Mammakarzinome und für >80% der familiären Mamma- und Ovarialkarzinome verantwortlich. Bei BRCA1-Mutationsträgern liegt das kumulative Risiko, an Brustkrebs zu erkranken bei 65% im Alter von 70 Jahren und bei 39% an Eierstockkrebs zu erkranken(13). 1994 konnte ein zweites Tumorsuppressorgen auf Chromosom 13 gefunden werden, das BRCA2-Gen, welches ebenfalls bei Mutation zu einem erhöhten Risiko für Brust- und Eierstockkrebs führt.

Auch bei Männern führt das Vorliegen einer Mutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen zu einem erhöhten Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Mutationen in weiteren Tumorsuppressorgen wie TP53, PTEN, CHEK2 oder ATM können in seltenen Fällen Ursache für familiären Brustkrebs sein.

Brustdrüsenveränderungen mit proliferativen Veränderungen stellen ebenso einen Risikofaktor für die Brustkrebsentstehung dar: bei proliferativer Veränderung ohne Atypie erhöht sich das Risiko fast um das zweifache, bei Auftreten einer atypischen Hyperplasie ist

das Risiko auf das 4,2-fache erhöht(14).

Ebenso stellen Rasse und ethnische Herkunft einen Risikofaktor dar: Die Inzidenz, an Brustkrebs zu erkranken, ist in den westlichen Ländern drei bis viermal so hoch wie in afrikanischen oder asiatischen Ländern(15). Das Risiko kann sich nach Migration im Verlauf der Generationen jedoch dem Risiko des Migrationslandes anpassen(16). So sind vermutlich neben unterschiedlichen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten auch regional differierende Umwelteinflüsse als Ursachen für diese Unterschiede der Inzidenz anzusehen.

Auch innerhalb einer Gesellschaft lassen sich Unterschiede feststellen: ein höherer sozioökonomischer Status birgt eine erhöhte Inzidenz, an Brustkrebs zu erkranken, wohingegen ein niedrigerer sozioökonomischer Status eine deutlich höhere Mortalität der Brustkrebserkrankung mit sich bringt(17).

Zusätzlich zu den oben genannten Faktoren haben auch Umwelt und Lebensstil einen Einfluss auf die Entstehung eines malignen Mammatumors. Beispielsweise kann sich ein regelmäßiger Alkoholkonsum günstig auf die Brustkrebsentstehung sowohl bei prä- als auch bei postmenopausalen Frauen auswirken (18,19). Hinsichtlich Übergewicht und des Risikos für Brustkrebs muss eine Unterscheidung in prä- oder postmenopausalen Zustand erfolgen. So wird beobachtet, dass Übergewicht in der Prämenopause zu einer Verringerung des Risikos für das Auftreten von Brustkrebs führt. Als Ursache wird eine höhere Anzahl anovulatorischer Menstruationszyklen mit daraus resultierender verringerter Konzentration an Östradiol und Progesteron vermutet. Adipositas nach der Menopause ist jedoch mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs vergesellschaftet. Unterschiedliche Studien ergaben Risikoerhöhungen zwischen 10 und 20% pro 5kg/m² Übergewicht. Ursächlich wird hier u.a. die Östrogenproduktion im Fettgewebe durch Aromatisierung von Androstendion bei abnehmender Hormonproduktion durch die Eierstöcke angesehen(20,21).

1.2 Das histopathologische Grading bei Brustkrebs

Nach Neudiagnose eines Mammakarzinoms ist es notwendig, einen Überblick über die lokale Tumorausdehnung, die Ausbreitung auf andere Körperregionen und die Biologie des Tumors zu erhalten. Dazu dient zum Einen die TNM-Klassifikation nach den UICC-Kriterien. Aber auch immunhistochemische Analysen verschiedener Parameter, wie Steroidrezeptorstatus oder Her2neu-Status, dienen der Charakterisierung des Tumors.

Der Erhalt all dieser Informationen ist von bedeutender klinischer Relevanz, da hiervon nicht

nur die nachfolgende Therapie abhängt, sondern auch eine prognostische Aussage hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Rezidiv-Wahrscheinlichkeit getroffen werden kann.

Der histopathologische Differenzierungsgrad (Synonym: Grading) des Mammakarzinoms und damit der Grad der De-Differenzierung zu einer normalen Brustdrüsenzelle besitzt eine entscheidende prognostischen Bedeutung für das Gesamtüberleben von

Brustkrebspatientinnen und ist aus diesem Grunde ein wichtiger Parameter in der Klassifizierung des Mammakarzinoms. Zur Einteilung des Malignitätsgrades hat sich die Methode nach Elston und Ellis (*Nottingham Grading System*), eine modifizierte Variante der Bloom-und-Richardson-Methode, etabliert, um eine verbesserte Objektivität der Ergebnisse zu erreichen. Dazu erfolgt eine semiquantitative Analyse von drei pathomorphologischen Parametern des zu untersuchenden Gewebes: die tubuläre Differenzierung des Gewebes, die Zellkern-Polymorphie und die Anzahl der Mitosen in Abhängigkeit der Gesichtsfeldgröße und des verwendeten Mikroskopes. Den einzelnen Parametern werden numerische Werte zugeteilt, nach Addition dieser Werte erhält man einen Score, mit welchem die Einteilung des histopathologischen Gradings erfolgt. Dabei unterscheidet man zwischen Malignitätsgrad 1 (G1) mit gut differenziertem Tumorgewebe, Grad 2 (G2) mit intermediär differenziertem Gewebe und Grad 3 (G3) mit schlecht differenziertem Tumorgewebe.

Da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass die verschiedenen Malignitätsgrade in eine unterschiedliche Rezidivrate und Überlebenswahrscheinlichkeit resultieren, wird das Grading als prognostischer Marker bei der Brustkrebserkrankung verwendet. So fanden Elston und Ellis in ihrem Patientenkollektiv heraus, dass Patientinnen mit einem G1-Tumor eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit von rund 80% haben und länger rezidivfrei sind. Patientinnen mit G3-Tumoren wiesen lediglich eine rund 40-prozentige Überlebensrate auf(22).

Aufgrund der Bedeutung dieses Parameters erfolgten verschiedene Ansätze zur Weiterentwicklung dieses Klassifizierungsmerkmals. Unter Anderem ist hier der *Nottingham Prognostic Index* zu nennen, der neben dem histopathologischen Grading auch den Lymphknotenstatus und die Tumorgöße involviert. Der Score teilt Brustkrebs-Patientinnen in 4 Gruppen mit 1. exzellenter, 2. guter, 3. moderater und 4. schlechter Prognose ein(23). Entscheidende Vorteile des Merkmals Grading sind u.a. das schnell, routinemäßig und preisgünstig durchführbare Messverfahren und die prognostische Vorhersagekraft. Daher hat es seinen Platz in Leitlinien, wie dem St. Gallen Consensus oder der Plattform *Adjuvant! Online* zur Abschätzung des Rezidivrisikos gefunden(24).

1.3 Genexpressionsanalyse durch DNA Microarray Technologie und Brustkrebs

Die Microarray Technologie ist eine relativ neue Methode, mit der gleichzeitig Tausende von Gene analysiert und hinsichtlich ihrer Genexpressionsstärke quantifiziert werden können. Dabei werden spezifische Nukleinsäure-Proben der zu untersuchenden Gene auf einer Glasplatte fixiert, welche den sogenannten *Microarray* (auch *Genchip* genannt) darstellt. Aus dem zu untersuchenden Gewebe erfolgt eine RNA-Extraktion mit anschließender Umwandlung in cDNA und Amplifikation der cDNA-Fragmente. Nach Markierung der cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen werden diese auf den Microarray aufgetragen. Die Fluoreszenz-markierten DNA-Moleküle hybridisieren dabei mit den auf dem Array fixierten Nukleinsäure-Proben nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung. Im anschließenden Waschschrift werden alle nicht-gebundenen DNA-Stücke entfernt. Die hybridisierten Nukleinsäuren werden mittels Fluoreszenz-Scanner nachgewiesen und quantifiziert. Man erhält so zum einen Informationen über die im Gewebe vorhandenen Gene. Zum anderen ermöglicht die Quantifizierung der Fluoreszenzstärke einen Rückschluss auf die Genexpressionsstärke des jeweiligen Genes(25)

Die Microarray Technologie stellt auch in der Brustkrebs-Forschung eine entscheidende Säule der wissenschaftlichen Untersuchungen dar.

Die niederländische Forschergruppe um van't Veer entwickelte beispielsweise anhand eines Patientenkollektivs mit primärem, nodalnegativem Brustkrebs eine 70-Gensignatur, mit der ein kurzes Metastasierungsintervall, sprich eine schlechtere Prognose vorhergesagt werden konnte. Zudem gelang es, tumorbiologisch aggressivere Tumore herauszufiltern, um sie einer entsprechenden adjuvanten Therapie zuzuführen, und Patientinnen mit einem weniger aggressiven Tumor eine Chemotherapie zu ersparen(4).

Ebenfalls mit Hilfe der Microarray Technologie gelang es Perou et al. und Sorlie et al. 5 intrinsische Subtypen von Brustkrebs zu identifizieren, nämlich *basal-like*, *ErbB2*, *luminal A*, *luminal B* und *normal like breast cancer*, die gegenwärtig als neue molekulare Klassifikation von Brustkrebs anerkannt sind(26,27).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das histopathologische Grading stellt einen wichtigen Bestandteil in der Charakterisierung von Brustkrebs hinsichtlich Prognose und Therapiewege dar. Dabei erfolgt die Einteilung in den Malignitätsgrad 1 mit gut differenziertem Tumorgewebe, Grad 2 mit intermediär differenziertem Gewebe und Grad 3 mit schlecht differenziertem Tumorgewebe nach Elston und Ellis. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit einem Grad 1-Tumor eine niedrigere Rezidivwahrscheinlichkeit und ein verlängertes Gesamtüberleben aufweisen. (siehe Kapitel 1.4.2)

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt das Merkmal Grading eine wichtige Entscheidungshilfe hinsichtlich des einzuschlagenden Therapieweges dar. Laut des St. Gallen Konsensus von 2009 bezüglich der Primärtherapie von frühem Brustkrebs gilt u.a. ein Grad 1-Tumor als relative Indikation für eine alleinige Hormontherapie, während ein Grad 3-Tumor eine relative Indikation für eine kombinierte Hormon- und Chemotherapie darstellt.

Jedoch kann bezüglich Grad 2-Tumoren keine sichere Aussage hinsichtlich des optimalen Therapieweges getroffen werden. Es zeigt sich, dass ein Malignitätsgrad 2 kein verlässlicher Faktor für die Therapiefindung ist(5).

Jedoch weisen 30-60% der Brustkrebs-Patientinnen einen Malignitätsgrad 2 auf. Vor allem in Kombination mit einer kleinen Tumorgroße und nur ein bis drei befallenen Lymphknoten besteht somit bei einem großen Patientenanteil die Schwierigkeit, eine adäquate Therapie zu finden. Je nach gewähltem Therapieweg werden manche G2-Patientinnen mit alleiniger Hormontherapie nicht ausreichend therapiert und erleiden möglicherweise ein Rezidiv, während andere G2-Patientinnen mit Hormon- und Chemotherapie mitunter unnötig unter den starken Nebenwirkungen dieses harten Therapieregimes leiden.

Zudem ist die zum Teil hohe Rate der Interobserver-Variabilität unter verschiedenen Pathologen mit einer unterschiedlichen Grading-Einteilung derselben Tumorprobe ein weiterer Kritikpunkt am histopathologischen Grading. Dies ist womöglich auch eine der Ursachen für die zum Teil deutlich differierenden numerischen Anteile der einzelnen Grading-Klassen im Vergleich verschiedener Patientenkollektive. Der jeweilige Malignitätsgrad wird durch die subjektive Einschätzung eines Pathologen hinsichtlich der drei oben genannten morphologischen Parameter ermittelt. Vor allem bei Grad 2-Tumoren lässt sich eine solche unterschiedliche Einstufung vermehrt beobachten(28,29).

Wie oben aufgezeigt werden erste Grenzen des histopathologischen Gradings als prognostisches Merkmal bei Brustkrebs deutlich. Durch das eingeführte Mammographie-

Screening steigt jedoch die Inzidenz kleiner, nicht weit fortgeschrittener Mamma-Karzinome. Daher erscheint es umso wichtiger, ein objektivierbares Verfahren zur Bestimmung des Malignitätsgrades zu finden(30).

Mittels der genetischen Analyse von Brustkrebs gelang es bereits Sotiriou et al. das histopathologische Grading auf molekulargenetischer Ebene zu ergänzen(2). Durch Vergleich von Genexpressionsprofilen von G1- und G3-Tumoren entwickelten Sotiriou et al. aus einem Set aus 97 Genen den *Gene Expression Grade Index* (GGI), wobei ein $GGI < 0$ einem niedrigem Risiko, ähnlich dem histologischen G1, und ein $GGI > 0$ einem hohen Risiko, ähnlich dem histologischen G3, entsprach. Für das histologische G2 fanden Sotiriou et al. kein spezifisches Genexpressionsprofil.

Die Gültigkeit des GGI als prognostischer Faktor wurde durch Anwendung auf drei öffentlich zugängliche Datensets mit Follow-up Informationen für insgesamt 570 Patientinnen getestet. Beim Vergleich der Daten zeigte sich bei *Gene Expression Grade 3* (GG 3) eine höhere Rezidivrate als bei *Gene Expression Grade 1* (GG 1). Nach Unterteilung der G2-Tumoren in *G1-like* und *G3-like* gemäß des *Gene Expression Grade Index* zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Rezidiv-freien Überleben, ähnlich dem von G1- und G3-Tumoren.

Mit dem *MapQuant Dx(TM) Genomic Grade Test* stellt IPSOGEN® einen kommerziellen, in Europa zugänglichen molekulargenetischen Test zur Verfügung. Er ist speziell ausgerichtet für Brustkrebspatientinnen mit G2-Tumoren und ermittelt anhand der 97-Genliste die Differenzierung zu *G1-like* oder *G3-like*, um somit eine verbesserte prognostische Aussage treffen zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Grading auf molekulargenetischer Ebene anhand eines Patientenkollektivs aus 168 Brustkrebspatientinnen zu untersuchen, da aufgrund der oben genannten Gründe eine erweiterte Klassifikation für die klinische Praxis notwendig erscheint.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zum *Gene Expression Grade Index* von Sotiriou et al. soll dabei einem direkten Vergleich sowie einer Validierung des GGI dienen.

2 Übersicht: Entwicklung und Validierung der Genliste CP44

I: Entwicklung der Genliste CP44

- ❖ Trainingskollektiv (n=168)
- ❖ Genexpressionsanalyse durch Microarray Technologie
- ❖ Datenausarbeitung
 - SAM (Auswahl signifikanter Gene für molekulargenetisches Grading)
 - PAM (Entwicklung Genliste CP44)
 - Validierung der Genliste anhand GOrilla Gene Ontology
 - Hierarchische Clusteranalyse CP44 und Grading G1+G3

II. Validierung der Genliste CP44

- ❖ Internes Testkollektiv (n=73)
- ❖ Genexpressionsanalyse durch Microarray Technologie
- ❖ Anwendung der Genliste CP44 auf Testkollektiv
 - Hierarchische Clusteranalyse
 - Vergleich mit „*Gene Expression Grade Index*“ von Sotiriou et al.

- ❖ Externes Testkollektiv EXT1 „van de Vijver“ (n=295)
- ❖ Anwendung der Genliste CP44
 - Korrelation mit klinikopathologischen Eigenschaften
 - Überlebensanalyse (Overall Survival+Disease Free Survival)
 - Vergleich mit „*Gene Expression Grade Index*“ von Sotiriou et al.
 - Vergleich mit „70-Gensignatur“ von van't Veer et al.

- ❖ Externes Testkollektiv GSE 1456 (n=159)
- ❖ Anwendung der Genliste CP44
 - Aufteilung der G2-Gruppe durch Score Con44
 - Überlebensanalyse: Krankheitsfreies Überleben

- ❖ Externes Testkollektiv GSE3494 (n=238)
- ❖ Anwendung der Genliste CP44
 - Aufteilung der G2-Gruppe durch Score Con44
 - Überlebensanalyse: Krankheitsfreies Überleben

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit besteht aus 168 Brustkrebs-Patientinnen, bei denen im Zeitraum von Januar 2009 bis Juni 2010 ein Mammakarzinom diagnostiziert wurde. Die Patientinnen wurden in verschiedenen Brustzentren in Offenburg, Hilden, Aachen und Düsseldorf behandelt. Der überwiegende Anteil der Patientinnen wurde einer Brustoperation unterzogen und ein Anteil des intraoperativ gewonnene Brustkrebsmaterials wurde zur weiteren Analyse zum Institut für onkologische Molekularpathologie Professor Dr. H. Bojar, Düsseldorf gesandt. Alternativ wurde bei einem Teil der Patienten auch Material aus Stanzbiopsien verwendet. Dazu wurden die geläufigsten klinischen Parameter der Patientinnen, wie Alter, histologischer Typ, TNM-Klassifikation, Rezeptorstatus etc. aus den Patientenakten der beteiligten Kliniken rekrutiert und statistisch ausgewertet.

Aktenzeichen Ethikvotum: Studiennr. 4852

3.1.1 Verteilung Alter der Patienten

Das Alter der Patientinnen lag zwischen 35 und 90 Jahren, der Altersdurchschnitt betrug 61,1 Jahre (Modalwert 60 Jahre), wie in Tabelle und Abbildung 1 dargestellt.

Alter (Jahre)	≤40	>40 bis ≤50	>50 bis ≤60	>60 bis ≤70	>70bis≤80	>80 bis ≤90
Anzahl (n)	7	36	42	45	28	10
Anteil (%)	4%	21%	25%	27%	17%	6%

Tabelle 1: Verteilung Alter der Patientinnen (in Jahren)

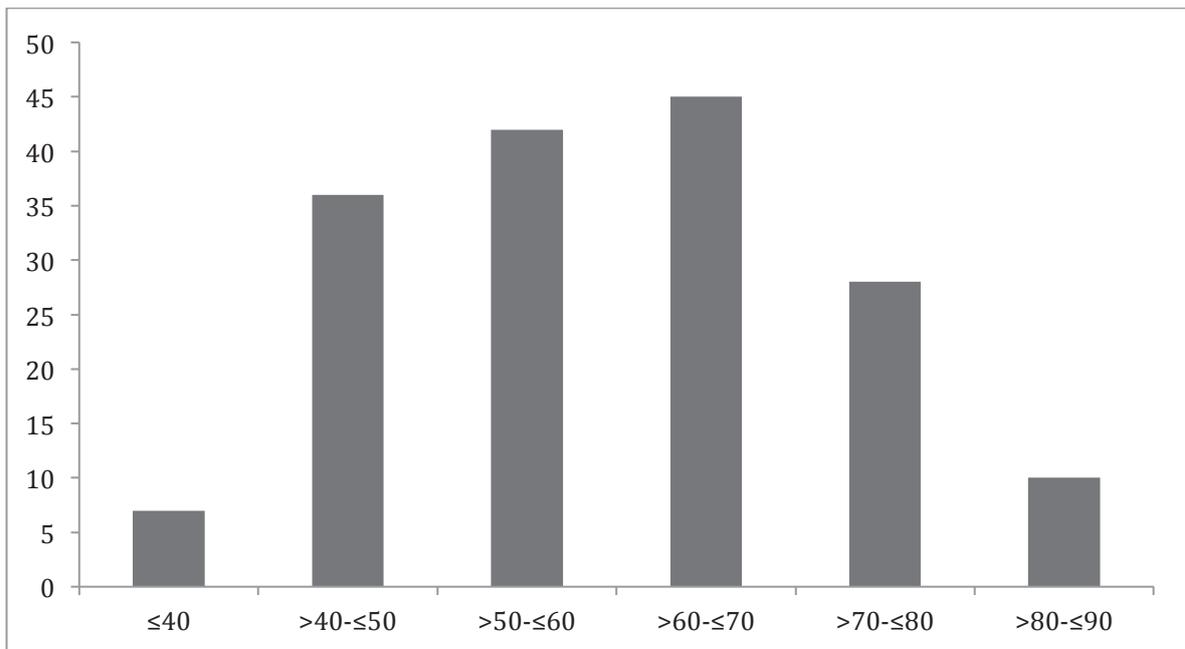


Abb. 1: Verteilung Alter der Patientinnen; y-Achse: Anzahl , x-Achse: Alter in Jahren

3.1.2 Verteilung histologischer Typ

Die verschiedenen histologischen Formen des Mammakarzinoms teilten sich innerhalb des Patientenkollektivs wie in Tabelle und Abbildung 2 dargestellt auf:

Histologie	invasiv- duktal	invasiv- lobulär	medullär	muzinös	duktulär	nichtinvasiv intraduktal
Anzahl (n)	116	21	3	2	1	1
Anteil (%)	80%	15%	2%	1%	1%	1%

Tabelle 2: Verteilung histologischer Typ

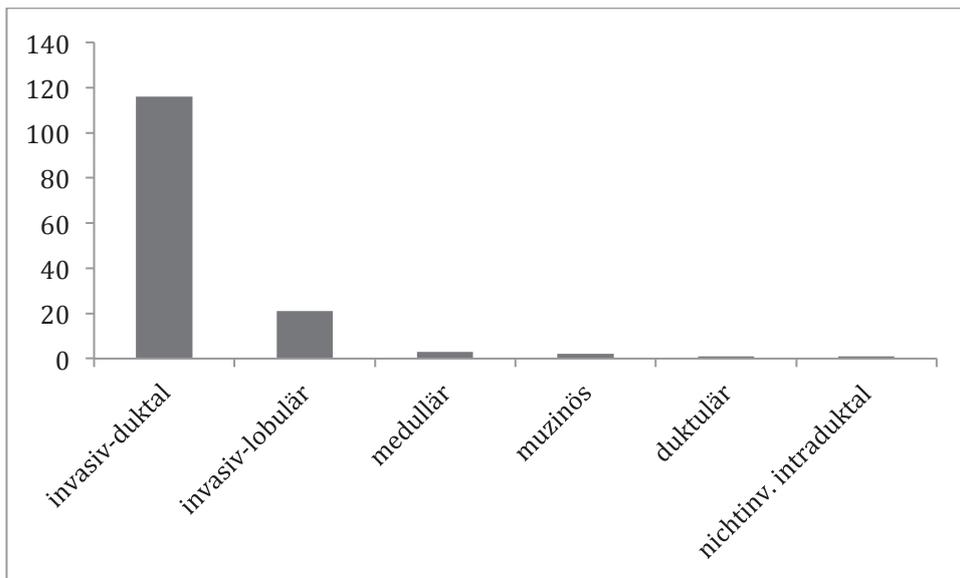


Abb. 2: Verteilung Histologischer Typ des Tumors; y-Achse: Anzahl, x-Achse histologischer Typ

3.1.3 Verteilung Tumorstadium

Die Verteilung der Tumorgröße zeigte sich folgendermaßen (siehe Tabelle und Abbildung 3):

T-Stadium	pTis	pT1	pT2	pT3	pT4
Anzahl (n)	4	102	50	4	3
Anteil (%)	2%	63%	31%	2%	2%

Tabelle 3: Verteilung Tumorgröße (pT)

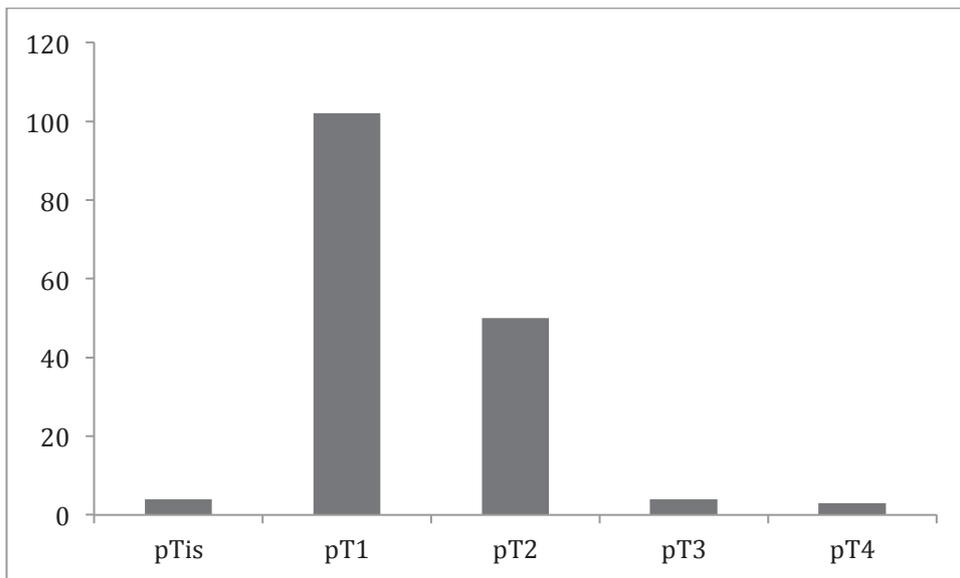


Abb. 3: Verteilung Tumorgröße (pT); y-Achse: Anzahl, x-Achse: Tumorstadium

3.1.4 Verteilung Lymphknotenstatus

Die Verteilung des Lymphknotenstatus zeigte sich wie in der folgenden Tabelle bzw. Abbildung dargestellt:

N-Status	pN0	pN1	pN2	pN3
Anzahl (n)	96	44	12	11
Anteil (%)	59%	27%	7%	7%

Tabelle 4: Verteilung Lymphknotenstatus (pN)

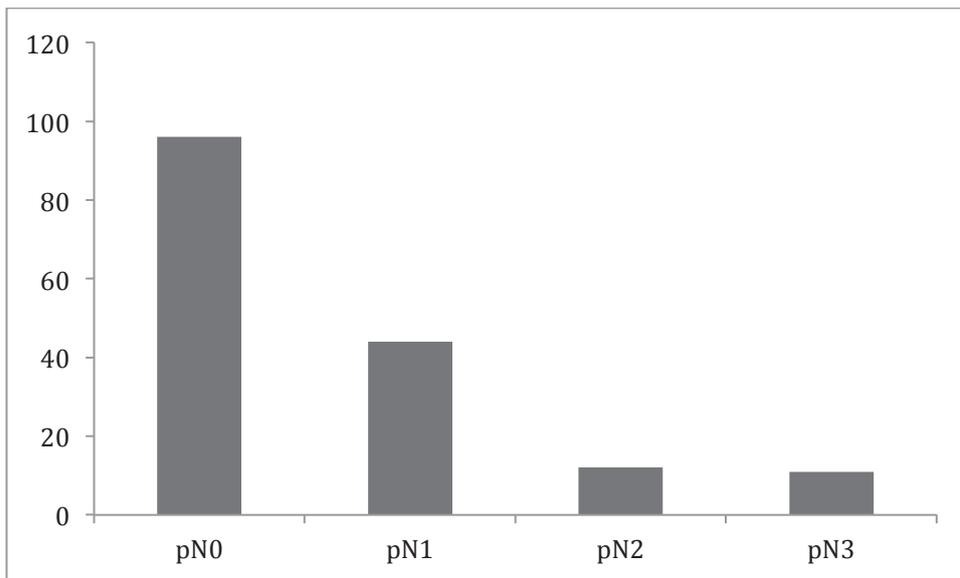


Abb. 4: Verteilung Lymphknotenstatus (pN); y-Achse: Anzahl, x-Achse: Lymphknotenstatus

3.1.5 Verteilung Grading

Hinsichtlich des histopathologischen Differenzierungsgrades wiesen 7% der Patientinnen ein G1-Stadium auf, bei 30% Prozent wurde ein niedrig differenziertes Stadium (G3) gefunden. Der größte Anteil (63%) zeigte ein G2-Stadium, welches einem mäßig differenzierten Tumorstadium entspricht (siehe Tabelle und Abbildung 5).

