# Aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito - Funktionsbereich Cytopathologie -

TV-bildanalytische Quantifizierung der TUNEL-Reaktion beim Mammakarzinom

## Dissertation

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

> vorgelegt von Christin Achterfeld 2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker Erstgutacher: Prof. Dr. med. S. Biesterfeld Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. M. Hampl Für meine Mutter

## Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist in Deutschland die mit Abstand häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen und zeigt einen sehr heterogenen klinischen Verlauf. Um die Patientinnen adäquat therapieren zu können, bedarf es gut definierter und klinisch valider prädiktiver Größen, von denen viele im Rahmen der morphologischen Tumordiagnostik in der Pathologie erhoben werden. Zu ihnen gehören die Tumorausdehnung gemäß TNM-Klassifikation, Tumorgrading, das die Hormonrezeptorexpression und der HER-2/neu-Status. Auch in der Zusammenschau dieser Größen lassen sich aber nicht alle Fälle ausreichend gut klassifizieren; nach wie vor gibt es Fälle mit günstigen prognostischen Faktoren und schlechtem klinischen Verlauf und umgekehrt, so dass weiterhin Bedarf zur Erprobung weiterer Größen besteht. In der hier vorgestellten retrospektiven Studie werden morphologisch darstellbare Apoptosemerkmale von Mammakarzinomen auf die Prognose der Patientinnen bezogen.

An repräsentativen Schnitten von 113 primären unilateralen Mammakarzinomen waren unter Verwendung des gewerblich erhältlichen ApopTag®-Kits (Fa. Oncor) per in-situ-Hybridisierung apoptotische Zellen nach DAB-Entwicklung mit einem braunen Kernsignal dargestellt worden (TUNEL-Methode). Unter Verwendung eines TV-Bildanalysesystems war die Zahl in der Färbung positiver Tumorzellen an 20 Gesichtsfeldern bestimmt und auf die Gesamtzahl an Tumorzellen unter Verwendung verschiedener abgeleiteter Größen (darunter der Mittelwert der 20 Gesichtsfelder (APO<sub>mean</sub>) und der höchste Einzelwert eines Gesichtsfeldes (APO<sub>max</sub>)) bezogen worden. Die jetzt vorgenommene Auswertung der Rohdaten zeigte bezogen auf ein Langzeit-Follow-Up in der univariaten Überlebensanalyse für das Gesamtkollektiv eine 5-Jahresbzw. 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 65% bzw. 48,5%. Stärkste Überlebensprädiktoren waren das Tumorstadium nach TNM (p = 0,0001, Wilcoxon-Breslow-Test), der Lymphknotenstatus pN (p = 0,0002), das morphologische Grading (p = 0.0031), die Mitoserate (p = 0.0036) und der Progesteronrezeptorstatus (PR) (p=0,0156). Aufgeteilt in drei Gruppen im Verhältnis 1:2:1 zeigte APO<sub>mean</sub> ein besseres Überleben für Patientinnen mit hoher Apoptoserate (p = 0.0108); APO<sub>max</sub> wies einen identischen Trend auf (p = 0.0559), die übrigen Apoptoseparameter zeigten keinen erkennbaren prognostischen Einfluss. In der multivariaten Analyse (Cox-Modell) ergab sich im Besonderen eine hohe prognostische Signifikanz im Zusammenwirken von pN und PR; der Einfluss der Apoptoseparameter ist als lediglich marginal und klinisch nicht relevant aufzufassen. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch bei der Validierung des Cox-Modells am Datensatz.

Die Bedeutung der Bestimmung von Apoptoseparametern mit der TUNEL-Methode wird beim Mammakarzinom in der Literatur in recht heterogen aufgebauten Studien unterschiedlich gesehen. Neben Studien, die univariat einer hohen Apoptose eine günstigere Prognose zuschreiben, gibt es auch Untersuchungen mit gegenteiligem Ergebnis und solche, die überhaupt keinen prognostischen Einfluss sehen. Allen Studien ist dabei allerdings gleich, dass ein multivariater Effekt nicht in klinisch relevantem Maß gesichert werden kann. Unsere Erfahrungen belegen, dass auch die mit weniger subjektiven Einflussgrößen versehene bildanalytische Auswertung keine klinisch wesentliche prognostische Relevanz herausarbeiten lässt.

## Abstract

Breast carcinoma is by far the most common malignant tumour disease in women and exhibits a very heterogenous clinical course. In order to treat patients adequately, there is a need for well-defined and clinically-valid predictive variables, many of which are collected in pathology, in the context of morphological tumour diagnostics. These include tumour spread according to the TNM classification, tumour grading, the hormone receptor expression and the HER-2/new status. But even with an overview of all these variables, not all cases can be classified sufficiently well; there are still cases with favourable prognostic variables and bad clinical courses and vice versa, so that a need to test further variables still exists. In the retrospective study presented here, representable morphological apoptotic characteristics of breast carcinomas are related to the patients' prognoses.

Representative slides from 113 primary, unilateral breast cancers were represented with a brown nuclear signal by in-situ hybridisation of apoptotic cells following DAB development (TUNEL method), using the commercially available ApopTag®-Kits (Fa. Oncor). Using a TV image analysis system, the number of positive tumour cells within the staining was determined at 20 visual fields and related to the total number of tumour cells by using various derived variables (including the mean of the 20 visual fields (APO mean) and the highest individual value of a visual field (APO max)).

The following evaluation of the raw data in relation to a long-term follow-up, showed a 5-year or 10-year survival probability of 65% or 48.5% respectively, in the univariate survival analysis for the entire collective. The strongest predictors of survival were the tumour stage according to the TNM (p = 0,0001, Wilcoxon- Breslow-Test), the lymph node status pN (p = 0,0002), the morphological grading (p = 0,0031), the mitosis rate (p = 0,0036) and the progesterone receptor status (PR) (p=0,0156). Divided into three groups in the proportion 1:2:1, the APOmean showed a better survival for patients with a high apoptosis rate (p = 0,0108); APOmax demonstrated an identical trend (p = 0,0559), the other apoptosis parameters showed no identifiable prognostic influence. In the multivariate analysis (Cox-Modell), there was, in particular, a high prognostic significance in the interaction of pN and PR; the influence of the apoptosis parameters is to be understood as only marginal and not clinically relevant. These results were confirmed by the validation of the Cox model on the data set.

The importance of determining the apoptosis parameters with the TUNEL method in respect of breast carcinomas, is seen very differently in heterogeneously constructed studies reported in the literature. As well as studies in which a favourable prognosis is attributed to a apoptosis univariate, there are also investigations with the opposite result, and those which find no prognostic influence at all. However, all the studies agree that a multivariate effect of a clinically-relevant size cannot be ensured. Our experience shows that even those image analysis evaluations with less subjective influencing variables, do not allow a clinically relevant prognostic relevance to be derived.

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	atypische duktale Hyperplasie
AI	Apoptoseindex
APO	Kurzform für Apoptose in den Abkürzungen der Messparameter
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Protein im Endoplasmatischen Retikulum
Bax	Mitochondriales Protein
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> . Onkoprotein aus der B-Zell-Lymphom Reihe
BET	brusterhaltende Therapie
bidest.	bidestillata
BMDP	Name des verwendeten Statistikprogramms
bp	Basenpaar
BRCA1 / BRCA2	Breast Cancer 1- bzw2-Gen. Tumorsuppressorgene
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i> , membrangebundene Glykoproteine
CD44	Oberflächenprotein. Adhäsionsprotein
ced-3. ced-4. ced-9	Caenorhabditis elegans death gene. Zelltod-Gene
Chi <sup>2</sup>	Chi-Quadrat[-Test], gängiges statistisches Testverfahren
1D	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
2D	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
dATP	Desoxvadenosintriphosphat
DCIS	duktales Carcinoma in situ
dest.	<i>destillata</i> , destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Deoxyuridin-Triphosphat
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Enzymgekoppelter
	Immunchemischer Test
ER	Östrogenrezeptor
Fas	membranständiger Rezeptor
FEA	flache Epithelatypie der Milchgänge
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GATA-3	Transkriptionsfaktor
GnRH-Analoga	Analoga des Neurohormons Gonadotropin-Releasing-Hormon
Gy	Grav
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2/neu	Menschlicher Epidermaler Wachstumsrezeptor Faktor 2
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins, Apoptoseproteininhibitor
ICE	interleukin-1-beta converting enzyme, Cysteinprotease
IgM	Immunglobulin M
KP	Kernpleomorphie
L	Bezeichnung für Lymphspalteninvasion in der TNM-
	Klassifikation
1L	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
2L	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
LIN3	Carcinoma lobulare in situ

М	Mittelwert
MP4/MP5	Multiparameter
4M	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
min.	Minute
MIT	Mitoserate
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomograph
NST	no special type
p53	Tumorsuppressorgen/-protein
р	Wahrscheinlichkeit
PAI-1	plasminogen activator inhibitor type 1, Enzym, hemmt die
	Fibrinolyse
PAS	Periodic acid-Schiff reaction, Färbetechnik in der Histologie
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen, Ringklemmprotein, Cofaktor
	der DNA-Synthese während der Replikation
pCR	pathologische Komplettremission
PR	Progesteronrezeptor
pTNM	Postoperatives TNM-Stadium
r	Korrelationskoeffizient
R	Beurteilung des Resektionsrandes in der TNM-Klassifikation
RKI	Robert Koch-Institut
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (Aachen)
<b>S</b> 3	höchstmögliches Qualitätsmerkmal einer Leitlinie der AWMF
	(Stufen: S1, S2k, S2e, S3)
SD	standard deviation, Standardabweichung
Smac	Second Mitochondria- derivated Activator of caspase,
	mitochondriales Protein, kann die Apoptose verstärken, indem es
	an XIAP bindet und dessen Bindung an Caspasen verhindert
sog.	sogenannt
Т	Beurteilung des Primärtumors in der TNM-Klassifikation
Tab.	Tabelle
TD	tubuläre Differenzierung
TDLU	duktulo tubuläre Einheit
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Beurteilungssystem für maligne Tumoren nach Ausdehnung des
	Primärtumors (T), ggfls. befallenen Lymphknoten (N) und
	eventuellen Fernmetastasen (M) gemäß den Vorgaben der UICC
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, Zytokin,
	induziert Apoptose
TRM	Tumorregister München
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin
	nick end labeling, Nachweisverfahren apoptotischer Zellen
TV	television, hier: TV-Bildanalyse, d.h. Bildanalyse am von einer
	Kamera auf einen Monitor übertragenen Bild
UICC	Union of International Cancer Control, eigentlich Union
	international contre le cancer
ULW	Uberlebenswahrscheinlichkeit
uPA	Plasminogen Aktivator vom Urokinasetyp

V	Bezeichnung der Blutgefäßinvasion in der TNM-Klassifikation
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation
Х	Bezeichnung der Abszisse im Koordinatensystem
х	-fach; z.B. 40-fache Vergrößerung (40x)
XIAP	x-linked inhibitor of apoptosis, Protein, Apoptoseinhibitor
у	Bezeichnung der Ordinate im Koordinatensystem
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μĺ	Mikroliter

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2	Ätiologie des Mammakarzinoms	2
1.3	Pathologie des invasiven Mammakarzinoms	4
1.4	Klinik, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms	6
1.5	Prognostische und prädiktive Faktoren	15
1.6	Apoptose, der "programmierte Zelltod"	19
1.7	Ziel der Untersuchung	26
1.8	Ethikvotum	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Bestimmung des Tumorstadiums	27
2.2.2	Bestimmung der Tumorgradierung	30
2.2.3	Bestimmung des Hormonrezeptorstatus	32
2.2.4	Bestimmung der Apoptoserate im Tumorgewebe	32
2.2.5	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Univariate Überlebensanalyse	39
3.1.1	Gesamtüberleben aller Patientinnen	39
3.1.2	TNM-Klassifikation und ihre Komponenten	40
3.1.3	Grading und seine Komponenten	44

3.1.4	Östrogen- und Progesteronrezetorstatus	49
3.1.5	Apoptosebezogene Parameter	51
3.2	Multivariate Überlebensanalyse	59
3.2.1	Methodische Untersuchungen zu den Variablen der Apoptosequantifizierung	60
3.2.2	Berechnung eines Cox- Modells	63
3.2.3	Validierung des Cox-Modells am Datensatz	67
4	Diskussion	72
4.1	Therapeutischer Strategiewandel beim Mammakarzinom in den vergangenen 40 Jahren: Von radikalen zu weniger umfangreichen, individualisierten Konzepten	72
4.2	Veränderungen in der makroskopischen Aufarbeitung von Mammakarzinom	74
4.3	Erprobung und Etablierung morphologischer Marker in Therapieplanung und Prädiktion des klinischen Verlaufes ("Prognosemarker")	75
4.4	Stellenwert des Proliferationsmarkers Ki-67 beim Mamma- karzinom	77
4.5	Prognosestellung beim Mammakarzinom durch morpho- logisch charakterisierbare Apoptosemarker	78
4.6	Ausblick: Aktuelle Ansätze zur weiteren Prognoseverbesserung von Mammakarzinomen	89
5	Literaturverzeichnis	98

## 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit einer jährlichen Neuerkrankungszahl von knapp einer Million Fällen weltweit und rund 70.000 nationalen Fällen die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau (Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015; Tumorzentrum München, 2015) noch vor dem kolorektalen Karzinom, dem Bronchialkarzinom, dem Endometriumkarzinom und dem malignen Melanom der Haut (Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015, p. 18). Laut der Statistik des Robert-Koch-Instituts (RKI) und des Tumorregisters München (TRM) verstarben im Jahre 2010 zwischen ~ 17% und 25% der betroffenen Frauen (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015; Tumorregister München, 2015). Dabei lässt sich aus den Tabellen des TRM ablesen, dass das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, für die Frau im Alter zwischen 50 und 70 am höchsten ist. Etwa jede vierte erkrankte Frau ist bei der Diagnosestellung unter 55 Jahre, jede zehnte unter 45 Jahre alt (Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015, p. 75; Tumorregister München, 2015, p. 9). Das kumulative Erkrankungsrisiko, als neugeborenes Mädchen bis zum Alter von 75 Lebensjahren an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei 1:8 (12,8%) (Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).

Seit 1980 steigt die Brustkrebsinzidenz (Neuerkrankungsrate) laut den Angaben des RKI stetig an, wobei die Mortalitätsrate rückläufig ist und heute weniger Frauen versterben als vor 10 Jahren (Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2010). So liegt die Inzidenz in Deutschland je 100.000 Frauen bei 169,1 und die Mortalitätsrate je 100.000 Frauen bei 43,2 (Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).

Durch den medizinischen Fortschritt haben sich die Überlebenschancen deutlich verbessert. Dies mag zum einen daran liegen, dass seit der Etablierung des Mammographie-Screenings 2005 mehr Fälle in frühen Stadien erkannt werden. Außerdem sind auch Fortschritte in der systemischen adjuvanten bzw. neoadjuvanten Therapie eingetreten, die ebenfalls zu einer Verbesserung der Überlebensaussichten geführt haben. Auch trägt ein Umdenken in der Verordnungshaltung der Hormonersatztherapeutika im Periklimakterium zu einer sinkenden Inzidenz bei (Chlebowski et al., 2009; Katalinic et al., 2009).

Männer können ebenfalls am Mammakarzinom erkranken; die Inzidenz ist hier allerdings mit 1,6 je 100.000 Personen sehr niedrig. Das Robert-Koch Institut bezifferte 2012 620 Neuerkrankungen und 150 Sterbefälle. Am häufigsten sind Männer betroffen, die über erhöhte Spiegel weiblicher Geschlechtshormone ("Hyperöstrogenismus") verfügen, z.B. Patienten mit Leberzirrhose oder hormonbehandelte Patienten bei Prostatakarzinom (Schlappack et al., 1985; Sørensen et al., 1998).

## 1.2 Ätiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist wie viele andere Karzinome ein multifaktorielles Karzinom; einen "Regelfall" der Ätiologie gibt es nicht. Entsprechend wurde eine Vielzahl an Untersuchungen durchgeführt, um mögliche Risikofaktoren ausfinden zu machen (Haag et al., 2003; McPherson et al., 2000).

- Zuerst wäre da die genetische Disposition zu nennen, die das Tumorrisiko erhöht und bereits im Vorfeld in Untersuchungen der Keimbahn genetisch nachweisbar ist, nämlich in Form einer Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 bzw. BRCA2. Insgesamt gesehen macht diese Art von Tumorsuppressionsmutation rund 25% der bisher als erblich bedingt erkannten Mammakarzinom-Neuerkrankungen (Easton, 1999) und insgesamt 5-10% der gesamten Anzahl der Mammakarzinome aus (Campeau et al., 2008). Eine erste Mutation an einem Suppressorgen führt zum Ausfall des ersten Allels. Der Ausfall des zweiten Allels, der sog. "second hit", führt zum Ausfall der Genfunktion und erleichtert somit die Tumorentstehung.
- Ebenfalls zu berücksichtigen wäre die Familiengeschichte der Patientinnen. Bereits ohne Nachweis einer Mutation haben Frauen mit erblicher Vorbelastung im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom ein 1,5-6-fach erhöhtes Risiko zu erkranken (Brandt et al., 2010). Bei einer BRCA-Mutationsträgerin beträgt das Risiko, bis zum 70. Lebensjahr zu erkranken, 50-80% (Antoniou et al., 2003). Das Risiko steigt

zusätzlich bei einer Erkrankung im Verwandtenkreis 1. Grades unter 50 Lebensjahren um das 1,2-fache für BRCA-1 Mutationsträgerinnen, bei BRCA-2 um das 1,7-fache (Metcalfe et al., 2010).

- Zu weiteren Risikofaktoren gehören hormonelle Faktoren. Auf welche Weise diese das Tumorrisiko erhöhen, ist nicht geklärt. Allgemein kann man sagen, dass Frauen mit früher Menarche, später Menopause, keinen oder eher späten Schwangerschaften ein erhöhtes Risiko aufweisen (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012). Man könnte daraus folgern, dass ein Lebensverlauf mit vielen Östrogen-betonten Phasen ohne eine Unterbrechung durch längere Gestagen-betonte Phasen (Schwangerschaft) mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist. Bei Frauen, die ihre Kinder gestillt haben, wird ein geringeres Tumorrisiko veranschlagt.

Eine äußere Hormonzufuhr durch die Einnahme von Kontrazeptiva führt dagegen zu einem nur geringem Risikoanstieg von 1,24 und ist 10 Jahre nach Beendigung der Einnahme nicht mehr relevant (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996). Eine Hormonsubstitution während der Menopause erhöht ebenfalls das Brustkrebsrisiko und zeigte sich abhängig von der Dauer der Östrogensubstitution und der alleinigen Anwendung oder in der Kombination mit Progesteron (Ross et al., 2000).

- Ernährungstechnisch hat sich gezeigt, dass Frauen, die zu Adipositas neigen, ein erhöhtes Risiko haben. Generell ist ein zu großer Anteil an fettreicher Nahrung negativ zu werten. Frauen, die nach der Postmenopause zu Bewegungsmangel und erhöhten Fettdepots neigen, zeigen ebenfalls ein signifikantes erhöhtes Risiko, am Mammakarzinom zu erkranken. Dabei wäre auch ein Augenmerk auf die Dichte der Brustdrüse zu legen. Eine erhöhte Dichte, also relativ mehr Drüsengewebe, schlägt sich in einer höheren Wahrscheinlichkeit, ein Mammakarzinom zu entwickeln, nieder. Rauchen und Alkoholabusus zeigten ebenfalls eine positive Korrelation zur Mammakarzinom-Inzidenz.
- Offenbar spielt auch die geographische Lage bzw. ethnische Herkunft bei der Inzidenz des Mammakarzinoms eine Rolle. So findet sich eine erhöhte genetische Disposition vor allem bei jüdischen Frauen. Ebenfalls zeigen sich erhöhte Inzidenz- und Mortalitätsraten in nordamerikanischen und nordeuropäischen Ländern, während niedrige Raten im afrikanischen und asiatischen Raum zu finden sind (Kelsey, 1979).

Für diese Verteilung gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Eine Hypothese stützt sich auf Migrationsstudien, die den Anstieg der Mammakarzinominzidenz bei asiatischen Frauen nach ihrer Auswanderung in die USA in der 2. und 3. Generation zeigt (Buell, 1973). Hier sah man den Wandel der Lebens- und Essgewohnheiten, vor allem von pflanzenreicher, fettarmer zu fleisch- und fettreicher Nahrung als ursächlich an.

Andere diskutierte Einflüsse sind Umweltfaktoren, wie die Belastung der natürlichen Umwelt durch Östrogene und radioaktive Strahlung, ein höherer Sozialstatus, der mit einem höherem Alter bei der Erstgeburt bzw. Nullipara oder einem höheren Gebrauch an Hormonersatz assoziiert wird, oder auch virale Infektionen.

Die Möglichkeit zur Ausbildung eines Mammakarzinoms ist somit offensichtlich multikausal. Entscheidend für den Verlauf der Erkrankung ist es, eine gesicherte möglichst frühe Erkennung zu erreichen sowie optimierte Therapien und eine Interdisziplinarität in der Behandlung zu gewährleisten.

#### **1.3** Pathologie des invasiven Mammakarzinoms

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine maligne Tumorform, die sich durch große Heterogenität auszeichnet und bei der es weitere spezielle Differenzierungsformen gibt. Bei den invasiven Formen wurden von der WHO lange insbesondere eine invasiv-duktale und eine invasiv-lobuläre Entität unterschieden, die auch in unserem Patientenkollektiv differenziert wurden (Tavassoli and Devilee, 2003). Außerdem sind diverse Sondertypen definiert. Inzwischen werden nach der neuen WHO-Klassifikation von 2012 (Lakhani et al., 2012) die invasiv-duktalen Karzinome als "invasives Adenokarzinom (NST / duktal)" bezeichnet, wobei "NST" für <u>no special type</u> steht. Im Folgenden wird aber bei der Bezeichnung als invasiv-duktal, die zur Zeit der Zusammenstellung des Patientenkollektivs galt und die sich auch in den allermeisten Publikationen in der Literatur findet, geblieben.

Das invasiv-duktale Mammakarzinom ist mit ca. 60-75% der Fälle am häufigsten, gefolgt vom invasiv-lobulären Karzinom mit ca. 15-20%. Auch Mischformen, die "duktolo-lobulär"

genannt werden, sind möglich. Daneben gibt es viele weitere, oft prognostisch günstige, aber seltene Unterformen, die separat geführt werden, darunter das medulläre Karzinom (1-7%), das tubuläre Karzinom (1-2%), das muzinöse Karzinom (1-2%) und das papilläre Karzinom(1-2%) (Tumorzentrum München, 2015); die Häufigkeit von Langzeitrezidiven (Rosen et al., 1989) wird bei ihnen nur mit ca. 10% angegeben. Andere seltene Sonderformen sind beispielsweise das lipidreiche Karzinom, das adenoid-zystische Karzinom oder das apokrine Karzinom. Die Differenzierung zwischen den einzelnen Tumortypen erfolgt auf der Basis ihrer histologischen Wachstumsformen; in Zweifelsfällen darüber, ob eine invasivlobuläre Differenzierung vorliegt, wird eine E-Cadherin-Immunhistochemie durchgeführt, deren negativer Ausfall im Tumor einen invasiv-lobulären Tumortyp nahelegt, aber nicht beweist.