Grading	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Anzahl	12	105	51
Anteil (%)	7%	63%	30%

Tabelle 5: Verteilung Grading (G)

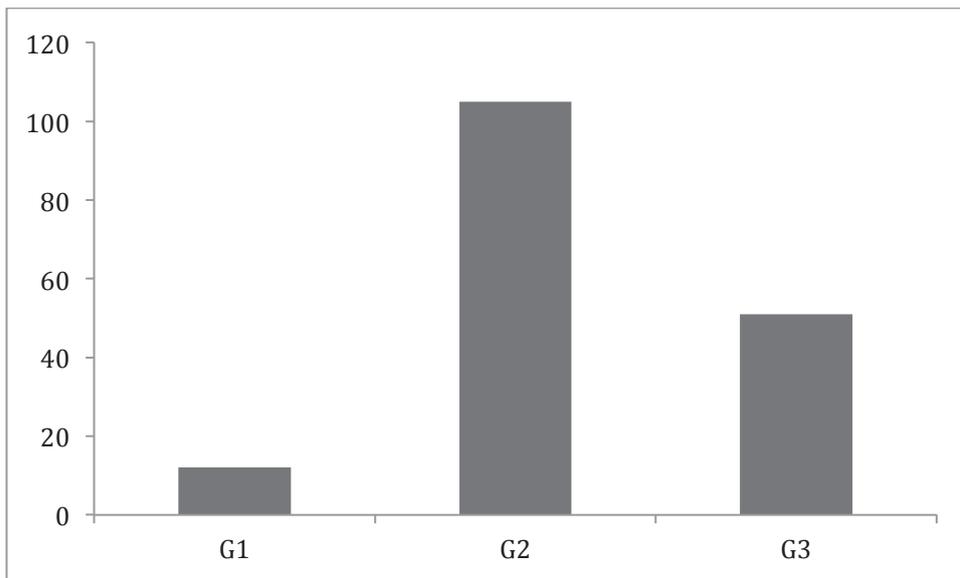


Abb. 5: Verteilung Grading (G); y-Achse: Anzahl, x-Achse: Grading

3.1.6 Verteilung Östrogenrezeptorstatus

Die Verteilung des Östrogenrezeptorstatus zeigte sich wie in Tabelle und Abbildung 6 dargestellt:

ER-Status	positiv	negativ
Anzahl	131	37
Anteil (%)	78%	22%

Tabelle 6: Verteilung Östrogenrezeptorstatus

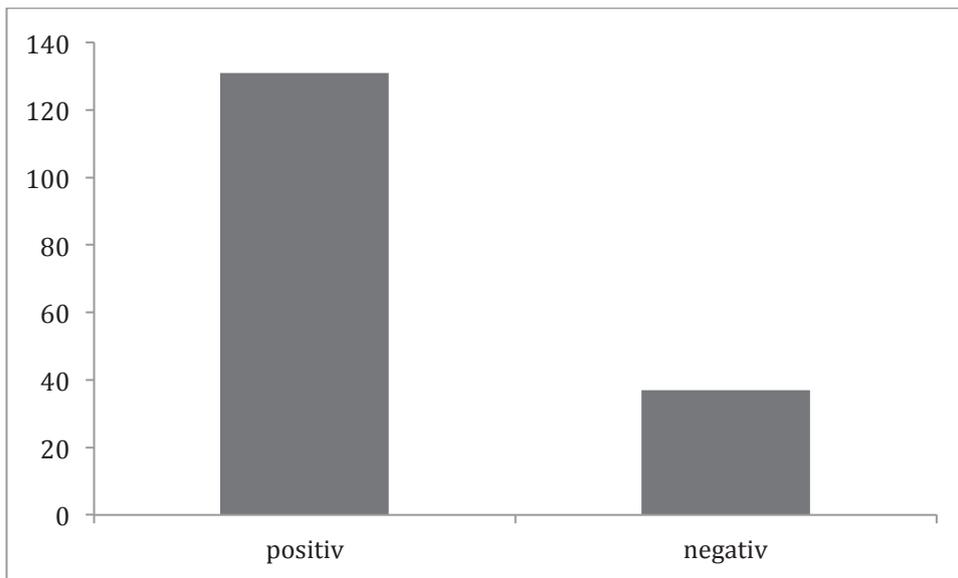


Abb. 6: Verteilung Östrogenrezeptorstatus; y-Achse: Anzahl, x-Achse: ER-Status

3.2 Material und Apparaturen

Verwendete Gerätschaften:

- ⤴ RNeasy®Mini Kit (Firma Quiagen, Hilden)
- ⤴ Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- ⤴ Microarray: Whole Genome Human Agilent 4x44K, Design 014850
- ⤴ Agilent Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- ⤴ RNA Spike-In Kit, One-Color, Agilent Technologies
- ⤴ Gene Expression Hybridization Kit, Agilent Technologies
- ⤴ DNA Microarray Scanner Typ G2505C, Agilent Technologies

3.3 Untersuchungsmaterial

Die histologische Untersuchung des Brustkrebs-Materials erfolgte durch die pathologischen Institute der jeweiligen Kliniken. Ihre Erkenntnisse zu Tumorstadium, Histologie, Grading etc. wurden in diese Arbeit übernommen.

Bei allen 168 Patientinnen erfolgte die Genexpressionsanalyse aus gefrorenem Tumorgewebe. Dazu wurde das intraoperativ bzw. aus einer Biopsie gewonnene Material unmittelbar in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert.

Im Institut für onkologische Molekularpathologie erfolgte sowohl die immunhistochemische Analyse als auch die Genexpressionsanalyse mittels AGILENT Microarray Technologie®.

Bei allen Patienten erfolgte die Analyse des Tumorgewebes vor Beginn einer adjuvanten Therapie, sodass kein Einfluss einer zytochemischen oder hormonellen Therapie auf das Tumorgewebe bestand.

3.3.1 RNA-Extraktion aus Gefriergewebe

Zur RNA-Extraktion aus gefrorenem Tumorgewebe diente das *RNeasy®Mini Kit* der Firma Quiagen, Hilden. Dazu wurden 8-10 Schnitte à $14\mu\text{m}$ Gefriermaterial benötigt. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers Quiagen.

Zunächst wurde das Tumorgewebe mittels $350\mu\text{l}$ einer Lysesubstanz (RLT + β -Mercaptoethanol) auf dem Gerät *TissuLyserII* (Qiagen) für 30 sek bei 25 cyc/sek lysiert.

Danach wurden die lysierten Proben auf Schreddersäulchen gegeben und für 2 min bei 20000g zentrifugiert. Auf den entstandenen Durchfluss wurden $350\mu\text{l}$ 70%-iger Ethanol gegeben und vermischt. Das Gemisch wurde auf eine *RNeasy Spin Säule* pipettiert.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 sek bei 15000g und Verwerfung des Durchflusses. Die Säule wurde mittels $350\mu\text{l}$ eines Waschpuffer RW1 gewaschen, bei 15000g für 15 sek zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Als nächstes wurden $80\mu\text{l}$ eines Gemisches aus DNASE-Lyophilisat und RDD-Puffer dazugegeben. Eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur schloss sich an, um die verbliebene DNA zu verdauen.

Es folgte ein zweiter Waschvorgang mit zunächst $350\mu\text{l}$ RW1-Puffer und Zentrifugation für 15 sek bei 15000g . Dann wurden $500\mu\text{l}$ PRE-Puffer hinzupipettiert und ebenfalls für 15sek zentrifugiert. Nach erneutem Zufügen von $500\mu\text{l}$ PRE-Puffer erfolgte eine 2-minütige Zentrifugation bei 15000g , der Durchfluss wurde jeweils verworfen.

Zum Trocknen der Proben wurden die Säulchen auf ein neues Sammel-Röhrchen gegeben und für 2 min bei 20000g zentrifugiert.

Zum Schluss folgte die Elution der RNA von den Reinigungssäulchen mit Hilfe von $60\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser und Zentrifugation für 1 min bei 8000g .

Die Menge der extrahierten RNA wurde mittels der optischen Dichtemessung bei 260nm durch das Spektrophotometer Nanodrop ND-1000 der Firma peqlab Biotechnologie GmbH ermittelt.

Dabei galt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

3.4 Microarray Analyse

Die Genexpressionsanalyse des Tumorgewebes erfolgte mit Hilfe der *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* der Firma *Agilent Technologies*®. Der verwendete Microarray-Chip 4 x 44K, Design 014850 enthielt 44.000 Gensonden, mit welchem die Aktivität von ca. 41.000 Genen pro Tumorprobe analysiert werden konnte.

Zur Probenzubereitung diente das *Agilent Quick Amp Labeling Kit* und das *RNA Spike-In Kit* der Firma *Agilent Technologies*®. Zur Hybridisierung wurde das *Gene Expression Hybridization Kit, Agilent Technologies*®, verwendet. Die experimentelle Arbeit erfolgte jeweils gemäß der Anleitung des Herstellers.

3.4.1 Probenzubereitung

Schritt 1: Herstellung von One-Color Spike Mix mittels Agilent One-Color RNA Spike-In Kit

In einem ersten Schritt wurde der im Kit beinhaltete *One-Color Spike-Mix* dem RNA-Gehalt der Probe entsprechend mit einer Verdünnungslösung vermischt, da pro 100ng RNA-Menge 1µl des Spike-Mix benötigt wurde.

Schritt 2: Vorbereitung der Markierungs-Reaktion

Zu der RNA der Probe wurden 1,2µl des T7 Promoter Primer, die dem RNA-Gehalt entsprechende Menge des verdünnten Spike-Mix und Nuclease-freies Wasser gegeben, um ein Gesamtvolumen von 11,5µl zu erhalten. Durch Inkubation bei 65°C über 10 Minuten wurden Primer und Template denaturiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Röhrchen anschließend auf Eis gelagert. Nun wurde 8,5µl eines cDNA Master Mix zu jedem Röhrchen gegeben. Dieser cDNA Master Mix bestand aus 4µl 5X First Strand Puffer, 2µl 0,1M DTT, 1µl 10mM dNTP mix, 1µl MMLV-RT und 0,5µl RNaseOut. Die Proben wurden für 2 h bei 40°C und für 15 min bei 65°C inkubiert. Als nächstes fügte man den Proben 60µl des

Transkriptions Master Mix hinzu. Dieser setzte sich zusammen aus den folgenden Lösungen: 15,3µl Nuclease-freies Wasser, 20µl 4X Transkriptionspuffer, 6µl 0,1M DTT, 8µl NTP Mix, 6,4µl 50% REG, 0,5µl RNaseOut, 0,6µl Inorganische Pyrophosphatase, 0,8µl T7 RNA Polymerase, 2,4µl Cyanine 3-CTP. Anschließend folgte eine Inkubation bei 40°C für 2 h.

Schritt 3: Aufreinigung der markierten/amplifizierten RNA

Zu jedem Röhrchen wurden 20µl Nuclease-freies Wasser gegeben, um ein Gesamtvolumen von 100µl zu erhalten. Dann wurden nacheinander 350µl der RLT Puffer-Lösung und 250µl 100-prozentiges Ethanol hinzugefügt. Die insgesamt 700µl der cRNA-Probe wurden auf ein *RNeasy Mini Spin Säulchen* der Firma Qiagen gegeben, und nach Zentrifugation über 30 sek bei 13.000rpm wurde der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 500µl des RPE-Puffers hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und jeweils der Durchfluss verworfen, sodass sichergestellt wurde, dass die Säule mit der gereinigten cRNA frei von RPE war. Um die cRNA von der Säule zu lösen, wurde 30µl RNase-freies Wasser auf die *RNeasy Filter Membran* gegeben. Nach Zentrifugation wird der cRNA-enhaltende Durchfluss auf Eis gelagert.

Schritt 4: Messung des cRNA-Gehalts

Mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop wurde die cRNA quantifiziert bei einer RNA-Absorptionsrate von 260nm. Eine minimale Ausbeute von 1,65µg und eine minimale spezifische Aktivität von 9,0pmol Cy3 pro µg cRNA wurde benötigt, um den Hybridisierungsschritt anzuschließen.

3.4.2 Hybridisierung

Schritt 1: Zubereitung der Hybridisierungsproben

Hierzu verwendete man das *Agilent Gene Expression Hybridization Kit*. Zu je 1,65µg Cy3-markierter und amplifizierter cRNA wurde ein Fragmentationsmix, bestehend aus 11µl 10X Blocking Agent, 2,2µl 25v Fragmentationspuffer und Nuclease-freies Wasser für ein Gesamtvolumen von 55µl gegeben. Zur Spaltung der cRNA erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 60°C. Zum Stoppen der Fragmentierungsreaktion fügte man 55µl des 2x GEX Hybridisierungspuffers HI-RPM hinzu. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 13.000rpm konnte die Probe im nächsten Schritt auf den Array aufgetragen werden.

Schritt 2: Die Hybridisierungseinheit

Hierzu wurde ein Objektträger in die *Agilent SureHyb* Kammer gelegt und 100µl der zubereiteten Hybridisierungsprobe auf den Objektträger aufgetragen. Nun wurde ein mit den Gensonden beschichteter Objektträger darauf positioniert und mit dem Deckel der *Agilent SureHyb* Kammer fest verschraubt (siehe Abbildung 7). Dabei müssen frei bewegliche Luftblasen zwischen den Objektträgern bestehen. Dann wurde die Kammer für 17h in einen Hybridisier-Ofen verbracht, in dem sich der Hybridisierungsschritt bei 10rpm und 65° vollzog.

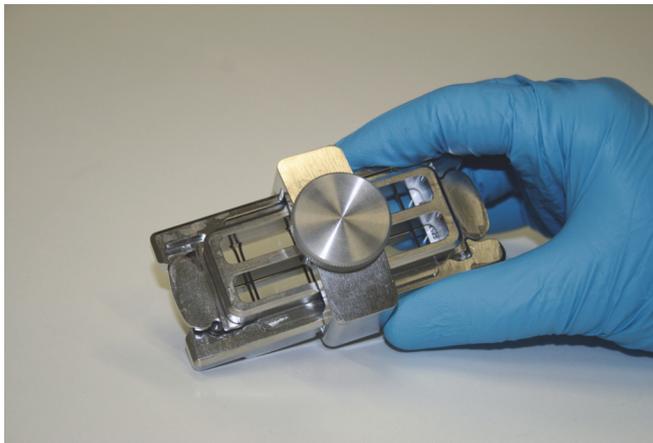


Abb. 7: Agilent SureHyb Kammer mit den aufeinander positionierten Microarray-Objektträgern

3.4.3 Microarray Waschvorgang

Ziel der folgenden Schritte war das Entfernen von nicht gebundenen cDNA-Stücken und das Minimieren von Rückständen, die den Scan-Vorgang stören konnten.

In der Vorbereitung wurde eine Glas-Küvette #1 mit *Gene Expression* Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur gefüllt. Eine Küvette #2 wurde mit einem Küvetteneinsatz, einem magnetischen Rührfisch und Waschpuffer 1 bestückt. Eine Küvette #3 wurde schon am Vortag mit Waschpuffer 2 befüllt, über Nacht bei 37°C vorgewärmt und erst kurz vor Gebrauch auf einen Magnetrührer positioniert.

Nach Beendigung der Hybridisierungszeit wurde die Hybridisierungskammer geöffnet und die zusammengelegten Objektträger herausgenommen und in die Waschküvette #1 überführt. Wenn die Objektträger vollkommen von der Waschlösung umgeben waren, wurden sie geöffnet und der mit Gensonden beschichtete Objektträger (Microarray) sofort in den

Küvetteninsatz von Waschbehälter #2 gegeben und zum Spülen für eine Minute auf der Magnetplatte gerührt. Anschließend wurde der Microarray-Objektträger mit Küvetteninsatz in die vorgewärmte Küvette #3 gegeben. Es folgte ebenfalls ein Rührvorgang für 1 Minute. Danach wurde der Küvetteninsatz mitsamt Objektträger langsam aus der Waschlösung entfernt.

Um eventuelle Waschpuffer-Rückstände zu entfernen, wurde der Küvetteninsatz mit Objektträger anschließend in eine Glas-Küvette mit Acetonitrile-Lösung überführt. Das Scannen der Array-Platten schloss sich unmittelbar an, um den Einfluss von Umweltoxidantien auf die Signalintensitäten zu minimieren. Dazu wurde der Microarray-Objektträger gemäß der Anleitung des Herstellers in den Scan-Einsatz gelegt und in das Scan-Gerät gegeben (siehe Abbildung 8).



Abb. 8: Einlegen des Scan-Einsatz mit dem Microarray in das Scan-Gerät

3.4.4 Scan-Vorgang und Auswertung der Genexpressionsdaten

Im anschließenden Scan-sowie Auswertungs-Prozess wurde anhand der Intensität der Fluoreszenzmarkierung die Expressionsstärke der jeweiligen Gene analysiert. Als Scan-Software diente die folgende Version: „*Agilent Scan Controll V.8.1.3*“.

Mittels Photomultiplier (PMT) erfolgt die Umwandlung des Fluoreszenz-Signals zunächst in ein elektrisches Signal. Das PMT-Signal wurde in eine digitale Form konvertiert und als TIFF-file gespeichert.

Die Analyse der Genexpression aus den Bilddaten erfolgte mittels „*Agilent Feature Extraction 10.7.3.1 Software*“.

3.5 Immunhistochemische Analyse des Östrogenrezeptorstatus

Der Östrogenrezeptorstatus wurde mittels der immunhistochemischen Analyse des Tumorgewebes nach dem üblichen Verfahren ermittelt, welche im Institut für onkologische Molekularpathologie Düsseldorf durchgeführt wurde.

Dabei galt als Schwellenwert für die Positivität dieses Parameters ein Nachweis von >10% Östrogenrezeptor-positive Tumorzellen.

3.6 Statistische Analyse

3.6.1 Significance Analysis of Microarray (SAM)

SAM ist eine von Tusher et al. entwickelte statistische Methode zur Identifizierung von signifikant unterschiedlich exprimierten Genen in Microarray Daten. Die Methode basiert auf einer modifizierten Version des Standard t-Tests.

Als Grundlage dienen die Genexpressionswerte der Microarray-Analyse, die Zielvariable des Experimentes stellte hier das histopathologische Grading dar.

Um den Zusammenhang zwischen Genexpression und Zielvariable zu quantifizieren, errechnet SAM für jedes Gen i einen statistischen Wert d_i . Mit Hilfe eines Permutationsverfahrens wird ermittelt, ob die Expression der jeweiligen Gene in einem signifikanten Zusammenhang zur Zielvariablen steht. Der Benutzer kann dazu selbstständig auf der Basis der Falsch-Positiv-Rate den Schwellenwert für die Signifikanz mittels des Parameters δ bestimmen. Dabei gilt: je kleiner der δ -Wert, desto größer die Anzahl an signifikanten Genen bei jedoch ebenfalls erhöhter *false discovery rate*(31,32).

3.6.2 Prediction Analysis of Microarray (PAM)

PAM ist eine statistische Methode, mit der aus Genexpressionsdaten eine Klassenvorhersage durch die Methode „*Nearest Shrunken Centroids*“ getroffen werden kann. Sie wurde von Tibshirani, Hastie, Narasimhan und Chu (2002) entwickelt.

Auf der Basis der Genexpressionswerte wird für jedes Gen ein geschrumpfter standardisierter Zentroid (*shrunken centroid*) für jede Klasse ermittelt. Er errechnet sich aus dem durchschnittlichen Genexpressionswert für jedes Gen in den beiden Klassen, dividiert durch

die Standardabweichung für dieses Gen. Mittels Kreuzvalidierung wird dabei das Ausmaß des Schrumpfens bestimmt. Als Maß der Genauigkeit der Klassenvorhersage dienen ein mittels Kreuzvalidierung ermittelter Schwellenwert (*Threshold*) und der entsprechende Misklassifizierungsfehler.

Mit Hilfe dieser statistischen Methoden (*Nearest Shrunken Centroid* und *Leave-one-out Cross Validation*) wurde hier eine Genliste (*Classifier*) mit für die Gradingklassen G1 und G3 signifikanten Genen gefunden, welche anschließend zur Klassenvorhersage verwendet wurde. Eine neue Probe konnte anschließend anhand ihres Genexpressionsprofil durch Vergleich mit den Klassenschwerpunkten entsprechend in Gradingklasse G1 und G3 eingeteilt werden(33).

3.6.3 GOrilla Gene Ontology

Zur Ermittlung der Funktion von Genen und Genlisten wurde das Web-basierte Programm GOrilla Gene Ontology herangezogen. Es ermöglicht die Suche und Analyse von *Gene Ontology* (GO)-Annotationen, den entsprechenden Genen und deren Funktionen auf der Basis der Gen-Ontologie-Datenbank(34). Dabei identifiziert es GO-Annotationen/Gene, die innerhalb eines Datensets signifikant überrepräsentiert sind, wodurch sich Rückschlüsse auf die Funktionen der Genliste ziehen lassen. Dazu liefert es eine graphische Darstellung der signifikant überrepräsentierten Termini im Sinne eines gerichteten azyklischen Graphen. Entsprechend der Signifikanz, ermittelt durch den p-Wert, erfolgt eine farbliche Codierung der Darstellung(35).

3.6.4 Hierarchische Cluster-Analyse

Zur Berechnung und Gruppierung von Ähnlichkeiten innerhalb von Genprofilen und Array-Daten wurde die Funktion der hierarchischen Cluster-Analyse nach Eisen et al. verwendet(36).