Allen Mammakarzinomen gleich ist ihre Entstehung in der terminalen duktulo-tubulären Einheit (TDLU), oftmals auf dem Boden von Tumorvorstufen wie dem duktalen Carcinoma in situ (DCIS), möglicherweise auch dem Carcinoma lobulare in situ (LIN3). Andere Veränderungen in der Brustdrüse sind nicht selber sicher präkanzerös, werden aber als "Indikatorläsion" für ein erhöhtes Risiko, ein invasives Mammakarzinom zu entwickeln, gerechnet, darunter die flache Epithelatypie der Milchgänge (FEA) und die atypische duktale Hyperplasie (ADH).

Die Prognose der invasiv-duktalen und der invasiv-lobulären Mammakarzinome gilt stadienbezogen als gleich. Der klinisch-morphologische Unterschied beider Tumorentitäten ist allerdings, dass die Tumorgröße beim invasiv-duktalen Karzinom im Wesentlichen dem Palpations- und Mammographiebefund entspricht, während invasiv-lobuläre Karzinome manchmal unerwartet viel größer sind. Dies liegt daran, dass man präoperativ nicht die wirkliche Tumorgröße bestimmt, sondern die Größe des Bezirks, in dem tumor-assoziiert oder tumor-induziert eine bindegewebige Sklerosierung des ortsständigen Fettgewebes entstanden ist. Invasiv-duktale Karzinome halten sich üblicherweise recht streng begrenzt nur in oder an dieser Sklerosierungszone auf, während invasiv-lobuläre Karzinome über die Fähigkeit verfügen, in kleinsten Strängen und Verbänden über diese Zone hinaus in das angrenzende, palpatorisch und mammographisch unauffällige Fettgewebe vorzuwachsen. Außerdem können sie in das Mantelbindegewebe von Milchgängen eindringen und sich in diesem unter konzentrischer Umwachsung der Milchgänge ausbreiten und auch auf diese Weise weit jenseits der Sklerosierungszone angetroffen werden.

## 1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms

#### <u>Klinik</u>

Allgemeinsymptome fehlen im frühen Stadium des Mammakarzinoms. Im späteren Verlauf bzw. fortgeschrittenem Stadium kann es zu Gewichtsabnahmen und Leistungsminderungen kommen. Lokale Symptome können sich als tastbare Knoten, Hautveränderungen einschließlich *peau d'orange* (sog. Orangenhaut oberhalb des Tumors), Einziehungen der Haut und der Mamille, Veränderungen der Kontur oder der Symmetrie der Brust, Blutungen oder Sekretion der Mamille sowie bestehender flächiger Rötung und Überwärmung (bei einem inflammatorischen Mammakarzinom) darstellen. Weiterhin gelten vergrößert tastbare Lymphknoten in der Axilla oder der Supraklavikularregion als mögliche lokale Symptome.

Primärmanifestationen lassen sich zu 50% im oberen äußeren Quadranten der Brust lokalisieren, am seltensten im unteren inneren Quadranten. Die übrigen verbleibenden Quadranten und der zentrale Anteil sind in etwa gleichen Anteilen betroffen. Dabei spricht man bei einem Auftreten von mehreren, aber getrennten Karzinomherden in einem Quadranten bzw. bei einem Abstand von unter 4 cm zwischen den Herden von Multifokalität. Das Auftreten von getrennten Karzinomherden in mehr als einem Quadranten bzw. einem Abstand über 4 cm bezeichnet man als Multizentrizität (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012).

Von der Lokalisation der Primärmanifestation ausgehend unterscheidet man zwischen lokaler, regionaler und ferner Metastasierung. Bei der lokalen Ausbreitung kommt es zur direkten Infiltration in das Nachbarparenchym und zu einer lokalen Ausbreitung entlang der Milchgänge. Regional erfolgt die Ausbreitung über die axillären, supra- und infraklavikulären und zentral der Mamma gelegene Lymphknoten. Fernmetastasen können in fast allen Regionen des Körpers auftreten. Häufigste Lokalisationsorte sind dabei Skelett, Leber, Lunge und Gehirn. Symptomatisch für eine Metastasierung des Tumors können Schwellungen des Armes durch Lymphödem bei einer Lymphknotenmetastasierung in der Axilla,

Knochenschmerzen bei Skelettmetastasen, Husten und Dyspnoe bei pulmonaler und / oder pleuraler Metastasierung, Ikterus und Leberinsuffizienz bei Lebermetastasierung und neurologische Symptome bei cerebraler Metastasierung sein (Wörmann et al., 2018). Vielfach verläuft die Metastasierung aber längere Zeit asymptomatisch.

#### **Diagnostik**

Nach einer positiven, also befundauffälligen Basisuntersuchung, bestehend aus der Inspektion und der Palpation der Brust und der Lymphabflussgebiete, ist der erste Schritt die Bestätigung der klinischen bildgebenden Verdachtsdiagnose.

Die weiterführende Methode der ersten Wahl ist dabei die beidseitige Mammographie der Brust. Da es sich dabei um eine Untersuchung basierend auf Röntgenstrahlen (4 mGy Dosis) handelt und die Sensitivität bei steigender Dichte der Brust um bis zu 50% abnehmen kann, wird bei Frauen < 40 Jahren als Mittel der ersten Wahl auch die Sonographie empfohlen (Tumorzentrum München, 2015, p. 37).

Die zusätzliche Nutzung der beidseitigen Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittelgabe dagegen wurde bei der Konsensuskonferenz in St. Gallen 2013 als Standard für eine präoperative Abklärung wie auch als Routinemaßnahme bei der Entscheidungshilfe für oder gegen Brusterhalt abgelehnt. Das MRT erhöht zwar die Nachweisrate zusätzlicher Läsionen und kann das operative Vorgehen beeinflussen, aber bisher konnte kein Nachweis erbracht werden, dass durch eine präoperative MRT-Abklärung die Prognose verbessert oder die Rezidivquote gesenkt wird (Houssami et al., 2008; Tumorzentrum München, 2015, p. 55).

Die nach Bildgebung verbleibenden auffälligen Brustbefunde bedürfen einer histologischen Abklärung. Die früher verbreitete primäre offene Exzisionsbiopsie sollte gemäß der aktuellen S3-Leitlinie nur noch angewandt werden, wenn eine der gerade genannten bildgebenden Verfahren nicht möglich ist (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012, chap. 4.2.3.2), und wird heutzutage kaum noch ausgeführt. Stattdessen bedient man sich der bildgebenden Stanz- oder Vakuumbiopsie.

Die Stanzbiopsie dient im Falle eines manifesten Mammakarzinoms bereits der Bestimmung erster tumorrelevanter morphologischer Faktoren. Neben der Bestimmung des Tumortyps gemäß WHO-Klassifikation sollte auf eine DCIS-Komponente eingegangen werden. Außerdem ist üblich, an den Stanzen bereits ein Grading (Elston and Ellis, 1991) vorzunehmen, welches aber am Resektionspräparat wiederholt werden soll. Ferner werden immunhistochemische Färbungen zur Darstellung einer Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor-Expression (ER, PR) vorgenommen und auf die gleiche Weise der HER2/neu-Status bestimmt.

Sofern man sich klinischerseits nicht für ein neoadjuvantes Vorgehen entscheidet, folgt dann die stadiengerechte Tumorresektion gemäß den gültigen S3-Leitlinien (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012), die heute in den meisten Fällen als anatomisches Segmentresektat (z.B. "Mammasegmentresektat links 8 - 9 Uhr") vorgenommen wird. An diesem werden vom Pathologen erneut Aussagen zum Tumortyp und zum Grading erwartet, ferner die dreidimensionale Bestimmung der Tumorausdehnung inklusive Übertragung der Messwerte in die pT-Kategorie der pTNM-Klassifikation (Sobin et al., 2010). Außerdem sind Angaben zu den Sicherheitsabständen zu allen sechs Dimensionen (mamillennah, mamillenfern, ventral, thorakal sowie zu den beiden Nachbarsegmenten, auf das obige Beispiel bezogen: Richtung 7 Uhr und 10 Uhr) zu tätigen und daraus der R-Status abzuleiten. Außerdem ist es üblich geworden, die eigentlich noch fakultativen Angaben zu einer Lymphangiosis carcinomatosa (L) und einer Hämangiosis carcinomatosa (V) zu machen. Sofern keine technischen Probleme aufgetreten waren, ist eine Wiederholung der Bestimmungen von ER, PR und HER2/neu am Resektat nicht vorgesehen.

Leicht modifiziert ist die Vorgehensweise, wenn nach neoadjuvanter Therapie operativ vorgegangen wird. Das Tumorgrading wird durch den Regressionsgrad nach Sinn (Sinn et al., 1994), der die Reaktion des Tumors auf die Chemotherapie abschätzen soll, ersetzt. Außerdem werden die Bestimmungen von ER, PR und HER2/neu am Resttumor wiederholt, um Erkenntnisse über therapierelevante Veränderungen der Expressionsmuster zu erhalten.

Die Diagnose eines invasiven Mammakarzinoms zieht auch ein Staging zur bildgebenden Abklärung von eventuellen Fernmetastasen nach sich, welche neben einer Skelettszintigraphie eine Lebersonographie bzw. ein Oberbauch-CT und eine bildgebende Abklärung der Lunge umfasst.

#### Therapie

Die stadiengerechte adäquate Therapie eines Mammakarzinoms ist heute im Wesentlichen multimodal und schließt operative Maßnahmen und adjuvante Ansätze wie Strahlentherapie, Chemotherapie, Hormontherapie und Therapieformen mit Antikörpern ein. Im Rahmen dieser Arbeit können nur die Prinzipien kurz skizziert werden, wobei betont werden soll, dass sich Details der Therapie im stetigen Wandel befinden und immer wieder aktuell an die Ergebnisse von Studien angepasst werden.

#### Neoadjuvante Therapie

Der häufigen primär operativen Therapie soll hier die seltenere neoadjuvante Therapie vorangestellt werden, weil in den betroffenen Fällen eine adjuvante Maßnahme der operativen Therapie vorausgeht - bezeichnet mit dem *Misnomer* "neoadjuvant", womit also eigentlich "präoperativ adjuvant" gemeint ist. Laut dem Jahresbericht 2017 der deutschen Krebsgesellschaft wurde in 7036 Fällen eine neoadjuvante Therapie vor OP eingeleitet, dies entsprach knapp 13% der an zertifizierten Brustkrebszentren betreuten Patienten (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. et al., 2017). Ihr Sinn liegt darin, bei großen oder multizentrischen Tumoren bzw. bei sich extrem über die Lymphwege ausbreitenden Tumoren, den "inflammatorischen Karzinomen", die Operabilität der Patientin zu erleichtern bzw. auch eine brusterhaltende Therapie zu ermöglichen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012). Sollte eine systemische Chemotherapie grundsätzlich indiziert sein, besteht auch die Möglichkeit, sie optional bei primär operablen Mammakarzinomen einzusetzen, um eine Verkleinerung des Tumors bzw. möglichst vollständige Elimination der Tumorzellen zu erreichen. Hinsichtlich des Langzeitüberlebens ist die neoadjuvante Therapie der adjuvanten Therapie gleichwertig.

Zudem erlaubt dieses Therapiekonzept durch regelmäßige Kontrollen des Ansprechens eine Individualisierung der Therapie (Kaufmann et al., 2006). Als valider Surrogatmarker für das Ansprechen einer neoadjuvanten Chemotherapie und ein längeres progressionsfreies Gesamtüberleben dient die Beurteilung der Rate der pCR (pathologische Komplettremission). Sie ist definiert als fehlender Tumorzellnachweis in Brust- und Lymphknotengewebe nach erfolgter neoadjuvanter Chemotherapie und gilt für Triple-negative, für Hormonrezeptornegative und gleichzeitig HER2/neu-positive sowie für Luminal  $B^1$  eingestufte und HER2/neu-negative Tumorkonstellationen (Minckwitz et al., 2012).

Wenn eine neoadjuvante Chemotherapie indiziert ist, sollte in der Medikation ein Anthrazyklin und ein Taxan enthalten sein und eine Dauer von mindestens 6 Zyklen präoperativ beinhalten. Nach zwei Zyklen sollte der Therapieeffekt kontrolliert werden. Hierbei macht sich ein Vorteil der neoadjuvanten Therapie bemerkbar, da frühzeitig die Chemosensibilität des Primärtumors beurteilt und je nach Befund die Therapie weitergeführt, umgestellt oder abgebrochen werden kann.

Zusätzlich kann präoperativ zur Chemotherapie bei HER2/neu-überexprimierenden Tumoren die Gabe von Trastuzumab die pCR und somit das Gesamtüberleben signifikant erhöhen (Minckwitz et al., 2012). Wie in der adjuvanten Therapie sollte auch hier die Gabe von Trastuzumab postoperativ über ein Jahr fortgesetzt werden.

Eine weitere neoadjuvante Therapieform stellt die endokrine Therapie mit Aromatasehemmern bei postmenopausalen, hoch rezeptorpositiven Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Mammakarzinom dar, bei denen eine Operation kontraindiziert oder abgelehnt worden ist (Smith et al., 2005).

## **Operative Therapie**

Die operative Therapie ist überwiegend brusterhaltend und beschränkt sich, anders als dieses noch vor 30-40 Jahren war, in den meisten Fällen auf eine anatomische Resektion eines oder mehrerer Segmente. Stellt sich in der morphologischen Untersuchung heraus, dass der Tumor mit einem gewissen Sicherheitsabstand im Gesunden entfernt ist, wird derzeit keine weitere operative Therapie für notwendig gehalten. Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass die brusterhaltende Therapie (BET) mit adjuvanter Bestrahlung des Restdrüsenkörpers der modifiziert radikalen Mastektomie bezüglich des Überlebens gleichwertig ist (Fisher et al., 2001; Veronesi et al., 2002). Eine modifiziert-radikale Mastektomie, die früher Standard-therapie war, wird heute nur noch in bestimmten Situationen vorgenommen werden müssen, beispielsweise bei sehr großen Tumoren der Stadien T3 und T4, insbesondere auch bei einem inflammatorischen Karzinom, oder bei multizentrischem Tumorwachstum (Tumorzentrum

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Auf Definitionen für "Luminal B" und für "Luminal A" wird unten in Kapitel 1.5 eingegangen.

München, 2015, p. 122). Weitere Kontraindikationen für ein operatives Vorgehen mit Brusterhalt können aber auch eine ungünstige Relation von Tumorgröße zu Brustvolumen, etwaige Kontraindikationen für eine nachfolgende Bestrahlung (z.B. extreme Makromastie) oder eine inkomplette Tumorentfernung auch nach Nachresektion (bei einem Sicherheitsabstand von 1 mm für die invasive Komponente und 2mm für die intraduktale Komponente) sein (Houssami et al., 2010).

Die operative Therapie des Primärtumors wird mit einer intraoperativen Inspektion der Axilla kombiniert. Üblicherweise wird dort eine Entfernung des oder der zuvor nuklearmedizinisch markierten Sentinel-Lymphknoten vorgenommen. Hierunter versteht man den oder die ersten Lymphknoten, die das Mammakarzinom drainieren und somit die Lymphknoten mit der höchsten Wahrscheinlichkeit auf eine Karzinominfiltration sind. Generell nehmen der bzw. die Sentinel-Lymphknoten als erste den periareolär eingespritzten Tracer auf. Die Aufarbeitung dieser Lymphknoten erfolgt Leitlinien-gerecht in enger Serienschnitt-Technik. Sind die Sentinel-Lymphknoten tumorfrei, so wird zur Vermeidung von Nebenwirkungen (therapieresistentes chronisches Lymphödem, Dysästhesien, Bewegungseinschränkungen und chronische Schmerzzustände) heutzutage nicht mehr radikal axillär disseziert; die lokale Morbidität ist bei alleiniger Entnahme der Sentinel-Lymphknoten gegenüber einer herkömmlichen axillären Lymphknotendissektion signifikant reduziert (Veronesi et al., 2003). Anders ist das Vorgehen, wenn sich bereits palpable, womöglich auch harte Lymphknoten in der Axilla primär präsentieren. Findet sich in den Sentinel-Lymphknoten eine Metastasierung, die über eine sogenannte Mikrometastasierung, also eine 2 mm große Lymphknotenmetastase, hinausgehen, so werden zumindest die Lymphknoten des axillären Level I, nicht selten auch die des Level II, in einem zweiten Eingriff entfernt. Eine solche Axilladissektion umfasst die Entfernung von mindestens 10 Lymphknoten.

Die Untersuchung axillärer Lymphknoten dient der histopathologischen Tumorklassifikation, der Prognoseabschätzung und als prädiktiver Faktor für eine mögliche adjuvante systemische Therapie.

Bei der Konsensuskonferenz in St. Gallen ist die Vorgehensweise, bei positiven Sentinel-Lymphknoten die axilläre Lymphknotendissektion vorzunehmen, hinterfragt worden, basierend auf der Anfang 2011 publizierten Z0011-Studie (Giuliano et al., 2010). Patientinnen mit einem Tumorstadium pT1-pT2/cN0 und 1-2 positiven Sentinel-Lymphknoten wurden mit einer brusterhaltenden Therapie mit nachfolgender perkutaner Radiotherapie über tangentiale Gegenfelder behandelt. Es ergab sich kein Nachteil gegenüber einer Axilladissektion. Unter bestimmten Rahmenbedingungen wäre somit ein Verzicht auf eine Axilladissektion auch bei positiven Sentinel-Lymphknoten möglich.

## <u>Strahlentherapie</u>

Allgemein soll eine Bestrahlung der betroffenen Brustdrüse nach brusterhaltender Operation bei invasivem Mammakarzinom durchgeführt werden. Dies schließt man aus Studien, die eine Verbesserung des Gesamtüberlebens und die Senkung lokoregionärer Rezidive angeben (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005, 2011; Fisher et al., 2002). So verringert sich die Rezidivrate bei pN0 von 28,3% auf 10,4%, bei pN+ von 39,9% auf 10,9%, bezogen auf 15 Jahre (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012, p. 126), während die erkrankungsspezifische Mortalität um 3,3 % bei pN0 und um 8,5% bei pN+ reduziert wird. Vier bis sechs Wochen nach der Operation sollte mit der Bestrahlung begonnen werden, alternativ nach Abschluss einer vorgeschalteten adjuvanten Chemotherapie.

Das Zielvolumen schließt dabei die gesamte verbliebene Brustdrüse und die angrenzende Thoraxwand ein. Bis vor einigen Jahren galt die Dosis einer sog. konventionellen Fraktionierung von 5 x 1,8-2 Gy über 5-6 Wochen, was somit 45-50 Gy entsprach, als Mittel der Wahl. Aktuelle Studien hinsichtlich einer moderaten Hyperfraktion zeigen jedoch ebenfalls gute Ergebnisse hinsichtlich der Tumorkontrolle und Spättoxizität an (Haviland et al., 2013; Whelan et al., 2010). Hyperfraktion bedeutet, dass die Einzeldosis sich erhöht, die Anzahl der Fraktionen jedoch verringert wird, sodass sich die Gesamtdosis insgesamt reduziert. Für die Patientinnen bedeutet dies 15-16 Fraktionen anstelle der 25-28 bei einer Verkürzung der Behandlungszeit von 5-6 Wochen auf 3 Wochen, insgesamt mit gleicher lokaler Tumorkontrolle, verminderter akuter Hautreaktion und tendenziell verminderten Spätfolgen (Zhou et al., 2015).

In wie weit eine weitere Erhöhung der Einzelfraktionen bzw. eine weitere Verkürzung der Behandlungszeit sinnvoll ist, ist Gegenstand derzeitiger Studien. Jüngere Frauen und Frauen mit erhöhtem Rezidivrisiko profitieren zusätzlich noch von einer Dosisaufsättigung des

12

Tumorbettes (Boost-Bestrahlung) um 10-16 Gy, die zu einer Senkung der lokalen Rezidivrate führen kann. Sie sollte obligat bis zum 50. Lebensjahr erfolgen (Tumorzentrum München, 2015, p. 133).

Ebenfalls empfohlen wird eine Strahlentherapie der Axilla bei bestehendem Resttumor in der Axilla bzw. bei eindeutig klinischem Befall und nicht erfolgter Axilladissektion (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012, p. 147). Bei Patientinnen mit Bestrahlung der Lymphabflusswege gilt weiterhin die konventionelle Fraktionierung als 1. Therapiewahl, da derzeit die Datenlage zu schwach ist.

## Adjuvante Therapie

Unabhängig vom Alter der Patientinnen und Nodalstatus verbessert eine systemische Therapie in Form einer zytotoxischen Chemotherapie das rezidivfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2012). Die genauen Vorgehensweisen bei der Chemotherapie können hier nicht umfassend dargestellt werden und unterliegen stetig Veränderungen im Rahmen der Ergebnisse von aktuellen Studien, in die viele Patientinnen eingeschleust werden. Eine typische Anthrazyklin- und Taxan-haltige adjuvante Chemotherapie dauert 18-24 Wochen (6-8 Zyklen).

Die Gabe einer anti-östrogenen endokrinen Therapie ist im Wesentlichen an die immunhistochemische Positivität des Östrogenrezeptors gebunden und kann mit zentral (GnRH-Analoga) bzw. peripher (z. B. Tamoxifen) angreifenden Pharmaka erfolgen. Ca. 65-75% der Mammakarzinome zeigen eine Expression von Östrogen- und / oder Progesteron-rezeptoren (Miller et al., 2014).

Patientinnen mit primärem Mammakarzinom mit einem Durchmesser  $\geq 1$ cm und HER2/neu-Überexpression sollten zur Chemotherapie eine anti-HER2/neu-Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab erhalten. Die Dauer der Antikörpertherapie beträgt 1 Jahr. Trastuzumab wird dabei als Infusion oder subkutane Injektion wöchentlich oder in 3-wöchentlichen Intervallen verabreicht. Hierbei ist eine Überwachung einer adäquaten Herzfunktion obligat, diese sollte während (alle 3 Monate) und nach der Behandlung (2-5 Jahre) erfolgen.