Der Analyse in Kapitel 3.3 diente die Cluster-Funktion des Programms „BRB Array Tools“, Version: 3.8.1(37). Für das Clustering in Kapitel 3.4 wurde das Programm „Gene Cluster 3.0“(38) angewandt. Das Ergebnis der Darstellung dieses Algorithmus erfolgte durch das Programm Java Tree View 1.1.5.r2(39).

3.6.5 SPSS – Programm

Das IBM SPSS-Programm Version 20 wurde zur statistischen Analyse verwendet.

Zur Ermittlung von Zusammenhängen zwischen klinikopathologischen Eigenschaften und der Genliste dienten Kreuztabellen. Die Signifikanz-Einschätzung erfolgte zweiseitig mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

Zur Berechnung und Darstellung des Gesamtüberlebens oder Rezidivfreien Überlebens wurde die Methode von Kaplan-Meier verwendet. Die Signifikanz wurde mittels Log-Rank-Test errechnet. Auch hier wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Wie oben beschrieben erfolgte die Genexpressionsanalyse der 168 Tumorproben mittels der Agilent Microarray Technologie. Die Genexpressionswerte der Analyse wurden normalisiert zum Median und anschließend logarithmiert. Dazu wurden klinische und pathologische Parameter wie Alter der Patientin, TNM-Stadium, Östrogenrezeptor-Status, Proliferationsindex usw. zur statistischen Analyse herangezogen. Ziel der Arbeit war es, auf der Basis der Genexpressionsanalyse diejenigen Gene zu finden, die für das histopathologische Grading kodieren.

4.1 SAM (Significance Analysis of Microarray) und Grading

Die Analyse wurde zunächst mit dem Programm „SAM“ (*Significance Analysis of Microarray*) durchgeführt. Auf der Basis eines modifizierten Standard t-Testes identifiziert SAM die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene in Microarray Daten. Zielvariable war das histopathologische Grading.

4.1.1 SAM und G1 vs. G2 vs. G3

Bei der Analyse des Gradings mit seinen drei Klassen G1, G2 und G3 fand SAM 11.108 signifikante Gene (siehe Abbildung 9):

- bei einer False Discovery Rate (FDR) von 0,1 (mit 1.110,8 falsch positiv ermittelten Gene, entspricht 10%)
- delta-Wert: 0,12
- Korrekturfaktor (fudge factor) für die Standardabweichung: 0,12

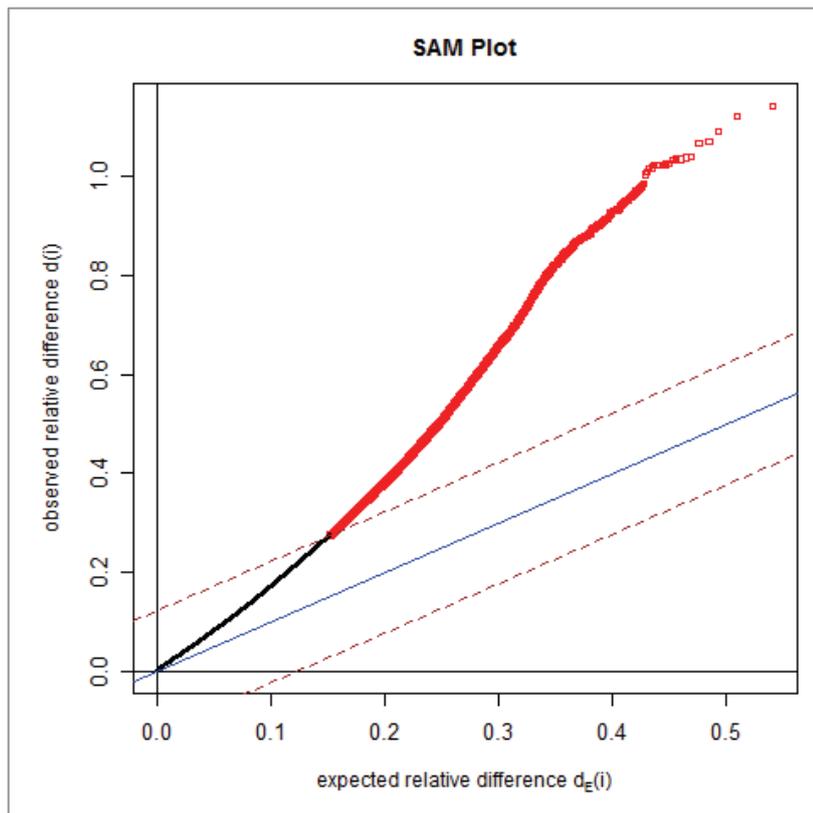


Abb. 9: SAM-Plot: G1 vs. G2 vs. G3 mit 11.108 positiv exprimierten, signifikant korrelierten Genen, y-Achse: beobachteter relativer Unterschied $d(i)$, x-Achse: erwarteter relativer Unterschied $d_E(i)$

4.1.2 SAM und G1 vs. G3

In einem nächsten Schritt führten wir die SAM-Analyse nur mit G1- und G3-Tumoren durch. Diese Analyse ergab eine Liste mit 218 signifikant unterschiedlich exprimierten Genen (siehe Abbildung 10):

- FDR 0,0003 (0,06 falsch positive Werte, entspricht 0,3%)
- d-Wert 1,75
- Korrekturfaktor (fudge factor) für die Standardabweichung: 0,11

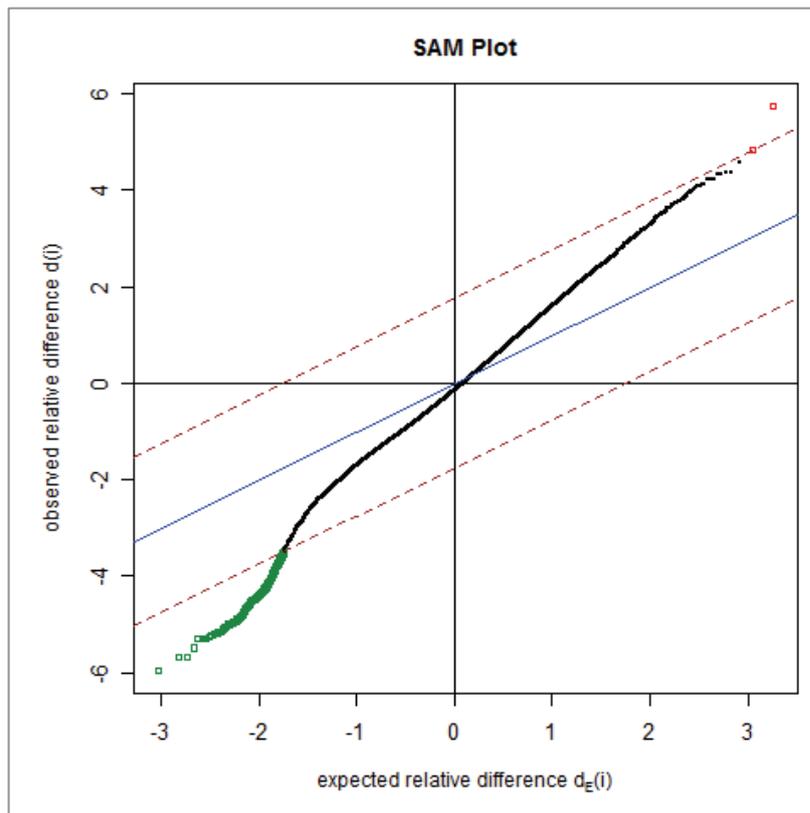


Abb. 10: SAM-Plot G1 vs. G3 mit 2 negativ exprimierten (rot) und 216 positiv exprimierten, signifikant korrelierten Genen, y-Achse: beobachteter relativer Unterschied $d(i)$, x-Achse: erwarteter relativer Unterschied $d_E(i)$

Bei einem deutlich geringeren Anteil falsch positiver Werte stellen die 218 in diesem Prozess ausgewählten Gene einen besseren Korrelationszusammenhang dar als die sehr große Gengruppe, die in 3.1.1 ausgewählt wurde.

4.1.3 GOrilla Gene Ontology Analyse der Genliste SAM218

Es erfolgte eine Analyse der Funktion der 218 Gene mithilfe des Web-Programmes *GOrilla Gene Ontology*. Hier zeigte sich, dass der überwiegende Anteil der 218 Gene mit signifikanter Relevanz involviert ist in Zellzyklusprogression, Regulation des Zellzyklus und Zellorganellen-Organisation (siehe Abbildung 11).

Abb. 11: Output GOrilla Gene Ontology und SAM218 (siehe Anhang)

4.2 PAM (Prediction Analysis of Microarray): G1 vs. G3

Als nächstes erfolgte die Analyse der Genexpressionsprofile der G1- und G3-Tumoren mittels PAM (*Prediction Analysis of Microarray*). Ziel war es, einen spezifischen *Classifier* (Genliste) zu erhalten, der eine Klassenvorhersage und dementsprechend eine Zuteilung in „G1“ oder „G3“ auf Genexpressionsebene ermöglicht.

Das Ergebnis der PAM-Analyse war eine Genliste bestehend aus 44 Genen mit dem niedrigsten Misklassifizierungsfehler im Kreuzvalidierungsverfahren (13% Kreuzvalidierungs-Misklassifizierungsrate). Tabelle 7 zeigt die Leistung des Classifiers während des Kreuzvalidierungsverfahrens hinsichtlich Sensitivität und Spezifität des Tests an. Dabei entspricht Klasse 1 der Niedrigrisiko-Gruppe und Klasse 2 der Hochrisiko-Gruppe.

Klasse	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
1	0,833	0,882	0,625	0,957
2	0,882	0,833	0,957	0,625

Tabelle 7: Leistung des Classifiers während Kreuzvalidierung; PPV= positive predictive value / NPV= negative predictive value

Tabelle 8 stellt die ermittelte Genliste CP44 aus der PAM-Analyse dar. Sie besteht aus insgesamt 40 einzelnen Genen bei 44 Array-Proben. In der ersten Spalte sind die *Unique IDs*, bzw. die Array-Proben aufgelistet, in Spalte 2 die dazugehörigen Gensymbole. Spalte 3 und 4 enthalten die geometrischen Mittelwerte der Genexpressionsstärken für das entsprechende Gen in der Klasse 1 (entspricht Niedrigrisiko-Gruppe) und 2 (entspricht Hochrisiko-Gruppe). 36 der 44 Gene waren in Klasse 2 überexprimiert und 8 in Klasse 1.

In Tabelle 9 sind die offiziellen Bezeichnungen der Gene der Genliste CP44 aufgelistet. Diese wurde ebenfalls mit Hilfe des BRB Array Programms erstellt und mittels des Programms „Gene Expression Omnibus“(40) überprüft.

Unique ID	Gene Symbol	Intensität Kl. 1	Intensität Kl. 2
A_23_P26976	CHAD	958,74	78,93
A_23_P161474	MCM10	55,17	452,31
A_24_P412088	MCM10	47,97	303,9
A_32_P66517	AK023508	97,57	10,59
A_23_P94422	MELK	171,75	1012,38
A_23_P143190	MYBL2	259,42	1604,21
A_23_P323751	FAM83D	104,33	664,84
A_23_P23303	EXO1	157,95	878,33
A_23_P94782	ENST00000366874	992,55	67,93
A_24_P297539	UBE2C	2293,5	12767,57
A_32_P109296	C15orf42	260,17	1518,91
A_23_P345707	C15orf42	36	199,63
A_24_P335620	SLC7A5	466,53	2864,99
A_32_P151800	FAM72A	92,84	429,37
A_32_P228037	PDE11A	110,41	17,66
A_23_P99285	GPR19	24,14	119,28
A_23_P133123	MND1	154,17	786,77
A_23_P413862	ENST00000303697	685,81	50,05
A_23_P151150	FOXM1	281,11	1526,16
A_24_P413884	CENPA	70,4	408,37
A_23_P361419	DEPDC1B	54,47	269,72
A_23_P388812	CKAP2L	71,55	357,3
A_24_P20607	CXCL11	33,24	281,51
A_32_P151570	A_32_P151570	112,47	18,21
A_24_P306896	ENST00000323198	19,84	108,21
A_24_P234196	RRM2	88,03	517,74
A_24_P257099	DKFZp762E1312	69,79	341,77
A_24_P680947	LOC146909	69,67	385,61
A_23_P256956	KIF20A	144,93	652,66
A_23_P34325	LRP8	42,84	194,14
A_23_P333998	POLQ	31,72	151,31
A_23_P58321	CCNA2	81,15	369,44
A_23_P218827	POLQ	106,03	422,6
A_23_P124417	BUB1	153,37	684,37
A_23_P12533	ANKRD30A	235,16	23,43
A_23_P34788	KIF2C	931,99	4150,36
A_23_P118174	PLK1	114,36	529,41
A_24_P313504	PLK1	1093,7	4974,02
A_23_P36018	VSIG2	934,68	129,28
A_23_P252292	CENPI	29,23	112,92
A_23_P83381	LOC388743	4806,71	487,62
A_24_P916195	GTSE1	105,85	456,76
A_23_P88331	DLG7	348,5	1469,37
A_23_P259586	TTK	69,75	314,53

Tabelle 8: Genliste (Classifier) CP44 mit 44 Array-Proben (40 Gene); Intensitäten der Expression jedes Gens als geometrisches Mittel angegeben für Klasse 1 und 2

Unique id	Gene symbol	Gene Name
A_23_P26976	CHAD	CHAD chondroadherin (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P161474	MCM10	minichromosome maintenance complex component 10 (<i>Homo sapiens</i>)
A_24_P412088	MCM10	minichromosome maintenance complex component 10 (<i>Homo sapiens</i>)
A_32_P66517	AK023508	cDNA FLJ13446 fis, clone PLACE1002968 (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P94422	MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P143190	MYBL2	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2 (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P323751	FAM83D	Homo sapiens family with sequence similarity 83, member D [NM_030919]
A_23_P23303	EXO1	Exonuclease 1, transcript variant 3 (<i>Homo sapiens</i>) [NM_003686]
A_23_P94782	CAPN8 (ENST00000366874)	calpain 8 (CAPN8), transcript variant 4 (LOC388743) (<i>Homo sapiens</i>)
A_24_P297539	UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C, transcript variant 6, [NM_181803] (<i>Homo sapiens</i>)
A_32_P109296	C15orf42	chromosome 15 open reading frame 42 [NM_152259] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P345707	C15orf42	chromosome 15 open reading frame 42 [NM_152259] (<i>Homo sapiens</i>)
A_24_P335620	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5
A_32_P151800	FAM72A	family with sequence similarity 72, member A [NM_207418] (<i>Homo sapiens</i>)
A_32_P228037	PDE11A	phosphodiesterase 11A, transcript variant 4 [NM_016953] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P99285	GPR19	G protein-coupled receptor 19 [NM_006143] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P133123	MND1	meiotic nuclear divisions 1 homolog (<i>S. Cerevisiae</i>) [NM_032117] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P413862	ENST00000303697	doublecortin domain containing 5 [RefSeq_peptide;Acc:NP_940864]
A_23_P151150	FOXM1	forkhead box M1, transcript variant 1, [NM_202002] (<i>Homo sapiens</i>)
A_24_P413884	CENPA	centromere protein A, transcript variant 1 [NM_001809] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P361419	DEPDC1B	DEP domain containing 1B [NM_018369] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P388812	CKAP2L	cytoskeleton associated protein 2-like [NM_152515] (<i>Homo sapiens</i>)
A_24_P20607	CXCL11	(C-X-C motif) ligand 11 [NM_005409] (<i>Homo sapiens</i>)
A_32_P151570	A_32_P151570	
A_24_P306896	ENST00000323198	similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C (Ubiquitin-protein ligase C)
A_24_P234196	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide [NM_001034] (<i>Homo sapiens</i>)
A_24_P257099	DKFZp762E1312	HJURP Holliday junction recognition protein [NM_018410] (<i>Homo sapiens</i>)
A_24_P680947	KIF18B (LOC146909)	KIF18B kinesin family member 18B (LOC146909) [<i>Homo sapiens</i> (human)]
A_23_P256956	KIF20A	kinesin family member 20A [NM_005733] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P34325	LRP8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor,
A_23_P333998	POLQ	POLQ polymerase (DNA directed) theta (PRO0327) [AF090919] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P58321	CCNA2	cyclin A2 [NM_001237] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P218827	POLQ	polymerase (DNA directed), theta [NM_199420] (<i>Homo sapiens</i>)
A_23_P124417	BUB1	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase [<i>Homo sapiens</i> (human)]

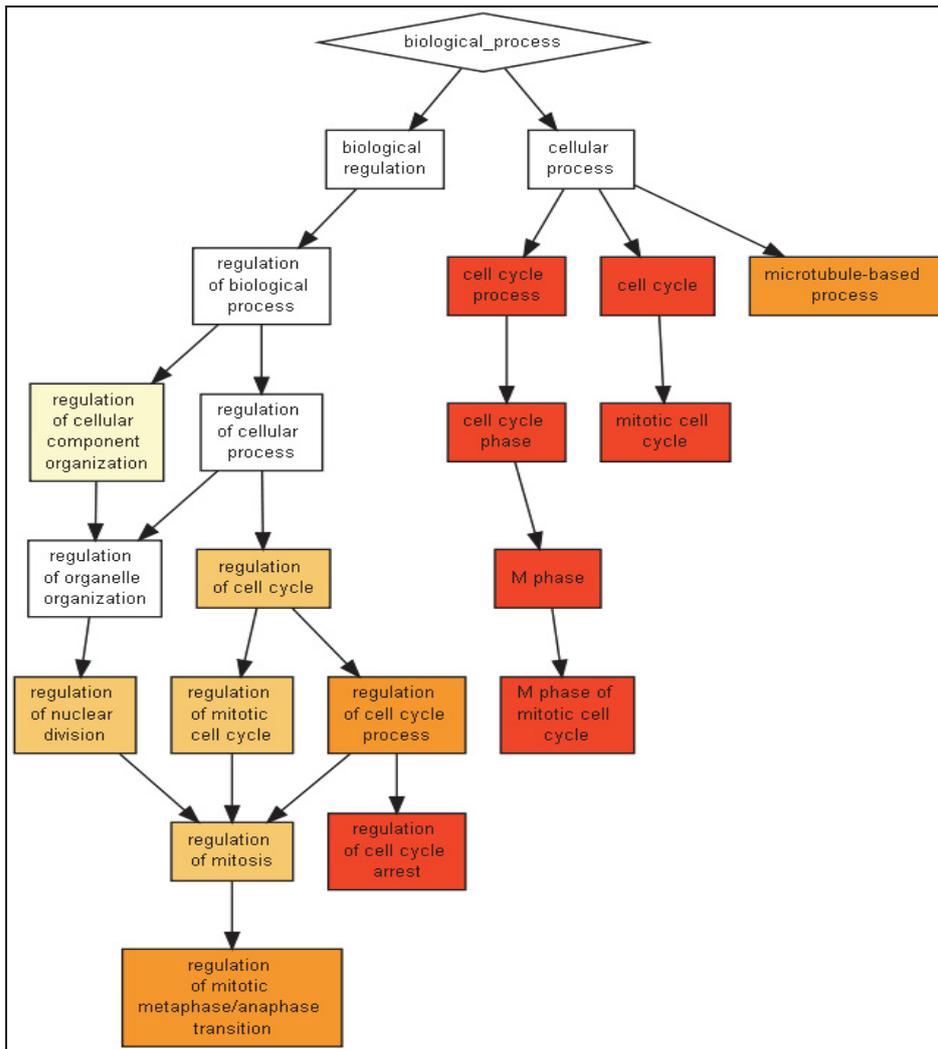
A_23_P12533	ANKRD30A (NY-BR-1)	ankyrin repeat domain 30A [NM_052997] (NY-BR-1) (Homo sapiens)
A_23_P34788	KIF2C	kinesin family member 2C [NM_006845] (Homo sapiens)
A_23_P118174	PLK1	polo-like kinase 1 (Drosophila) (PLK1), mRNA [NM_005030] (Homo sapiens)
A_24_P313504	PLK1	polo-like kinase 1 (Drosophila) (PLK1), mRNA [NM_005030] (Homo sapiens)
A_23_P36018	VSIG2	V-set and immunoglobulin domain containing 2 [NM_014312] (Homo sapiens)
A_23_P252292	CENPI	centromere protein I [NM_006733] (Homo sapiens)
A_23_P83381	CAPN8(LOC388743)	calpain 8, transcript variant 4 (LOC388743) [XM_938885] (Homo sapiens)
A_24_P916195	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1 [NM_016426] (Homo sapiens)
A_23_P88331	DLG7	discs, large homolog 7 (Drosophila) [NM_014750] (Homo sapiens)
A_23_P259586	TTK	TTK protein kinase [NM_003318] (Homo sapiens)

Tabelle 9: offizielle Bezeichnung der Gene der Genliste CP44

4.2.1 GOrilla Gene Ontology Analyse der Genliste CP44

Es erfolgte ebenfalls eine Analyse der CP44-Genliste mit Hilfe der Gorilla Gene Ontology Analyse, bildlich dargestellt in Abbildung 12. Hier zeigte sich eine Über-Repräsentation der Gene mit einem p-Wert $<10^{-9}$, welche involviert sind in folgende biologische Prozesse:

- Zellzyklus
- Zellzyklusprozess
- Zellzyklusphase
- Mitotischer Zellzyklus
- M-Phase des mitotischen Zellzyklus
- M-Phase
- Regulation des Zellzyklus-Stop
- Regulation des Zellzyklusprozess
- Regulation Übergang mitotische Metaphase/Anaphase
- Mikrotubuli-assoziiertes Prozess



p-Wert Farbtafel:



Abb. 12: Output Gene Ontology Analyse der Genliste CP44, inklusive Farbtafel p-Wert

4.3 Hierarchische Cluster-Analyse der Genliste CP44

Im Anschluss wurde eine hierarchische Cluster-Analyse durchgeführt. Dabei können Beziehungen zwischen Genen anhand ihres ähnlichen Genexpressionsprofils analysiert und mit Hilfe eines Dendrogramms visualisiert werden. Dazu wird die Stärke der Genexpression anhand einer „Heat map“ farblich codiert und sichtbar gemacht. Eine rote Markierung bedeutet eine hohe Expressionsstärke des Gens, während grün eine niedrige Expressionsstärke darstellt(41).

In unserer Analyse wurden die Patientenproben hinsichtlich der Expressionsstärke der 44 Gene der Genliste CP44 analysiert. Abbildung 13 stellt die hierarchische Cluster-Analyse der Genliste CP44 und des histopathologischen Gradings dar (siehe Anhang).

Die gelb gestrichelte Linie stellt die erste Trennung in der Cluster-Analyse dar, die beiden Untergruppen wurden entsprechend in Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Gruppen eingeteilt. Es zeigt sich eindrücklich in der Heatmap, dass der überwiegende Anteil der Gene der Liste CP44 in der Niedrigrisiko-Gruppe unter- und in der Hochrisiko-Gruppe überexprimiert ist. Bei der Zuordnung der histopathologischen Grading-Einteilungen fällt auf, dass in der Niedrigrisiko-Gruppe der Cluster-Analyse alle G1-Proben (n=12) und 62 G2-Proben und 6 G3-Proben enthalten sind. Dahingegen finden sich 43 G3-Proben und 45 G2-Proben und keine G1-Proben in der Hochrisiko-Gruppe wieder.

Abb. 13: Hierarchische Cluster-Analyse CP44 und Grading (siehe Anhang)

4.4 Validationsset V2: Anwendung der Genliste CP44 und Vergleich mit GGI

Zur Validation des neu ermittelten Classifiers diente ein Patientenkollektiv bestehend aus 73 Brustkrebs-Patientinnen mit bekanntem histopathologischen Grading, deren Tumormaterial im Institut für onkologische Molekularpathologie, Düsseldorf im Zeitraum 2010-2011 analysiert wurde. Für die molekulargenetische Untersuchung des Tumormaterials wurde ein modifizierter Gen-Chip mit verändertem Design verwendet: Whole Genome Human Agilent 4x44K V2, Design 026652. Auf diesem Chip befanden sich ca. 44.500 Gensonden, davon waren 1000 Gene 10fach vorhanden, sodass die Anzahl der einzelnen Gene kleiner war als beim zuerst verwendeten Genchip. Die Aufarbeitung der Patientenproben erfolgte in gleicher Weise gemäß der Anleitung der Hersteller wie bereits in Kapitel 3 beschrieben. Für den Scan-Vorgang wurde ebenfalls das Scan-Gerät *DNA Microarray Scanner Typ G2505C, Agilent Technologies*, sowie die dementsprechende *Scan Control* und *Feature Extraction Software* verwendet (siehe Kap. 3.4).

Wir erhielten für die 73 Patientenproben die Genexpressionswerte der rund 44.500 Gensonden, welche als lineare Werte normiert wurden (Mittelwert geteilt durch die Standardabweichung). Zusätzlich standen immunhistochemische und zum Teil histopathologische Eigenschaften der Tumorproben zur Verfügung. Acht Tumorproben

wiesen ein G1-Stadium, 45 Proben ein G2-Stadium und 20 Proben ein G3-Stadium auf.

In der Anwendung der CP44-Genliste auf die Array-Daten dieses Patientenkollektiv fand sich eine Übereinstimmung von 38 Proben mit 34 einzelnen Genen. Aufgrund des neuen Chip-Designs mit veränderter Gensonden-Zusammensetzung kam es zu einem Verlust von 6 Genen der CP44-Genliste. Als auf dieses Datenset angewandte CP44-Genliste wurde die Genliste Con38 eingeführt.

Auf Basis dieser Genliste wurde zunächst untersucht, inwieweit das Testkollektiv durch einfaches hierarchisches Clustern (*unsupervised*) subgruppiert werden konnte (siehe Abb. 14). Ähnlich wie das Trainingskollektiv wird auch das Testkollektiv durch den Cluster-Algorithmus in zwei Klassen aufgeteilt. Die eine Klasse (blau markiert) enthält die G1 Tumore, die andere Klasse (orange markiert) die G3 Tumore. Die Gruppe mit dem histopathologischen Grading (G2) wurde auf beide Klassen aufgeteilt. Nur eine G3 Probe wurde der günstigen Klasse zugeordnet (siehe orangefarbenes Kästchen in der blauen Markierung).

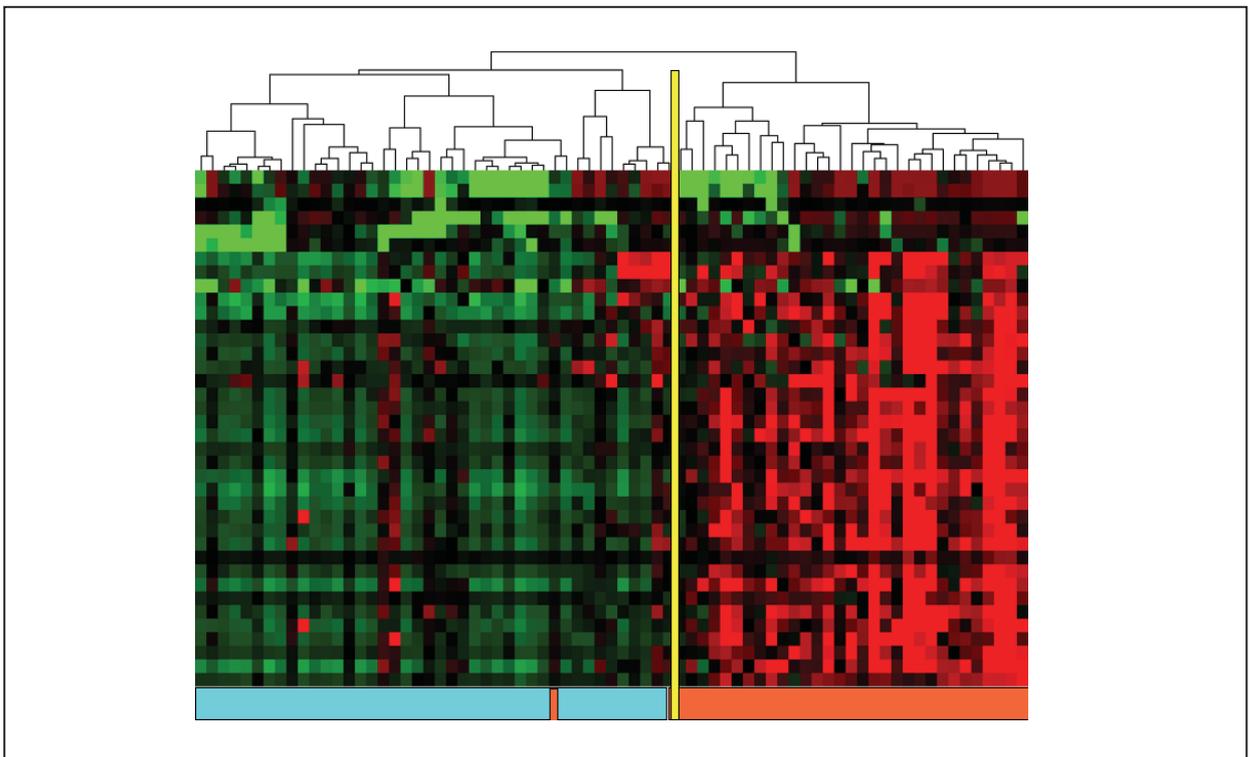


Abb. 14: Hierarchische Cluster-Analyse Validationsset V2 mit Grading-Einteilung. rot=hohe Expressionsstärke, grün=niedrige Expressionsstärke; blaue Markierung:G1- u. G2-Tumore, orangene Markierung: G3- u. G2-Tumore

4.4.1 Gegenüberstellung Score Con38 – Gradingklassen 1-3

Zur weiteren Anwendung und statistischen Analyse der Genliste Con38 wurde ein Score Con38 ermittelt. Dazu wurde die Summe aus den 38 normierten Genexpressionswerten pro Patient gebildet. Gene mit erhöhter Expression in der G1-Gruppe gingen dabei mit dem Faktor -1 in die Addition ein. Zur Skalierung wurde der entstehende Wert auf einen Wertebereich von 0 bis 100 gedehnt.

Tabelle 10 zeigt die Mittelwerte des Scores Con38 für die drei verschiedenen histologischen Gradingklassen inklusive der Standardabweichung. Die Abbildung 15 zeigt anhand der Boxplot-Darstellung die Verteilung der Score-Werte aufgeteilt auf die drei Grading-Klassen. Es zeigt sich eine deutliche Unterscheidung der Score-Werte innerhalb der Grading-Klassen 1 und 3: Mittelwert G1: 18,98 bzw. Mittelwert G3: 50,14. Hingegen finden sich in der G2-Klasse Überschneidungen mit den Score-Werten von G1 und G3.

Grad	Anzahl (n)	Mittelwert	Standardabweichung
1	8	18,983	8,8786
2	45	23,556	16,1256
3	20	50,140	21,7846
Insgesamt	73	30,338	21,0667

Tabelle 10: Verteilung Grading-Klassen und Mittelwerte des Score Con38 im Validationsset V2

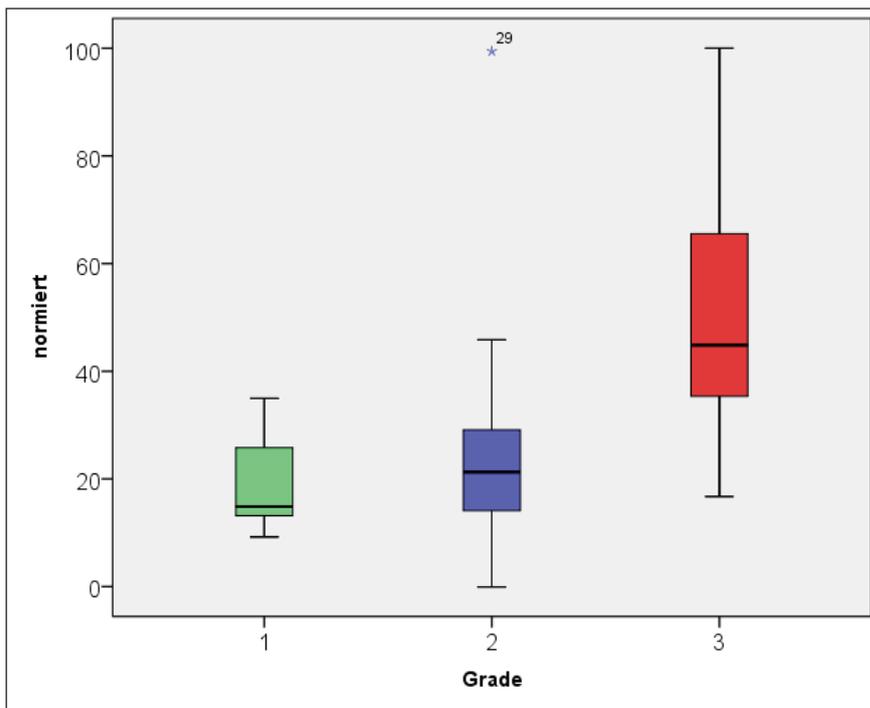


Abb. 15: Boxplot-Darstellung der Con38-Score-Werte verteilt auf G1-3; y-Achse: normierte Score-Werte Con38; x-Achse: Grading-Klasse 1-3

4.4.2 Vergleich der Gensets Con38 – Sotiriou96

Der *Gene Expression Grade Index* (GGI) von Christos Sotiriou et al.(2) basiert auf einer Genliste aus 97 Genen und wurde zur molekulargenetischen Klassifizierung des histopathologischen Gradings entwickelt.

96 der 97 Genen finden sich bei Anwendung der Genliste in unserem Validationsset wieder. Vergleicht man die Genliste von Sotiriou und die Con38-Liste, findet sich eine Überlappung von 18 der 34 Gene (entspricht 53%). Wie bereits für die Genliste Con38 wurde anhand der GGI-Genliste ein Score Sotiriou96 für jeden Patienten des Validationssets ermittelt. Dazu wurden die Summen der Genexpressionswerte der 96 Gene pro Patient zu einem Score im Wertebereich von 0 bis 100 verrechnet.

Zum Vergleich dieser beiden Scores wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient als Maß für den linearen Zusammenhang angewandt. Er betrug $\text{Pearson } r = 0,979$ bei einer Signifikanz $p = 0,00$.

Abbildung 16 zeigt anhand des Streudiagramms die hohe Korrelation zwischen Con38 und Sotiriou96.

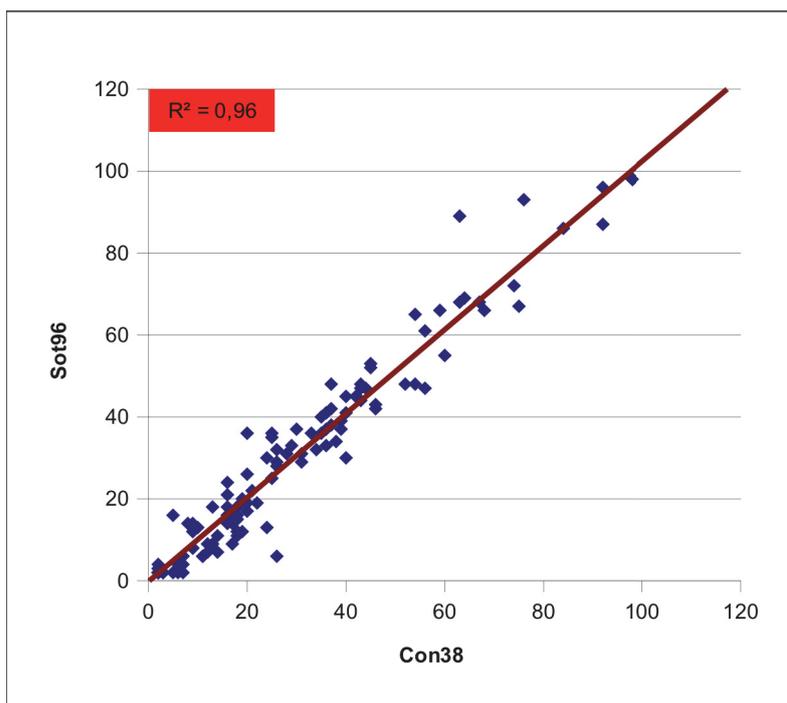


Abb. 16: Streudiagramm: Korrelation Con38 und Sotiriou96 mit $r^2=0,96$

4.5 Anwendung CP44 auf das externe Datenset EXT1 (Van de Vijver et al., „A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer“, NEJM 2002)

Da im Rahmen dieser Arbeit keine Nachverfolgungsdaten des Patientenkollektivs zur Verfügung standen, die CP44-Genliste als prognostischer Marker jedoch nur mit Hilfe von Überlebensdaten validiert werden kann, wurden die Nachverfolgungsdaten eines öffentlich verfügbaren und online zugänglichen Datensets hinzugezogen.

Dieses Datenset EXT1 entstammt der Arbeit von Van de Vijver et al., „A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer“(3).

Die Arbeitsgruppe nutzte ein Patientenkollektiv mit 295 Brustkrebs-Patientinnen inklusive klinischer, pathologischer und molekulargenetischer Daten, um die prädiktive Aussagekraft ihres zuvor entwickelten 70-Gen-Prognose-Profiles(42) anhand von uni- und multivariabler statistischer Analyse zu evaluieren.

Das Patientengut bestand aus 295 Patientinnen (151x N0, 144x N+, 226x ER+, 69x ER-, 75x

G1, 101x G2, 119x G3). Die durchschnittliche Nachverfolgungszeit lag bei 6,7 Jahren. Die Arbeitsgruppe verwendete ebenfalls die Microarray-Technik von Agilent Technologies mit einem Microarray bestehend aus 24.479 Oligonukleotiden und 1281 Kontrollproben.

Zunächst wurde überprüft, ob sich Gene der CP44-Genliste in den Array-Daten dieser Arbeit wiederfinden würden. Dabei konnten 28 Array-IDs mit 27 einzelnen Genen gefunden werden. Das Gen EXO1 war darunter zweimal erhalten. Tabelle 11 stellt die 28 Gene dar. Daraus wurde eine auf das Datenset EXT1 angepasste Genliste der Genliste CP44 abgeleitet.

Unique Array ID	Gene Symbol
NM_002466	MYBL2
NM_001809	CENPA
NM_003318	TTK
NM_003486	SLC7A5
NM_005030	PLK
NM_004336	BUB1
NM_003686	EXO1
NM_006027	EXO1
NM_004631	LRP8
NM_005409	SCYB11
NM_006143	GPR19
U74612	FOXM1
NM_014312	CTXL
NM_005733	RAB6KIFL
NM_006596	POLQ
NM_014750	KIAA0008
NM_006733	FSHPRH1
NM_014791	KIAA0175
NM_006845	KNSL6
NM_016426	GTSE1
NM_017522	LRP8
NM_016953	PDE11A
NM_018410	DKFZp762E1312
NM_001034	RRM2
Contig40232_RC	SLC7A5
NM_001211	BUB1B
NM_001237	CCNA2
NM_001267	CHAD

Tabelle 11: Liste aus 28 Genen - auf das Datenset EXT1 angepasste Genliste CP44 (unique Array-ID mit Gensymbol)

Zur statistischen Analyse wurde ein Koeffizient *Con44Rang* gebildet. Dazu wurden die logarithmierten Genexpressionswerte der oben genannten 28 Gene für jeden Patienten addiert und ein Mittelwert gebildet. Der jeweilige Mittelwert wurde im Anschluss einem Prozentrang (zwischen 0 und 100) zugeordnet, welcher im Folgenden als Koeffizient *Con44Rang* bezeichnet wird. Wir erhielten einen auf das Datenset von Vijver zugeschnittenen Score, dessen Basis die CP44-Genliste war.

4.5.1 ROC-Kurve

Zunächst wurde die Validität des Koeffizient *Con44Rang* und der Zusammenhang zum Grading anhand einer ROC-Kurve mittels Sensitivität und Spezifität getestet. Dabei wurden nur die Patientenproben mit Grad 1 (n=75) und Grad 3 (n=119) verwendet. Die resultierende Fläche der ROC-Kurve von 0,874 deutete auf eine hohe Güte der Testvariablen bei hoher Signifikanz (p=0,00) hin (siehe Abb. 17).

Fläche	Standardfehler ^a	Asymptotische Signifikanz ^b	Asympt. 95%-Konfidenzintervall
0,874	0,024	0,00	{0,826; 0,922}

a. unter der nichtparametrischen Annahme

b. Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0,5

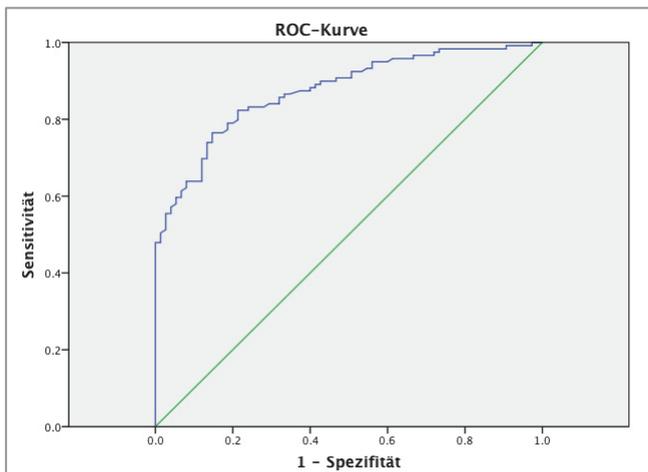


Abb. 17: ROC-Kurve Con44Rang und Grading-Klassen 1 u. 3; y-Achse: Sensitivität; x-Achse: 1-Spezifität

Die Koordinatenwerte dieser ROC-Kurve dienen der Ermittlung eines idealisierten Trennpunktes des Koeffizienten *Con44Rang*, um eine binäre Variable zu erhalten. Für die

weitere Klasseneinteilung wurde der Trennpunkt mit Klasse 1 <51 und Klasse 2 ≥ 51 gewählt. Gemäß der Annahme, dass bei den aggressiven, schnell proliferierenden Tumoren eine hohe Expressionsstärke der Gene der Genliste CP44 aufzufinden war, wurde die Klasse 2 der Variable Con44Rang als Hochrisiko-Faktor definiert. Klasse 1 hingegen stellte einen Niedrig-Risiko-Faktor dar.

4.5.2 Korrelation von Con44Rang zu anerkannten Prognosefaktoren

In einem nächsten Schritt wurde der Score Con44Rang anhand des Patientenkollektivs von Van de Vijver auf seine Validität im Vergleich zu anerkannten kliniko-pathologischen Parametern überprüft. Als statistisches Mittel dienten hier Chi-Quadrat-Tests.

4.5.2.1 Korrelation von Con44Rang zum Alter

Alter	<40 Jahre	40-44 Jahre	45-49 Jahre	≥ 50 Jahre	Gesamt
Con44Rang Kl. 1 Anzahl (%)	33 (44%)	38 (52%)	52 (53%)	27 (55%)	150 (51%)
Con44Rang Kl. 2 Anzahl (%)	42 (56%)	35 (48%)	46 (47%)	22 (45%)	145 (49%)

Signifikanz (Chi-Quadrat nach Pearson): $p = 0,573$

Tabelle 12: Kreuztabelle Con44Rang Klasse 1 und 2; Alter geteilt in 4 Klassen

Das Patientenalter wurde in 4 Klassen unterteilt, mit Klasse 1 <40 Jahren, Klasse 2 40-44 Jahre, Klasse 3 45-49 Jahre, Klasse 4 >50 Jahre. Dabei verteilen sich die vier Altersgruppen relativ einheitlich über die beiden Klassen des Con44Rang-Scores. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und der Variable Con44Rang findet sich nicht ($p=0,573$). Tabelle 12 stellt die Verteilung der vier Altersklassen auf die 2 Klassen des Con44Rang-Scores dar.

4.5.2.2 Korrelation von Con44Rang zum Grading

Grading	G1	G2	G3	Gesamt
Con44Rang Kl 1 Anzahl (%)	61 (81%)	64 (63%)	25 (21%)	150 (51%)
Con44Rang Kl. 2 Anzahl (%)	14 (19%)	37 (37%)	94 (79%)	145 (49%)

Signifikanz (Chi-Quadrat nach Pearson): $p=0,00$

Tabelle 13: Kreuztabelle Grading Klasse G1-3 und Con44Rang

Ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p=0,00$) fällt zwischen den drei Gradingklassen und der Variablen Con44Rang auf.

Mehr als 80% der G1-Tumore finden sich in der Klasse 1 (Con44Rang) und ca. 80% der G3-Tumore in Klasse 2 (Con44Rang) wieder. Die G2-Tumore verteilen sich in 2/3 der Fälle zu Klasse 1 und 1/3 zu Klasse 2 (siehe Tabelle 13).

4.5.2.3 Korrelation Con44Rang zum Lymphknotenbefall

Anzahl befallene Lymphknoten	≥ 4	1-3	0	Gesamt
Con44Rang Kl 1 Anzahl (%)	16 (42%)	53 (50%)	81 (54%)	150 (51%)
Con44Rang Kl. 2 Anzahl (%)	22 (58%)	53 (50%)	70 (46%)	145 (49%)

Signifikanz (Chi-Quadrat nach Pearson): $p=0,435$

Tabelle 14: Kreuztabelle Anzahl befallener Lymphknoten und Con44Rang

Der Lymphknotenbefall wurde in 3 Gruppen eingeteilt:

- kein Lymphknoten befallen entsprechend pN0
- 1-3 Lymphknoten befallen
- ≥ 4 Lymphknoten befallen

Wie in Tabelle 14 dargestellt, verteilten sich die Tumoren ohne befallene Lymphknoten annähernd hälftig in die beiden Klassen 1 und 2. Bei 1-3 befallenen Lymphknoten ist die Verteilung genau 50%:50%. Bei 4 oder mehr befallenen Lymphknoten werden ca. 58% der Klasse 2 und 42% der Klasse 1 zugeordnet. Die Signifikanz-Analyse erbrachte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Lymphknotenbefall und dem Score Con44Rang

(p=0,435).

4.5.2.4 Korrelation Con44Rang zur Tumorgröße

Tumorgröße	≤2cm	>2cm	Gesamt
Con44Rang Kl 1 Anzahl (%)	94 (61%)	56 (40%)	150 (51%)
Con44Rang Kl. 2 Anzahl (%)	61 (39%)	84 (60%)	145 (49%)

Signifikanz (Chi-Quadrat nach Pearson): p=0,00

Tabelle 15: Kreuztabelle Tumorgröße und Con44Rang

Die Tumorgröße wurde in 2 Gruppen eingeteilt: Tumore ≤ 2cm und > 2cm.

60% der kleinen Tumoren wurden der Klasse 1 zugeordnet und 60% der größeren Tumoren wurden Klasse 2 des Score Con44Rang zugeteilt (siehe Tabelle 15).

Die Signifikanz betrug p=0,00 nach Pearson.

4.5.2.5 Korrelation Con44Rang zum Östrogenrezeptor-Status

Östrogenrezeptorstatus	Positiv	negativ	Gesamt
Con44Rang Kl 1 Anzahl (%)	142 (63%)	8 (12%)	150 (51%)
Con44Rang Kl. 2 Anzahl (%)	84 (37%)	61 (88%)	145 (49%)

Signifikanz (Chi-Quadrat nach Pearson): p=0,00

Tabelle 16: Kreuztabelle Östrogenrezeptorstatus und Con44Rang

Mit einer Signifikanz von p=0,00 zeigte sich die Korrelation von Östrogenrezeptorstatus und dem Score Con44Rang. Dabei wurden ca. 63% der Östrogenrezeptor-positiven Tumore der Klasse 1 zugeordnet wie in Tabelle 16 dargestellt. In der Klasse 2 fanden sich 88% der Östrogenrezeptor-negativen Tumore wieder.

4.5.2.6 Korrelation Con44Rang zur 70-Gensignatur

70-Gensignatur	„good“	„poor“	Gesamt
Con44Rang Kl 1 Anzahl (%)	104 (90%)	46 (26%)	150 (51%)
Con44Rang Kl. 2 Anzahl (%)	11 (10%)	134 (74%)	145 (49%)

Signifikanz (Chi-Quadrat nach Pearson): $p=0,00$

Tabelle 17: Kreuztabelle 70-Gensignatur und Con44Rang

In der Korrelations-Analyse zwischen der 70-Gensignatur und dem Score Con44Rang waren mit einer Signifikanz von $p=0,00$ 90% der Tumore der „good prognosis“-Gruppe der Klasse 1 (Con44Rang) zugeteilt. Knapp 75% der „poor prognosis“-Tumoren befanden sich in der Klasse 2. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 17 dargestellt.

4.6 Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeit der Scores Con44sum vs. Sot68sum

Im folgenden Kapitel wird die prognostische Aussagekraft des Scores Con44 mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven am Patientenkollektiv von van de Vijver überprüft.

Zudem erfolgte die Anpassung des *Gene Expression Grade Index* (GGI) von Sotiriou et al. auf das Datenset von van de Vijver(3). Mit dem modifizierten GGI wurden ebenfalls Überlebensanalysen durchgeführt, wodurch ein direkter Vergleich mit unserem Score möglich war.