## Risikogruppen nach St. Gallen (2007)

Es gibt somit bestimmte Kriterien, mit denen sich das Rezidivrisiko für Frauen mit Brustkrebs einschätzen lässt. Auf der Konferenz von St. Gallen wurden 2007 drei Risikokategorien gebildet, die wiederum auf den in drei Gruppen angeordneten Lymphknotenstatus, der vielfach als der wichtigste Prognosefaktor gilt, bezogen werden. Da manche Kombinationen, z.B. pN0 / hohes Risiko, unbesetzt sind, werden statt theoretisch neun nur fünf verschiedene Konstellationen unterschieden (Tabelle 1):

pN-Status	Rezidivrisiko		
	niedrig	mittel	hoch
pN0	alles erfüllt:	mind. 1 erfüllt:	
	• Tumor $\leq 2 \text{ cm}$ (pT1a - pT1c)	• Tumor > 2 cm (ab pT2)	
	• G1	• G2/G3	
	<ul> <li>keine Blut- gefäßinvasion</li> </ul>	<ul> <li>Blutgefäß- invasion</li> </ul>	
	• ER- oder PR- positiv	• ER- und PR- negativ	
	• HER-2/neu- negativ	• HER-2/neu- positiv	
	• $\geq$ 35 Jahre	• < 35 Jahre	
pN+ (1–3 LK)		ER- PR-positiv und HER-2/neu-negativ	ER- und PR-negativ oder HER-2/neu- positiv
pN+ (≥ 4 LK)			immer

**Tab 1:** Einschätzung des Rezidivrisikos von Mammakarzinomen als niedrig, mittel oder hoch durch Kombination des Lymphknotenstatus mit weiteren morphologischen Größen gemäß der St. Gallen-Konvention von 2007 (Goldhirsch et al., 2007)

Wegen der schlechteren Prognose schließt sich postoperativ insbesondere für Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko eine Chemotherapie an (Goldhirsch et al., 2007). Bei Frauen mit einem vergleichsweise niedrigen Risiko (Luminal A, nur 1-3 LK befallen) kann man unter Umständen auf eine adjuvante Chemotherapie verzichten, dennoch sollte hier eine endokrine Therapie, prämenopausal mit Aromatasehemmern, postmenopausal zumeist mittels Tamoxifen, stattfinden (Goldhirsch et al., 2007). Moderne molekulare Testverfahren wie z.B. der OncoType- oder der Endopredict-Test werden derzeit dazu eingesetzt, diejenigen Patientinnen möglichst exakt zu identifizieren, bei denen trotz formaler Indikation hierzu vielleicht doch auf eine Chemotherapie verzichtet werden kann.

## 1.5 Prognostische und prädiktive Faktoren

Prognosefaktoren geben zum Zeitpunkt der Diagnose einer Erkrankung Informationen über den zu erwartenden Krankheitsverlauf, vor allem in Bezug auf das Rezidiv-freie Überleben und das Gesamtüberleben. Prädiktive Faktoren helfen bei der Entscheidung zu einer Therapieoption bzw. machen eine Aussage über das wahrscheinliche Therapieansprechen adjuvanter oder neoadjuvanter Ansätze.

Folgende Faktoren, die in ihrer prognostisch klinischen Relevanz unbestritten sind, werden derzeit beim Mammakarzinom als obligat betrachtet und daher auch routinemäßig erhoben:

- Die international anerkannte TNM-Klassifikation der UICC (Sobin et al., 2010) ("Staging") mit ihren drei obligaten Faktoren Tumorgröße (pT), Lymphknotenstatus (pN) und Fernmetastasen (pM) und den derzeit noch fakultativen Angaben zu einer eventuellen Lymphspalten- (L) bzw. Blutgefäßinvasion (V) sowie zur Beurteilung des Resektionsrandes (R) spielt in der Prognostik des Mammakarzinoms die größte Rolle. Dabei stellt der axilläre Lymphknotenstatus (pN) den prognostisch stärksten Einzelfaktor dar. So korreliert der Lymphknotenstatus direkt mit der Rezidiv- und Metastasenhäufigkeit als auch dem Gesamtüberleben (Atkinson et al., 1986; Bloom and Richardson, 1957; Carter et al., 1989; Soerjomataram et al., 2008; Veronesi et al., 1993).
- Die histologische Tumordifferenzierung nach Bloom und Richardson ("Grading"), modifiziert durch Elston und Ellis (Elston and Ellis, 1991; Lakhani, 2012; Sobin et al., 2010; Tavassoli and Devilee, 2003), ist ebenfalls von großer Bedeutung geblieben.

Die drei zugrunde gelegten histologischen bzw. zytologischen Kriterien sind die Bildung tubulärer bzw. duktaler Tumorstrukturen, die Kernpleomorphie und die Mitoserate. Obwohl das Grading einen sehr aussagekräftigen Faktor für die Prognose und die Therapie darstellt (Silverstein et al., 1996), findet es auch seine Grenzen, z.B. in der eingeschränkten Reproduzierbarkeit, und ist stark von der Erfahrung des beurteilenden Pathologen abhängig (Champion and Wallace, 1971; Remmele, 1997)

- Die immunhistochemische Bestimmung der Expression des Östrogenrezeptors (ER) und des Progesteronrezeptors (PR) im Tumorgewebe ist, wie bereits oben erwähnt, beim Mammakarzinom Standard. Ausgedrückt wird sie im deutschsprachigen Raum durch den semiquantitativen Remmele-Score (Remmele and Stegner, 1987). Insbesondere das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren wird als prognostisch günstig und hinweisend auf ein geringeres Rezidivrisiko und ein verbessertes Gesamtüberleben angesehen (Roodi et al., 1995). 70% der Mammakarzinome Fälle sind Östrogenrezeptor-positiv (Lumachi et al., 2013; Miller et al., 2014). Die Hormonrezeptor-Bestimmung hat nicht nur prognostische, sondern auch prädiktive Aussagekraft, da bei einem positiven Befund eine anti-östrogene Hormontherapie indiziert ist (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012). So liegt die Ansprechrate einer endokrinen Therapie mit Tamoxifen bei 50% bei Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom, aber nur bei 5% bei Östrogenrezeptornegativen Patienten (Osborne, 1998). Oftmals sind ER und PR gleichgerichtet in ihrer Ausprägung, was zu einem Therapieansprechen von 70-80% führt. Es kommen aber auch Fälle vor, in denen die Ergebnisse divergieren und das Therapieansprechen auf Tamoxifen verringert ist (Arpino et al., 2005). Dabei wird dem alleinigen Nachweis von Progesteronrezeptoren keine klare signifikante Aussagekraft zugewiesen (ER-, PR+), einer alleinigen Östrogenrezeptorexpression (ER+, PR-) hingegen schon. Dies ist darauf zurück zu führen, dass Progesteronrezeptoren als Produkt der aktivierten Östrogenrezeptoren gebildet werden (Horwitz and McGuire, 1975). Patientinnen mit hormonnegativen Tumoren (ER-, PR-) sprechen signifikant besser auf die primäre Chemotherapie an als hormonrezeptorpositive Patientinnen (Fisher et al., 2001).
- Ebenfalls einen hohen pr\u00e4diktiven Wert hat der HER2-neu-Status, der in Deutschland üblicherweise durch Immunhistochemie, bei bestimmten Konstellationen auch per *in situ*-Hybridisierung (ISH) erhoben wird. Er macht eine Aussage \u00fcber das prospektive Ansprechen auf Antik\u00f6rper wie Trastuzumab, seine Statuserhebung ist inzwischen

Standard bei neu diagnostizierten Mammakarzinomen. HER2-neu stimuliert die Zellproliferation und hemmt die Apoptose. Er hat bei einigen Tumorpatientinnen einen großen Einfluss auf das Tumorwachstum. So liegt bei 20-25% aller invasiven Mammakarzinome eine Überexpression des HER2-neu-Rezeptors vor, was mit einer schlechteren Überlebensprognose korreliert (Untch et al., 2006). Die Therapie mit Trastuzumab bremst das Tumorwachstum durch Blockade des Rezeptors und wurde anfangs nur Patientinnen mit metastasieren Mammakarzinom gegeben, da Trastuzumab vor allem in Verbindung mit einer Chemotherapie zu längerem Überleben führte (Marty et al., 2005). Nach derzeitiger S3-Leitlinienempfehlung ist eine adjuvante Behandlung nach Operation mit Trastuzumab auch bei allen Nodalpositiven sowie -negativen Tumoren mit einem Durchmesser > 1 cm mit HER2/neu-Überexpression grundsätzlich indiziert (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012). Da die alleinige Wirkung von Trastuzumab derzeit nicht belegt ist, wird die Behandlung vorzugsweise simultan mit der adjuvanten Chemotherapie begonnen (Petrelli and Barni, 2012). Die Dauer der Therapie beträgt 1 Jahr. Liegt die Indikation für eine Chemotherapie bei Tumoren < 1 cm vor, sollte zusätzlich ebenfalls Trastuzumab gegeben werden, sofern keine Kontraindikationen (z.B. bekannte Herzinsuffizienz) vorliegen.

Bei Ki-67 handelt es sich um ein Proliferationsprotein, das ausschließlich während der Zellteilung im Zellkern exprimiert wird. Es ist nur in Zellen der S-, G2- und der M-Phase des Zellzyklus zu finden, nicht dagegen in ruhenden Zellen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase. Somit dient es der Differenzierung zwischen aktiven und ruhenden Tumorzellpopulationen und gibt einen Aufschluss über die Proliferationsaktivität des Gewebes. Der paraffingängige monoklonale Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung des Ki-67-Proteins heißt MIB-1. Das Wachstum eines Tumors ist geringer, wenn der prozentuale Wert für Ki-67 niedrig ist. Ein erhöhter Wert dient der therapeutischen Entscheidung für eine zytostatischen Chemotherapie, z B. zusätzlich zur antihormonellen Therapie bei ER-positiven Tumoren (Tumorzentrum München, 2015, p. 94).

Mit Hilfe der genannten Parameter wurde im St. Gallen-Konsensus 2011 eine neue molekulare Typisierung der Mammakarzinome vorgeschlagen und eine Basis für die Empfehlung adjuvanter systemischer Therapie erarbeitet (Tabelle 2) (Goldhirsch et al., 2011).

Dabei werden Hormonrezeptor-positive und HER2-negative Tumoren mit einer niedrigen Proliferationsrate als "Luminal A" gewertet, Tumoren mit einer hohen Proliferationsrate als "Luminal B". Ein Problem dieser Typisierung ist die Definition der Ki-67-Ausprägung als "niedrig" oder "hoch", da der Standardisierungsgrad dieser Anwendung eine Verallgemeinerung ebenso wenig zulässt wie die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Untersuchung (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012, p. 165). Werte von  $\leq$ 10% werden als niedrig proliferierend, Werte über 20-25% als hoch proliferierend eingestuft (Coates et al., 2015).

Molekularer Subtyp	Subgruppe	Definition	Therapie
Luminal A		<ul> <li>ER / PR positiv</li> <li>HER2 negativ</li> <li>Ki67 niedrig</li> </ul>	Endokrine Therapie
Luminal B	HER2 negativ	<ul> <li>ER / PR positiv</li> <li>HER2 negativ</li> <li>Ki67 hoch</li> </ul>	Chemotherapie+ endokrine Therapie
	HER2 positiv	<ul> <li>ER / PR positiv</li> <li>HER2 positiv</li> <li>Ki67 niedrig oder hoch</li> </ul>	Chemotherapie + endokrine Therapie + Anti-HER2- Therapie
HER2- positiv non-luminal		<ul> <li>ER und PR negativ</li> <li>HER2 positiv</li> </ul>	Chemotherapie + Anti-HER2- Therapie
Basalzelltyp ("triple negative")		<ul> <li>ER und PR negativ</li> <li>HER2 negativ</li> </ul>	Chemotherapie (kein Ansprechen auf antihormonelle oder Anti-HER2- gerichtete Therapie)

**<u>Tab. 2</u>**: Therapeutische Auswirkungen der Definition molekularer Subtypen des Mammakarzinoms durch Kombination der Ausprägung von ER, PR und HER2-neu (Goldhirsch et al., 2011) Molekularpathologische Untersuchungen gehören nicht zum Standardprogramm der Diagnostik, da ihnen derzeit noch keine allgemeine Bedeutung in der Therapieplanung und Prognostik zukommt. In besonderen Fällen, z.B. wenn eine erbliche Erkrankung vermutet wird, stehen sie aber zur Verfügung und können auch nachträglich beauftragt werden. Aufgrund der Dokumentationspflicht in der Medizin werden Paraffinblöcke üblicherweise mindestens 10 Jahre aufbewahrt, so dass sich ein langes Zeitfenster für Folgeuntersuchungen ergibt.

#### 1.6 Apoptose, der "programmierte Zelltod"

Die vorliegende Studie befasst sich mit Apoptose-assoziierten Parametern als möglichen Prognosefaktoren für das Mammakarzinom. Deswegen soll im Folgenden auf das biologische Phänomen der Apoptose genauer eingegangen werden.

Die Apoptose ist ein streng geregelter Vorgang eines programmierten, physiologischen Zelltodes und in ihrer Form wichtig für die Entwicklung, Erhaltung und das Altern vielzelliger Organismen.

Der Begriff der Apoptose wurde 1972 durch Kerr, Wyllie und Currie geprägt (griech. Apo (weg), ptosis (Fall) = "Herabfallen der Blätter von Bäumen") und beschreibt ein morphologisch zu beobachtendes Phänomen, bei dem einzelne Zellen zur Schrumpfung veranlasst werden und dabei kleine rund bis ovale zytoplasmatische Fragmente mit basophilen nukleären Anteilen bilden. Diese Zellüberbleibsel nennt man "*Apoptotic bodies*", sie werden im weiteren Verlauf phagozytiert (Kerr et al., 1972).

Grundsätzlich wird die Apoptose als ein aktiver biochemischer Vorgang einer einzelnen Zelle und Bestandteil des Zellstoffwechsels von dem Vorgang der Nekrose unterschieden.

 Bei der Nekrose verliert eine Zelle die Kontrolle über ihre Konzentrationsgradienten durch einen pathologischen Stimulus, z.B. ein Trauma. Es kommt zum Wassereinbruch mit Anschwellung und Zerplatzen der Zelle durch die Schädigung der Plasmamembran. Mit dem Austritt des Zytoplasmas und der Zellorganellen in den Extrazellularraum kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Beteiligung von Makrophagen. In Folge der ablaufenden Reaktion werden die Zell- und DNA-Fragmente unspezifisch verdaut.

 Dahingegend läuft die Apoptose lokal begrenzt ab, ohne eine Schädigung des Nachbargewebes. Sie ist durch klare morphologische Kriterien gekennzeichnet: Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung, bei der die DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke (der sog. "DNA-Leiter", s. unten) geschnitten wird und dem sog. "Membranblebbing" durch Umstrukturierung des Cytoskelettes und Zellschrumpfung (Ellis et al., 1991).

Durch die Membranveränderungen werden apoptotische Zellen umgehend erkannt und phagozytiert, sodass es zu keiner möglichen Freisetzung von zellulären Bestandteilen und somit auch nicht zu einer Entzündungsreaktion kommen kann (Martin et al., 1995).

Neben der visuellen Möglichkeit, Apoptose lichtmikroskopisch nachweisen zu können, indem man morphologischen Merkmale apoptotischer Zellen wie die Zellschrumpfung, "*membrane blebbing*", "*apoptotic bodies*" und Nukleus-Fragmentierung darstellt, bestehen weitere gut etablierte Standardverfahren.

Mittels DNA-Elektrophorese kann gut zwischen apoptotischer und nekrotischer DNA-Spaltung unterschieden werden. Im späteren Verlauf der Apoptose wird die DNA spezifisch durch Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup>-abhängige Endonukleasen enzymatisch fragmentiert. Hierbei entstehen sehr große DNA-Fragmente, deren Größe später ca. 180-200 bp und deren Vielfaches beträgt. Diese Molekülgrößen werden in Agarosegel aufgetrennt, wobei das Muster einer "Leiter" entsteht (Wyllie, 1980). Das Vorhandensein einer derartigen DNA-Leiter stellt somit einen Hinweis auf apoptotischen Zelltod dar, in nekrotischen Zellen wird dagegen an zufälligen Stellen geschnitten.

Weiterhin gibt es eine Reihe von immunhistochemischen Nachweistests, die relativ spezifische, an der Apoptose beteiligte Proteine, wie p53, Bax, bcl-2, BAG-1 oder Caspasen, darstellen. Ferner können DNA-Fragmente auch mithilfe der Durchflusszytometrie und am Fluoreszensmikroskop dargestellt werden.

Bei der TUNEL-Färbung (transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling), die ebenfalls auf der kontrollierten Zerlegung der DNA basiert, wird ein mit Fluoreszein-markiertes dUDP mithilfe einer Transferase an DNA-Bruchstücke apoptotischer Zellen gekoppelt (Gavrieli et al., 1992). Entsprechende Antikörper können an das Fluoreszein binden, wobei die fragmentierten Bruchstücke farblich dargestellt werden können.

Der Ablauf einer Apoptose von der Zellschrumpfung bis zur Bildung der *apoptotic bodies* kann unterschiedlich schnell ablaufen und dauert beispielsweise bei Lymphozyten 1-3 Stunden, bei Keratozyten hingegen 48-72 Stunden (Haake und Polakowska, 1993; Polakowska et al., 1994). Innerhalb kurzer Zeit (1-2 Std.) erkennen dann Phagozyten apoptotische Zellen im Organismus und phagozytieren diese (Savill, 1997).

Apoptose kann durch verschiedene äußere und innere Faktoren ausgelöst werden. Externe Signale können unter anderem Röntgenstrahlen, Gammastrahlen, ultraviolette Strahlung, Oxidation, Hitzeschock, veränderte pH-Werte, veränderte ATP-Level und Glucose-Level, der Entzug von Wachstumsfaktoren, Glucocorticoide und Zytostatika sein, die direkt im Zytoplasma wirken. Interne Signale, die durch membranständige Rezeptoren vermittelt werden, wie der Fas-Ligand (auch CD95L genannt), TNF bei T-Zellen oder IgM bei B-Zellen wirken ebenfalls Apoptose-induzierend (Green and Scott, 1994). Der Verlust der Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix (Anoikis) kann ebenfalls zur Apoptose führen (Frisch and Francis, 1994; Meredith et al., 1993).

Eine bedeutende Rolle zur Identifizierung wichtiger am Zelltod beteiligter Moleküle kommt der Forschung an der Nematode *Caenorhabditis elegans* zu (Gumienny et al., 1999; Horvitz, 1999; Yuan, 1995). Während der Entwicklung des Fadenwurmes zum adulten Tier werden von ca. 1090 somatischen Zellen, die während der Entwicklung eines Hermaphroditen gebildet werden, genau 131 Zellen eliminiert (Ellis and Horvitz, 1986). Genetische Untersuchungen führten zur Isolierung von drei Genen, ced-3, ced-4 und ced-9, wobei "ced" für "*cell death defective*" steht. Die Aktivität der Gene ced-3 und ced-4 führt zum Untergang besagter 131 somatischer Zellen (Yuan and Horvitz, 1990). Ced-9 dagegen ist ced-3 und ced-4 übergeordnet und verhindert bei eigener Aktivierung die Aktivierung der beiden anderen und somit die Apoptose (Chinnaiyan et al., 1997). Eine Überexpression der Zelltodaktivatoren ced-3 und ced-4 durch den Wegfall von ced-9 führt dagegen ebenfalls zu ausgedehnten Gewebsuntergängen (Hengartner et al., 1992).

Auslöser der zur Apoptose führenden zellulären Veränderungen stellen proteolytische Enzyme, die sog. Caspasen, dar (Cystein-Aspartyl-Proteasen) (Hengartner, 2000). Beim Menschen wurden bisher 12 verschiedene Caspasen beschrieben. Man unterscheidet bis zu 3 Gruppen von Caspasen: die Apoptose-auslösenden Initatorcaspasen, Effektorcaspasen sowie die proinflammatorischen Caspasen.

Die Caspasen werden auf einem intrinsischem oder einem extrinsischen Weg aktiviert. Extrinsisch kommt es zur Apoptoseeinleitung über extrazelluläre Signale (z.B. TNF oder Fas-Ligand), die rezeptorvermittelt werden. Nach Bildung einer sog. Todesdomäne setzt sich eine Kaskade in Gang, an deren Ende die Aktivierung der Effektorcaspasen steht und somit die Apoptose ausgelöst wird. Intrinsisch dagegen spielen die Mitochondrien der Zellen eine wichtige Rolle. Durch äußere Einflüsse, wie DNA-Schädigung, Stress oder virale Infekte kommt es zu einer zunehmenden Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran.

1993 entdeckten Horvitz und seine Mitarbeiterin Yuan die Ähnlichkeit von ced-3 zum humanen Analog des Cysteinprotease interleukin-1-beta *converting enzyme* (ICE oder auch Caspase-1) (Yuan et al., 1993; Yuan and Horvitz, 2004).

Als die humane Version von ced-9 ist das bcl-2 Gen (B-cell lymphoma-2-Gen) anzusehen (Chinnaiyan et al., 1997; Hengartner and Horvitz, 1994). Dessen Produkt, ein Protein, verhindert die Freisetzung von Cytochrom c in der Membran von Mitochondrien, indem es an die proaptotischen bcl-2-Proteine Bax (Bcl-2 associated X protein) und Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) bindet. Bax und Bak liegen als Heterodimer vor und bilden in ihrer aktiven Form eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran, durch die proapoptotische Moleküle wie z.B. Cytochrom c das Mitochondrium verlassen können. Das antiapoptotische Bcl-2 vermag an Bax/Bak zu binden und diese an der Porenbildung zu hindern (Oltval et al., 1993).

Neben dem bcl-2 Gen hat auch das p53-Gen Apoptose-induzierenden Einfluss. Dem Gen kommt die Funktion eines "Wächters des Genoms" zu (Lane, 1992). Kommt es zu DNA-Schäden, z.B. durch ionisierende Strahlen, einem Doppelstrangbruch oder ähnlichem, bewirkt die Funktion des p53-Suppressorgens eine DNA-Reparatur sowie den Stopp des Zellzyklus (Hooper, 1994). Bei zu starker Anhäufung von p53 aktiviert es die Gene der bcl-2-Gruppe,

vor allem Bax. Es kommt zur Apoptose. Eine Mutation des p53-Genes lässt sich in ungefähr 55% aller Krebsarten nachweisen, somit gehört es zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Tumorzellen (Greenblatt et al., 1994; Hollstein et al., 1991).

Apoptose tritt schon in der Embryonalentwicklung auf. So bilden sich die Finger und Zehen eines embryonalen Säugetieres erst durch die interdigitale Apoptose (Alberts et al., 2013; Jacobson et al., 1997; Zuzarte-Luis and Hurle, 2004).

Beim Heranreifen des Zentralnervensystems spielt die Apoptose ebenfalls eine wichtige Rolle. Fast über die Hälfte der neugebildeten Neuronen wird bei normalem Hirnwachstum apoptotisch eliminiert (Barres et al., 1992; Burek and Oppenheim, 1996; Krueger et al., 1995). Dies dient der Verbesserung der neuronalen Verschaltung. Durch den apoptotischen Zelltod werden die Anzahl der Nervenzellen an die Zahl der zu innervierenden Neurone bzw. Zielgewebe angepasst und fehlerhafte Verbindungen eliminiert (Burek and Oppenheim, 1996; Waters, 1996).