Von den 97 Genen des GGI waren 68 Gene im Datenset von van de Vijver wiederzufinden. Zur Ermittlung eines Scores für die statistische Analyse wurden die Genexpressionswerte dieser 68 Gene pro Patient addiert unter Berücksichtigung der Richtung (positiv/negativ). Man erhielt einen auf das Datenset angepassten GGI-Score, der im folgenden *Sot68sum* genannt wird.

Ebenso wurde nach dem gleichen Verfahren auf der Basis der CP44-Genliste ein Score *Con44sum* ermittelt.

4.6.1 ROC-Kurve

Mit Hilfe einer ROC-Kurve wurde der Zusammenhang des Gradings und der beiden Scores Con44sum und Sot68sum anhand von Sensitivität und Spezifität dargestellt und verglichen. Dazu wurden nur die Patientenproben mit Grade 1 (n=75) und Grade 3 (n=119) verwendet.

	Fläche	Standardfehler ^a	Asymptotische Signifikanz ^b	Asympt. 95% Konfidenzintervall
Con44sum	0,879	0,024	0,00	{0,832; 0,926}
Sot68sum	0,881	0,025	0,00	{0,832; 0,929}

a. unter der nichtparametrischen Annahme

b. Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0,5

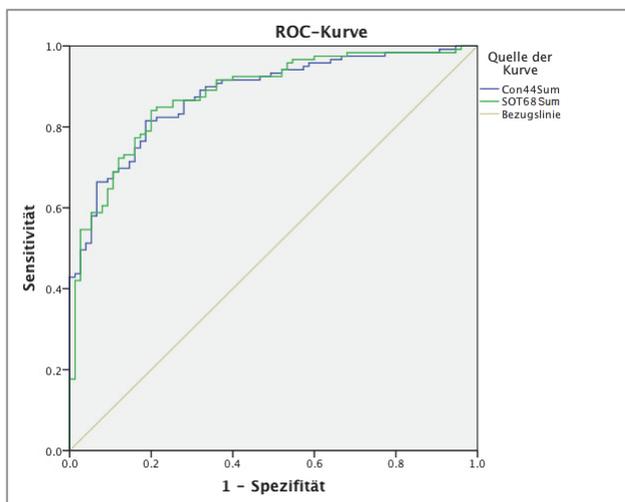


Abbildung 18: ROC-Kurve Con44sum und Sot68sum und Grading-Klassen 1 u. 3; y-Achse: Sensitivität; x-Achse: 1-Spezifität

Sowohl die dargestellte Kurve als auch die angegebene Fläche und Signifikanz (Abbildung 18) geben Hinweise auf einen positiven Zusammenhang der beiden Scores hinsichtlich des Gradings. Mit hoher Signifikanz sind die Werte der Fläche unter der Kurve nahezu identisch. Als nächstes wurde mittels der Koordinaten von Sensitivität und Spezifität das Optimum für die jeweiligen Scores ermittelt, damit eine Einführung einer binären Variablen erfolgen konnte. Der Trennpunkt für Sot68sum wurde auf -3,44 festgesetzt. Die Klasse 0: $< -3,44$ und Klasse 1: $\geq -3,44$ wurde eingeführt. Bei Con44sum wurde der Trennpunkt auf -1 gelegt mit Klasse 0: < -1 und Klasse 1: ≥ -1 . Diese Variablen wurden zur anschließenden statistischen Analyse verwendet.

4.6.2 Gesamtüberleben: Con44sum vs. Sot68sum

4.6.2.1 Allgemeines Überleben

Im Folgenden wurde die prognostische Aussagekraft der beiden Scores Sot68sum und Con44sum für das Gesamtüberleben anhand van de Vijvers Datenset unmittelbar verglichen. Dazu dienten zum Einen Kaplan-Meier-Überlebenskurven, zum Anderen die mittleren Überlebenszeiten in Jahren mit dem 95%-igen Konfidenzintervall.

Der Tod durch die Brustkrebskrankung einer Patientin stellte das zeitlimitierende Kriterium dar. Eine Unterteilung in zwei Klassen erfolgte sowohl bei Con44sum als auch bei Sot68sum wie oben beschrieben.

Die Gesamtkollektiv-Analyse erbrachte nahezu identische Ergebnisse hinsichtlich der mittleren Überlebenszeiten zwischen Con44sum und Sot68sum: 16,38 Jahren in Klasse 0 und 11,31 Jahren in Klasse 1 bei Con44sum gegenüber 16,58 Jahren in Klasse 0 und 11,1 Jahren in Klasse 1 bei Sot68sum.

143 Patientinnen mit 15 Todesfällen durch Brustkrebs wurden der Klasse 0 des Con44-Scores zugeteilt, 136 Patientinnen und 13 Todesfälle der Klasse 0 des Sot68-Scores. Die Klasse 1 bestand bei der Con44-Analyse aus 152 Patientinnen und 64 Todesfällen, bei der Sot68-Analyse aus 159 Patientinnen mit 66 Todesfällen (siehe Tabelle 18: Überlebensanalysen Con44sum und Sot68sum). Abbildung 19 zeigt die Gesamtüberlebenskurven für Con44sum und Sot68sum.

Con44sum	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall
0	143	15	16,38	0,48	{15,43; 17,33}
1	152	64	11,31	0,63	{10,06; 12,55}
Gesamt	259	79	13,82	0,44	{12,9; 14,7}
Sot68sum	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall
0	136	13	16,58	0,47	{15,56; 17,50}
1	159	66	11,1	0,6	{9,93; 12,27}

Gesamt	259	79	13,82	0,44	{12,9; 14,7}
--------	-----	----	-------	------	--------------

Tabelle 18: Gesamt-Überlebensanalysen Con44sum vs. Sot68sum, jeweils unterteilt in die Klassen 0 und 1 mit Anzahl, Todesfällen und mittlerem Überleben in Jahren, Standardfehler, 95-%Konfidenzintervall, Signifikanzen jeweils für Con44sum und Sot68sum; $p=0,00$

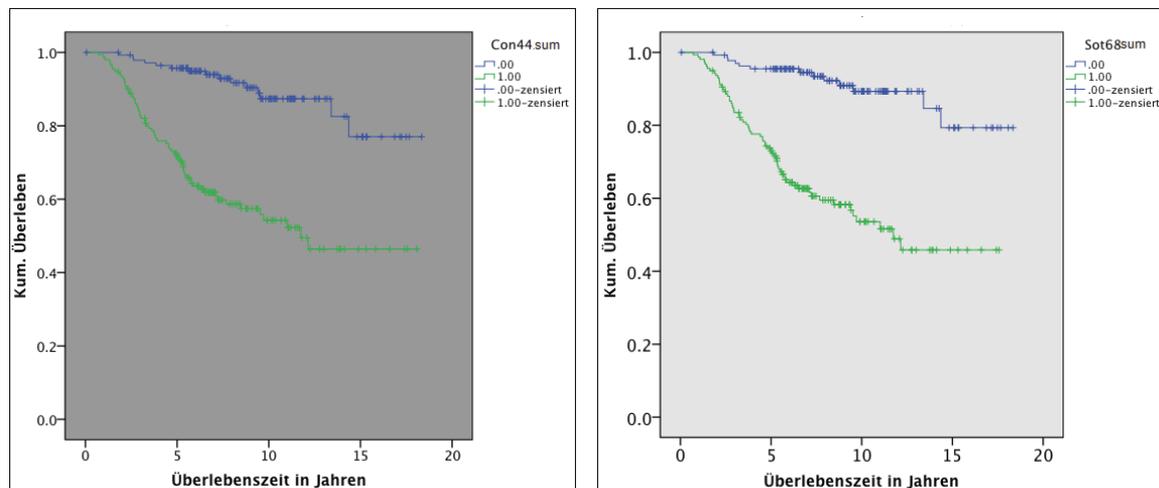


Abb. 19: Gesamt-Überlebenskurven für Con44sum vs. Sot68sum; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Überlebenszeit in Jahren; Überlebenskurve Klasse 0 blau markiert, Überlebenskurve Klasse 1 grün markiert

4.6.2.2 Überlebenszeit geschichtet auf 3 Grading-Klassen

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich die Vorhersagekraft der Scores bei Anwendung auf die drei verschiedenen Grading-Klassen verhält. Dazu wurden Überlebensanalysen für jedes Grading durchgeführt. Es erfolgte auch die Einteilung in die 2 Klassen der Scores, um herauszufinden, ob hierdurch eine Unterscheidung im Überleben existierte.

Dabei sind zum direkten Vergleich der Vorhersagekraft die Ergebnisse der beiden Scores Con44sum und Sot68sum aufgelistet.

GRAD 1:

Die Überlebensanalyse der Patientinnen mit G1-Stadium ergab bei beiden Scores identische Ergebnisse. Es zeigt sich, dass der Con44sum-Score die gleiche Aussagekraft hinsichtlich des mittleren Überleben nach Brustkrebs im G1-Stadium hat wie der GGI von Sotiriou bei einer Signifikanz von $p=0,022$. Der Klasse 0 wurden jeweils 60 Patientinnen zugeteilt, die Anzahl der Todesfälle durch Brustkrebs betrug 2, das mittlere Überleben lag bei 15,45 Jahren. Klasse 1 bestand aus jeweils 15 Patientinnen, von denen 2 einen Tod durch Brustkrebs

erlitten, das mittlere Überleben betrug 12,42 Jahre (Tabelle 19). Es zeigte sich jedoch anhand der Überlebenskurven (Abb. 20), dass im G1-Stadium eine gültige Vorhersagekraft nur bis 10 Jahre nach Brustkrebs-Erkrankung besteht, ab >10 Jahre in Klasse 0 nimmt das kumulative Überleben rapide ab.

Con44sum	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
0	60	2	15,45	0,42	{14,63; 16,27}	
1	15	2	12,42	0,95	{10,56; 14,28}	
Gesamt	75	4	15,15	0,45	{14,27; 16,04}	0,022
Sot68sum	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
0	60	2	15,45	0,42	{14,63; 16,27}	
1	15	2	12,42	0,95	{10,56; 14,28}	
Gesamt	75	4	15,15	0,45	{14,27; 16,04}	0,022

Tabelle 19: Überlebensanalyse der Patienten mit G1-Tumoren: Con44sum vs. Sot68sum

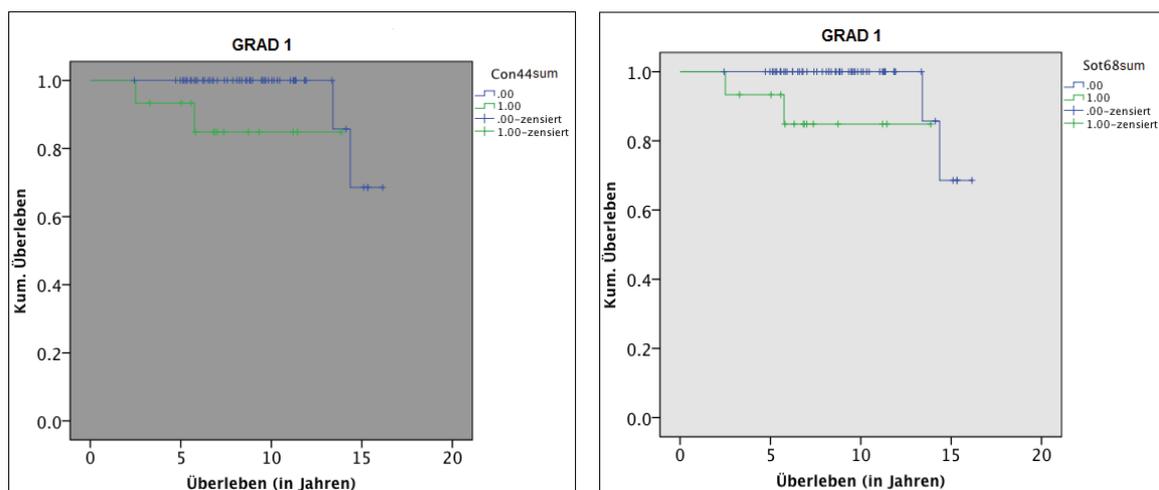


Abb. 20: Überlebenskurven der G1-Tumore: Con44sum vs. Sot68sum; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Überlebenszeit in Jahren; Überlebenskurve Klasse 0 blau markiert, Überlebenskurve Klasse 1 grün markiert

GRAD 2:

Auch in der Analyse der G2-Patientinnen ergaben sich sehr ähnliche Ergebnisse. Durch Con44sum wurden 61 Patientinnen in Klasse 0 und 40 in Klasse 1 eingeteilt, bei Sot68sum waren es 55 in Klasse 0 und 46 in Klasse 1. Die Verteilung der Todesfälle in den jeweiligen

Klassen war nahezu identisch, ebenso wie das mittlere Überleben in Jahren. Die Patientinnen in Klasse 0 von Sot68sum lebten im Mittel 0,67 Jahre länger, in Klasse 1 0,14 Jahre kürzer (siehe Tabelle 20 und Abbildung 21).

Con44sum	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
0	61	5	16,28	0,51	{15,28; 17,29}	
1	40	19	10,71	1,16	{8,44; 13,00}	
Gesamt	101	24	14,27	0,68	{12,94; 15,60}	0,00
Sot68sum	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
0	55	4	16,95	0,54	{15,88; 18,01}	
1	46	20	10,57	0,96	{8,62; 12,46}	
Gesamt	101	24	14,27	0,68	{12,94; 15,60}	0,00

Tabelle 20: Überlebensanalyse der Patienten mit G2-Tumoren: Con44sum vs. Sot68sum

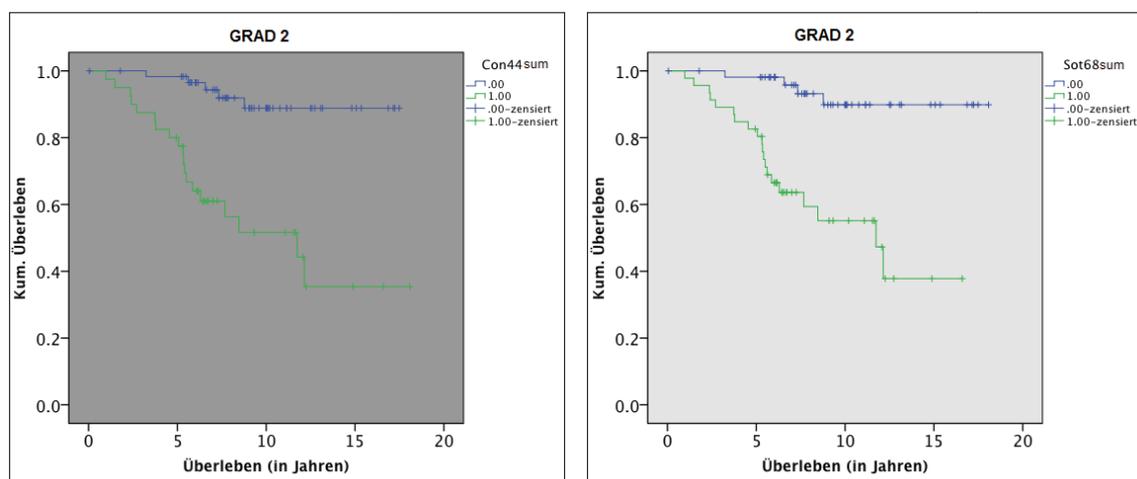


Abb 21: Überlebenskurven der G2-Tumore: Con44sum vs. Sot68sum; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Überleben in Jahren; Überlebenskurve Klasse 0 blau markiert, Überlebenskurve Klasse 1 grün markiert

GRAD 3:

Die Analyse der G3-Patientinnen zeigte ebenfalls auffällig ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Zuteilung in die Klassen 0 und 1, der Anzahl der Todesfälle und des mittleren Überlebens in Jahren, wie in Tabelle 21 und Abbildung 22 dargestellt. Jedoch ist nach Log Rank Test

keine Signifikanz gegeben (Con44sum: $p=0,305$; Sot68sum: $p=0,209$).

Con44sum	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
0	22	8	13,04	1,48	{10,14; 15,93}	
1	97	43	10,75	0,77	{9,26; 12,25}	
Gesamt	119	51	11,46	0,71	{10,06; 12,86}	0,305
Sot68sum	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
0	21	7	13,42	1,52	{10,44; 16,40}	
1	98	44	10,63	0,76	{9,14; 12,12}	
Gesamt	119	51	11,46	0,71	{10,06; 12,86}	0,209

Tabelle 21: Überlebensanalyse der Patienten mit G3-Tumoren: Con44sum vs. Sot68sum

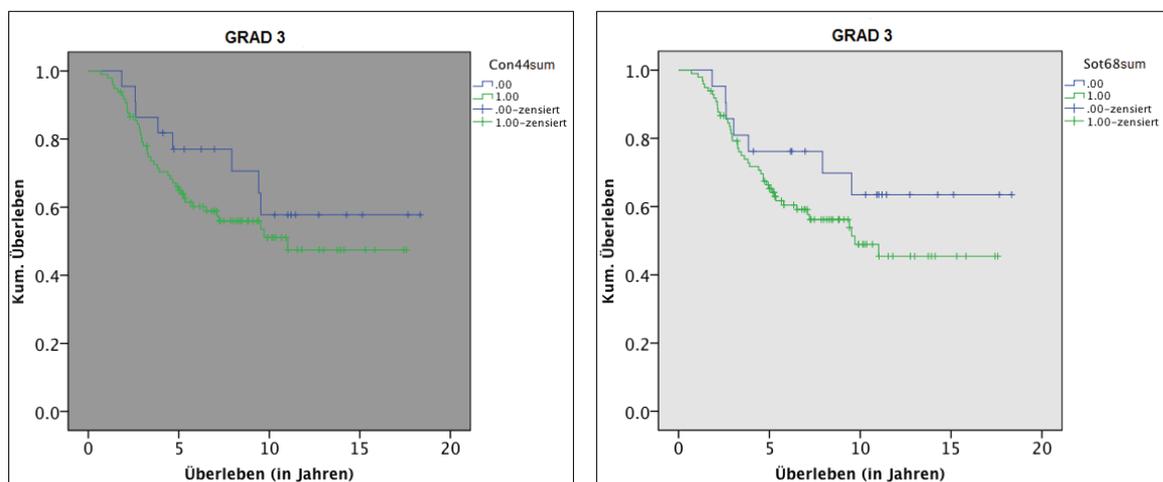


Abb. 22: Überlebenskurven der G3-Tumore: Con44sum vs. Sot68sum; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Überleben in Jahren; Überlebenskurve Klasse 0 blau markiert, Überlebenskurve Klasse 1 grün markiert

4.7 Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Scores Con44 vs. 70GeneScore

4.7.1 Gesamtüberleben: Con44 vs. 70GeneScore

Im folgenden Kapitel wurde die prognostische Vorhersagekraft des Scores Con44 mit der 70-Gensignatur von van de Vijver verglichen. Dazu wurden ebenfalls Kaplan-Meier-Überlebenskurven erstellt und mit denen des 70GeneScore verglichen. Ebenfalls galt der Tod durch die Brustkrebserkrankung als zeitlimitierendes Kriterium.

Für diese Analyse wurde der Koeffizient Con44Rang verwendet, dessen Ermittlung bereits in Kapitel 3.5. und 3.5.1 beschrieben wurde. Zur Ermittlung des 70GeneScore wurden pro Patient die Genexpressionswerte der 70 Gene der Signatur von van de Vijver addiert und der Mittelwert gebildet. Eine Unterteilung in zwei Risikogruppen erfolgte sowohl bei Con44Rang (Klasse 1 und 2) als auch bei der 70-Gensignatur („good prognosis“ und „poor prognosis“). Zum Vergleich der zwei Scores dienten die mittleren Überlebenszeiten in Jahren sowie der Standardfehler und das 95%-Konfidenzintervall.

4.7.1.1 Allgemeines Überleben

Bei Con44Rang lag die mittlere Überlebenszeit in der Gruppe 1 bei 16,25 Jahren, in der Gruppe 2 bei 10,87 Jahren. Der 70GeneScore erzielte eine mittlere Überlebenszeit in der „good prognosis“-Gruppe von 17,01 Jahren und in der „poor prognosis“-Gruppe von 11,56 Jahren.

Die mittleren Überlebenswerte differierten um 0,76 Jahre in der Niedrigrisiko- (Kl.1) und „good prognosis“-Gruppe, um 0,69 Jahre in der Hochrisiko- (Kl.2) / „poor prognosis“-Gruppe. Die Signifikanz nach Log Rang Test betrug in beiden Analysen $p=0,00$ (siehe Tabelle 22, Abbildung 23).

Con44Rang	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahren)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
1	150	17	16,25	0,48	{15,3; 17,2}	
2	145	62	10,87	0,62	{9,7; 12,1}	
Gesamt	295	79	13,82	0,44	{12,9; 14,7}	0,00
70GeneScore	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahren)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
good	115	7	17,01	0,51	{16; 18}	
poor	180	72	11,56	0,58	{10,4; 12,7}	
Gesamt	295	79	13,82	0,44	{12,9; 14,7}	0,00

Tabelle 22: Gesamt-Überlebensanalysen Con44Rang vs. 70GeneScore, jeweils unterteilt in die Klassen 1 und 2, bzw. „good“ und „poor“ mit Anzahl, Todesfällen und mittlerem Überleben in Jahren, Standardfehler, 95-%Konfidenzintervall

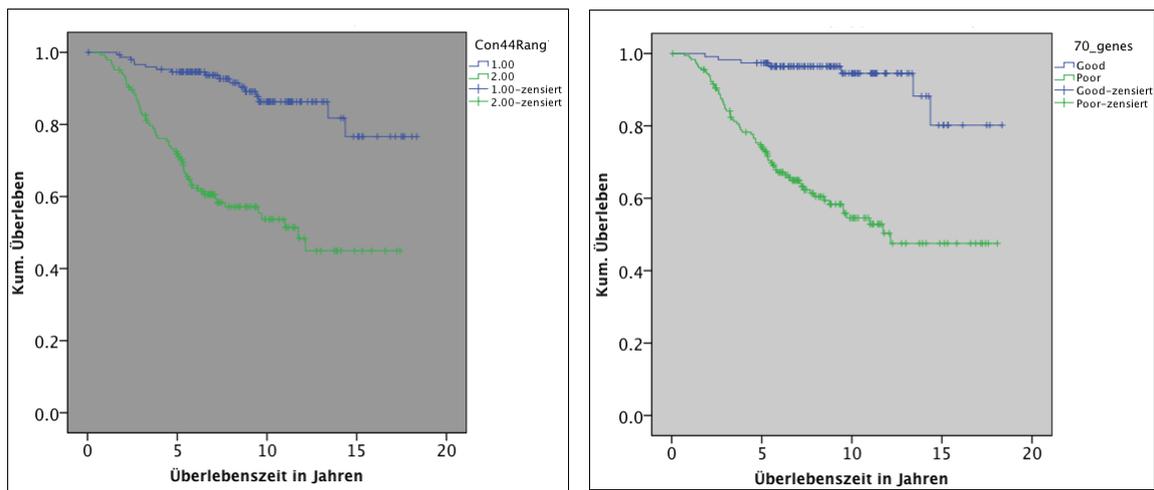


Abb. 23: Gesamt-Überlebenskurven für Con44Rang vs 70GeneScore; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Überlebenszeit in Jahren; Überlebenskurve Klasse 1 bzw. „good“ blau markiert, Überlebenskurve Klasse 2 bzw. „poor“ grün markiert

4.7.1.2 Überlebenszeit getrennt für die drei Grading-Klassen

Desweiteren wurde untersucht, wie sich die Vorhersagekraft des Scores bei Aufteilung des Patientenkollektivs in die drei verschiedenen Grading-Klassen verhält. Dazu wurden Überlebensanalysen für jede Grading-Klasse durchgeführt. Es erfolgte ebenfalls die Einteilung in die zwei Klassen der Scores, um zu ermitteln, ob hierdurch auch eine Unterscheidung hinsichtlich der Überlebenszeit besteht.

Zusätzlich sind zum direkten Vergleich der Vorhersagekraft die Ergebnisse der Analyse des 70-Gene-Score aufgelistet.

GRAD 1

Im Kollektiv der G1-Patientinnen ordnet der Score Con44Rang 61 Patientinnen der Klasse 1 zu, darunter finden sich im Verlauf 2 Todesfälle. Die mittlere Überlebenszeit beträgt hier 15,45 Jahre. 14 Patientinnen werden in Klasse 2 eingeteilt und darunter befinden sich ebenfalls im Laufe der Zeit 2 Todesfälle, das mittlere Überleben belief sich auf 12,3 Jahre. Die Signifikanz der Analyse liegt bei $p=0,017$.

Der 70GeneScore teilt 56 Patientinnen in die „good prognosis“-Gruppe, es finden sich

ebenfalls 2 Todesfälle durch Brustkrebs. Die mittlere Überlebenszeit liegt hier bei 15,49 Jahren.

In der „poor prognosis“-Gruppe befinden sich 19 Patientinnen mit 2 Todesfällen, das mittlere Überleben beträgt 10,53 Jahre. Die Signifikanz beträgt $p=0,01$ (siehe Tabelle 23 und Abb.24).

Con44Rang	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahren)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
1	61	2	15,45	0,42	{14,63; 16,27}	
2	14	2	12,3	1,02	{10,3; 14,3}	
Gesamt	75	4	15,15	0,45	{14,27; 16,04}	0,017
70GeneScore	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
good	56	2	15,49	0,4	{14,7; 16,27}	
poor	19	2	10,53	0,61	{9,34; 11,72}	
Gesamt	75	4	15,15	0,45	{14,27; 16,04}	0,01

Tabelle 23: Überlebensanalyse der Patienten mit G1-Tumoren: Con44Rang vs. 70GeneScore

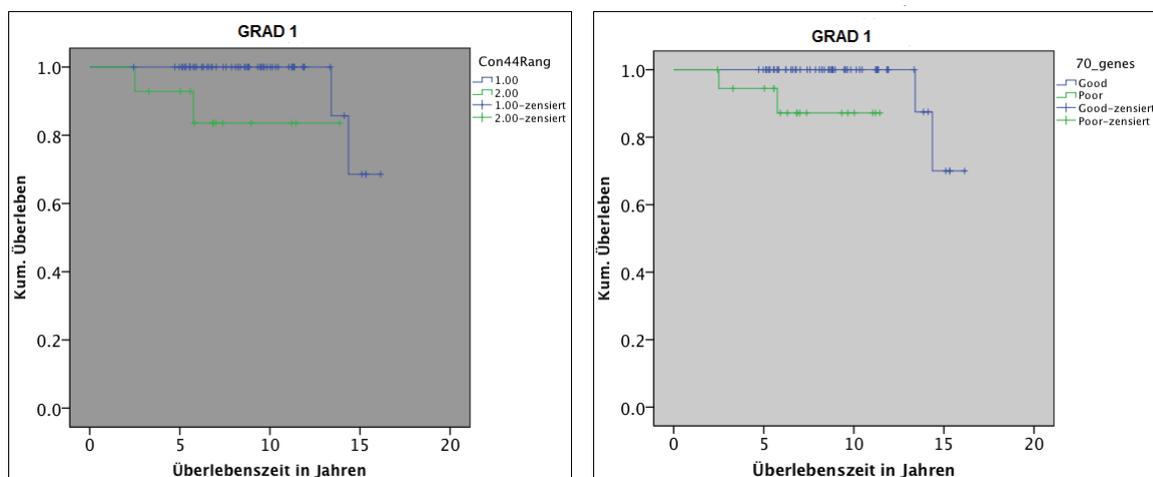


Abb. 24: Überlebenskurven der G1-Tumore: Con44Rang vs. 70GeneScore; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Überlebenszeit in Jahren; Überlebenskurve Klasse 1 bzw. „good“ blau markiert, Überlebenskurve Klasse 2 bzw. „poor“ grün markiert

GRAD 2

Die Überlebensanalyse des G2-Kollektivs erbrachte eine auffällige Unterscheidung hinsichtlich der Überlebensjahre nach Zuteilung in Klasse 1 und 2 von Con44Rang. 64

Patientinnen mit 6 Todesfällen wurden der Klasse 1 zugeordnet, das mittlere Überleben betrug 16,58 Jahre. In der Klasse 2 waren 37 Patientinnen mit 18 Todesfällen, die mittlere Überlebenszeit war 10,18 Jahre. Graphisch mittels Kaplan-Meier-Kurve (Abb.25) dargestellt. Die Patientinnen der Klasse 1 (Score Con44Rang) wiesen eine ähnliche Lebenserwartung auf wie G1-Tumorpatientinnen. Wohingegen Klasse 2 des Scores Con44Rang eine ähnliche Lebenserwartung wie bei G3-Tumoren bedeutete. Hieraus zeigt sich ein entscheidender Nutzen des Scores Con44Rang: diese zusätzlichen Informationen hinsichtlich der Tumoraggressivität können einen Einfluss auf den einzuschlagenden Therapieweg darstellen. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch die Analyse der 70-Gensignatur: unter 45 Patientinnen der „good prognosis“-Gruppe befindet sich ein Todesfall, die mittlere Überlebenszeit betrug 17,2 Jahre. Von den 56 Patientinnen der „poor prognosis“-Gruppe verstarben 23 im Verlauf, die mittlere Überlebenszeit lag bei 11,62 Jahren. Die Signifikanz nach Log Rank betrug bei beiden Signaturen $p=0,00$ (siehe Tabelle 24).

Con44Rang	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
1	64	6	16,58	0,58	{15,45; 17,71}	
2	37	18	10,18	1,12	{7,99; 12,38}	
Gesamt	101	24	14,27	0,68	{12,94; 15,60}	0,00
70GeneScore	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
good	45	1	17,2	0,28	{16,64; 17,76}	
poor	56	23	11,62	0,98	{9,70; 13,55}	
Gesamt	101	24	14,27	0,68	{12,94; 15,60}	0,00

Tabelle 24: Überlebensanalyse der Patienten mit G2-Tumoren: Con44Rang vs. 70GeneScore

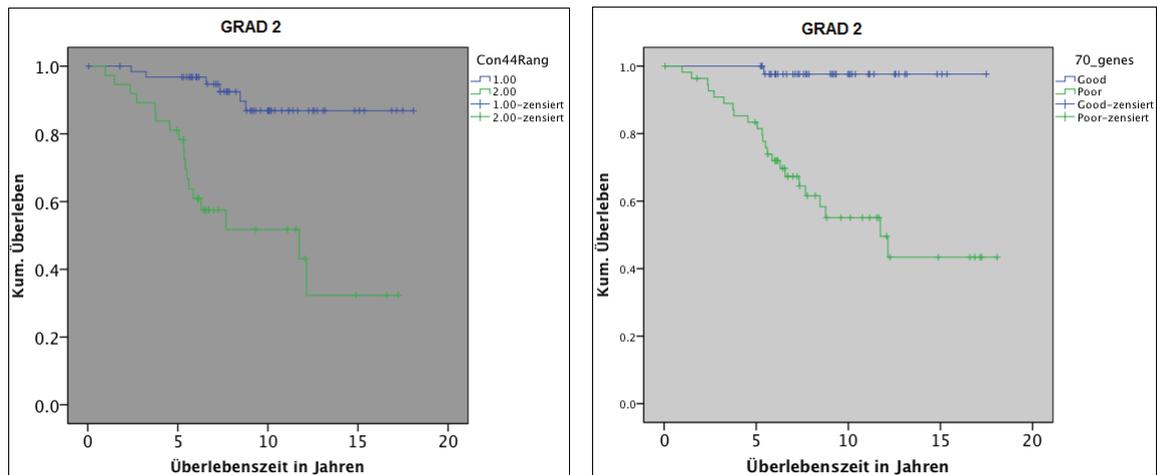


Abbildung 25: Überlebenskurven der G2-Tumore: Con44Rang vs. 70GeneScore; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Überlebenszeit in Jahren; Überlebenskurve Klasse 1 bzw. good blau markiert, Überlebenskurve Klasse 2 bzw. poor grün markiert

GRAD 3

Im Kollektiv der G3-Patientinnen ergab die Analyse folgende Ergebnisse: 9 der 25 Patientinnen der Klasse 1 des Scores Con44Rang verstarben an Brustkrebs, ihr mittleres Überleben lag bei 12,96 Jahren. Unter den 94 Patientinnen der Klasse 2 fanden sich 42 Todesfälle, die mittlere Überlebenszeit war 10,62 Jahre. Bei 14 Patientinnen der „good prognosis“-Gruppe der 70-Gensignatur fanden sich 14 Todesfälle, bei einer mittleren Überlebenszeit von 14,13 Jahren. 47 von 105 Patientinnen der „poor prognosis“-Gruppe verstarben an ihrer Krankheit, das mittlere Überleben belief sich auf 10,71 Jahre (siehe Tabelle 25 und Abb. 26).

Auch in diesem Patientenkollektiv beweist der Score Con44 eine ähnliche Vorhersagekraft wie die 70-Gensignatur.

Con44Rang	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
1	25	9	12,96	1,42	{10,17; 15,74}	
2	94	42	10,62	0,77	{9,12; 12,13}	
Gesamt	119	51	11,46	0,71	{10,06; 12,86}	0,29
70GeneScore	Anzahl	Todesfälle	Mittleres Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
good	14	4	14,13	1,79	{10,62; 17,63}	
poor	105	47	10,71	0,73	{9,28; 12,13}	
Gesamt	119	51	11,46	0,71	{10,06; 12,86}	0,195

Tabelle 25: Überlebensanalyse der Patienten mit G3-Tumoren: Con44Rang vs. 70GeneScore

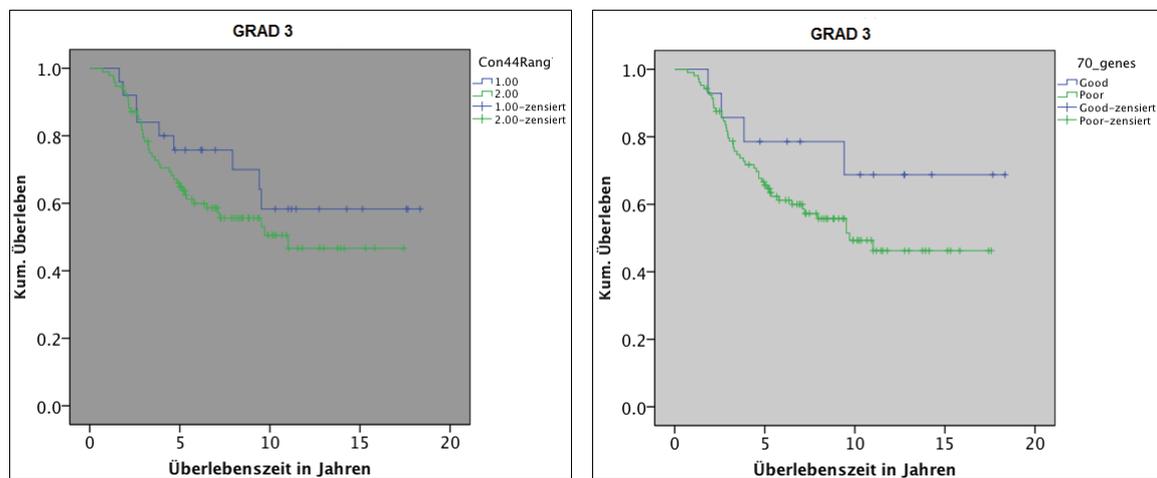


Abbildung 26: Überlebenskurven der G3-Tumore: Con44Rang vs. 70GeneScore; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Überlebenszeit in Jahren; Überlebenskurve Klasse 1 bzw. „good“ blau markiert, Überlebenskurve Klasse 2 bzw. „poor“ grün markiert

4.8 Vergleich des Krankheitsfreien Überlebens der Scores Con44 und 70GeneScore

Das folgende Kapitel beinhaltet die Überlebensanalysen der Scores Con44Rang und 70GeneScore bezüglich des krankheitsfreien Überlebens. Zeitlimitierender Faktor stellt ein Ereignis dar, dass ein Wiederauftreten bzw. Fortschreiten der primären Brustkrebs-Erkrankung beschreibt: ein Rezidiv, Metastase(n) oder Tod durch Brustkrebs.

Zunächst erfolgte ebenfalls die Analyse des allgemeinen Überlebens, gefolgt von der Analyse mit Unterteilung des Patientenkollektivs in die drei Grading-Klassen.

Zum Vergleich der beiden Scores dienten die mittleren Überlebenszeiten in Jahren, angegeben als Mittelwert sowie der Standardfehler und das 95%-Konfidenzintervall. Bildlich wurde dieser Vergleich durch Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt.

4.8.1 Allgemeines Krankheitsfreies Überleben

In der Analyse der Variable Con44Rang wurden 150 Patientinnen der Klasse 1 zugeteilt, unter ihnen trat in 39 Fällen ein Krankheitsereignis auf. Das mittlere Krankheitsfreie Überleben lag bei 13,97 Jahren mit einem 95%-igen Konfidenzintervall {12,81;15,13}. Eine ähnlich große Gruppe (145 Patientinnen) wurde in Klasse 2 eingeteilt mit 79 aufgetretenen Ereignissen, das Krankheitsfreie Überleben lag deutlich niedriger bei 9,02 Jahren, 95%-KI {7,79;10,25}.

Die Analyse mithilfe des 70GeneScores zeigte eine Zuteilung von ca. 1/3 der Patienten (n=115) in die „*good prognosis*“-Gruppe und 2/3 (n=180) in die „*poor prognosis*“-Gruppe. Dies resultierte in eine geringere Anzahl Brustkrebs-assoziiertes Ereignisse in der „*good prognosis*“-Gruppe mit einem verlängerten Krankheitsfreien Intervall von 15,35 Jahren (95%-iges KI {14,18;16,52}). In der „*poor prognosis*“-Gruppe traten 98 Ereignisse auf, das mittlere Krankheitsfreie Überleben lag bei 9,24 Jahren, 95%-iges KI {8,09;10,39}. Die Signifikanz nach Log-Rank-Test betrug in beiden Analysen $p=0,00$ (siehe Tabelle 26 und Abbildung 27).

Con44Rang	Anzahl	Ereignisse	Krankheitsfreies Überleben(Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
1	150	39	13,97	0,59	{12,81; 15,13}	
2	145	79	9,02	0,63	{7,79; 10,25}	
Gesamt	295	118	11,67	0,47	{10,75; 12,59}	0,00
70GeneScore	Anzahl	Ereignisse	Krankheitsfreies Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
good	115	20	15,35	0,59	{14,18; 16,52}	
poor	180	98	9,24	0,59	{8,09; 10,39}	
Gesamt	295	118	11,67	0,47	{10,75; 12,59}	0,00

Tabelle 26: Gesamt-Analysen Krankheitsfreies ÜberlebenCon44Rang vs. 70GeneScore, jeweils unterteilt in die Klassen 1 und 2, bzw. good und poor mit Anzahl, Rezidiv-Ereignissen und mittlerem Krankheitsfreiem Überleben in Jahren, Standardfehler, 95-%Konfidenzintervall

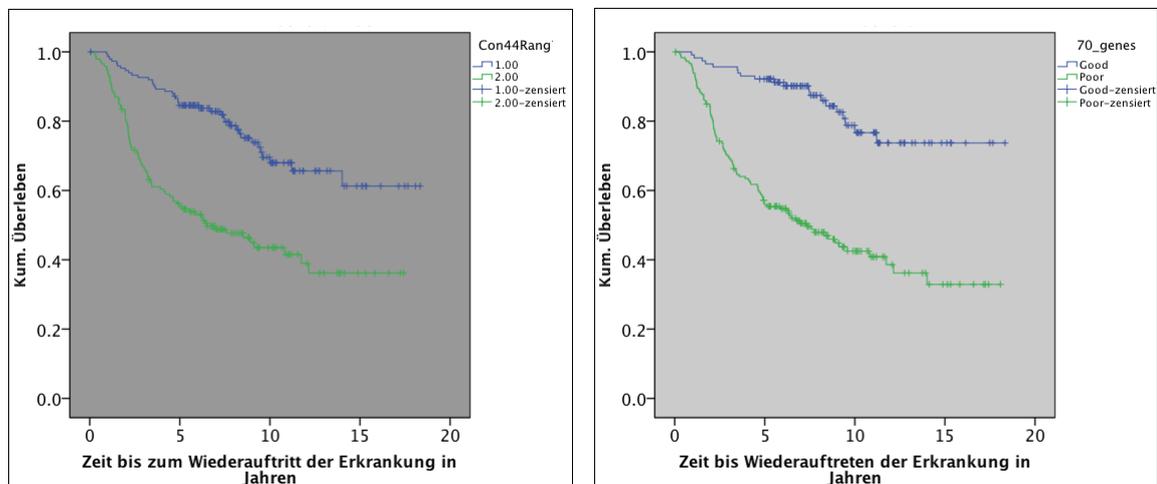


Abbildung 27: Gesamt-Überlebenskurven für Krankheitsfreies Überleben Con44Rang vs. 70GeneScore; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs in Jahren; Überlebenskurven Klasse 1 bzw. „good“ blau markiert, Überlebenskurven Klasse 2 bzw. „poor“ grün markiert

4.8.2 Krankheitsfreies Überleben, geschichtet auf die 3 Grading-Klassen

Hier erfolgte ebenfalls die Unterteilung des Patientenkollektivs in die drei Grading-Klassen. Analog zu Kapitel 3.7.2.1 wurden Überlebensanalysen für jede Grading-Klasse unternommen, mit jeweiliger Unterscheidung in die 2 Klassen der Scores, sowohl für Con44Rang als auch für den 70GeneScore.

GRAD 1

Die Verteilung der Patientinnen mit G1-Stadium in die 2 Klassen der jeweiligen Scores zeigt hier sehr große Ähnlichkeiten, 61 Patientinnen in Klasse 1 von Con44Rang und 14 Patientinnen in Klasse 2, es traten jeweils 7 Ereignisse auf. Die 70GeneScore-Analyse teilte 56 Patientinnen in die Klasse „good prognosis“ und 19 in die Klasse „poor prognosis“, es traten ebenfalls jeweils 7 Brustkrebs-assoziierte Ereignisse auf. Diese Ähnlichkeit in der Performance zeigt sich somit auch in den mittleren Krankheitsfreien Überlebenszeiten mit 14,44 Jahren in Klasse 1 und 14,35 Jahren in Klasse „good prognosis“, sowie 8,39 Jahren in Klasse 2 und 8,13 Jahren in Klasse „poor prognosis“, dargestellt in Tabelle 27 und Abb.28). Die Signifikanz betrug $p=0,00$ in der Con44Rang-Analyse und $p=0,002$ in der 70GeneScore-Analyse.

Con44Rang	Anzahl	Ereignisse	Krankheitsfreies Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
1	61	7	14,44	0,59	{13,29; 15,59}	
2	14	7	8,39	1,46	{5,53; 11,25}	
Gesamt	75	14	13,46	0,63	{12,24; 14,72}	0,00
70GeneScore	Anzahl	Ereignisse	Krankheitsfreies Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
good	56	7	14,35	0,62	{13,1; 15,56}	
poor	19	7	8,13	0,92	{6,34; 9,92}	
Gesamt	75	14	13,46	0,63	{12,24; 14,72}	0,002

Tabelle 27: Analyse des Krankheitsfreien Überleben der Patienten mit G1-Tumore: Con44Rang vs. 70GeneScore

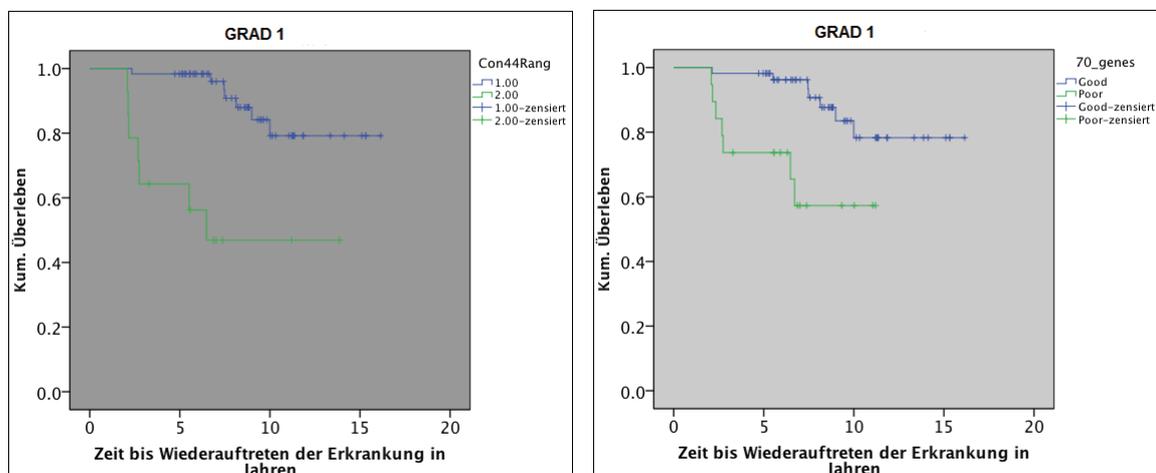


Abbildung 28: Krankheitsfreie Überlebenskurven der G1-Tumore: Con44Rang vs. 70GeneScore; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs in Jahren; Überlebenskurven Klasse 1 bzw. „good“ blau markiert, Überlebenskurven Klasse 2 bzw. „poor“ grün markiert

GRAD 2:

Die Ergebnisse der Analyse zu Grad 2 sind in der nachfolgenden Tabelle 28 und Abb. 29 dargestellt. Das krankheitsfreie Überleben in Klasse 1 und „good prognosis“ unterscheidet sich um 1,23 Jahre, in Klasse 2 und „poor prognosis“ um 0,44 Jahre.

Der Score Con44Rang teilt 64 Patientinnen in Klasse 1, unter denen 6 Ereignisse auftreten, hingegen befinden sich in der „good prognosis“-Gruppe lediglich 45 Patientinnen mit einem Ereignis. Daraus resultiert ein leicht verlängertes Krankheitsfreies Überleben in der „good prognosis“-Gruppe. In der Klasse 2 des Con44Rang treten bei 18 der 37 Patientinnen ein Brustkrebs-assoziiertes Ereignis auf, während anhand der 70-Gensignatur 56 Patientinnen mit 23 Ereignissen in die „poor prognosis“-Gruppe eingeteilt werden. Das Überleben ist auch in letzter Gruppe leicht verlängert. Die Signifikanz betrug in beiden Analysen $p=0,00$.

Con44Rang	Anzahl	Ereignisse	Krankheitsfreies Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
1	64	6	13,24	0,89	{11,49; 14,99}	
2	37	18	8,29	1,1	{6,13; 10,45}	
Gesamt	101	24	11,42	0,76	{9,96; 12,89}	0,00
70GeneScore	Anzahl	Ereignisse	Krankheitsfreies Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
good	45	1	14,47	0,93	{12,65; 16,30}	
poor	56	23	8,73	0,95	{6,87; 10,59}	
Gesamt	101	24	11,42	0,76	{9,96; 12,89}	0,00

Tabelle 28: Analyse des Krankheitsfreien Überleben der Patienten mit G2-Tumoren: Con44Rang vs. 70GeneScore

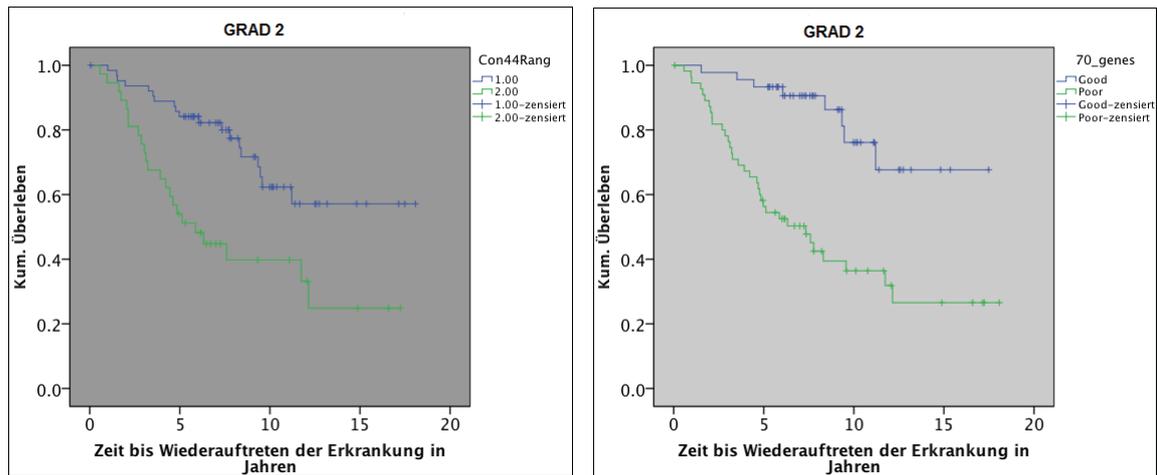


Abbildung 29: : Krankheitsfreie Überlebenskurven der G2-Tumore: Con44Rang vs. 70GeneScore; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs in Jahren; Überlebenskurven Klasse 1 bzw. „good“ blau markiert, Überlebenskurven Klasse 2 bzw. „poor“ grün markiert

GRAD 3:

25 Patientinnen wurden der Klasse 1 der Con44Rang-Variable zugeteilt, unter ihnen traten 9 Ereignisse auf, das mittlere Krankheitsfreie Überleben lag bei 10,51 Jahren mit einem 95%-igen KI {7,53; 13,48}. In Klasse 2 traten 42 Ereignisse unter 94 Patientinnen auf, das Überleben lag bei 9,26 Jahren, 95%-iges KI {7,69; 10,83}.