Bei der Differenzierung des Immunsystems dient die Apoptose dem Aussortieren nichtfunktioneller, ggfls. autoreaktiver B- und T-Lymphozyten (Melchers et al., 1995). Während ihrer Reifung zu T- und B-Zellen durchlaufen lymphoide Stammzellen im Thymus und im Knochenmark verschiedene Kontrollpunkte. Durch "positive Selektion" werden unreife T-Zellen, die nicht in der Lage sind, einen funktionelle Antigenrezeptor zu bilden, durch Apoptose eliminiert (von Boehmer, 1994). In einer zweiten Selektionsrunde werden Autoantigene den Lymphozyten präsentiert. Reagiert eine Zelle auf das Antigen und wäre somit potenziell autoreaktiv, wird diese durch "negative Selektion" aussortiert (Palmer, 2003). B-Zellen mit einem nichtfunktionellem B-Zellrezeptor werden im Knochenmark ebenfalls durch Apoptose eliminiert (Osmond, 1993).

Eine weitere Aufgabe kommt der Apoptose beim Erhalt des zellulären Gleichgewichts zwischen alten und neuen Zellen im adulten Körper zu, der sog. Homöostase. Die Apoptose stellt somit die Gegenkraft zur Proliferation dar (Wagener and Müller, 2009). Dabei unterscheidet man zwischen der stetigen Erneuerung von Geweben mit langsamer Proliferation wie in Gehirn, Herz, Leber, Schweißdrüsen, Skelettmuskeln und in schnell proliferierenden Geweben. Aufgrund ihrer relativ kurzen Lebensdauer müssen z.B. Zellen der

Haut (Lebensdauer von ca. 20 Tagen), Gewebe des Gastrointestinaltraktes (Zotten der Darmwand erneuern sich alle 3-5 Tage), Leukozyten (10 Tage) etc. häufig erneuert werden. Apoptose ist auch während des weiblichen Zyklus in der Gebärmutterschleimhaut oder in den Brustdrüsen zu finden, in deren Epithelanteil ständig Umbau stattfindet (Ferguson and Anderson, 1981).

Fehlregulationen im Ablauf der Apoptose können zu Krankheiten führen. So lässt sich bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. amyotropher Lateralsklerose, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder multipler Sklerose eine übermäßige, pathologisch gesteigerte Apoptose beobachten (Rassow et al., 2012). Auch Erkrankungen, die sich zunächst durch Nekrose manifestieren wie z.B. ein Herzinfarkt oder ein Schlaganfall, schädigen im weiteren Verlauf durch gesteigerte Apoptose das entsprechende Organ. Durch toxische, ischämische oder entzündliche Vorgänge kann es zum apoptotischen Untergang potenziell lebensnotwendiger Zellen kommen, so z. B. bei den B-Zellen der Pankreasinseln mit dem ausgebildeten Krankheitsbild des Diabetes Typ 1 oder dem vermehrten Abbau von CD4-Zellen durch das HI-Virus (Ameisen et al., 1994; Ashwell et al., 1994; Jeremias et al., 2001; Krijnen et al., 2009; Thompson, 1995). Verminderte Apoptose dagegen führt zu einem Überschuss an Zellen. Es entsteht zusätzliches Gewebe, fehlerhafte oder transformierte Zellen überleben, und die Entstehung von Tumoren wird begünstigt.

Der natürliche Schutzmechanismus der Zelle wird bei maligner Tumorbildung außer Kraft gesetzt, indem während des Transformationsprozesses die Tumorzelle eine Apoptoseresistenz erhält und als entartete Zelle nicht mehr apoptotisch wird. Zusätzlich besteht eine ungebremste Zellteilung, und sie besitzen die Fähigkeit zur Metastasierung sowie sich mit Blutgefäßen zu versorgen (Hanahan and Weinberg, 2011). Tumorzellen haben verschiedene Schutzmechanismen gegen apoptotische Stimuli entwickelt (Thompson, 1995). Eine Wiederherstellung der Apoptosebereitschaft könnte deshalb auch zur Therapie von Tumoren genutzt werden (Stamatiadis-Smidt et al., 2006). So findet man bei Radio-, Chemo- und Immuntherapie eine Hemmung des Tumorwachstums durch teilweise Induktion der Apoptosefähigkeit (Hickman, 1992). Eine zentrale Bedeutung nehmen hier wieder die als Todesrezeptor bezeichneten Rezeptoren CD95 und TRAIL ein. TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) spielt im Immunsystem eine Rolle, indem es Zielzellen inaktiviert und Apoptose auslöst, aber bei nicht-tumorösen Zellen nur wenig

Zellschädigung verursacht (Chinnaiyan et al., 2000). Problematisch wird es bei Störungen der CD95- oder TRAIL-assoziierten Apoptose, da sie an der Zytostatika-induzierten Apoptose beteiligt sind. Manche Zytostatika führen über eine Hochregulierung der Todesrezeptoren zum Untergang der Tumorzellen. In diesem Fall tragen Störungen der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose auch zur Resistenz gegenüber einer Chemotherapie bei.

Wie man sieht, hat die Apoptose einen starken Einfluss auf Tumorentstehung und Tumorwachstum. Dabei ist ein hoher Apoptoseindex oft in Tumoren mit hoher Mitoserate vorhanden, was mit einer schlechteren Prognose auf das Rezidivintervall und das Gesamtüberleben verbunden ist. So fand man höhere Apoptoseraten bei Ovarialkarzinomen (Kalogeraki et al., 2011), Non-Hodgkin-Lymphomen (Leoncini et al., 1993), Karzinomen der Prostata (Aihara et al., 1994), der Harnblase (Lipponen and Aaltomaa, 1994) oder des Larynx (Teppo et al., 2003) in Verbindung mit einer schlechteren Prognose. Studien an anderen Geweben wie dem Ösophaguskarzinom und dem Astrozytom ergaben jedoch wiederum eine verbesserte Prognose bezüglich des Überlebens bei hohen Apoptoseindizes (Kuriyama et al., 2002; Shibakita et al., 2000). So kann bei einer erhöhten Apoptoserate das Tumorwachstum beschränkt sein und möglicherweise dadurch prognostisch günstig wirken, dass sie die Proliferationsrate übersteigt.

Für das Mammakarzinom lassen sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Apoptoserate auf die Prognose finden. Histopathologische Untersuchungen zeigten, dass eine Reduzierung der Apoptoserate eine Karzinomentstehung in der Mamma begünstigt (Allan et al., 1992). Tanaka et al. untersuchten in einer Studie mit 167 Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom die Beziehung von Survivin, einem Apoptose hemmendem Protein, auf die bcl-2 Expression und die Apoptoserate beim Mammakarzinom und schluss-folgerten, dass niedrige Apoptoseindizes auf eine schlechtere Überlebensrate deuten als bei hohe Apoptoseraten (Tanaka et al., 2000). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie, die den Caspasen-Inhibitor XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) untersuchte. Wie Survivin gehört auch XIAP ebenfalls zu der Familie der IAPS (*inhibitor of apoptosis proteins*). Durch Bindung an die Caspasen 3,7 und 9 wirkt es antiapoptotisch. Eine Überexpression von XIAP und Survivin, sowie eine Dysbalance zu dem XIAP-Antagonisten Smac (*mitochondria-derivated activator of caspase*) reduziert die Sensitivität zu Chemotherapeutika und korreliert signifikant mit Kanzerogenese, Progression und der Überlebensprognose (Zhang et al., 2011).

Autoren anderer Studien untersuchten weitere Proteine von apoptotisch wirkenden Promoterund Suppressorgenen, die ebenfalls prognostische Signifikanz aufwiesen. Eine direkte Korrelation zwischen Apoptoserate und Gesamtüberleben konnte aber in keiner dieser Studien nachgewiesen werden (Schöndorf et al., 2004; Sirvent et al., 2004).

Aus anderen Studien wiederum wurde abgeleitet, dass ein hoher Apoptosewert ein Indikator für Invasivität und Proliferation ist (Berardo et al., 1998; Lipponen et al., 1994; Lipponen, 1999) und zu einer schlechteren Prognose führt (González-Cámpora et al., 2000; Parton et al., 2001). Bei Zhang et al. bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Tumorgröße, dem Lymphknotenbefall und einem erhöhtem Apoptoseindex (Zhang et al., 1997).

## 1.7 Ziel der Untersuchung

Aus dem bisher Dargestellten erschließt sich, dass man weiterhin nach möglichen prognostischen Faktoren sucht, die die derzeitigen Standards der klinischen Parameter sinnvoll ergänzen, gerade in Bezug auf die Stadieneinteilung und das Tumorgrading. Für die Wahl einer geeigneten Therapie und für das Erreichen einer guten Beeinflussung bzw. Heilung einer Krebserkrankung ist nicht nur eine frühzeitige Diagnose, sondern auch bestmögliches Wissen darüber, wie sich eine Tumorart verhält, von Bedeutung. Ziel ist es, zu der derzeit bestehenden Routinediagnostik besser aussagekräftige und immer weniger aufwendige Parameter mit hinzuzuziehen, um noch genauere Prognosen bzw. individuellere und bessere Therapien der jeweiligen Erkrankung zu ermöglichen.

Gegenstand dieser retrospektiven Arbeit war es, den Einfluss der Apoptose als prognostischen Parameter beim Mammakarzinom mit Hilfe der TUNEL-Methode nach bildanalytischer Quantifizierung zu bestimmen und anschließend mit anderen, bisher gängigen Einflussgrößen in einer Multiparameter-Analyse zu vergleichen. Dazu stand ein gut definiertes Patientenkollektiv mit bekanntem Follow-Up zur Verfügung.

## 1.8 Ethikvotum

Zu der Studie wurde ein Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingeholt (Studiennummer 4217 vom 8.4.2013).
# 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

In dieser retrospektiven Studie wurde an einem Kollektiv von 113 konsekutiven Fällen von Mammakarzinomen mit einem Beobachtungszeitraum von > 10 Jahren untersucht. Bei allen Patientinnen wurde ein primäres, unilaterales, invasiv-duktales oder invasiv-lobuläres Karzinom ohne vorige maligne Erkrankung diagnostiziert. Alle Patientinnen wurden nach den damaligen üblichen, stadienorientierten operativen und adjuvanten Therapiekonzepten behandelt. So konnte in den meisten Fällen die betroffene Brust brusterhaltend operiert werden, bei einigen Fällen musste jedoch auch eine Mastektomie durchgeführt werden. Zeitgleich wurde die seinerzeit übliche Axilladissektion des Level I immer durchgeführt. Anschließend wurden je nach Stadium eine adjuvante Chemotherapie, Radiatio und Antihormontherapie bzw. Kombination dieser Therapieansätze angeschlossen.

Die primäre Befunderhebung fand am Institut für Pathologie der RWTH Aachen statt. Sie umfasste die Bestimmung des Tumorstadiums gemäß der TNM-Klassifikation, des modifizierten Gradings und des Hormonrezeptorstatus auf biochemischem und auf immunhistochemischem Weg. Letztere Bestimmungsmethode ist allerdings nicht Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit, da sie in einem eigenen Promotionsprojekt bearbeitet worden ist.

# 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bestimmung des Tumorstadiums

Die Stadieneinteilung der Tumoren nach Größe des Primärtumors, Lymphknotenstatus und eventueller Fernmetastasierung erfolgte nach den TNM-Kriterien der 5. Ausgabe der UICC-Klassifikation (Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 1997). Dabei steht "T" für die Größe des Primärtumors (T1-T4), "N" für das Ausmaß einer eventuellen Lymphknotenmetastasierung (N0-N3) und "M" für die Beurteilung von Fernmetastasen in z.B. Knochen, Leber, Lunge und Gehirn. Das Präfix "p" wird vorangestellt, wenn die Angabe auf einer histopathologischen Untersuchung basiert.

Im Folgenden werden die in der Studie verwendeten Kategorien für die Stadienparameter wiedergegeben. Gegenüber der 7. Auflage der TNM-Klassifikation (Wittekind and Meyer, 2010), die zur Zeit der Re-Evaluation der Fälle galt, wurden dabei einzelne Vereinfachungen vorgenommen, um nicht zu viele und zu schlecht besetzte Patientengruppen zu erhalten (Tabellen 2.1 - 2.3)

Zunächst soll die Einteilung der Tumorgröße (pT) tabellarisch dargestellt werden (Tabelle 2.1).

pT nach TNM	Definition	Kategorie in der Studie	
рТО	kein Tumor nachweisbar		
pTis	Carcinoma in situ, kein invasiver Tumor		
pT1	Tumorgröße $\leq 2 \text{ cm}$		
pT1mi	Mikroinvasion bis 0,1cm Größe		
pT1a	Tumorgröße 0,1 cm - 0,5 cm		
pT1b	Tumorgröße 0,5 cm - 1 cm	pT1	
pT1c	Tumorgröße 1 cm - 2 cm	pT1	
pT2	Tumorgröße 2 cm - 5 cm	pT2	
pT3	pT3 Tumorgröße > 5 cm		
pT4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut	pT4	
pT4a	Ausdehnung auf die Brustwand		
pT4b	Ödem oder Ulzeration der Brust- haut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust	pT4	
pT4c	Kriterien von pT4a und pT4b zusammen	pT4	
pT4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom	pT4	

**Tab. 2.1:** Stadieneinteilung gemäß der 7. Auflage der TNM-Klassifikation für die postoperative Tumorgröße pT; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte dargestellte vereinfachte Kategorisierung herangezogen. --- = Kategorie unbesetzt.

Auf die Wiedergabe der ausführlichen Version der pN-Klassifikation, die neben pNx ("Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden") und pN0 ("Keine regionären Lymphknotenmetastasen") im Falle von Lymphknotenmetastasen die kompliziert und sehr diversifiziert definierten Kategorien pN1 (mit den Sub-Kategorien pN1mi, pN1a, pN1b und pN1c), pN2 (mit den Subkategorien pN2a und pN2b) sowie pN3 (mit den Subkategorien pN3a, pN3b und pN3c) kennt, wird hier verzichtet. Grund dafür ist, dass nur in 54 Fällen überhaupt Lymphknotenmetastasen vorlagen, davon die meisten in einer der Kategorien von pN1. Entsprechend wären viele sehr kleine und damit schlecht auswertbare Gruppen entstanden. Wir haben uns daraufhin auf eine stark vereinfachte Auswertung beschränkt, die in der Zusammenschau ausschließlich mit den Hauptkategorien von pN wiedergegeben werden soll (Tabelle 2.2).

pN nach TNM	Definition	Kategorie in der Studie
pNx	keine Lymphknoten nachweisbar	
pN0	keine Lymphknotenmetastasen	pN0
pN1	Mikroskopische Metastasierung nachgewiesen durch Untersuchung des Schildwächterlymph- knotens, aber nicht klinisch erkennbar	
pN1	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymph- knoten und / oder ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, aber nicht klinisch erkennbar	pN1
pN2	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymph- knoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen	pN1
pN3	Alle übrigen Konstellationen regionärer Lymph- knotenmetastasen	

**Tab. 2.2:** Stadieneinteilung gemäß der 7. Auflage der TNM-Klassifikation für den postoperativen Lymphknotenstatus pN; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte dargestellte vereinfachte Kategorisierung herangezogen. --- = Kategorie unbesetzt.

Die Kategorisierung der Fernmetastasen folgt beim Mammakarzinom lediglich dem Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Metastasen, die nicht zu den regionären Lymphknoten gehören (Tabelle 2.3).

M nach TNM	Definition	Kategorie in der Studie
<b>M0</b>	keine Fernmetastasen nachgewiesen	<b>M0</b>
M1	Fernmetastasen nachgewiesen	M1

**Tab. 2.3:** Stadieneinteilung gemäß der 7. Auflage der TNM-Klassifikation für die Fernmetastasierung M, die unverändert in der Studie übernommen wurde.

Außerdem kann man die jeweilige TNM-Formel eines Tumors (z.B. pT2, pN1, M0) auch einem zusammenfassenden Stadium nach der UICC zuordnen (Tab. 2.4).

Stadium nach UICC	TNM-Konstellationen	Kategorie in der Studie
0	pT0, pN0, M0 und pTis, pN0, M0	
Ι	pT1, pN0, M0	I
IIa	pT1, pN1, M0 und pT2, pN0, M0	II
IIb	pT2, pN1, M0 und pT3, pN0, M0	II
IIIa	pT1-pT3, pN2, M0 und pT3, pN1, M0	III
IIIb	pT4, pN1/pN2, M0	III
IIIc	pN3, M0 (unabhängig von pT)	III
IV	M1 (unabhängig von pT und pN)	IV

**Tab. 2.4:** Stadieneinteilung gemäß der 7. Auflage der TNM-Klassifikation für das Gesamtstadium nach UICC; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte dargestellte vereinfachte Kategorisierung herangezogen. --- = Kategorie unbesetzt.

### 2.2.2 Bestimmung der Tumorgradierung

Die Tumorgradierung wurde nach dem 1957 entwickelten System von Bloom und Richardson in der modifizierten Form nach Elston und Ellis (Bloom and Richardson, 1957; Elston and Ellis, 1991) durchgeführt. Hierzu werden drei Kriterien semiquantitativ in einem System von ein bis drei Punkten einzeln bewertet, und zwar die histologische Wachstumsform (Tubulusbildung oder "tubuläre Differenzierung"), die zytologischen Veränderungen (Kernpleomorphie) und die Zellteilungsaktivität (Mitoserate). Während im ursprünglichen Grading ausschließlich rein subjektiv geschätzt wurde, ergibt sich durch die Modifikation von Elston und Ellis eine gewisse Skalierung der Schätzungen für Tubulusbildung und Mitoserate (Tab. 2.5 - 2.7).

Beurteilung der Grading- Komponenten	Tubuläre Differenzierung	Kernpolymorphie	Mitoserate
1	> 75%	gering	0-6
2	10% - 75%	mäßig	7-11
3	< 10%	stark	ab 12

**Tab. 2.5:** Komponenten und Bewertungskriterien des dreigliedrigen modifizierten Gradings für Mammakarzinome. Die Prozentangaben bei der tubulären Differenzierung beziehen sich auf lumenbildende Wachstumsformen des Tumors. Die Mitoserate berücksichtigt 10 ausgezählte Gesichtsfelder mit 400x-facher Endvergrößerung bei einem Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm (Sehfeldzahl 18) und einer Gesamtfläche von 1,59 mm<sup>2</sup>. Für Mikroskope mit größeren oder kleineren Gesichtsfeldern müssen die beiden Grenzwerte entsprechend angepasst werden (Biesterfeld, 1997).

Für das Grading werden die pro Tumor ermittelten Werte der Grading-Komponenten addiert und die Tumoren als gut (G1), mäßig (G2) oder gering differenziert (G3) eingestuft (Tab. 2.6).

Grading	Summe der Werte der Grading-Komponenten	Interpretation
G1	3 bis 5	gut differenziert
G2	6 und 7	mäßig differenziert
G3	8 und 9	gering differenziert

Tab.	2.6:	Modifiziertes	Grading	des	Mammakarzinoms	nach	Elston	und	Ellis	(Elston	and
Ellis,	1991	l). Zu den Grad	lingkomp	oner	nten siehe oben bzw	7. Tab.	2.5.				

Streng genommen ist das Grading in allen seinen Komponenten sinnvollerweise nur bei invasiv-duktalen Karzinomen anwendbar, da insbesondere aufgrund ihrer abweichenden Wachstumsform das Kriterium "tubuläre Differenzierung" bei invasiv-lobulären Karzinomen keine Anwendung finden kann. Deswegen fehlen in unserer Studie bei den Gradingkomponenten einige Angaben. Das Gesamtgrading wurde für diese Tumoren aus histomorphologischen Gesichtspunkten heraus im Facharztkonsens mehrerer Untersucher erstellt.

### 2.2.3 Bestimmung des Hormonrezeptorstatus

#### **Biochemische Analyse**

Die Durchführung der biochemischen Analyse erfolgte im Rahmen der primären Krankenversorgung im Rezeptorlabor der Frauenklinik der RWTH Aachen an unfixiertem Tumormaterial, das unter Einhaltung einer sogenannten Kühlkette, d.h. transportiert auf Eis, vom Operationssaal über die Pathologie dorthin gebracht worden war. Angewandt wurde ein an die speziellen Laborbedingungen adaptierter *Dextran-Coated Charcoal Assay* (DCC) aus einem Tumorhomogenisat. Dabei wird im Zytosol die Konzentration freier Rezeptoren für <sup>3</sup>Hmarkiertes 17 β-Östradiol für den Östrogenrezeptor bzw. für <sup>3</sup>H-markiertes R5020 für den Progesteronrezeptor bestimmt (Etzrodt et al., 1983). Als Grenzwert für ein positives Ergebnis wurde 10 fmol/mg Protein für den Östrogenrezeptor und 20 fmol/mg Protein für den Progesteronrezeptor festgelegt, was einer international üblichen Grenzziehung vieler vergleichbarer Studien entspricht.

### Immunhistochemische Analysen

Eine immunhistochemische Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors wurde im Rahmen dieser Studie ebenfalls vorgenommen, blieb aber Teil eines eigenen Projektes und stand deswegen für die hier vorgelegte Arbeit nicht zur Verfügung. Gleiches gilt für die HER2/-neu-Bestimmung und die Bestimmung der Ki-67-Proliferationsrate. Daher soll hier auch auf technische Details nicht eingegangen werden.

### 2.2.4 Bestimmung der Apoptoserate im Tumorgewebe

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Apoptoserate wurden in einer Kooperation zwischen den Instituten für Pathologie der Universität Mainz und der RWTH Aachen vorgenommen und standen für diese Arbeit als nicht ausgewertete Rohdaten zur Verfügung.

### Präparatevorbereitung

Vor Herstellung der Schnittpräparate von den 113 zu untersuchenden Fällen wurden die aus der Primärdiagnostik vorliegenden HE-Schnitte noch einmal daraufhin durchgesehen, an welchem Tumorabschnitt vitale und besonders repräsentative, möglichst zelldichte Tumorareale vorlagen. Auf diese Weise konnte der am besten geeignete Paraffinblock ausgewählt werden. Von diesem wurden ca. 3  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte mithilfe eines Schlittenmikrotoms genommen und auf einen Objektträger aufgezogen.

# Vorbereiten der Schnitte zur Apoptosedarstellung

Um die von Apoptose betroffenen Zellen darstellen zu können, mussten die Schnitte zuerst entparaffiniert werden. Dazu verbrachten sie ca. 12-16 h im Wärmeschrank und wurden danach für 10 min mit Xylol behandelt. Darauf folgte eine Behandlung der Präparate mit einer absteigenden Alkoholreihe zur Rehydrierung:

- 5 min in absolutem Alkohol
- 15 min. in einem Methanol- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Gemisch (Verhältnis 29:1)
- 5 min in 96 % igen Alkohol
- 5 min in 70 %igen Alkohol
- 5 min in Aqua bidest.
- 2 x 5 min in PBS- Puffer (Aliquot eines Ansatzes aus 51 Aqua dest. mit 40g NaCl, 5,75g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 1,0 g KCl, jeweils von der Qualität "reinst pro analysi" von Merck)

Nun wurde jedes einzelne Präparat mit 50  $\mu$ l Proteinase K für 15 min inkubiert. Dabei vermischt man zusätzlich noch 4  $\mu$ l Proteinase K mit 1000  $\mu$ l PBS-Puffer. Dann erfolgte wiederum eine Spülung mit PBS- Puffer für 5 min.