Mithilfe der 70GeneScore-Variable wurden 14 Patientinnen der Klasse „good prognosis“ zugeteilt, unter denen 4 Ereignisse auftraten. Die Zeit bis zum Auftreten lag bei 12,57 Jahren (95%-iges KI {8,49; 16,64}). Nach 8,95 Jahren (95%-iges KI {7,49; 10,42}) traten bei 47 der 105 Patientinnen in der Klasse „poor prognosis“ ein Brustkrebs-assoziiertes Ereignis auf (siehe Tabelle 29 und Abb.30). Eine Signifikanz war in beiden Analysen nicht gegeben.

Con44Rang	Anzahl	Ereignisse	Krankheitsfreies Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
1	25	9	10,51	1,52	{7,53; 13,48}	
2	94	42	9,26	0,79	{7,69; 10,83}	
Gesamt	119	51	9,77	0,75	{8,3; 11,23}	0,608
70GeneScore	Anzahl	Ereignisse	Krankheitsfreies Überleben (Jahre)	Standardfehler	95%-KI	Signifikanz (p)
good	14	4	12,57	2,08	{8,49; 16,64}	
poor	105	47	8,95	0,75	{7,49; 10,42}	
Gesamt	119	51	9,77	0,75	{8,3; 11,23}	0,185

Tabelle 29: Analyse des Krankheitsfreien Überleben der Patienten mit G3-Tumore: Con44Rang vs. 70GeneScore

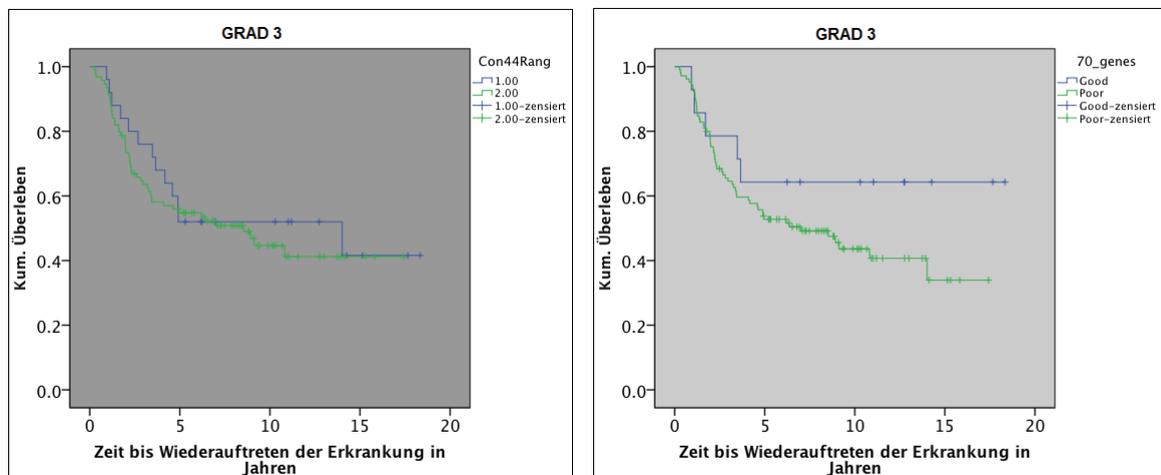


Abbildung 30: Krankheitsfreie Überlebenskurven der G3-Tumore: Con44Rang vs. 70GeneScore; y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse: Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs in Jahren; Überlebenskurven Klasse 1 bzw. „good“ blau markiert, Überlebenskurven Klasse 2 bzw. „poor“ grün markiert

4.9 Die CP44-Genliste in der Überlebensanalyse an weiteren Datensets

4.9.1 Anwendung der Genliste CP44 auf das Testset GSE 1456

Zur zusätzlichen Validierung der Genliste CP44 wurde ein weiteres öffentlich zugängliches Datenset, GSE 1456, hinzugezogen. Es entstammt der Arbeit von Pawitan et al., „*A gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts.*“ (43) Das Patientenkollektiv bestand aus 159 Patientinnen mit primärem Brustkrebs. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels der Affymetrix Technologie (Chip U133, A (3393 *probe sets*) und B (3180 *probe sets*)). Von den 44 Genen der CP44-Genliste waren 35 Gene mit 53 Gensonden auf Genchip U133A+B zu finden. Mit Hilfe der auf dieses Datenset angewandten CP44-Genliste konnte das Grading auf molekulargenetischer Ebene in die *Molecular Grade Classes* 1-3 eingeteilt werden, wobei die Klasse 2 zusätzlich noch in eine prognostisch günstige Untergruppe 2A und eine prognostisch ungünstige Gruppe 2B durch Anwendung der Genliste CP44 eingeteilt wurde (siehe Tabelle 30).

Die anschließende Überlebensanalyse stellt die Unterschiede in den Überlebensjahren anhand der Abbildung 31 dar. Das Auftreten eines Rezidivs der Brustkrebserkrankung galt hier als Zeitlimitierendes Kriterium. Dabei sind vor allem die Unterschiede der Rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit der Gruppe 2A im Vergleich zu 2B auffällig. Die Gruppe Grade 2A weist ein ähnliches Überleben wie Grade 1 auf, während die Untergruppe Grade 2B ein deutlich schlechteres Überleben liefert, ähnlich dem von Grade 3. Die Signifikanz der Rezidivfreien Überlebensanalyse nach LogRank (Mantel Cox) betrug 0,001 (siehe Tabelle 30).

Molecular Grade	Gesamtzahl	Anzahl Rezidiv n (%)	Anzahl kein Rezidiv n (%)	Signifikanz (p)
Grade 1	28	4 (14%)	24 (86%)	
Grade 2A	35	5 (14%)	30 (86%)	
Grade 2B	23	12 (52%)	11 (48%)	
Grade 3	61	24 (39%)	37 (61%)	
Gesamt	147	45 (30%)	102 (70%)	0,001

Tabelle 30: Überlebensanalysen aufgeteilt in Molecular Grade 1-Tumore, Grade 2A-, Grade 2B-, Grade 3-Tumore mit Gesamt-Zahl, Anzahl der Rezidiv-Ereignisse und Anzahl ohne Rezidiv

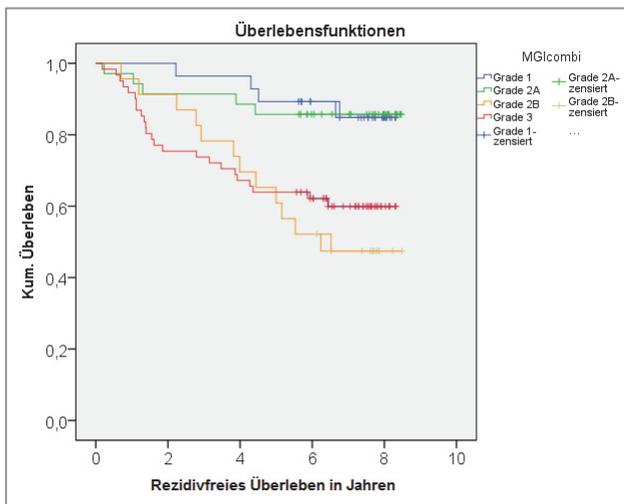


Abbildung 31: Überlebenskurven: G1-Tumoren (blau), G2A-Tumore (grün), G2B-Tumore (gelb,) G3-Tumore (rot); y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse Rezidivfreies Überleben in Jahren

4.9.2 Anwendung der Genliste CP44 auf das Testset GSE 3494

Zur Validierung der Genliste CP44 erfolgte die Anwendung auf ein weiteres Testset. Dieses entstammt der Arbeit von Miller et al. *“An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects and patient survival”* (44). Schwerpunkt dieser Arbeit war das Tumorsuppressor-Gen p53 bei Brustkrebs. Dazu wurde auf der Basis von 251 primären Brustkrebspatienten eine Signatur aus 32 Genen entwickelt, die eine Einteilung in p53-mutanten oder Wildtyp-Brustkrebs ermöglichte und damit therapeutisches Ansprechen und Prognose vorhersagen konnte. Die Grading-Einteilung der Tumore wurde durch einen Pathologen durchgeführt und präsentierte sich wie folgt: 63 Patientinnen mit Grade 1, 122 Patientinnen mit Grade 2 und 52 Patientinnen mit Grade 3. Die Genexpressionsanalyse erfolgte ebenfalls mittels Genchips U133A und U113B (Affymetrix Technologie).

Von den 44 Genen der Genliste CP44 waren 35 Gene mit 53 Gensonden auf den Chips U133A und B wiederzufinden. Die Grading-Klasse 2 wurde durch das molekulare Grading CP44 in eine günstige Gruppe 2A mit 93 Patientinnen und eine ungünstige Gruppe 2B mit 29 Patientinnen aufgeteilt (siehe Tabelle 31). Anschließend erfolgte eine Analyse des Rezidivfreien Überlebens für die jeweiligen histologischen Grading-Klassen, welche in Abbildung 32 dargestellt ist. Das Auftreten eines Rezidivs der Brustkrebserkrankung stellte das zeitlimitierende Kriterium dar.

Molecular Grade	Gesamtzahl	Anzahl Rezidiv n (%)	Anzahl kein Rezidiv n (%)	Signifikanz (p)
Grade 1	63	7(11%)	56 (89%)	
Grade 2A	93	20 (22%)	73 (88%)	
Grade 2B	29	10 (34%)	19 (66%)	
Grade 3	52	17 (33%)	35 (67%)	
Gesamt	237	54 (23%)	183 (77%)	0,00

Tabelle 291: Überlebensanalysen aufgeteilt in Molecular Grade 1-Tumore, Grade 2A-, Grade 2B-, Grade 3-Tumore mit Gesamt-Zahl, Anzahl mit und ohne Rezidiv

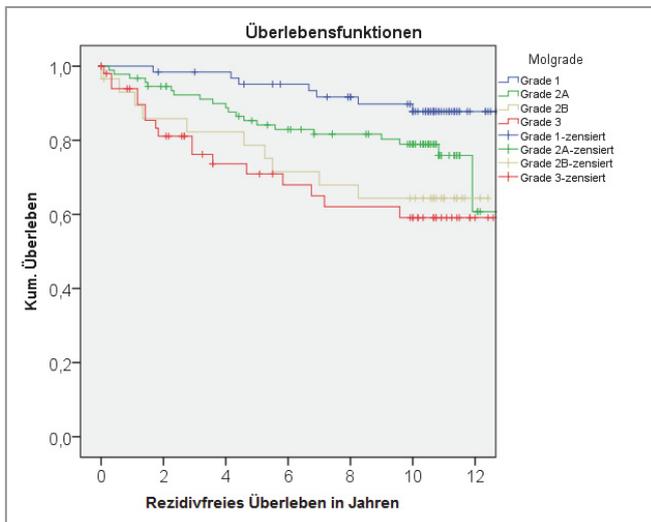


Abbildung 32: Krankheitsfreie Überlebenskurven von G1-Tumoren (blau), G2A-Tumoren (grün), G2B-Tumoren (gelb,) G3-Tumoren (rot); y-Achse: Kumuliertes Überleben, x-Achse Überleben in Jahren

Die Abbildung 32 visualisiert die Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeiten für Molecular Grade1, Grade 2A+B und Grade 3. Dabei weist Grade 2 A ein günstigeres Überleben und Grade 2B ein ähnlich ungünstiges Überleben wie Grade 3 auf. Auffällig ist jedoch nach 12 Jahren die Verschlechterung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Untergruppe Molecular Grade 2A.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Gensignatur als molekulargenetisches Äquivalent zum histopathologischen Grading für das Mamma-Karzinom zu finden.

Zwar besitzt das histopathologische Grading einen hohen prognostischen Stellenwert bei der Erkrankung Brustkrebs, jedoch sind diesem Merkmal als Prognosefaktor auch Grenzen gesetzt. Dazu zählt u.a. eine reduzierte Objektivität, da die Zuteilung durch eine zum Teil subjektive Einschätzung des Untersuchers erfolgt. Auch mangelt die Malignitätsgrad-Einteilung „G2“ einer eindeutigen prognostischen und damit Therapie-entscheidenden Aussagekraft. Dies fällt insbesondere ins Gewicht, da mitunter 30-60% der Mamma-Tumore einem intermediären Differenzierungsgrad zugeteilt werden.

Mit der Microarray-Technologie ist die genetische Analyse von Brustkrebs und die Ermittlung von Genen möglich, welche beispielsweise die einzelnen Tumoreigenschaften kodieren. Daher wurde diese Technologie zur Ermittlung eines Classifiers für den Malignitätsgrad von Brustkrebs auf molekulargenetischer Ebene in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Signifikanz-Analyse der Genexpressionsprofile der 168 Brustkrebspatientinnen mittels SAM (*Significance Analysis of Microarray*) ergab mehr als 11.000 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene (FDR 0,1) zwischen den Gradingklassen G1-3. Dieses Ergebnis gibt Hinweise darauf, dass auf molekulargenetischer Ebene eine Einteilung in die drei histopathologischen Grading-Klassen möglicherweise nicht sinnvoll ist. Daher wurde eine Signifikanz-Analyse nur mit den Grading-Klassen G1 und G3 abgeschlossen und erbrachte eine Genliste aus 218 signifikant unterschiedlich exprimierten Genen bei einer FDR von 0,0003. Die Gen-Ontologie-Analyse mittels *GOrilla* zeigte, dass der überwiegende Anteil der 218 Gene mit signifikanter Wahrscheinlichkeit in Zellzyklus-Vorgänge wie Zellzyklusprogression, Regulation des Zellzyklus und Zellorganellen-Organisation involviert war und somit ein Zusammenhang mit dem histopathologischen Grading gesehen werden kann.

In ihrer Arbeit zum Gene Expression Grade Index (GGI)(2) fanden Sotiriou et al. ebenfalls kein eigenes Genexpressionsprofil für die G2-Brusttumore und ermittelten die genomische Malignitätsgrad-Signatur auf der Basis von Genexpressionsprofilen von G1- und G3-Tumoren. G2-Tumoren schrieb er eine Mittelstellung zwischen dem hochdifferenzierten und

niedrigdifferenzierten Tumorgrad oder sogar eine Mischung aus G1- und G3-Tumorprofilen zu. Auf der Basis des Genexpressionsprofils konnte er mit Hilfe des *Gene Expression Grade Index* die G2-Tumore in *G1-like* oder *G3-like* einteilen und validierte diese Einteilung anschließend anhand von Überlebensdaten, in denen *G1-like* G2-Tumore ein verlängertes Überleben im Vergleich zu *G3-like* G2-Tumore aufwiesen.

Eine weitere Studie von Ivshina et al. zur genetischen Grundlage des Gradings erbrachte ähnliche Erkenntnisse hinsichtlich der G2-Tumoren, nämlich, dass G2-Tumoren auf molekularer Ebene in *high-grade*-ähnliche oder *low-grade*-ähnliche Tumore einzuteilen waren und kein eigenes Genprofil aufwiesen(45).

Mittels des Programms *Prediction Analysis of Microarray* wurde anhand unseres Patientenkollektivs ein Classifier für das molekulargenetische Grading auf der Grundlage der Genexpressionsprofile von G1- und G3-Tumoren erstellt. Diese Gensignatur (Genliste CP44) umfasst 44 Array-Proben mit 40 einzelnen Genen und ermöglichte eine Einteilung der Tumore in eine Hoch-Risiko- und eine Niedrig-Risiko-Klasse.

Ziel war es, eine neue Tumorprobe anhand der Expressionsstärken der 44 Array-Proben einer Klasse des Classifiers zuzuteilen.

Die Gene Ontology Analyse der Genliste CP44 wies nach, dass die ermittelten Gene mit hoher Signifikanz an Zellzyklus-Prozessen, wie Zellzyklus-Progression oder -Organisation, beteiligt sind, welche entscheidende Merkmale des histopathologischen Gradings sind.

Darunter befanden sich Gene, deren Einfluss auf Zellzyklus-Progression und Proliferation bereits anerkannt ist, wie BUB1, KIF20A, MYBL2, MCM10, GTSE1.

Dies unterstützt die Annahme, dass innerhalb der Genliste CP44 für das Grading verantwortliche Gene repräsentiert sind und die Genliste CP44 als ein Äquivalent des histopathologischen Gradings auf molekulargenetischer Ebene angesehen werden kann.

Zum Vergleich führten wir eine Gegenüberstellung der 97 Gene des *Gene Expression Grade Index* von Sotiriou mit den 40 Genen der CP44-Genliste durch. Dabei konnten 20 gemeinsame Gene gefunden werden. Die nachfolgende Tabelle 32 zeigt die 20 übereinstimmenden Gene:

Gensymbol
BUB1
CCNA2
CENPA
DKFZp76E1312
DLG7
EXO1
FOXM1
GTSE1
KIF20A
KIF2C
LOC146909
MCM10
MELK
MYLB2
PLK1
POLQ
RRM2
SLC7A5
TTK
UBE2C

Tabelle 302: Auflistung der 20 übereinstimmenden Gene zwischen Gene Expression Grade Index und CP44-Genliste

Eine Ursache für die nicht vollständige Übereinstimmung der Genlisten bei ähnlicher Fragestellung kann u.a. in der unterschiedlich durchgeführten Microarray-Analyse liegen. Während unsere Genexpressionanalyse mit Hilfe der Agilent Technologie erfolgte, nutzte Sotiriou die Technologie inklusive Genchip von Affymetrix. Zwar lässt sich mit beiden Techniken eine Microarray-Analyse durchführen, jedoch sind Versuchsaufbau, verwendete Materialien und auch die Genchip-Zusammensetzung unterschiedlich. Auch wurden verschiedene Statistik-Programme zur Ermittlung der Gensignaturen verwendet. Hier zeigt sich ein Kritikpunkt an der Microarray Technologie. Auch wenn sie ein objektivierbares Messverfahren mit Computer-gesteuerter Auswertung ist, so sind die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Herstellungsverfahren nicht immer vollständig vergleichbar. Vor allem in der Zusammensetzung der Genchips existieren große Unterschiede, wie z.B. in der Anzahl der Gensonden und damit der zu untersuchenden Gen-Anzahl.

Das „MicroArray Quality Control“-Projekt konnte jedoch aufzeigen, dass mit Hilfe geeigneter Studiendesigns und präziser Anwendung der Technik und Datenanalyse eine Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit von Microarray-Daten möglich ist(46).

Durch das Veröffentlichen der gesamten Microarray-Analysedaten meist online in einer Genom-Datenbank ist es möglich, die Experiment-Abläufe und Ergebnisse anderer Forschungsgruppen zu wiederholen und damit zu validieren. Es ermöglicht aber auch die Überprüfung der Reproduzierbarkeit von eigenen Gensignaturen und erhöht somit die Validierung der eigenen Gensignatur(47).

In der Heat Map der hierarchischen Clusteranalyse aus Kap. 3.3 sind die Genexpressionsmuster der Genliste CP44 aller Tumorproben bildlich dargestellt. Eine Unterteilung der Tumorproben in zwei Gruppen ist dabei auffällig. Die Unterexprimierung der Mehrzahl der Gene (grün) steht links relativ einheitlich einer Überexprimierung in der rechten Gruppe (rot) gegenüber. Die Verteilung der histopathologischen Grading-Klassen im Bezug zeigt, dass sich die G3-Tumore ausschließlich in der überexprimierten Gruppe befinden. Dies unterstützt die Annahme, dass die überexprimierten Gene der Genliste CP44 einen Hochrisiko-Tumor bedingen, mit z.B. erhöhter Proliferationsrate. Die G2-Tumore verteilen sich über beide Gruppen. Somit ließen sich die G2-Tumore gemäß ihres Genexpressionsprofil ebenfalls der Hoch- oder Niedrig-Risiko-Klasse zuteilen.

Um zu überprüfen, ob sich die Zuteilung der G2-Tumore in die Niedrig-Risiko- oder Hoch-Risiko-Gruppe gemäß der Gensignatur CP44 auch in einem entsprechend unterschiedlichen Gesamt-Überleben widerspiegelt, wäre eine Follow-Up Studie mit diesem Patientenkollektiv notwendig. So könnte überprüft werden, ob die G2-Tumoren, die aufgrund dieser Analyse den „Niedrig-Risiko“-Tumoren zugeteilt wurden, auch tatsächlich eine geringere Rezidivrate und ein verlängertes Überleben aufweisen, im Vergleich zu den G2-Tumoren der „Hoch-Risiko“-Gruppe. Allerdings wäre dabei jedoch der Einfluss der bereits durchgeführten Therapie auf das Gesamtüberleben zu beachten.

Vor allem bei nicht weit fortgeschrittenen Tumoren könnte diese molekulargenetische Unterteilung der G2-Tumoren eine Hilfestellung für die Therapiefindung darstellen. Patientinnen mit einem G2-Tumor, der ein Niedrig-Risiko-Profil aufweist, ähnlich dem von G1-Tumoren, könnten die Nebenwirkungen und Schädigungen durch eine Chemotherapie erspart werden. Wohingegen ein Hoch-Risiko-Profil eines G2-Tumors ein eindeutiger Faktor zur Entscheidung für eine aggressive Therapie-Linie ist.

Um die tatsächliche prognostische Aussagekraft der Genliste CP44, vor allem bezogen auf die G2-Tumore, zu validieren, wäre eine prospektive, randomisierte Studie mit Langzeit-Nachverfolgung notwendig, in der die Rezidiv-Raten und das Gesamt-Überleben von Brustkrebs-Patientinnen nach Einteilung und entsprechender Therapie-Wahl durch die CP44-Signatur gegenüber der klassischen Grading-Einteilung verglichen werden müsste. Zum direkten Vergleich der Aussagekraft könnten in dieser Studie weitere prognostische Scores wie der GGI, die 70-Gensignatur angewandt und gegenübergestellt werden.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine Nachverfolgungsdaten zur Evaluierung der prognostischen Aussagekraft der Gensignatur CP44 zur Verfügung standen, wurde hierzu ein öffentlich zugängliches Datenset (van de Vijver et al.(3)) verwendet. So war mit Hilfe der umfangreichen Follow-up-Informationen eine Testung der prognostischen Aussagekraft der Gensignatur CP44 möglich. Zudem erfolgte der unmittelbare Vergleich des Score CP44 mit den prognostischen Eigenschaften des GGI und der 70-Gensignatur. Beide Scores sind bereits anerkannte und kommerziell vertriebene Gensignaturen. Mapquant DX Genomic Grade (Ipsogen, Marseille, France) ist eine nur in Europa verfügbare Gensignatur, welche die 97 Gene des Gene Expression Grade Index enthält und vor allem für G2-Tumorpatientinnen eine Entscheidungshilfe hinsichtlich adjuvanter Chemotherapie darstellt. Laut des Consensus von St Gallen 2009 wird sogar empfohlen, den Genomic Grade als Zusatzinformation zum histologischen Grading zu berücksichtigen, sofern vorhanden. Zunächst nur anwendbar auf gefrorenes Tumorgewebe, ist inzwischen auch eine Version für Formalin-fixiertes Tumorgewebe verfügbar(48).

MammaPrint (Agendia, Amsterdam, Niederlande) ist der kommerziell erwerbliche Test zur Ermittlung des Metastasierungsrisikos bei Lymphknoten-negativem Brustkrebs auf der Basis der 70-Gensignatur.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Signatur CP44 auf das Datenmaterial von van de Vijver angewandt und ein Koeffizient Con44Rang zur statistischen Analyse erstellt mit einer Unterteilung in Klasse 1 und 2. Damit war eine Korrelations-Analyse der Signatur mit gängigen klinischen und pathologischen Merkmalen möglich.

Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang in der Korrelations-Analyse von Con44Rang und dem Patienten-Alter. Als Tendenz lässt sich in der Verteilung der Tumoren bei Patientinnen <40 Jahren jedoch erkennen, dass hier etwas mehr Patientinnen der Klasse 2 (Con44), also der Hoch-Risiko-Gruppe, zugeordnet wurden.

Dass sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Variable Con44Rang und dem Grading findet, verwundert nicht, wenn man annimmt, dass die Genliste CP44 u.a. Gene für das histopathologische Grading auf molekularer Ebene enthält. Eine nicht vorhandene Signifikanz hätte Zweifel an der Validität dieses Scores aufkommen lassen.