# Darstellung der apoptotischen Zellen mithilfe der TUNEL-Methode

Nach dieser Vorbehandlung wurde die Darstellung apototischer Zellen mithilfe der TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) vorgenommen, bei der es sich formal um eine *in situ*-Hybridisierung handelt. Dabei fand das gewerblich erhältliche ApopTag<sup>®</sup>-Kit (*In Situ Apoptosis Detection Kit - Peroxidase*) der Firma Oncor Verwendung, das bereits zuvor im Institut für Pathologie der RWTH Aachen erfolgreich erprobt und für die dort gegebenen Laborbedingungen optimiert worden war.

Die Darstellbarkeit apoptotischer Zellen geht dabei auf die endonucleotische Zersetzung der DNA zurück, aus der in mehreren Arbeitsschritten viele mittelgroße DNA-Fragmente von ca. 180 bp Länge generiert werden. Diese verfügen über freie 3'-OH-DNA-Enden, an die Digoxigenin-Nukleotide enzymatisch durch TdT (terminale Desoxynucleotidyltransferase) angelagert werden. Dieses Enzym katalysiert die Addition von Desoxyribonucleotid-Triphosphaten an das 3'-OH-Ende doppel- und einzelsträngiger DNA. Konjugiert man diese Nukleotide mit einem an Peroxidase gekoppelten Antidigoxigenin-Antikörper aus Digoxigenin-11-dUTP und dATP, so kann das entstandene Produkt mit DAB in einen braunen Farbstoff umgesetzt werden.

Die schon entparaffinierten Schnitte wurden für 5-10 Minuten in 50  $\mu$ l Equilibrations-Puffer behandelt, um danach bei 37 °C in einem Brutschrank mit 50  $\mu$ l / pro Schnitt einer Working Solution aus TdT-Enzyme und einem Reaktionspuffer (2:1) zu lagern. Danach erfolgte eine Behandlung mit Stop/Wash-Puffer, ebenfalls bei 37 °C über 30 min., gefolgt von einer 2 x 5 min Spülung mit PBS-Puffer. Schlussendlich wurde das Präparat noch einmal für 30 min mit einer Antidigoxinin-Peroxidase bei Raumtemperatur inkubiert.

Zeitgleich erfolgte im Dunkeln die Herstellung des Färbesubstrates aus 30 mg Diaminobenzidin (DAB von Sigma) und 0,3 g Trishydroxymethylaminomethan (Merck) in 50 ml aqua dest. Hierbei musste ein pH-Wert von 7,6 eingestellt werden.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Präparate wiederholt mit dem PBS-Puffer gespült. Nun erfolgte der Auftrag der Färbelösung auf die Präparate, zusätzlich wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1000) zur Katalyse der Reaktion hinzugefügt. Die Reaktion des Inkubationsproduktes mit dem DAB ergab eine bräunliche Kernfärbung, die unter dem Lichtmikroskop sichtbar ist. Nach 60-90 Sek. wurde eine weitere Anfärbung des Präparates durch eine Aqua dest.-Spülung unterbrochen. Nun erfolgte eine gesonderte Anfärbung der Zellkerne mit Methylgrün, an die sich eine Spülung mit Butanol zum Auswaschen überschüssiger Farbstoffe anschloss. Nach einer weiteren 10-min Inkubation mit Xylol wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium (Vitro Clud, Langenbrinck) beschichtet und mit einem Deckglas eingedeckt.

#### Bildanalytische Auswertung

Um die nun entstandenen Schnitte auswerten zu können, wurde ein TV-Bildanalysesystem CM-2 (Hund Wetzlar) verwendet. Es setzt sich zusammen aus einem HUND H 500 LL Mikroskop (Firma Helmut Hund GmbH, Wetzlar)- bestehend aus Kondensor, Objektiven mit 10-, 20-, 40-facher Vergrößerung und 1.6facher Zwischenlinse, einer 50 Watt Halogen-Lichtquelle, deren Weiterleitung über eine Glasfasereinheit erfolgt, einem automatischem Filterrad (Normallicht, Rotlicht mit einer Wellenlänge  $\approx 623$ nm  $\pm 5$ nm, Grünlicht mit einer Wellenlänge  $\approx 500$ nm  $\pm 5$ nm), einer Graustufen CCD Videokamera Pulnix TM 765 mit logarithmischer Antwortkurve, ferner einem handelsüblichen PC mit Monitor, Tastatur und Maus sowie einem Laserdrucker.

Die von der ABOS GmbH (Eching bei München) in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der RWTH Aachen entwickelte Software diente ursprünglich der Quantifizierung von mit DAB entwickelten kernbindenden immunhistochemischen Reaktionen, z.B. im Rahmen der immunhistochemischen Hormonrezeptoranalyse oder der Auswertung der Ki-67-Immunhistochemie. Mit dem Programm besteht für den Untersucher die Möglichkeit, Schnittpräparate zu analysieren, Bildausschnitte manuell nachzubearbeiten und aus der späteren Datenverteilung bestimmte Parameter zu extrahieren und graphisch darzustellen. Da die TUNEL-Methode ebenfalls eine kernbindende Reaktion auf der Basis einer DAB-Entwicklung darstellt, ist ihre Auswertung mit der gleichen Software ebenfalls uneingeschränkt möglich.

Pro Messung wurden 20 Gesichtsfelder eines Schnittes mit 20xfacher Vergrößerung untersucht. Dabei betrug die Einzelfläche eines Gesichtsfeldes 0,0484 mm<sup>2</sup>, was einer Gesamtfläche von 0,968 mm<sup>2</sup> und damit fast genau einem mm<sup>2</sup> entspricht. Die Schnitte wurden dabei jeweils mäanderförmig untersucht. Für jedes Präparat wurden zwischen 944 und 6966 Kerne (Mittelwert  $\pm$  SD: 3109  $\pm$  982) ausgewertet. Unterschiede in der Tumorzelldichte, dem Stromaanteil und den Kerngrößen führten zu den recht hohen Schwankungen in der Messzellzahl (Variationskoeffizient: 31,6%). Pro Messung wurden die

35

Zahl und die Summenfläche der positiven Messzellen sowie die Zahl und die Summenfläche aller Messzellen aus allen 20 Gesichtsfeldern dokumentiert, ferner die Apoptoserate pro Gesichtsfeld, berechnet als Quotient aus den positiven Messzellen und allen Messzellen in Prozent. Entsprechend standen pro Messung vier Zahlenwerte bezogen auf alle Gesichtsfelder und jeweils ein weiterer für jedes der 20 Gesichtsfelder, insgesamt also 24 Daten, zur Verfügung.

Aus diesen wurden folgende Zellzahl-bezogene Apoptose-Parameter zur späteren klinischen und methodischen Auswertung extrahiert (Tab. 2.7):

Parameter	Definition
<b>APO</b> min	Niedrigste der in den 20 Gesichtsfeldern erhobenen Apoptoseraten (in %)
<b>APO</b> <sub>max</sub>	Höchste der in den 20 Gesichtsfeldern erhobenen Apoptoseraten (in %)
<b>APO</b> mean	Quotient (in %) der als positiv angenommenen Messzellkerne in allen untersuchten 20 Gesichtsfeldern, bezogen auf die gesamte Messzellzahl
<b>APO</b> <sub>med</sub>	Median der 20 einzeln pro Gesichtsfeld erhobenen Apoptoseraten (in %)
<b>APO</b> modal	Modalwert der 20 einzeln pro Gesichtsfeld erhobenen Apoptoseraten (in %)
APOtent	Mittelwert der Zahl der in den 20 Gesichtsfeldern untersuchten positiven bzw. negativen Messzellen
APOtarea	Mittelwert der Kernfläche der in den 20 Gesichtsfeldern untersuchten positiven bzw. negativen Messzellen (in µm <sup>2</sup> )

**Tab. 2.7:** Definition der verwendeten Apoptoseparameter. "Apoptoserate" bezeichnet dabei den Quotienten aus der Zahl positiver Zellen und aller Zellen (in %) eines Gesichtsfeldes

Bei den Apoptose-bezogenen Parametern stellte sich außerdem die Frage nach dem Auswertemodus. Während für die TNM-Klassifikation und das Tumorgrading sowie für deren beider Einzelparameter feste Gruppendefinitionen vorlagen und für den biochemischen Hormonrezeptorstatus sich Grenzwerte in gewisser Weise "eingependelt" haben (siehe Kap. 2.2.3), sind für die Apoptose-bezogenen Parametern keine solchen Grenzwerte bekannt.

Sinnvoll erschien, möglichst neutrale Grenzen zu wählen, also nicht solange die Grenzwerte zu verändern, bis ein möglichst optimales Ergebnis in den p-Werten des Wilcoxon-Breslow-Tests erreicht war, sondern nach bestimmten Vorgaben auszuwerten. Da eine Auswertung in drei Gruppen vorgesehen war, kamen eine 1:1:1- oder eine 1:2:1-Quantilisierung in Betracht, durch die die Patientenfälle den drei Gruppen Q1, Q2 und Q3 im Verhältnis 38:37:38 oder 28:57:28 zugeordnet würden<sup>2</sup>. Unter der Annahme, dass bei vielen Datenverteilungen klinisch-prognostischer Parameter mehr Fälle in den mittleren Kategorien angesiedelt sind als am Rand, wurde hier das 1:2:1-Modell gewählt. Die entsprechenden Grenzwerte sind im Ergebnisteil in Kapitel 3.1.5 in Tabelle 3.11 wiedergegeben.

#### 2.2.5 Statistische Auswertung

Die biometrische Auswertung erfolgte eigenständig bzw. unter Anleitung am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf, teilweise in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, und zwar mit dem biometrischen Programmpaket BMDP. Die verwendeten Unterprogramme (1D, 1L, 2D, 2L, 4M) sind im folgenden Abschnitt in Klammern den jeweiligen Auswerteschritten hinzugefügt (z.B. "1D").

An biometrischen Grunddaten standen alle Parameter der deskriptiven Statistik, d. h. Modalwert, Median, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert, Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient sowie Angaben zu allen gewünschten Perzentilen zur Verfügung (1D, 2D). Zur kompakten Darstellung von Korrelationen zwischen den Apoptose-bezogenen Parametern wurde ferner ein Varianzkomponentenmodell mit Varimax-Rotation angewandt (4M).

Univariate Überlebensanalysen erfolgten unter Berechnung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Kaplan and Meier, 1958), die mit dem Wilcoxon-Breslow-Test auf statistische Signifikanz überprüft wurden (1L). Angeschlossen wurden multivariate Überlebensanalysen mit Cox-Modellen (Cox, 1972) im *forward stepping*-Modus (2L).

 $<sup>^2</sup>$  Abweichungen ergeben sich dann, wenn mehrere Fälle genau den gleichen Wert haben und dieser dem Grenzwert entspricht. So ist z.B. bei APO<sub>min</sub> (s.u.) eine Verteilung im Verhältnis 48:38:27 dadurch eingetreten, dass 48 Werte bei 0 lagen (Grenzwert von Q1 nach Q2); da ferner zwei Werte dem Grenzwert zwischen Q2 und Q3 entsprachen, enthält die Gruppe Q3 statt 28 nur 27 Fälle.

Ungestufte Parameter wurden in die univariate und die multivariate Überlebensanalyse jeweils nach neutraler 1:2:1-Quantilisierung der Datensätze (2D) eingebracht.

Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein  $\alpha$ -Niveau von  $\leq 0,05$  (Cox-Modelle:  $\leq 0,10$ ) angenommen, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 5\%$  ( $\leq 10\%$ ), die Nullhypothese fälschlich zu verwerfen.

Wegen der in dieser Studie vorliegenden multiplen Testproblematik, welche immer dann auftritt, wenn anhand eines Kollektivs mehrere statistische Tests bezüglich verschiedener Zielparameter durchgeführt werden, wurde die statistische Auswertung explorativ angesetzt.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Univariate Überlebensanalyse

# 3.1.1 Gesamtüberleben aller Patientinnen

In der nachfolgenden Statistik wurde der Krankheitsverlauf von 113 Patientinnen nach einer Mammakarzinom-Diagnose über einen Zeitraum von > 10 Jahren verfolgt. Am Ende des Beobachtungszeitraumes lebten noch 51 Patientinnen, 59 waren nach  $5,3 \pm 5,2$  Jahren (SD) gestorben. Die Überlebensdaten von drei Patientinnen waren nach  $6,2 \pm 1,0$  Jahren (SD) nicht weiter zu ermitteln gewesen.

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit lag bei 65%, die für 10 Jahre bei 48,5% (Abb. 3.1). Das mittlere Überleben betrug 7,7 Jahre, das mediane Überleben 9,2 Jahre.



Abb. 3.1: Kaplan und Meier-Überlebenskurve für alle 113 Patientinnen

# 3.1.2 TNM-Klassifikation und ihre Komponenten

Die Tabellen 3.1 - 3.4 bzw. die Abbildungen 3.2 - 3.5 zeigen den Einfluss der einzelnen Staging-Parameter auf das Überleben. Im Anschluss an die Darstellungen werden die Ergebnisse zusammengefasst.

Tumorgröße pT

рТ	1	2	3	4
Anzahl der Patienten	20	67	17	9
verstorbene Patienten	6	37	10	6
mittl. Überleben (Jahre)	9,5	7,8	6,3	4,6
5-Jahres-ÜLW (%)	85%	70,2%	47,1%	33,3%
10-Jahres-ÜLW (%)	69,6%	46,3%	41,2%	33,3%

**Tab 3.1.**: Überleben in Beziehung zur Tumorgröße (pT) (p = 0,0230)



Abb. 3.2: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zur Tumorgröße (pT)

# Lymphknotenstatus pN

pN	0	1
Anzahl der Patienten	58	54
verstorbene Patienten	21	37
mittl. Überleben (Jahre)	9,2	6,0
5-Jahres-ÜLW (%)	79,3%	51,9%
10-Jahres-ÜLW (%)	66,6%	30,5%

**Tab. 3.2:** Überleben in Beziehung zum Lymphknotenstatus (pN) (p = 0,0002). In einem Fall war der Lymphknotenstatus nicht bekannt, so dass hier nur 112 Fälle erfasst sind.



**Abb. 3.3:** Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für den Lymphknotenstatus (pN); n = 112

# Fernmetastasierung bei Diagnosestellung (M)

М	0	1
Anzahl der Patienten	105	7
verstorbene Patienten	52	7
mittl. Überleben (Jahre)	7,97	3,77
5-Jahres-ÜLW (%)	68,57%	28,57%
10-Jahres-ÜLW (%)	51,74%	0,0%

**Tab. 3.3:** Überleben in Beziehung zur Fernmetastasierung (M) (p = 0,0024). In einem Fall war der Fernmetastasenstatus nicht bekannt, so dass hier nur 112 Fälle erfasst sind.



Abb. 3.4: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zur Fernmetastasierung (M); n = 112

# TNM-Stadium

pTNM	1	2	3	4
Anzahl der Patienten	14	75	16	7
verstorbene Patienten	2	39	11	7
mittl. Überleben (Jahre)	10,48	7,94	5,23	3,77
5-Jahres-ÜLW (%)	92,86%	76,67%	37,5%	28,57%
10-Jahres-ÜLW (%)	85,71%	49,62%	31,25%	0,0%

**Tab. 3.4:** Überleben in Beziehung zum Staging (pTNM) (p = 0,0001). In einem Fall waren keine Angaben zu Lymphknoten- bzw. Fernmetastasenstatus bekannt, so dass hier nur 112 Fälle erfasst sind.



Abb. 3.5: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zum Staging (pTNM). n = 112

Wie aus der Tabelle und Abbildung zum pTNM Staging zu entnehmen ist, sieht man, dass es sich hierbei um einen hoch signifikanten prognostischen Parameter handelt (p=0,0001).

Auch die drei Parameter (pT, pN und M) lassen einen guten Rückschluss auf das Überleben der Patientinnen zu, wobei der Lymphknotenstatus der aussagekräftigste Einzelparameter ist (p < 0,0001). Kurz gesagt, kann man bereits bei Diagnosestellung ohne axilläre Lymphknotenmetastasierung eine deutlich positivere Aussage für das Überleben der Patientin treffen als bei Patientinnen mit Metastasierung.

### 3.1.3 Grading und seine Komponenten

Als weitere Klassifizierung wurden die modifizierte Tumorgradierung nach Elston und Ellis (1991) sowie ihre Komponenten als Prognosefaktoren herangezogen. Im Folgenden sind die entsprechenden Tabellen und Überlebenskurven wiedergegeben.

Aus der Einzelbetrachtung der drei Parameter tubuläre Differenzierung, Kernpleomorphie und Mitoserate lässt sich aus den Tabellen und den Überlebenskurven ableiten, dass eine univariate prognostische Bedeutung in erster Linie für die Mitoserate besteht (Tab. 3.7, Abb. 3.8) (p = 0,0036).

Bei der tubulären Differenzierung (Tab. 3.5, Abb. 3.6) und der Kernpleomorphie (Tab. 3.6, Abb. 3.7) sind die Unterschiede nicht so deutlich, vor allem auch, weil die Gruppen recht ungleich besetzt sind und gute Differenzierungsausprägungen nur in geringer Zahl vorkamen (p > 0,05).

Das aus den drei Komponenten zusammengesetzte Grading wiederum (Tab. 3.8, Abb. 3.9) zeigt für die univariate Überlebensanalyse eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von p = 0,0031 und lässt diesen als weiteren aussagekräftigen Prognosefaktor durchaus sinnvoll erscheinen.

# Tubuläre Differenzierung

tubuläre Differenzierung	1	2	3
Anzahl der Patienten	5	29	66
verstorbene Patienten	1	14	39
mittl. Überleben (Jahre)	9,7	8,1	7,1
5-Jahres-ÜLW (%)	80,0%	72,4%	59,1%
10-Jahres-ÜLW (%)	80.0%	54,3%	41,8%

**Tab. 3.5:** Überleben in Beziehung zur tubulären Differenzierung (TD) (p = 0,3052). In den 13 Fällen lobulärer Karzinome wurde dieser Parameter nicht bestimmt, so dass hier nur 100 Fälle erfasst sind.



**Abb. 3.6:** Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zur tubulären Differenzierung (TD). n = 100

# Kernpleomorphie

Kernpleomorphie	1	2	3
Anzahl der Patienten	9	45	52
verstorbene Patienten	3	20	32
mittl. Überleben (Jahre)	9,3	8,5	6,7
5-Jahres-ÜLW (%)	77,8%	75,6%	55,8%
10-Jahres-ÜLW (%)	66,7%	54,9%	41,5%

**Tab. 3.6:** Überleben in Beziehung zur Kernpleomorphie (KP) (p = 0,0608). In sieben Fällen wurde dieser Parameter nicht bestimmt, so dass hier nur 106 Fälle erfasst sind.



Abb. 3.7: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zur Kernpleomorphie (KP). n = 106

# **Mitoserate**

Mitoserate	1	2	3
Anzahl der Patienten	52	36	17
verstorbene Patienten	20	22	12
mittl. Überleben (Jahre)	8,9	7,1	5,2
5-Jahres-ÜLW (%)	76,9%	63,9%	35,3%
10-Jahres-ÜLW (%)	62,9%	38,0%	35,3%

**Tab. 3.7:** Überleben in Beziehung zur Mitoserate (MIT) (p = 0,0036). In acht Fällen wurde dieser Parameter nicht bestimmt, so dass hier nur 105 Fälle erfasst sind.



Abb. 3.8: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zur Mitoserate (MIT). n = 105

# Grading

Grading	1	2	3
Anzahl der Patienten	21	54	37
verstorbene Patienten	7	25	26
mittl. Überleben (Jahre)	9,0	8,4	5,8
5-Jahres-ÜLW (%)	76,2%	74,1%	48,7%
10-Jahres-ÜLW (%)	66,3%	54,9%	31,5%

**Tab. 3.8:** Überleben in der Beziehung zum Grading (Grad) (p = 0,0031). In einem Fall liegt keine abschließende Angabe zum Grading vor, so dass hier nur 112 Fälle erfasst sind.



Abb. 3.9: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zur Grading (Grad). n = 112

# 3.1.4 Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus

Die Tabellen 3.9 und 3.10 bzw. die Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen den Einfluss der biochemisch bestimmten Hormonrezeptoren auf das Überleben der Patientinnen.

### Östrogenrezeptor

ER	negativ	positiv
Anzahl der Patienten	29	84
verstorbene Patienten	16	43
mittleres Überleben (Jahre)	6,8	8,0
5-Jahres-ÜLW (%)	55,2%	70,2%
10-Jahres-ÜLW (%)	44,3%	50,3%

**Tab. 3.9:** Überleben in Beziehung zum biochemischen Östrogenrezeptorstatus (ER) (p = 0,1428)



**Abb. 3.10:** Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zum biochemischen Östrogenrezeptorstatus (ER)

# Progesteronrezeptor

PR	negativ	positiv
Anzahl der Patienten	57	56
verstorbene Patienten	35	24
mittl. Überleben (Jahre)	6,7	8,7
5-Jahres-ÜLW (%)	56,1%	76,8%
10-Jahres-ÜLW (%)	41,7%	56,1%

**Tab. 3.10:** Überleben in Beziehung zum biochemischen Progesteronrezeptorstatus (PR) (p = 0,0156)



Abb. 3.11: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier zum biochemischen Progesteronrezeptorstatus (PR)

Bei ER (p=0,1428) zeigt sich im Vergleich zu PR (p=0,0156) keine statistische Signifikanz. Daraus resultiert, dass der Progesteronrezeptor eine signifikant wertvollere Aussage für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten zulässt. Der Überlebensvorteil für Rezeptorpositive Patientinnen ist beim Östrogenrezeptor nur bis 8. Jahr nach Diagnosestellung signifikant nachweisbar.

### 3.1.5 Apoptose-bezogene Parameter

Die Auswertung der Apoptose-bezogenen Parameter wurde in drei Gruppen nach einer 1:2:1-Quantilisierung vorgenommen. Die entsprechenden Grenzwerte und die konkrete Verteilung der Fallzahlen auf die drei Gruppen Q1 (niedrig), Q2 (mittel) und Q3 (hoch) ist in Tabelle 3.11 wiedergegeben. Außer für APO<sub>min</sub> konnten dabei die angestrebten idealen Gruppenverteilungen von 28 : 57 : 28 ganz oder zumindest weitgehend eingehalten werden.

Parameter	Grenzwert Q1 / Q2	Grenzwert Q2 / Q3	Q1 : Q2 : Q3
<b>APO</b> min	0%	2,50%	48 : 38 : 27
APOmax	22,8%	54,05%	28 : 57 : 28
<b>APO</b> mean	7,95%	21,65%	28 : 57 : 28
APOmed	6,375%	22,5%	28 : 59 : 26
<b>APO</b> modal	3,3%	11,1%	24 : 52 : 37
APOtent	119	182,15	28 : 56 : 29
<b>APO</b> tarea	2028,675 μm²	3845,85 μm²	28 : 56 : 29

Tab. 3.11: Grenzwerte der Apoptose-Parameter bei 1:2:1-Quantilisierung und Verteilung	; der
Fälle auf die drei gebildeten Gruppen Q1, Q2 und Q3	

Die Tabellen 3.12 - 3.18 und die gleich nummerierten Abbildungen zeigen die Ergebnisse der univariaten Überlebensanalyse.

۸	Dr	<b>)</b> .
$\mathbf{n}$	JU	min

APO min	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten	48	38	27
verstorbene Patienten	25	21	13
mittl. Überleben (Jahre)	8,1	7,1	7,7
5-Jahres-ÜLW (%)	70,8%	57,9%	70,4%
10-Jahres-ÜLW (%)	51,4%	43,5%	51,9%

**Tab. 3.12:** Überleben in Beziehung zum niedrigsten Apoptosewert der 20 Gesichtsfelder  $(APO_{min})$  (p = 0,7118)



Abb. 3.12: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für APOmin

APOmax	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten	28	57	28
verstorbene Patienten	19	31	9
mittl. Überleben (Jahre)	6,3	7,6	9,1
5-Jahres-ÜLW (%)	50%	70,2%	75%
10-Jahres-ÜLW (%)	34,2%	46,6%	67,9%

**Tab. 3.13:** Überleben in Beziehung zum höchsten Apoptosewert der 20 Gesichtsfelder  $(APO_{max})$  (p = 0,0559)



Abb. 3.13: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für APOmax

# <u>APO</u><sub>mean</sub>

APOmean	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten	28	57	28
verstorbene Patienten	20	30	9
mittl. Überleben (Jahre)	5,9	7,7	9,3
5-Jahres-ÜLW (%)	46,4%	68,4%	82,1%
10-Jahres-ÜLW (%)	30,1%	48,7%	67,7%

**Tab. 3.14:** Überleben in Beziehung zur prozentualen Apoptoserate aller 20 Gesichtsfelder (APO<sub>mean</sub>) (p=0,0108)



Abb. 3.14: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für APOmean

<u>APO</u> <sub>n</sub>	ned
-------------------------	-----

APOmed	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten	28	59	26
verstorbene Patienten	16	31	12
mittl. Überleben (Jahre)	7,4	7,6	8,1
5-Jahres-ÜLW (%)	64,3%	66,1%	69,2%
10-Jahres-ÜLW (%)	44,8%	48,6%	53,9%

**Tab. 3.15:** Überleben in Beziehung zum medianen Apoptosewert der 20 Gesichtsfelder  $(APO_{med})$  (p = 0.8165)



Abb. 3.15: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für APO<sub>med</sub>

# <u>APO<sub>modal</sub></u>

APO modal	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten	24	52	37
verstorbene Patienten	14	28	17
mittl. Überleben (Jahre)	7,3	7,7	7,9
5-Jahres-ÜLW (%)	58,3%	69,2%	67,6%
10-Jahres-ÜLW (%)	49,7%	45,0%	53,7%

**Tab. 3.16:** Überleben in Beziehung zum modalen Apoptosewert der 20 Gesichtsfelder (APO<sub>modal</sub>) (p=0,8350)



Abb. 3.16: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für APOmodal

<u>APO<sub>tcnt</sub></u>
---------------------------

APOtent	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten	28	56	29
verstorbene Patienten	13	32	14
mittl. Überleben (Jahre)	8,1	7,4	7,8
5-Jahres-ÜLW (%)	71,4%	64,3%	65,5%
10-Jahres-ÜLW (%)	51,9%	44,5%	54,4%

**Tab. 3.17:** Überleben in Beziehung zur Gesamtzahl der untersuchten Tumorzellen in 20 Gesichtsfeldern (APO<sub>tent</sub>) (p=0,7867)



Abb. 3.17: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für APOtent

APOtarea	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten	28	56	29
verstorbene Patienten	12	32	15
mittl. Überleben (Jahre)	8,2	7,3	7,8
5-Jahres-ÜLW (%)	71,4%	64,3%	65,5%
10-Jahres-ÜLW (%)	55,6%	44,5%	50,7%

**Tab. 3.18:** Überleben in Beziehung zur Gesamtfläche der untersuchten Tumorzellen (APO<sub>tarea</sub>) (p=0,6287)



Abb. 3.18: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für APOtarea

Fasst man die Ergebnisse der Tabellen 3.12 - 3.18 und der Abbildungen 3.12 - 3.18zusammen, so zeigen sich insbesondere für die Auswertemodi nach dem Mittelwert apoptotischer Zellen in allen 20 Gesichtsfeldern (APO<sub>mean</sub>) und dem Wert für das Gesichtsfeld mit der höchsten Apoptoserate innerhalb der 20 Gesichtsfelder (APO<sub>max</sub>) eine zumindest graphisch erkennbare bessere Prognose insbesondere für die Fallgruppe Q3, also für die Patientinnen mit hohen Werten, und ebenso eine gewisse Unterscheidbarkeit zwischen den Gruppen Q2 und Q1. Diese Ergebnisse sind für APO<sub>mean</sub> statistisch signifikant (p = 0,0108) und für APO<sub>max</sub> fast signifikant (p = 0,0559). Die übrigen Auswertemodi der Datenverteilung (APO<sub>min</sub>, APO<sub>med</sub>, APO<sub>modal</sub>) führen hingegen zu keinen sinnvollen Unterscheidungen der Fallgruppen.

Besonders hinzuweisen ist noch darauf, dass sich für APO<sub>tarea</sub> und APO<sub>tent</sub> keinerlei Trends oder Signifikanzen ergaben. Dieser Effekt ist ausdrücklich als positiv herauszustellen und ist methodisch von großer Bedeutung. Die beiden Parameter beschreiben nämlich keine Apoptoseraten, sondern beziehen sich rein auf die Gesamtfläche bzw. die Gesamtzahl aller erfassten Tumorzellen in allen 20 Gesichtsfeldern im Rotfilterbild (in der Bezeichnung jeweils angedeutet mit "t" wie "total"). Wenn sich bei ihrer Auswertung bezüglich der Prognose der Patientinnen keine Unterschiede zeigen, ist dies ein Hinweis auf die gewünschte Unabhängigkeit des Messergebnisses von der untersuchten Tumorkernfläche bzw. Tumorzellzahl.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich mithilfe der "klassischen" Parameter APO<sub>mean</sub> und APO<sub>max</sub> ähnlich wie bei immunhistochemischen Anwendungen mit dem gleichen Meßsystem prognostische Aussagen erheben ließen, mit anderen Auswerte-vorschlägen hingegen nicht.

# 3.2 Multivariate Überlebensanalyse

Die multivariate Überlebensanalyse in Cox-Modellen soll der univariaten Überlebensanalyse angeschlossen werden. Bevor diese dargestellt wird, ist es aber zuvor sinnvoll, Korrelationen zwischen den Apoptose-bezogenen Parameter darzustellen.

#### 3.2.1 Methodische Untersuchungen zu den Variablen der Apoptosequantifizierung

In diesem Teil sollen die einzelnen Variablen zur Apoptosequantifizierung untereinander verglichen werden. Dazu wurden für die sieben Parameter APO<sub>min</sub>, APO<sub>max</sub>, APO<sub>med</sub>, APO<sub>modal</sub>, APO<sub>mean</sub>, APO<sub>tarea</sub> und APO<sub>tent</sub> die Korrelationskoeffizienten berechnet (Tab. 3.19).

Variable	<b>APO</b> <sub>min</sub>	APO <sub>max</sub>	APO <sub>med</sub>	APO <sub>modal</sub>	APO <sub>mean</sub>	APO <sub>tarea</sub>	APOtcnt
APO <sub>min</sub>	-						
APO <sub>max</sub>	0,355	-					
APO <sub>med</sub>	0,541	0,577	-				
APO <sub>modal</sub>	0,625	0,527	0,839	-			
APO <sub>mean</sub>	0,616	0,795	0,836	0,841	-		
APO <sub>tarea</sub>	-0,171	-0,295	-0,186	-0,269	-0,375	-	
APO <sub>tent</sub>	-0,104	-0,242	0,004	-0,125	-0,239	0,651	-

Tab. 3.19: Korrelationskoeffizienten zwischen verschiedenen Größen zur Apoptosequantifizierung

Wie man aus der Tabelle entnehmen kann, gibt es zwischen den fünf eigentlichen Messgrößen APO<sub>min</sub>, APO<sub>max</sub>, APO<sub>med</sub>, APO<sub>modal</sub> und APO<sub>mean</sub> durchaus unterschiedliche Korrelationen. Dabei überrascht nicht, dass zwischen APO<sub>med</sub>, APO<sub>modal</sub> und APO<sub>mean</sub> jeweils Korrelationskoeffzienten von r > 0,83 erzielt werden, da diese Größen letztendlich alle etwas mit mittleren Werten zu tun haben. Von ihnen ist APO<sub>mean</sub> wiederum derjenige, der mit dem maximalen Messwert APO<sub>max</sub> am höchsten korreliert ist (r = 0,795).

Mit APO<sub>tarea</sub> und APO<sub>tcnt</sub> sind die fünf Messgrößen unkorreliert (-0,375  $\leq$  r  $\leq$  0,004); dieses zeigt eine Unabhängigkeit der Messwerte von der Gesamtfläche bzw. der Gesamtzahl analysierter Tumorzellen an und unterstützt die Annahme, dass für eine verlässliche Messung genügend Zellen erfasst worden sind. Der hohe Korrelationskoeffizient zwischen beiden wiederum (r = 0,651) ist ebenfalls nicht unerwartet.

Damit eine bessere Erkennbarkeit zwischen den 21 Einzelkorrelationen hergestellt werden kann, wurde eine Varianzkomponentenanalyse mit Varimax-Rotation durchgeführt. Dieses Verfahren ist in unserer Arbeitsgruppe erprobt und wurde auch bezüglich Validität und Darstellungsqualität als verlässlich dokumentiert (Sun et al., 1994). Sein Prinzip ist, eine Datenverteilung von n Daten im m-dimensionalen Raum, wobei m die Zahl der Variablen repräsentiert, in einem z.B. 2-dimensionalen Raum, d.h. in einer durch ein Kartesisches Koordinatensystem darstellbaren Ebene, als Summenvektoren abzubilden. Je näher zwei Summenvektoren zusammenliegen, um so höher sind die von ihnen repräsentierten Daten miteinander korreliert. Nicht zu verhindern ist, dass bei einer solchen Projektion, die im Grunde eine Vereinfachung repräsentiert, gewisse Informationen verloren gehen. Das Maß dafür, wie gut die Varianzkomponentenanalyse die realen Daten repräsentiert, ist der erklärte Anteil der Varianz an der Gesamtvarianz, die durch die Projektion nicht mehr vollständig abgebildet werden kann. Der erklärte Anteil der Varianz im hier untersuchten Datensatz beträgt 76,9%, was einem guten Wert entspricht.

In Tabelle 3.20 sind die x/y-Koordinaten der Summenvektoren (nach Varimax-Rotation) wiedergegeben. Abb. 3.19 zeigt die Lage der vom Ursprungspunkt (0/0) ausgehenden Summenvektoren, indem die Vektorenspitze durch ein Symbol charakterisiert wird.

Variable	Faktor1	Faktor2
APO <sub>min</sub>	0,727	-0,034
APO <sub>max</sub>	0,714	-0,285
APO <sub>med</sub>	0,918	-0,029
APO <sub>modal</sub>	0,909	-0,088
APO <sub>mean</sub>	0,936	-0,247
APO <sub>tarea</sub>	-0,192	0,874
APO <sub>tcnt</sub>	-0,024	0,917

**Tab. 3.20:** Varianzkomponentenanalyse zur Apoptosequantifizierung. Darstellung nach Varimax-Rotation. Erklärte Varianz: 76,9%



**Abb. 3.19:** Graphische Darstellung der Varianzkomponentenanalyse zur Apoptosequantifizierung. x-Achse: Faktor 1, y-Achse: Faktor 2

Die graphische Auswertung der Varianzkomponentenanalyse zeigt noch einmal sehr deutlich, dass die Parameter APO<sub>min</sub>, APO<sub>max</sub>, APO<sub>med</sub>, APO<sub>modal</sub> und APO<sub>mean</sub> in einem gemeinsamen Zusammenhang stehen, so wie es auch die Korrelationskoeffizienten in Tab. 3.21 bereits ausgedrückt haben. Gleichzeitig bestätigt sich auch der enge Zusammenhang zwischen APO<sub>tarea</sub> und APO<sub>tent</sub>.

Insgesamt lässt sich sehr anschaulich zeigen, dass die fünf eigentlichen Messparameter APO<sub>min</sub>, APO<sub>max</sub>, APO<sub>med</sub>, APO<sub>modal</sub> und APO<sub>mean</sub> von den beiden Variablen APO<sub>tarea</sub> und APO<sub>tent</sub> unabhängig sind. Diese Tatsache entspricht im weitesten Sinne einer Qualitätskontrolle der Messreihe, weil sie belegt, dass die Ergebnisse der Messungen so stabil sind, dass sie nicht (mehr) von der Zahl oder der Fläche der gemessenen Tumorareale abhängen.
#### 3.2.2 Berechnung eines Cox-Modells

Im Rahmen der multivariaten Analyse wurden die univariat prognostisch relevanten Parameter (Staging, Grading und Hormonrezeptorstatus) und die bildanalytischen Apoptose-Variablen auf sich ergänzende prognostische Aussagekraft überprüft. Hierbei wurden beim Grading die Einzelparameter nicht berücksichtigt und auch der Fernmetastasenstatus nicht herangezogen, weil die Angaben zu ihm nicht vollständig waren. Bei den Apoptosebezogenen Größen macht es keinen Sinn, APO<sub>tarea</sub> und APO<sub>tent</sub> zu berücksichtigen, da sich beide, wie oben ausgeführt, rein auf Aspekte der Qualitätssicherung der Messungen beziehen. Entsprechend wurden von den Apoptose-bezogenen Variablen lediglich APO<sub>min</sub>, APO<sub>max</sub>, APO<sub>med</sub>, APO<sub>modal</sub> und APO<sub>mean</sub>. in die multivariate Analyse eingebracht, und zwar nach einer 1:2:1-Quantilisierung. Die Ausgangswerte aller Variablen vor Schritt 1 sind in Tabelle 3.21 dargestellt.

Variable	Chi <sup>2</sup> enter-Wert	Chi <sup>2</sup> remove-Wert	p-Wert
Lymphknotenstatus pN	13,77		0,0002
Gradierung	9,61		0,0019
APO <sub>max</sub>	8,65		0,0033
Tumorgröße pT	7,07		0,0078
PR	5,05		0,0246
APOmean	3,97		0,0462
APO <sub>med</sub>	1,35		0,2451
ER	0,80		0,3720
APO <sub>min</sub>	0,08		0,7819

**Tab. 3.21:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der Stadienparameter, des Gradings, des Hormonrezeptorstatus und der Apoptose-basierten Variablen; n=112. Ausgangssituation vor Schritt 1. Die Variablen sind nach absteigender univariater Relevanz (fallender Chi<sup>2</sup>-enter-Wert) geordnet.

Als erste Variable wurde der Lymphknotenstatus in das Cox-Modell aufgenommen, das er mit einem Chi<sup>2</sup>-enter-Wert von 13,77 über die höchste univariate prognostische Relevanz der im Modell angebotenen Größen verfügte (Tabelle 3.22).

Variable	Chi <sup>2</sup> enter-Wert	Chi <sup>2</sup> remove-Wert	p-Wert
Lymphknotenstatus pN		13,77	0,0002
PR	7,39		0,0065
APO <sub>max</sub>	5,91		0,0151
Gradierung	5,05		0,0247
Tumorgröße pT	3,97		0,0462
APO <sub>mean</sub>	2,39		0,1220
ER	1,96		0,1614
APO <sub>med</sub>	1,87		0,1717
APO <sub>min</sub>	0,07		0,7878

**Tab. 3.22:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der Stadienparameter, des Gradings, des Hormonrezeptorstatus und der Apoptose-basierten Variablen; n=112. Schritt 1

Als zweite Größe wurde in Schritt 2 der Progesteronrezeptor-Status PR berücksichtigt, da ihm von den verbliebenen Variablen mit einem Chi<sup>2</sup>-enter-Wert von 7,39 die höchste Restrelevanz zukam. Tab. 3.23 zeigt die statistischen Kennwerte aller Variablen nach Schritt 2.

Variable	Chi <sup>2</sup> enter-Wert	Chi <sup>2</sup> remove-Wert	p-Wert
Lymphknotenstatus		16,11	0,0001
PR		7,39	0,0065
Tumorgröße pT	5,83		0,0157
Gradierung	4,23		0,0396
APO <sub>max</sub>	3,72		0,0539
APO <sub>mean</sub>	0,72		0,3950
APO <sub>med</sub>	0,41		0,5226
ER	0,03		0,8707
APO <sub>min</sub>	0,00		0,9868

**Tab. 3.23:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der Stadienparameter, des Gradings, des Hormonrezeptorstatus und der Apoptose-basierten Variablen; n=112. Schritt 2

Variable	Chi <sup>2</sup> enter-Wert	Chi <sup>2</sup> remove-Wert	p-Wert
Lymphknotenstatus pN		13,92	0,0002
PR		9,25	0,0024
Tumorgröße pT		5,83	0,0157
Gradierung	3,49		0,0616
APO <sub>max</sub>	2,68		0,1015
APO <sub>med</sub>	0,36		0,5468
APO <sub>mean</sub>	0,28		0,5989
APO <sub>min1s</sub>	0,11		0,7424
ER	0,05		0,8264

In den Schritten 3, 4 und 5 wurden daraufhin die Tumorgröße pT, das Grading und der Apoptoseparameter APO<sub>max</sub> in das Cox-Modell aufgenommen (Tab. 3.24 - 3.26).

**Tab. 3.24:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der Stadienparameter, des Gradings, des Hormonrezeptorstatus und der Apoptose-basierten Variablen; n=112. Schritt 3

Variable	Chi <sup>2</sup> enter –Wert	Chi <sup>2</sup> remove-Wert	p-Wert
Lymphknotenstatus		9,40	0,0022
PR		8,29	0,0040
Tumorgröße pT		5,09	0,0240
Gradierung		3,49	0,0616
APO <sub>max</sub>	2,78		0,0957
APO <sub>min</sub>	0,28		0,5962
APO <sub>mean</sub>	0,17		0,6776
APO <sub>med</sub>	0,11		0,7442
ER	0,03		0,8675

**Tab. 3.25:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der Stadienparameter, des Gradings, des Hormonrezeptorstatus und der Apoptose-basierten Variablen; n=112. Schritt 4

Variable	Chi <sup>2</sup> enter-Wert	Chi <sup>2</sup> remove-Wert	p-Wert
Lymphknotenstatus		8,66	0,0032
PR		6,60	0,0102
Tumorgröße pT		3,89	0,0486
Gradierung		3,59	0,0582
APO <sub>max</sub>		2,78	0,0957
APO <sub>mean</sub>	2,13		0,1448
APO <sub>min</sub>	1,39		0,2384
APO <sub>med</sub>	0,64		0,4228
ER	0,05		0,8309

**Tab. 3.26:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der Stadienparameter, des Gradings, des Hormonrezeptorstatus und der Apoptose-basierten Variablen; n=112. Schritt 5

Nach dem fünften Schritt erfüllte kein weiterer Parameter mehr das Aufnahmekriterium, nämlich einen p-Wert von < 0,10. Das Endergebnis des Cox-Modells ist entsprechend in Tab. 3.27 zusammengefasst.

Schritt	Improvement Chi <sup>2</sup>	p-Wert	Global Chi <sup>2</sup>	p-Wert
1 (pN)	13,77	< 0,001	14,13	< 0,001
2 (PR)	7,39	0,0065	21,44	< 0,001
3 (pT)	<b>3 (pT)</b> 5,83 0,0157		26,84	< 0,001
4 (Grad)	3,49	0,0616	30,30	< 0,001
5 (APO <sub>max</sub> )	2,78	0,0957	32,75	< 0,001

**Tab. 3.27:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der Stadienparameter, des Gradings, des Hormonrezeptorstatus und der Apoptose-basierten Variablen; n=112. Übersicht über die Entwicklung der statistischen Kenngrößen von Schritt zu Schritt.

Insgesamt wurden somit im Cox-Modell fünf Variable identifiziert, die den Modellvorgaben folgend sich in ihrer prognostischen Aussagekraft ergänzen.

#### 3.2.3 Validierung des Cox-Modells am Datensatz

Die Validierung des Cox-Modells am Datensatz dient dem Zweck, das Ergebnis der Modellrechnung am eigenen Datensatz auf wirkliche prognostische Relevanz zu überprüfen und den Einfluss der einzelnen Variablen auf das Gesamtergebnis abzuschätzen.

Zunächst wurde ein Ansatz gewählt, in welchem die beiden stärksten multivariaten Parameter, nämlich pN und PR, zusammengebracht wurden, entsprechend also die beiden Größen berücksichtigt wurden, die in Schritt 1 und Schritt 2 des Cox-Modells aufgenommen worden waren. Da beide über jeweils zwei Ausprägungen verfügen, entstehen somit vier Gruppen von Patientinnen mit den Ausprägungen pN0/PR+, pN0/PR-, pN+/PR+ und pN+/PR- (Tab. 3.28), die zufälligerweise auch annähernd gleich viele Patientinnen beinhalten, nämlich zwischen 27 und 30.

Parameter-Konstellation	N0/PR+	N0/PR-	N1/PR+	N1/PR-
Anzahl der Patienten	28	30	27	27
verstorbene Patienten	8	13	15	22
mittl. Überleben (Jahre)	9,6	8,7	7,6	4,4
5-Jahres-ÜLW (%)	85,7	73,3	66,7	37,0
10-Jahres-ÜLW (%)	70,9	63,0	43,3	17,8

**Tab. 3.28:** Überleben in Beziehung zu einer gemeinsamen Betrachtung zu pN und PR (p < 0,0001)

Die Überlebenskurven nach Kaplan und Meier sind in Abb. 3.20 wiedergegeben. Bezogen auf den Lymphknotenstatus als stärkstem prognostischen Parameter lässt sich sagen, dass die Hinzunahme des Progesteronrezeptor-Status die prognostische Gesamtaussage deutlich verbessert, aber nicht für pN0 und pN+ in gleichem Maße. Patientinnen mit der Konstellation pN0/PR+ überleben zwar im Trend länger als solche mit pN0/PR-, jedoch war dieser Trend im Einzelvergleich beider Kurven nicht signifikant (p > 0,05). Für Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen (pN+) hingegen zeigen sich zwischen den Gruppen pN+/PR+ und

pN+/PR- Überlebensunterschiede, die im Vergleich beider Gruppen statistisch signifikant (p = 0,0039) und auch graphisch überzeugend waren. Es ist somit als erstes wichtiges Ergebnis der Validierung zu beschreiben, dass der ergänzende prognostische Effekt von PR sich vor allem in der Gruppe der Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen manifestiert.