Die Korrelations-Analyse des Lymphknotenstatus ergab keine Signifikanz. Auch die Verteilung innerhalb der Lymphknotengruppen auf die beiden Klassen 1 und 2 zeigte keinen Zusammenhang bei annähernd hälftiger Zuteilung.

Bisher galt der Lymphknotenstatus als ein allgemein anerkannter Prognosefaktor hinsichtlich Rezidivrate und Gesamt-Überleben bei Brustkrebs(49). Allerdings muss seine Wertigkeit im Verlauf neu evaluiert werden, denn dank des Früherkennungsprogramms sinkt die Anzahl an neudiagnostizierten Tumoren mit Lymphknotenbefall(50).

Außerdem ist der genaue Lymphknotenstatus stark abhängig vom operativen Ausmaß hinsichtlich Größe des entfernten Lymphknotengewebes sowie von der Gründlichkeit der pathologischen Untersuchung und somit der Anzahl der entfernten Lymphknoten.

In der Korrelations-Analyse der Tumorgöße fällt auf, dass kleinere Tumoren mehrheitlich der Niedrig-Risiko-Gruppe (Klasse 1) nach Con44Rang zugeteilt werden. Gemäß der Annahme, dass proliferierende und somit auch das Wachstum beschleunigende Gene in der Klasse 2 überexprimiert sind, finden sich 60% der größeren Tumore in dieser Hochrisiko-Gruppe wieder.

Mit hoher Signifikanz ($p=0,00$) zeigte sich der Zusammenhang zwischen Östrogenrezeptor-Status und Con44Rang. 88% der Östrogenrezeptor-negativen Tumore wiesen ein Genexpressionsprofil der Klasse 2 auf. Ein negativer Östrogenrezeptor-Status ist ein anerkannter Marker für eine schlechte Prognose bei Brustkrebs. 63% der ER-positiven Tumore gehörten der Klasse 1 und somit der Niedrig-Risiko-Gruppe mit einer günstigeren Prognose an(51).

Ein hochsignifikantes Ergebnis erbrachte auch die Analyse des Zusammenhangs des Score Con44Rang mit der 70-Gensignatur von *MammaPrint* als molekulargenetischer Prognosefaktor. 90% der „*good prognosis*“-Tumore hatten ein Genexpressionsmuster der Klasse 1 von Score Con44Rang. Beide Untergruppen stellen Marker für eine günstige Prognose dar. 75% der „*poor prognosis*“-Tumoren waren in Klasse 2 und somit in die Hochrisiko-Gruppe eingeteilt worden.

Die nachfolgende Überlebensanalyse mit direktem Vergleich Con44Rang und der 70-Gensignatur bestätigte diese Ergebnisse und zeigte auf, dass beide Marker ein ähnliches

prognostisches Potential aufweisen (siehe Kapitel 3.5).

Im Vergleich der Gensignatur CP44 und des GGI von Sotiriou hinsichtlich des Gesamtüberlebens bezogen auf das Patientenkollektiv von van de Vijver erreichten beide Scores (Con44sum und Sot68sum) nahezu identische Ergebnisse:

In der Analyse des gesamten Patientenkollektivs sagte der Score Sot68sum ein um 0,2 Jahre verlängertes Überleben in der Klasse 1 im Vergleich zum Score Con44sum vorher. In der Klasse 2 unterschieden sich die Überlebensjahre um 0,21 Jahre (Con44sum 11,31 Jahre – Sot68sum 11,1 Jahre).

Die vorhergesagten Überlebensjahre waren innerhalb der G1-Klasse sogar identisch. In der G2-Analyse waren sowohl die Verteilung der Todesfälle in beiden Klassen als auch die Überlebensjahre sehr ähnlich zwischen Con44sum und Sot68sum (Øy Klasse 0 0,67 Jahre, Klasse 1 0,14 Jahre) bei einer Signifikanz von $p=0,00$. Auch die G3-Analyse erbrachte fast identische Werte hinsichtlich Überlebenszeitraum und Anzahl der Todesfälle durch Brustkrebs.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass unsere Genliste CP44 trotz geringerer Genanzahl verglichen mit dem GGI eine fast identische Vorhersagekraft hinsichtlich Prognose und Gesamtüberleben aufweist. Es lässt sich vermuten, dass in beiden Genlisten Gene vorhanden sind, welche einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung einnehmen. Vor allem hinsichtlich finanzieller Aspekte lässt sich hieraus ein Vorteil für die Genliste CP44 ableiten, denn durch die reduzierte Anzahl an Genen lassen sich auch die Kosten der Analyse des molekulargenetischen Gradings deutlich minimieren bei gleichwertigen Ergebnissen. Somit könnte ein Haupt-Kritikpunkt der Genexpressionanalyse, nämlich der hohe finanzielle Aufwand im Vergleich zur Analyse der klinikopathologischen Eigenschaften, etwas an Bedeutung verlieren.

Auch die Überlebensanalysen anhand des Scores Con44Rang und der 70-Gensignatur von van de Vijver zeigten eine ähnliche prognostische Aussagekraft der beiden Scores.

In der Gesamtkollektiv-Analyse prognostizierte der Score Con44Rang ein Gesamt-Überleben in Klasse 1 von 16,25 Jahren und in der „*good prognosis*“-Gruppe der 70-Gensignatur von 17,01 Jahren, damit ergab sich ein Unterschied von 0,76 Jahren.

Laut Vorhersage des Score Con44Rang lebten Patientinnen der Klasse 2 10,87 Jahre und Patientinnen der „*poor prognosis*“-Gruppe 11,56 Jahre. Hier bestand der Unterschied bei 0,69 Jahren.

Dann erfolgte die Separierung des Patientenkollektivs in die drei Grading-Klassen, um eine getrennte Überlebens-Analyse für die jeweilige Klasse zu erhalten.

In der G1-Klasse wies der Score Con44Rang eine ähnliche Vorhersagekraft auf wie die 70-Gensignatur. Bei jeweils 2 Todesfällen in beiden Untergruppen der untersuchten Gensignaturen bestand eine Differenz der Überlebenszeiten von 0,04 Jahren in der Klasse 1 bzw. „*good prognosis*“-Gruppe. Die Überlebenszeiten der Klasse 2 bzw. „*poor prognosis*“-Gruppe unterschieden sich um 1,77 Jahre. Auffällig zeigte sich in der Interpretation der Kaplan-Meier-Kurven beider Scores, dass das Sterbe-Risiko nach 12-15 Jahren deutlich anstieg. In der Analyse der G2-Klasse erbrachte die Anwendung des Scores Con44Rang einen auffälligen Unterschied der Überlebensjahre der Klassen 1 und 2 mit einer Signifikanz von $p=0,00$. In Klasse 1 traten 6 Todesfälle auf, das mittlere Überleben betrug 16,58 Jahre, in der Klasse 2 traten 18 Todesfälle auf, das Überleben lag bei 10,18 Jahren. Auch die Kaplan-Meier-Kurve visualisiert diese Unterscheidung des Überlebens eindrücklich.

Dieses Ergebnis stützt ebenfalls die Annahme, dass sich G2-Tumore mithilfe des Scores Con44Rang als molekulargenetischen Marker für das Grading differenzierter in eine Hochrisiko- oder Niedrigrisiko-Gruppe aufteilen lassen. Vor allem die Anzahl der Todesfälle durch Brustkrebs differierte zwischen den beiden Analysen, die G2-Tumore der Hochrisiko-Gruppe wiesen eine deutlich aggressivere Tumorbiologie auf. Die Anwendung eines molekulargenetischen Markers, wie z.B. den Score Con44Rang, könnte somit die Hochrisiko-G2-Tumore ermitteln und die Entscheidung zu einer aggressiven Therapie unterstützen, um damit das Überleben der Patienten zu verbessern.

Die 70-Gensignatur teilt im Vergleich zum Score Con44Rang mehr G2-Tumore in die „*poor prognosis*“-Gruppe, sodass auch mehr Todesfälle in dieser Gruppe auftreten – 23 im Vergleich zu 18 in der Con44Rang-Analyse. Erstaunlicherweise ist das Gesamtüberleben hier dennoch mit 11,62 Jahren um 1,44 Jahre länger als in der Con44Rang-Analyse.

Die Überlebensanalysen der G3-Tumore wiesen keine Signifikanz auf. Aus den Kaplan-Meier-Kurven wird dennoch erkennbar, dass die Tumore vor allem der jeweiligen Hochrisikogruppe (entsprechend Klasse 2 Con44Rang-Score und „*poor prognosis*“-Gruppe 70-Gensignatur) eine schlechte Prognose besitzen und somit zu einer hohen Anzahl an Todesfällen führen.

Auch die Anwendung der Genliste CP44 auf zwei weitere Datensets erbrachte eine differenziertere Unterteilung der Gradingklasse 2, die sich in einem unterschiedlichen Überleben widerspiegelte. Hier ähnelte das Überleben der günstigeren Untergruppe von

Gradingklasse 2 ebenfalls dem Überleben von Grad 1. Wohingegen die ungünstigere Untergruppe von G2 ein schlechteres Überleben aufwies.

Die Grading-Einteilung unseres Patientenkollektivs wurde durch unterschiedliche Pathologen durchgeführt. Auf der Basis dieser Einteilung fundieren die Ergebnisse dieser Arbeit, nämlich die Gensignatur für das molekulargenetische Grading. Womöglich wäre eine Grading-Einteilung durch einen einzelnen Pathologen zur Reduzierung der bereits dargestellten *inter- und intraobserver variability* wünschenswert gewesen. Da jedoch durch die Einführung des Nottingham Grading Systems (NGS) als Standardisierungssystem eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit und Objektivität in der Malignitätsgrad-Einteilung erreicht wird, konnte diese Problematik minimiert werden(30).

Zum aktuellen Zeitpunkt existieren eine Vielzahl an Microarray-Experimenten mit unterschiedlich zusammengesetzten Genchips verschiedener Hersteller, verschiedenen Versuchsabläufen und – materialien. Auch die verwendeten statistischen Tests und Ansätze variieren erheblich zwischen den einzelnen Arbeiten.

Dies führt dazu, dass multiple Gensignaturen entdeckt und veröffentlicht wurden.

Beispielsweise sind prognostische Gensignaturen mit Vorhersagemöglichkeit des Rezidivfreien Intervalls ein beliebter Forschungsansatz. Im direkten Vergleich dieser Signaturen finden sich jedoch nur eine geringe Übereinstimmung der Gene, sodass es immer wieder zu Zweifeln an der Validität dieser Gensignaturen und deren biologischer Bedeutung kommt(52) So finden sich zum Beispiel nur drei gemeinsame Gene beim Vergleich der 70-Gensignatur von van't Veer(42) und der 76-Gensignatur von Wang et al.(53) Beide Signaturen wurden zur Vorhersage des Metastasen-Risikos bei Lymphknoten-negativen Patientinnen ermittelt. Dabei bezog sich die 76-Gensignatur auf unbehandelte Lymphknoten-negative Patientinnen aller Altersgruppen, während van't Veers 70-Gensignatur zur Ermittlung des 5-Jahres-Metastasen-Risiko an Patientinnen im Alter bis 55 Jahre entwickelt wurde(47).

Neuere Erkenntnisse stützen jedoch die mögliche Ko-Existenz und Gleichwertigkeit verschiedener Gensignaturen mit ähnlicher Aussage. Denn nicht nur die unterschiedlichen Studiendesigns und Fragestellungen bedingen diese Diversität, sondern vor allem auch die große Vielfalt der biologischen Prozesse, die für die Entstehung von Brustkrebs verantwortlich sind. Fan et al.(54) fand beim direkten Vergleich von fünf Gensignaturen heraus, dass vier dieser Gensignaturen eine ähnlich gute prognostische Vorhersagekraft besaßen bei Anwendung auf ein einziges Datensets. Zu den vier Gensignaturen gehörten die

70-Gensignatur von van't Veer(42), die Wound-Response-Signatur von Chang et al.(55), das Recurrence-Score Modell von Paik et al.(56) und das intrinsische Subtypen-Modell von Perou et al(26)

Eine Phase-II- Studie des „MicroArray Quality Control“- Projektes besaß ihren Schwerpunkt in der Evaluierung von prädiktiven Molekularprofilen (Classifier) und der dafür verwendeten Methoden. Hier zeigte sich, dass auch mit unterschiedlichen Analyse-Methoden ähnliche Ergebnisse hinsichtlich prädiktiver Aussagen erreicht werden können und diese somit als vergleichbar anzusehen sind(57).

Die meisten der prognostischen Signaturen sind auf der Basis unterschiedlicher Patientenkollektive mit verschiedenen Schwerpunkten ermittelt worden, z.B. wurden entweder nur Östrogenrezeptor-positive Tumore, nur Lymphknoten-negative Patientinnen oder nur Patientinnen bis zu einem bestimmten Alter in die Studien mit eingeschlossen. Dies erklärt u.a. auch die Diversität der Gensignaturen und verdeutlicht, dass diese nicht auf jede Patientin übertragen werden kann.

Das gemeinsame Ziel dieser Gensignaturen ist jedoch zu differenzieren, welcher Tumor aggressive Eigenschaften besitzt und daher eine Hochdosis-Therapie notwendig ist und welcher Patientin mit einem Niedrigrisiko-Tumor eine harte Therapie mit Nebenwirkungen erspart werden kann(58).

Zudem wurden die meisten prognostischen Gensignaturen bei Mammakarzinom anhand von Daten von ER-positiven Patientinnen entwickelt, wie z.B. der GGI oder die 70-Gensignatur. Daher ist ihre Anwendung auf Patientinnen mit Östrogenrezeptor-negativen Tumoren nur begrenzt möglich(59).

Demgegenüber wurde die Genliste CP44 unabhängig des Östrogenrezeptorstatus entwickelt. Da jedoch in klinikopathologischen Analysen ein Zusammenhang zwischen dem Grading und dem Rezeptorstatus erscheint – ER-negative Tumore weisen überwiegend ein G3-Stadium auf – kann nicht ausgeschlossen werden, ob sich innerhalb der Genliste CP44 auch Gene befinden, die eigentlich den Rezeptorstatus kodieren(2).

Der tatsächliche Nutzen der prognostischen Gensignaturen vor allem unter dem Aspekt der hohen finanziellen Kosten einer Genexpressionsanalyse wird kontrovers diskutiert.

Die IMPAKT-2012-Studie verglich dazu die zu dem Zeitpunkt verfügbaren genomischen Tests bezüglich ihrer prognostischen Aussagekraft und des Therapie-Ansprechens. Dazu gehörten Oncotype Dx, MammaPrint, Genomic Grade Index, PAM50 (ROR-S) Breast Cancer

Index und EndoPredict. Evaluiert wurden analytische und klinische Validität sowie klinischer Nutzen. Hinsichtlich analytischer und klinischer Wertigkeit überzeugten sowohl MammaPrint als auch Oncotype Dx. Keine der Signaturen erfüllte den Anspruch klinischer Nutzen, da kein Nachweis vorlag, dass das Patientenüberleben allein durch das Ergebnis eines genomischen Test und des dadurch eingeschlagenen Therapieweges beeinflusst war.

Abschließend wurden folgende Empfehlungen ausgesprochen: 1. die Entwicklung einer Konzeptes, das genomische Signatur(en) und klinikopathologische Kriterien vereint. 2. der klinische Nutzen sollte in prospektiv randomisierten Studien bewiesen werden. 3.

Patientinnen, bei denen ein genomischer Test durchgeführt wurde, sollten in einem Register erfasst werden(60).

Aktuell laufen bereits prospektive Studien zur Validierung von prognostischen Gensignaturen, z.B. für den OncoType DX Recurrence Score (USA). In einer randomisierten Phase-III-Studie für Patientinnen mit Lymphknoten-negativem, Östrogen-Rezeptor-positivem Brustkrebs wird mittels des Oncotype DX Tests der individuelle Therapieweg für die Patientin ermittelt und die Krankheitsverläufe statistisch erhoben. Zudem wird untersucht, ob bei Vorliegen eines Oncotype DX Scores von 11-25 eine alleinige Hormontherapie oder eine Kombination mit einer Chemotherapie das Überleben verbessert. Start der Studie war im April 2006, die Datenerhebung läuft bis April 2014. Zum aktuellen Zeitpunkt liegen noch keine Ergebnisse vor. (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00310180)(61)

Die MINDACT-Studie (**M**icroarray **I**n **N**ode negative **D**isease may **A**void **C**hemo**T**herapy) gefördert durch die EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) ist eine prospektiv randomisierte Studie mit 6600 Brustkrebs-Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus zur Evaluierung der 70-Gensignatur (MammaPrint). Dabei wird anhand des 70-Genprofils und gängiger klinikopathologischer Kriterien das Rezidiv-Risiko ermittelt und der entsprechende Therapie-Weg gewählt. Bei Patientinnen mit nicht übereinstimmenden Risiko-Ergebnissen erfolgt eine Randomisierung zu einem Therapieweg entweder durch die klassischen Kriterien oder durch die 70-Gensignatur. Auch zu dieser Studie stehen die Ergebnisse noch aus(62).

Laut des St. Gallen Consensus von 2009(5) wird die Anwendung von validierten Multigene-Profiling-Assays als Zusatz zur Charakterisierung von Brustkrebs in solchen Fällen anerkannt, in denen die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie unsicher ist.

Vielleicht werden jedoch Ergebnisse der oben genannten Studien diese Meinung ändern,

sodass zukünftig die Genexpressionsanalyse als Standard bei der Charakterisierung von Brustkrebs angesehen wird.

Einsparungen bei den Kosten für eine Chemotherapie und den entstehenden Behandlungskosten von Nebenwirkungen werden als positive Argumente für die Anwendung prognostischer Gensignaturen gewertet und können somit dem Kritikpunkt der hohen finanziellen Aufwendungen entgegengehalten werden. In Europa sind in den meisten Fällen die Kosten der Analyse durch die Patientin selbst zu tragen. Das bedeutet, dass Patientinnen mit entsprechenden finanziellen Mitteln womöglich einen Überlebensvorteil haben, wenn sie sich eine Genanalyse ihres Tumors leisten können. Global gesehen würden vor allem Patientinnen aus nicht-industrialisierten Ländern mit einem weniger gut ausgestatteten Gesundheitssystem benachteiligt werden(30).

Inwiefern die Genexpressionsanalyse mit Microarray-Technologie etablierte und standardisierte Methoden zur prognostischen Vorhersage bei Brustkrebs in naher Zukunft ersetzen kann, bleibt offen. Die wesentlichen Forschungsergebnisse der letzten zehn Jahre, welche z.T. in diese Arbeit eingeflossen sind, lassen jedoch Alternativen und Verbesserungsmöglichkeiten insbesondere hinsichtlich personalisierter Prognosevorhersage und Therapie von Brustkrebs erkennen.

6 Literaturverzeichnis

1. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:48.
2. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Feb 15;98(4):262–72.
3. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999–2009.
4. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530–6.
5. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2009 Aug;20(8):1319–29.
6. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012 [Internet]. 2013 [cited 2013 Apr 11]. Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/krebs_in_deutschland_2012.pdf?__blob=publicationFile
7. Goldhirsch A, Gelber RD, Yothers G, Gray RJ, Green S, Bryant J, et al. Adjuvant therapy for very young women with breast cancer: need for tailored treatments. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;(30):44–51.
8. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3324–30.
9. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*. 1993;15(1):36–47.
10. Hunter DJ, Colditz GA, Hankinson SE, Malspeis S, Spiegelman D, Chen W, et al. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2010 Oct;19(10):2496–502.
11. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA J Am Med Assoc*. 2002 Jul 17;288(3):321–33.

12. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2003 Aug 9;362(9382):419–27.
13. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003 May;72(5):1117–30.
14. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jul 21;353(3):229–37.
15. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007. [cited 2013 Apr 9]; Available from: <http://eprints.ucl.ac.uk/4841/1/4841.pdf>
16. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Nov 17;85(22):1819–27.
17. Vainshtein J. Disparities in breast cancer incidence across racial/ethnic strata and socioeconomic status: a systematic review. *J Natl Med Assoc*. 2008 Jul;100(7):833–9.
18. Kaufmann M, Costa S-D, Scharl A. *Die Gynäkologie, 2.Auflage. 2., vollst. überarb.u. aktualisierte Aufl.* Springer; 2005. 930 p.
19. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007 [Internet]. 2013 [cited 2013 Apr 9]. Available from: <http://eprints.ucl.ac.uk/4841/1/4841.pdf>
20. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*. 2000 Sep 15;152(6):514–27.
21. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, Longcope C, et al. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Aug 20;95(16):1218–26.
22. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403–10.
23. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;22(3):207–19.
24. Hess V. [Adjuvant!Online--an Internet-based decision tool for adjuvant chemotherapy in early breast cancer]. *Ther Umsch Rev Thérapeutique*. 2008 Apr;65(4):201–5.
25. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):467–70.

26. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
27. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
28. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol*. 1995 Aug;26(8):873–9.
29. Longacre TA, Ennis M, Quenneville LA, Bane AL, Bleiweiss IJ, Carter BA, et al. Interobserver agreement and reproducibility in classification of invasive breast carcinoma: an NCI breast cancer family registry study. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2006 Feb;19(2):195–207.
30. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res BCR*. 2010;12(4):207.
31. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):5116–21.
32. Chu G, Li J, Narasimhan B, Tibshirani R. Significance analysis of Microarrays: User guide and technical document [Internet]. 2013 [cited 2013 Apr 11]. Available from: <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/sam.pdf>
33. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):6567–72.
34. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25–9.
35. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:48.
36. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14863–8.
37. Simon R, Lam A, Li M-C, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y. Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools. *Cancer Inform*. 2007 Feb 4;3:11–7.
38. de Hoon MJL, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinforma Oxf Engl*. 2004 Jun 12;20(9):1453–4.
39. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2004 Nov 22;20(17):3246–8.
40. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jan 1;30(1):207–10.

41. Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet.* 2001 Jun;2(6):418–27.
42. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002 Jan 31;415(6871):530–6.
43. Pawitan Y, Bjöhle J, Amler L, Borg A-L, Egyhazi S, Hall P, et al. Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res BCR.* 2005;7(6):R953–64.
44. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 20;102(38):13550–5.
45. Ivshina AV, George J, Senko O, Mow B, Putti TC, Smeds J, et al. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10292–301.
46. Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 2006 Sep;24(9):1151–61.
47. Cheang MCU, van de Rijn M, Nielsen TO. Gene expression profiling of breast cancer. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:67–97.
48. Toussaint J, Sieuwerts AM, Haibe-Kains B, Desmedt C, Rouas G, Harris AL, et al. Improvement of the clinical applicability of the Genomic Grade Index through a qRT-PCR test performed on frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics.* 2009;10:424.
49. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Nov 4;90(21):1601–8.
50. Swedish Organised Service Screening Evaluation Group. Effect of mammographic service screening on stage at presentation of breast cancers in Sweden. *Cancer.* 2007 Jun 1;109(11):2205–12.
51. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005 May 14;365(9472):1687–717.
52. Massagué J. Sorting out breast-cancer gene signatures. *N Engl J Med.* 2007 Jan 18;356(3):294–7.
53. Wang Y, Klijn JGM, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet.* 2005 Feb 19;365(9460):671–9.
54. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DSA, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006 Aug 10;355(6):560–9.

55. Chang HY, Nuyten DSA, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sørlie T, et al. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3738–43.
56. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
57. Shi L, Campbell G, Jones WD, Campagne F, Wen Z, Walker SJ, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. *Nat Biotechnol*. 2010 Aug;28(8):827–38.
58. Espinosa E, Vara JÁF, Navarro IS, Gámez-Pozo A, Pinto A, Zamora P, et al. Gene profiling in breast cancer: time to move forward. *Cancer Treat Rev*. 2011 Oct;37(6):416–21.
59. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Aug 15;14(16):5158–65.
60. Azim HAJ, Michiels S, Zagouri F, Delaloge S, Filipits M, Namer M, et al. Utility of prognostic genomic tests in breast cancer practice: The IMPAKT 2012 Working Group Consensus Statement. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2013 Mar;24(3):647–54.
61. Trial Assigning Individualized Options for Treatment: The TAILORx Trial – National Cancer Institute:Hormone Therapy With or Without Combination Chemotherapy in Treating Women Who Have Undergone Surgery for Node-Negative Breast Cancer (The TAILORx Trial) *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2013 [cited 2013 May 14]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00310180>
62. MINDACT trail (Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy) EORTC - TRANSBIG “A prospective, randomised study comparing the 70-gene expression signature with common clinical-pathological criteria in selecting patients for adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer.” (EORTC Protocol 10041 – BIG 3-04).