Kombinierte Prognostik: Lymphknotenstatus (N) und Progesteronstatus (PR)

**Abb. 3.20:** Validierung des Cox-Modells (nach Schritt 2): Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für eine kombinierte Prognostik durch Lymphknotenstatus (N) und Progesteronrezeptorstatus (PR)

Auf die gleiche Weise auch den in Schritt 3 aufgenommen Stadienparameter pT zu betrachten, ist nicht möglich. Er selber liegt in vier Ausprägungen vor, so dass dann 16 mutmaßlich inhomogen besetzte und kleine Patientengruppen entstünden, die man kaum noch vergleichen könnte.

Daher wurde eine andere Herangehensweise gewählt, die auf der Bildung von "Multivariate Funktionen" genannten Hilfsfunktionen basiert. Hierzu werden pro Patient die Einzelwerte der eingesetzten Variablen, jeweils korrigiert um einen im jeweiligen Schritt des Cox-Modells dokumentierten Koeffizienten, addiert und so für jeden Patienten ein Zahlenwert für die Multivariate Funktion ermittelt. Teilt man die Werteverteilung der Multivariaten Funktion in zwei oder mehrere Gruppen auf, z.B. mit dem Median als Grenzwert in zwei Gruppen oder nach 1:2:1-Quantilisierung in drei Gruppen, so können zwischen diesen Gruppen Überlebensvergleiche angestellt werden.

Im Folgenden soll diese Anwendung für die Ergebnisse am Cox-Modell nach Schritt 4 (Funktion MP4), d.h. nach Aufnahme von pN, PR, pT und Grading, und nach Schritt 5 (Funktion MP5), wenn auch der einzige aufgenommene Apoptoseparameter hinzugekommen ist, vorgenommen werden.

Die beiden Funktionen sind (unter Berücksichtigung der Koeffizienten) wie folgt definiert:

- MP4 = 0.87 x pN 0.79 x PR + 0.38 x pT + 0.39 x Grad
- MP5 =  $0.83 \text{ x pN} 0.72 \text{ x PR} + 0.34 \text{ x pT} + 0.39 \text{ x Grad} 0.01 \text{ x APO}_{\text{max}}$

Um zu einem möglichst geeigneten Vergleich mit pN zu gelangen, wurden die 112 Fälle im gleichen Verhältnis, in welchem pN als pN0 bzw. pN+ aufgetreten war (58:54), in zwei Gruppen eingeteilt.

In	Tab.	3.29	und	Abb.	3.21	sind	die	Ergebnisse	für	MP4	wiede	rgege	ben.
								<u> </u>					

Parameter-Konstellation	NO	N1	<b>MP4</b> (n)	<b>MP4</b> (h)
Anzahl der Patienten	58	54	58	54
verstorbene Patienten	21	37	20	38
mittl. Überleben (Jahre)	9,2	6,0	9,6	5,5
5-Jahres-ÜLW (%)	79,3	51,9	84,8	45,3
10-Jahres-ÜLW (%)	66,6	30,5	66,7	30,0

**Tab. 3.29:** Überlebensdaten für eine vergleichende Betrachtung von pN (p = 0,0002) und MP4 (p < 0,0001)



Vergleichende Prognostik: Lymphknotenstatus (N) und Multivariate Funktion MP4

**Abb. 3.21:** Validierung des Cox-Modells (nach Schritt 4): Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für eine vergleichende Prognostik durch den Lymphknotenstatus pN (gepunktet) bzw. die Multivariate Funktion MP4 (durchgezogen)

Die Grafik zeigt gut, worin der Effekt der drei nach pN in das Cox-Modell aufgenommenen Variablen PR, pT und Grading wirklich besteht: Sie spreizen die gepunktet dargestellten Überlebenskurven von pN etwas weiter auf, wobei sich der Effekt nach ca. 7 Jahren Beobachtungszeit verliert. Im paarweisen Vergleich sind allerdings die Überlebensunterschiede zwischen pN0 und MP4 (niedrig) bzw. zwischen pN+ und MP4 (hoch) nicht statistisch signifikant (p > 0,05), repräsentieren aber einen Trend. Viel steuern allerdings streng genommen die weiteren Variablen nicht zum Ergebnis bei.

In Tab. 3.30 und Abb. 3.22 sind die Ergebnisse der Validierung nach Schritt 5 dargestellt. Die tabellarische Darstellung zeigt bereits, dass sich die Kenndaten von MP4 und MP5 weder für das mittlere Überleben, noch für die 5-Jahres- bzw. 10-Jahres-ÜLW wesentlich unterscheiden. Auch Abbildung 3.22 illustriert, dass in der Tat der durch MP5 erzielbare zusätzliche Effekt auf den Verlauf der Überlebenskurven marginal ist. Die beiden fett gedruckten Kurven

weichen zwar von den übrigen im Sinne einer weiteren Aufspreizung ab, jedoch nur in ganz geringem Maße. Dieser geringe Unterschied ist letztendlich dasjenige prognostische Moment, das sich durch die Bestimmung der maximalen Apoptoserate herausarbeiten lässt.

Parameter-Konstellation	<b>MP4</b> ( <b>n</b> )	<b>MP4</b> (h)	MP5 (n)	MP5 (h)
Anzahl der Patienten	58	54	58	54
verstorbene Patienten	20	38	18	40
mittl. Überleben (Jahre)	9,6	5,5	9,9	5,3
5-Jahres-ÜLW (%)	84,8	45,3	88,0	40,7
10-Jahres-ÜLW (%)	66,7	30,0	70,0	27,0

**Tab. 3.30:** Überlebensdaten für eine vergleichende Betrachtung von MP4 (p < 0,0001) und MP5 (p < 0,0001)



**Abb. 3.22:** Validierung des Cox-Modells (nach Schritt 5): Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für eine vergleichende Prognostik durch den Lymphknotenstatus pN (gepunktet), die Multivariate Funktion MP4 (rot) bzw. die Multivariate Funktion MP5 (blau)

### 4 Diskussion

Tumorerkrankungen sind heute besser charakterisiert als je zuvor. In kaum einen Zweig der Medizin fließen so viele Forschungsmittel und sind so viele wissenschaftliche Gruppen unterwegs, um Tumorleiden besser zu verstehen, früher zu diagnostizieren und möglichst individualisiert zu therapieren. Dabei ist bislang noch kein Ende der Entwicklungen in Sicht.

Dieses gilt auch für das Mammakarzinom, eine Tumorentität (mit diversen Subentitäten), für die ebenfalls in den letzten Jahrzehnten eine neue Anschauung herausgearbeitet wurde. Aus dieser resultierten Schritt für Schritt vorgenommene Modifikationen der Diagnostik und Therapie, die in einer Verbesserung sowohl des klinischen Verlaufes als auch der Überlebensprognose mündeten.

## 4.1 Therapeutischer Strategiewandel beim Mammakarzinom in den vergangenen 40 Jahren: Von radikalen zu weniger umfangreichen, individualisierten Konzepten

Für die historische Entwicklung des Verständnisses von Mammakarzinomen im Allgemeinen sei auf einen aktuellen und sehr lesenswerten Übersichtsartikel von Kiven Lukong mit dem Titel "Understanding breast cancer - the long and winding road" verwiesen, in dem er einen Brückenschlag von der mutmaßlichen Erstbeschreibung eines Mammakarzinoms vor mehr als 3000 Jahren in zwei altägyptischen Papyri, nämlich dem *Edwin Smith Surgical Papyrus* und dem *Ebers Papyrus*, bis zur heutigen modernen Diagnostik mit *Next Generation Sequencing* und Behandlung mit modernsten adjuvanten Therapieverfahren versucht (Lukong, 2017).

Will man weniger lange zurückgehen, so genügt es möglicherweise, eine bis zwei Generationen in derjenigen Medizin zurückzuschauen, die wir heute betreiben und die stets als (zeitbezogene) "Hochleistungsmedizin" galt. Dazu steht zur Anschauung eine ältere Untersuchung aus der gleichen Arbeitsgruppe aus den späten 70er Jahren zur Verfügung, in der später auch die hier vorliegende Studie erbracht wurde. Aus dem Patientenkollektiv, das gut 10 Jahre nach seiner Akquise in einer Überlebensstudie nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewertet wurde, lässt sich das therapeutische Vorgehen dieser Zeit gut ablesen (Biesterfeld, 1989): Alle 104 Patientinnen, von den ca. drei Viertel zwischen 1975 und 1979 erkrankten, wurden unabhängig vom Tumorstadium mit einer *Ablatio mammae*  behandelt. Fast alle Patientinnen, nämlich 101, erhielten ergänzend eine Lymphadenektomie der axillären Level 1 und 2. Die adjuvanten Therapien bestanden in einer reinen Strahlentherapie (n = 76), in einer reinen Chemotherapie (n = 10) bzw. in Kombinationen beider (n = 3). Eine Patientin erhielt nach der Chemotherapie eine Radiomenolyse, was letztendlich einer ablativen Hormontherapie entspricht, und 14 Patientinnen wurden gar nicht adjuvant behandelt. Eine medikamentöse Hormontherapie war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht etabliert, wurde aber später im klinischen Verlauf verschiedentlich bei Rezidiven oder in metastasierten Situationen eingesetzt. Dabei waren die Patientinnen seinerzeit nicht etwa dermaßen fortgeschritten, dass man zu solch radikalen Maßnahmen aus heutiger Erkenntnis greifen müsste: 29 Frauen befanden sich im Tumorstadium pT1, 52 im Stadium pT2 und 23 in den Stadien pT3 bzw. pT4. Bezogen auf den Lymphknotenstatus waren 56 pN0 und 48 pN+, also in den Stadien pN1 bis pN3.

Heute kann man davon ausgehen, dass alle Patientinnen mit Tumoren im Stadium pT1 und die meisten mit Tumoren im Stadium pT2 brusterhaltend operiert worden wären und dass die 52 Patientinnen im Stadium pN0 lediglich eine *Sentinel-Node*-Entfernung in der Axilla erhalten hätten. Dass heute die Primärtumoren im Durchschnitt kleiner wären, würde sich in entsprechend noch höheren Raten für Brusterhalt und Beschränkung auf Sentinel-Lymphknoten niederschlagen. Außerdem wäre nach heutiger S3-Leitlinie zu erwarten, dass nicht nur alle Frauen mit brusterhaltender Therapie lokal strahlentherapiert würden, sondern auch ein Großteil adjuvant chemotherapiert und / oder mit Antiöstrogenen bzw. mit Trastuzumab (im Falle einer Her-2/neu-Positivität) behandelt würden. Wie viele Frauen seinerzeit einer synchronen oder metachronen Wiederaufbau der Brust erhalten haben, wurde nicht eruiert. Man kann aber auch hier sicher im Vergleich zu heutigen Ablatio-Fällen von geringeren Quoten ausgehen, allein schon deswegen, weil früher in der Regel stets auch eine große, den gesamten Drüsenkörper bedeckende Hautfläche mit entfernt wurde. Die heutigen Ablatio-Verfahren der "*skin sparing mastectomy*", bei der nur eine vergleichsweise kleine Hautspindel mit entfernt wird, machen einen Wiederaufbau sicher einfacher.

Ebenso fallen heute die adjuvanten Maßnahmen technisch und inhaltlich völlig anders aus als damals. Dazu tragen insbesondere technische Entwicklungen in der Strahlentherapie bei, die eine wesentliche genauere Dosierung der Strahlung mit stärkerer Reduktion der Streustrahlung erlauben. Im Bereich der Chemotherapeutika stehen heute viel mehr Substanzklassen zur Verfügung als damals, und außerdem sind mit der antihormonellen Therapie und den Anwendungen von Antikörpern neue Standbeine hinzugetreten. Zum aktuellen Stand soll hier auf die derzeit gültige S3-Leitlinie verwiesen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2017) werden.

#### 4.2 Veränderungen in der makroskopischen Aufarbeitung von Mammapräparaten

Der oben beschriebene therapeutische Paradigmenwechsel hat sich selbstverständlich nicht von heute auf morgen ergeben, sondern hat sich über die Zeit entwickelt. Gleichermaßen sind auch die radiologische und die morphologische Diagnostik einem ähnlich deutlichen Wandel unterworfen gewesen, der die frühere Vorgehensweise heute zumindest teilweise archaisch erscheinen lässt. Im Rahmen dieser Arbeit soll dabei im Besonderen auf die veränderte Rolle der Pathologie im diagnostischen Prozess eingegangen werden.

Die Methode der Wahl zur Sicherung (oder zum Ausschluss) eines Mammakarzinoms war dabei noch bis weit in die 90er Jahre hinein die Beurteilung einer Probeexzision (PE), üblicherweise im intraoperativen Schnellschnittverfahren mit späterer ergänzender Aufarbeitung in Paraffinschnitten; auf den Operationsplänen stand dann die Formulierung "V.a. Mammakarzinom, PE mit Schnellschnitt, ggfls. Weiteres", wobei die kursiv wiedergegebene Perspektive bis hin zur Ablatio mit ausführlicher Lymphadenektomie reichen konnte. Das Material, das auf Eis gekühlt zum Schnellschnitt übersandt wurde, war unmarkiert, enthielt also keine Markierungsfäden oder Metallclips, an denen man es im Raum hätte orientieren können, und keine Spickdrähte, die die Lage des verdächtigen Prozesses im Raum dargestellt hätten. Es wurde unter Schnellschnittbedingungen lamelliert, wobei die Läsion dargestellt und anschließend histologisch untersucht wurde. Dabei war ein ganzer Formenkreis von Erkrankungen möglich; viele Fälle gingen insofern gut aus, als nur eine Mastopathie oder ein Fibroadenom vorlagen, bei anderen wurde ein Mammakarzinom diagnostiziert. Auch seltene Läsionen wie ein malignes Lymphom, ein Sarkom oder ein Granularzelltumor, mit denen man die Möglichkeiten des Schnellschnittes im Grunde überschritt, kamen vor. Gelegentlich ergaben sich auch falsch-negative Schnellschnittdiagnosen, wenn ein kleines Mammakarzinom erst später in den Paraffinschnitten gefunden wurde. Von der Dimension her muss man sich dabei vorstellen, dass ein Schnellschnitt eine Fläche von ca. 0,5 \* 0,8 cm abdeckt und um z.B. acht Paraffineinbettungen von jeweils ca. 0,8 \* 1,2 cm ergänzt wurde. Bei diesen Problemfeldern verwundert es nicht, dass Schnellschnitte heute gemäß der aktuellen S3-Leitlinie in der primären Diagnostik von Mammakarzinomen weitestgehend obsolet sind (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2017).

Die heutige Vorgehensweise einer präoperativen Stanzdiagnostik, durch die die Operateure jetzt bereits bei Beginn der Operation genau wissen, welcher Entität die zu entnehmende Läsion zuzuordnen ist, wurde erst in den späten 90er Jahren als Standardverfahren allgemein eingeführt und war nicht möglich, bevor Vakuumstanzverfahren entwickelt waren, mit denen ein Verrutschen der Läsion im weichen und beweglichen Brustdrüsenparenchym vermieden werden konnte. Insbesondere negative, also tumorfreie Befunde waren mit den zuvor gebräuchlichen Stanzverfahren nicht glaubhaft gewesen. Heute ist (von Ausnahmen abgesehen) eine präoperative stanzbioptische Diagnostik verpflichtend.

Ebenso ist klar, dass eine darauf folgende Brustdrüsenteilresektion durch Fäden oder Metallclips so zu markieren ist, dass der Pathologe sie anhand einer Mammaskizze geometrisch ausrichten kann. Bei der Makropräparation werden dann die Angaben zur Lage im Raum durch am Präparat angebrachte Farbmarkierungen ersetzt, was wiederum eine Orientierung auch am histologischen Schnittpräparat ermöglicht. Alle diese Maßnahmen erlauben eine wesentliche präzisere Diagnostik für die betroffene Patientin, aus welcher dann wiederum auch eine bessere Therapieplanung resultiert. Bei randbildendem oder nahe an einen Rand reichendem Tumor ist bei einer solchen Vorgehensweise eine gezielte Nachresektion in einem zweiten Eingriff in Form einer gewebesparenden Entnahme nach Art einer Mondsichel möglich.

# **4.3** Erprobung und Etablierung morphologischer Marker in Therapieplanung und Prädiktion des klinischen Verlaufes ("Prognosemarker")

An dem oben zitierten Patientenkollektiv beschränkte sich die morphologische Untersuchung der hergestellten Präparate rein auf die sogenannte Routinemikroskopie an HE- bzw. auch PAS-gefärbten Schnitten. Diese Standardfärbungen sind auch nach wie vor dazu geeignet, grundlegende Fragestellungen zur Diagnose, Typisierung und Tumorausdehnung zu beantworten. Allerdings reichen sie andererseits nicht mehr aus, wenn es darum geht, spezielle Fragestellungen zu lösen, insbesondere wenn es um den morphologischen Beitrag zur Prognosestellung und zur Planung adjuvanter Therapien geht.

Nachdem konventionelle Sonderfärbungen keine entsprechenden Erkenntnisse ermöglichen, sind es insbesondere die immunhistochemischen Verfahren, mit denen man durch qualitative bzw. semiquantitative Auswertungen zu ergänzenden Aussagen gelangen kann. Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte sind sehr viele Marker an Mammakarzinomen erprobt worden, von denen sich drei als prognostische und therapeutisch prädiktive Marker durchgesetzt haben und zum Repertoire der individuellen Falldiagnostik gehören. Dabei handelt es sich um den Östrogenrezeptor (ER), den Progesteronrezeptor (PR) und um Her-2/neu, die Leitliniengemäß bei jedem Fall eines invasiven Mammakarzinoms bestimmt werden müssen. ER und PR wurden für den immunhistochemischen Routinegebrauch in den 80er Jahren verfügbar, erlebten ihren Durchbruch aber erst, als sie nicht mehr an unfixierten Gefrierschnitten angewandt werden mussten, sondern für Paraffinschnitte zur Verfügung standen. Her-2/neu ist in den mittleren 90er Jahren zum Standard geworden.

Viele andere Antikörper sind im Laufe der Jahre unter verschiedenen Zielsetzungen angewandt worden, von denen die meisten heute im klinischen Alltag nicht eingesetzt werden. Darunter befinden sich zum Beispiel p53, CD44 mit seinen Splicingvarianten v5 und v6, p16 oder p27<sup>KIP1</sup>, ferner auch bcl-2 oder PCNA.

Ebenfalls nicht mehr bzw. kaum noch in Verwendung ist die Bestimmung der Konzentrationen des urokinase-type plasminogen activator (uPA) und des plasminogen 1 (PAI-1). Eine activator inhibitor type prognostische Bedeutung ihrer Konzentrationsbestimmung ist in großen Studien insbesondere für Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen herausgearbeitet worden (Harbeck et al., 2002; Jänicke et al., 2001; Look et al., 2002), und die Bestimmung von uPA/PAI-1 war in früheren Auflagen der S3-Leitlinie für Mammakarzinome, zuletzt in derjenigen von 2012, auch für diese Patientengruppe empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. and Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2008; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012). Allerdings ist die Anwendbarkeit der Untersuchung nur biochemisch, und zwar mittels ELISA an Frischgewebe oder an unfixiert eingefrorenem Gewebe möglich und wurde auch nur an wenigen Laboren vorgehalten. Heute, wo annähernd ausschließlich an fixiertem Material gearbeitet wird, gibt es die uPA/PAI-1-Option praktisch nicht mehr.

#### 4.4 Stellenwert des Proliferationsmarkers Ki-67 beim Mammakarzinom

Eine besondere Bedeutung kommt beim Mammakarzinom dem Proliferationsmarker Ki-67 (Synonym: MIB-1) zu, der sich über die letzten 20 Jahre als wichtiger diagnostischer und prognostischer Marker bewährt hat. Er wird anders als die oben genannten immunhistochemischen Anwendungen, die vorwiegend qualitativ ausgewertet werden (Ja-Nein-Prinzip), semiquantitativ in vom Untersucher geschätzten Prozentwerten angegeben. Er dient bei unklaren Prozessen, insbesondere mesenchymalen Raumforderungen, als ergänzender Marker bei der Dignitätsbestimmung und hat bei einigen Tumorentitäten auch prognostische Bedeutung erlangt, insbesondere auch bei Mammakarzinomen. Bei anderen Tumoren, z. B. bei Lungenkarzinomen, gastrointestinalen Karzinomen oder Karzinomen der inneren Genitale der Frau, spielt er hingegen keine oder nur eine untergeordnete Rolle.

Die Ki-67-Expression ist mit der Mitoserate, welche ja beim Mammakarzinom einen besonderen Stellenwert im Grading hat, hoch korreliert und ermöglicht eine gute prognostische Aussage (Niikura et al., 2014). Dabei fällt auf, dass die Ki-67-Grenzwerte zwischen verschiedenen prognostischen Gruppen von Studie zu Studie recht unterschiedlich ausfallen und auch die Daten zur interspezifischen Reproduzierbarkeit der Ki-67-Expression widersprüchlich sind(Harris et al., 2016; Leung et al., 2016; Petrelli et al., 2015). Dennoch hat man sich bei der Schaffung des Konzeptes molekularer Subtypen (siehe Kapitel 1.5) darauf eingelassen, eine feste Grenze für die Einteilung ansonsten gleichartig konfigurierter Mammakarzinom als Luminal A oder Luminal B zu ziehen, die bei 14% liegt. Die Grenze selber ist aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen von Labor zu Labor schon à priori problematisch. Außerdem wird in Fällen, bei denen man bei einer semiquantitativen Schätzung in die Nähe dieses Wertes kommt, eine quantitative Auszählung unumgänglich sein. Diese kann manuell, also durch Auszählung von positiven und negativen Zellkernen durch den Untersucher selber, oder bildanalytisch erfolgen. Die Methode der Bildanalyse hat sich aber bislang nicht durchgesetzt.

Dass die Ki-67-Bestimmung beim Mammakarzinom methodisch umstritten ist, hat jetzt auch Eingang in die Leitlinien gefunden. Aktuell gibt es keinen einheitlich anerkannten, klinisch relevanten Schwellenwert mehr. Der starre Schwellenwert von 14% wurde im St. Gallen-Konsensus 2013 relativiert. 2015 legte sich das Konsensuspanel auf einen Schwellenwert von  $\leq 10\%$  als "niedrig proliferierend" und Werte  $\geq 20\%$  als "hoch proliferierend" fest. Eine Abgrenzung zwischen Luminal A und Luminal B nur anhand von Ki-67 kann somit nur in diesen beiden Gruppen erfolgen und bleibt für Fälle mit einer Proliferationsrate zwischen 10% und 20% strittig (Coates et al., 2015; Tumorzentrum München, 2015). Damit trägt man insbesondere auch dem Problem sich von Labor zu Labor unterscheidender Werte Rechnung. Ohne ins Detail zu gehen, sei erwähnt, dass in der aktuellen S3-Leitlinie von 2017 darauf verwiesen wird, dass "von den Experten (...) betont (wurde), dass es nicht möglich ist, allgemein gültige Ki-67-Grenzwerte für Prognose, Prädiktion und Monitoring anzugeben. In Studien definierte Grenzwerte könnten lokal nur angewandt werden, wenn die lokalen Ergebnisse gegenüber den Studienergebnissen validiert wurden" (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2017). Dennoch bleibt bei allen Unzulänglichkeiten und Einschränkungen Ki-67 die derzeit einzige Option, etwas über die Wachstumsgeschwindigkeit auszusagen.

### 4.5 Prognosestellung beim Mammakarzinom durch morphologisch charakterisierbare Apoptosemarker

Gerade auch weil man die Apoptose zumindest bedingt als "Gegenspieler" zur Ki-67darstellbaren Proliferation auffassen mag, macht es Sinn, sie in wissenschaftliche Untersuchungen mit einzubeziehen. Die Bearbeitung einer morphologisch charakterisierbaren Apoptosemarkierung mit der TUNEL-Methode ist dabei für die Pathologie aus verschiedenen Gründen attraktiv, insbesondere weil das Ergebnis der Untersuchung sichtbar, also sozusagen *in situ* fassbar ist. Dabei ist das Signal mit demjenigen identisch, dass sich bei der Immunhistochemie auch ergibt, obwohl kein immunhistochemisches Verfahren, sondern eine *in situ*-Hybridisierung angewandt worden ist: Es zeigt sich nach der DAB-Entwicklung eine homogene braune Kerndarstellung positiver Zellen, genau wie man es von den kernbindenden immunhistochemischen Antikörpern wie ER, PR, Ki-67 oder GATA-3 kennt. Hinzu kommt, dass man die Verteilung der Apoptose in verschiedenen Kompartimenten (z. B. Tumorperipherie gegenüber Tumorzentrum) getrennt darstellen könnte und auch die Apoptoserate im entzündlichen Begleitinfiltrat bestimmen könnte.

Das Verfahren, das man zur Apoptosedarstellung wählt, wird dabei von der wissenschaftlichen Ausrichtung der eigenen Arbeitsgruppe abhängen und könnte daher auch gut molekularer Natur statt wie hier Teil der morphologischen Onkologie sein. Dass hier ein morphologisches Verfahren gewählt wurde, hat auch damit zu tun, dass die Arbeitsgruppe, in der diese Arbeit erstellt wurde, eine bildanalytische Ausrichtung hat und neben den Methoden der DNA-Bildzytometrie und der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) auch die Immunhistometrie, also die bildanalytische Quantifizierung kernbindender immunhistochemischer Reaktionen, anwendet. Die bildanalytische Quantifizierung der Expression anderer oben erwähnter Marker war nicht möglich, da deren Färbesignale nicht rein im Kern, sondern nur bzw. auch in anderen Kompartimenten der Zelle liegen. So binden bcl-2 und Bax an der Zellmembran und im Zytoplasma bzw. BAG-1 im Zytoplasma und im Zellkern.

Bevor auf die Ergebnisse der TUNEL-basierten Apoptosebestimmung im Kontext der Literatur eingegangen wird, sollen die Ergebnisse der klinisch-morphologischen Untersuchungen zusammengefasst werden. Dass diese den Erwartungen entsprechen, belegt im Umkehrschluss die Eignung unseres Patientenkollektivs für die Erprobung weiterer Variablen.

#### Eigene Ergebnisse: Klinisch-prognostische Grundgrößen

In der Primärdiagnostik von Mammakarzinomen werden die Tumorgröße (pT), der axilläre Lymphknotenstatus (pN), das Grading, der Hormonrezepterstatus für ER und PR sowie der HER-2/neu-Status an Biopsat bzw. Resektat routinemäßig bestimmt und um klinischbildgebende Angaben zu etwaigen Fernmetastasen (M) ergänzt. Entsprechend wird zur Wahl der adjuvanten Therapie sowie zur Prognostik das Wissen um die Ausprägung dieser Parameter klinisch als gegeben vorausgesetzt. Die prognostische Aussagekraft dieser Größen konnte, soweit im Rahmen dieser Arbeit getestet, erneut bestätigt werden, was die Verwendbarkeit unseres Patientenkollektivs für prognostische Studien unterstützt. Anders herum gesagt wäre eine prognostische Aussage einer neuen Variablen kaum glaubhaft, wenn sie beispielsweise an einem Patientenkollektiv erbracht würde, bei dem pN prognostisch irrelevant wäre. In unserer Studie korrelierten das postoperative Tumorstadium (pTNM mit p = 0,0001) wie auch die Einzelkomponenten postoperative Tumorgröße (pT mit p = 0,0230) und Fernmetastasierung (M mit p = 0,0024) signifikant mit dem Gesamtüberleben. Besonders hervorzuheben ist der axilläre Nodalstatus (pN) als hochsignifikanter Parameter. Dies traf sowohl in der univariaten Analyse (p = 0,0002), als auch in der multivariaten Analyse im Cox-Modell zu, in der er als erster und somit wichtigster unabhängiger Faktor aufgenommen wurde. Auf die Zahl tumorös befallener Lymphknoten, die ebenfalls nach Studienlage mit dem erkrankungsfreiem Intervall und dem Gesamtüberleben korreliert (Fisher et al., 1983), wurde in unserer Studie nicht eingegangen, weil sonst viele kleine Subkollektive bei der Auswertung entstanden wären. Insgesamt besteht in der Literatur am besonderen Stellenwert der axillären Lymphknotenparameter kein Zweifel (Gaglia et al., 1987; Kett et al., 2002).

Die univariate Untersuchung der Tumorgröße pT ergab graphisch eine gute Trennschärfe, war aber (auch aufgrund der größeren Zahl von Gruppen) mit p = 0,0230 der schwächste Parameter der TNM-Klassifikation. Trotzdem wurde pT multivariat berücksichtigt, obwohl die Tumorgröße in gewisser Weise mit dem Lymphknotenstatus korreliert ist; in der Literatur wird jedenfalls davon ausgegangen, dass die Tumorgröße beim Mammakarzinom einen Rückschluss darauf zulässt, ob die axillären Lymphknoten befallen sein werden oder nicht (Giuliano et al., 2010). Dabei korreliert die Tumorgröße (pT) mit dem Risiko des Lymphknotenbefalls (pN) (Carter et al., 1989), worauf auch unten anhand neuerer Daten von Scheurer (2013) noch einmal eingegangen wird (siehe Kapitel 4.6), und ein Befall der Lymphknoten erhöht das Risiko für eine Fernmetastasierung (M) (Arriagada et al., 1992; Atkinson et al., 1986; Fisher et al., 1969). Bei nodal-negativen Befunden (pN0) stellt die Tumorgröße den wichtigsten weiteren prognostischen Faktor dar (Galea et al., 1992).

Das histomorphologische Grading war mit p = 0,0031 sowohl univariat als auch multivariat signifikant und wurde ebenfalls multivariat berücksichtigt. Das Grading in der heute obligaten modifizierten Form nach Elston und Ellis (Elston and Ellis, 1991) zeigt mit zunehmender Entdifferenzierung des Gewebes eine abnehmende Überlebenswahrscheinlichkeit an. In der Literatur wird die klinische Relevanz des Gradings ebenfalls bestätigt (Bilik et al., 1986; Freedman et al., 1979; Schumacher et al., 1993). Zudem wurden bei uns die in das Grading einfließenden Parameter Mitoserate (MIT), Kernpleomorphie (KP) und tubuläre Differenzierung (TD) einzeln betrachtet, wobei lediglich eine signifikante Korrelation zwischen der

Mitoserate und dem Überleben bestand (p = 0,0036). Keine Signifikanz zeigten hingegen die Kernpleomorphie (p = 0,0608), die aber graphisch zumindest im Trend eine schlechtere Prognose von Karzinomen mit hoher Kernpleomorphie erkennen ließ, und die tubuläre Differenzierung (p = 0,3052).

Ein positiver biochemischer Progesteronrezeptorstatus (PR) zeigte einen günstigen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit (p=0,0156). Seine Bedeutung für die Prognostik ist auch aus seiner Aufnahme in das Cox-Modell als zweiter Parameter bzw. auch aus seinem realen prognostischen Effekt bei der Validierung des Cox-Modells abzuleiten. Diese geht in erster Linie darauf zurück, dass er mit dem Lymphknotenstatus, der als erster aufgenommen wurde, nicht stark korreliert ist. Der Östrogenrezeptorstatus hingegen hat weder die entsprechende Signifikanz in der univariaten Untersuchung, noch wurde er in unser multivariates Cox-Modell aufgenommen. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass hier die inzwischen verlassene Methode der biochemischen Bestimmung am Frischmaterial verwendet wurde und die immunhistochemisch ermittelten prognostischen Aussagen anderer Promotionsstudien aus Gründen der Problematik der Zweitverwertung nicht dargestellt werden konnten. Auf eine weiterführende Literaturdiskussion wird daher hier auch verzichtet. Wichtig ist der Östrogenrezeptorstatus allein schon deswegen, da die antihormonelle Therapie beim Mammakarzinom eine primär antiöstrogene Wirkung hat und daher das Wissen um die Rezeptorausprägung als prädiktive Größe für das Ansprechen auf die antihormonelle Therapie herangezogen werden könnte.

#### Eigene Ergebnisse: Tumorprognostik mit TUNEL-basierter Apoptosequantifizierung

Was die TUNEL-basierte Analyse der Apoptose betrifft, so ließen sich mit den "klassischen" Größen der Betrachtung des durchschnittlichen Apoptosewertes über alle Messzellen der 20 untersuchten Gesichtsfelder (APO<sub>mean</sub>) und des höchsten Einzelwertes innerhalb der 20 Gesichtsfelder (APO<sub>max</sub>) Aussagen zur Prognose treffen, und zwar in der Hinsicht, dass Patientinnen mit hohen Apoptosewerten (Q3) besser abschnitten als Patientinnen mit mittleren (Q2) oder geringen Apoptosewerten (Q1). Eine höhere Apoptoserate hatte also einen positiven prognostischen Effekt, der bei APO<sub>mean</sub> signifikant (p = 0,0108) und bei APO<sub>max</sub> fast signifikant war (p = 0,0559). Mit den übrigen Messgrößen (APO<sub>min</sub>, APO<sub>mod</sub> und

APO<sub>med</sub>) ergaben sich erwartungsgemäß solche Ergebnisse nicht (p > 0,05); es wäre aus tumorbiologischer Sicht auch überraschend gewesen, wenn nun gerade aus dem Gesichtsfeld mit dem geringsten Apoptosewert eine prognostische Aussage zu ziehen gewesen wäre; Ähnliches gilt für die beiden Verteilungsparameter. Dass hingegen keine prognostische Aussage mit APO<sub>tent</sub> und APO<sub>tarea</sub> zu erzielen war (p > 0,05), ist ein im Grunde für die Glaubwürdigkeit der Studie notwendiges Ergebnis, da es die Unabhängigkeit der Aussage von der durchaus von Fall zu Fall deutlichen schwankenden Gesamtzahl bzw. Gesamtfläche der untersuchten Messzellen belegt.

Bezogen auf die multivariate Bedeutung der Apoptosequantifizierung fallen die Ergebnisse hingegen ernüchternd aus. Das multivariate Cox-Modell ergab, dass die Apoptose erst ganz am Ende in Form von APO<sub>max</sub> zu vier vorher aufgenommenen Größen (pN, PR, pT und Grad) als fünfte und somit relativ gesehen schwächste hinzutritt, aber immerhin aufgenommen wird. Diese Tatsache lässt aber bereits vermuten, dass das, was die Apoptosequantifizierung zur Gesamtprognose beisteuern kann, eher von geringer Bedeutung sein dürfte und bestätigte sich auch bei der Validierung der multivariaten Analyse. Dabei wurde versucht, die Berücksichtigung von Variablen Schritt für Schritt nachzuvollziehen und jeweils den wirklichen "Mehrwert" der Aufnahme der Einzelvariablen zu analysieren (siehe Kapitel 3.2.3). Der Zugewinn an prognostischer Information ist graphisch erkennbar, bleibt aber minimal: Er lässt sich als Unterschied des Kurvenverlaufes der multivariaten Funktion MP5 gegenüber dem der multivariaten Funktion MP4 interpretieren. Dieser ist so gering, dass ihm eine klinische Bedeutung sicher nicht zukommt und er auch in der biometrischen Analyse nicht signifikant ist.

Man kann also aus der Studie schlussfolgern, dass TUNEL-basierte Apoptosebestimmungen durchaus Überlebensunterschiede darstellen können, die einen positiven Effekt einer höheren Apoptoserate auf die Prognose von Mammakarzinomen beschrieben. Gleichzeitig aber zeigte sich, dass ihre Erhebung nicht notwendig ist, da andere "klassische" Parameter, die ohnehin in der Routinediagnostik erhoben werden, die Prognose bereits hinreichend und letztendlich besser abbilden. Bei alledem muss allerdings bedacht werden, dass in unserer Studie ausschließlich das "allgemeine Überleben" der Patientinnen als zeitliche Variable verwendet werden konnte, nicht hingegen das "tumorbedingte Überleben" oder die Zeit bis zum Auftreten eines Tumorrezidivs. Zudem stellt sich für den einzelnen Patienten auch die Frage nach der Lebensqualität und dem Mehrwert bzw. Überlebensvorteil durch neue Parameter, die genauere, individuelle Aussagen ermöglichen sollen.

## Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung der Apoptosequantifizierung beim Mammakarzinom in der Literatur

In der Literatur liegen bereits einige, unterschiedlich angelegte Studien zur Quantifizierung von apoptotischen Zellen bei Mammakarzinomen hinsichtlich ihrer Prognose vor. Dabei wurden alle verfügbaren Arbeiten berücksichtigt, die entweder eine Zählung von apoptotischen Zellen am HE-Schnitt oder am nach dem TUNEL-Verfahren hergestellten Präparat beinhalteten; dabei wurde durch manuelle Auszählung am Präparat in der Regel ein prozentualer Wert nach Art von APOmean bestimmt. Allgemein fiel auf, dass es sowohl Arbeiten gibt, bei denen hohe Apoptosewerte mit einer besseren Prognose der Patienten verbunden sind, als auch solche, die gegenteiliger Auffassung sind. Als sehr unterschiedlich erwiesen sich auch die Studien bezüglich ihres Designs, der berücksichtigten sonstigen Variablen und auch der klinischen Ergebnisse. Nicht alle vorgelegten Daten waren dabei verständlich bzw. nachvollziehbar. Bildanalytische Untersuchungen gibt es zu Mammakarzinomen überhaupt keine, so dass die hier vorgelegte Studie von der Methodik her eine Erstbeschreibung ist. Für die allermeisten Arbeiten gilt ferner, dass die in ihnen dargestellten Überlebensunterschiede lediglich univariat herausgearbeitet werden konnten und sich, soweit durchgeführt, ähnlich wie in unserer Studie keine nennenswerte Relevanz der Apoptoseparameter in der multivariaten Analyse ergab.

#### Arbeiten, in denen hohe Apoptosewerte mit guter Prognose assoziiert waren

Die beiden Arbeiten, die ähnlich wie bei uns für erhöhte Apoptosewerte zu prognostisch günstigeren Ergebnissen kamen, gehen jeweils auf eine TUNEL-Anwendung zurück.

Die größere von ihnen stammt aus Deutschland (Schöndorf et al., 2004) und umfasst 298 Fälle von Mammakarzinomen im Stadium M0 aus den Jahren 1983-1989. In ihr ging man bei der Auswertung in zwei Gruppen davon aus, dass ein erhöhter Apoptosewert ab 5% positiver Zellen anzunehmen wäre. Von den 189 Patientinnen mit geringer Apoptose lebten nach 8 Jahren noch ca. 50%, von den 109 Patientinnen mit erhöhter Apoptose noch ca. 70%.

Eine kleinere Studie aus Japan (Tanaka et al., 2000) an 167 konsekutiven Fällen aus den Jahren 1988-1994 setzte als Grenzwert zwischen niedrigen und hohen Apoptosewerten einen Wert von 0,52% an, also nur ca. ein Zehntel des Wertes aus der größeren Studie. Von den 89 Patientinnen mit hohen Werten lebten nach 7 Jahren noch ca. 95%, von den 78 Patientinnen mit niedrigen Werten noch ca. 75%. Überraschend und im Grunde nicht zu erklären sind die exzellenten Überlebensdaten im Patientenkollektiv, obwohl jeweils über 70% der Patientinnen Tumorgrößen von > 2 cm (Stadium T2 und höher) bzw. Blutgefäßinfiltrate aufwiesen (V1) und über 60% Lymphknotenmetastasen hatten (N+).

#### Arbeiten, in denen niedrige Apoptosewerte mit guter Prognose assoziiert waren

Dem gegenüber stehen Arbeiten, in denen ein Überlebensvorteil für diejenigen Patientinnen ermittelt wurde, deren Mammakarzinome eine geringe Apoptoseneigung zeigten. Dabei gibt es sowohl TUNEL-basierte Arbeiten als auch Arbeiten, bei denen Auszählungen von apoptotischen Zellen am HE-Schnitt vorgenommen wurden.

In einer TUNEL-basierten Studie aus Spanien an 65 Fällen (González-Cámpora et al., 2000), die bei einer medianen Tumorgröße von 3 cm allerdings vorwiegend Tumoren höherer Stadien (T2, T3) untersuchte, wurde für die Unterscheidung niedriger und hoher Apoptoseraten ein Grenzwert von 30 positiven Tumorzellen in 10 Gesichtsfeldern zugrunde gelegt, was einer Aufteilung der Fälle im Verhältnis 34:31 entsprach. Patientinnen mit hoher Tumorapoptose zeigten ein 6-Jahres-Überleben von ca. 50%, diejenigen mit niedrigen Werten hingegen von ca. 85% (p = 0,003). Auch multivariat erwies sich die Apoptoserate neben dem Östrogenrezeptorstatus als relevant.

Eine große Arbeit aus den USA befasste sich mit dem prognostischen Effekt der morphologischen Zählung von Apoptosezellen beim Mammakarzinom an HE-Schnitten (Liu et al., 2001). Zur Verfügung standen 791 Fälle mit Langzeit-Follow-Up; bei einem Grenzwert zwischen niedrigen und hohen Apoptosewerten von 0,368% (Original: 3,68 pro 1000 Tumorzellen) ergab sich ein 10-Jahres-Überleben bei niedrigen Werten von ca. 50% und für hohe Werte von ca. 40%; dabei wurde ein p-Wert von 0,006 genannt, der aber offenbar eher der großen Zahl von Fällen, weniger einem wirklichen klinisch nutzbaren Überlebensunterschied geschuldet ist. Mit der TUNEL-Methode wurden an einem Teilkollektiv methodische Daten im Vergleich zur Auszählung an HE-Schnitten erhoben und an 232 Fällen ein schwach signifikanter (p = 0,0238) Korrelationskoeffizient von vermutlich<sup>3</sup> r = 0,15 ermittelt.

Ähnlich kam eine Studie aus Finnland, in welcher ebenfalls an HE-Schnitten apoptotische Zellen ausgezählt wurden, zu dem Ergebnis, dass eine geringe Apoptose mit einer besseren Prognose assoziiert wäre (Lipponen et al., 1994). Dort wurde mit einem Grenzwert von 3 apoptotischen Zellen / mm<sup>2</sup> gearbeitet, durch welchen das Patientenkollektiv von 288 Fällen im Verhältnis 73:215, also etwa 1:3, aufgeteilt wurde. Für die Gruppe mit niedrigen Apoptosewerten ergab sich ein 10-Jahres-Überleben von ca. 75%, für die andere Gruppe von ca. 50% (p = 0,004); eine getrennte Analyse für den Lymphknotenstatus zeigte, dass der Überlebensvorteil in der Gruppe N0 stärker war als für N1-Patientinnen.

Eine spanische Arbeitsgruppe (Villar et al., 2001) untersuchte 116 Fälle von Mammakarzinomen mit der TUNEL-Methode und ermittelte für Patientinnen mit niedriger Tumorapoptose ein 5-Jahres-Überleben von gut 80% im Vergleich zur Gruppe mit hohen Werten, die auf ca. 55% kam. Als Grenzwert wurde ein Apoptosewert von 0,75% gesetzt. Nicht ganz nachvollziehbar ist in der Arbeit, dass dieser Wert den Median der Datenverteilung repräsentieren soll, die Patientengruppen aber im Verhältnis 43 : 73 sehr ungleich besetzt waren. Multivariat wurde hier der Apoptoseindex nach dem Tumorstadium

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> In der Arbeit ist ein Wert von r = 1,15 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,02 - 0,27 angegeben, was zu der Idee eines Schreibfehlers bei r führt. Zum einen gibt es keine Werte für r, die > 1 sein können, zum anderen muss der Korrelations-koeffizient im 95%-Konfidenzintervall liegen.

(T1/T2 vs. T3/T4) als relevant akzeptiert, was anhand der vorgelegten univariaten Daten überrascht.

Eine Arbeitsgruppe in den Niederlanden untersuchte die klinisch-prognostische Aussagekraft der Apoptosezählung am HE-Schnitt an 172 Fällen von Mammakarzinomen (De Jong et al., 2000). Mit einem Grenzwert von 10 apoptotischen Tumorzellen pro mm<sup>2</sup> lag das 10-Jahres-Überleben bei niedrigeren Werten bei ca. 80%, bei höheren nur bei ca. 50%. Multivariat ergänzten sich Mitosezahl und Apoptosezahl als wichtigste Parameter und waren hier sogar bedeutender als der Lymphknotenstatus. Mit dieser überraschenden Aussage stehen die Autoren allerdings allein.

#### Arbeiten, in denen Apoptosewerte keine Prognoseassoziation zeigten

Schließlich sind noch Arbeiten zu nennen, in denen die Bestimmung der Apoptose selbst univariat keinen sinnvollen prognostischen Effekt aufwies.

In einer spanischen Studie (Sirvent et al., 2004), die sich auf 186 Mammakarzinome in den Tumorstadien T1 und T2 bezog, wurde der Apoptoseindex als durchschnittliche Zahl TUNEL-positiver Tumorzellen in 10 Gesichtsfeldern bestimmt und mit einem Grenzwert von 10 gearbeitet; hierdurch ergaben sich für niedrige oder hohe Apoptosewerte zwei annähernd gleich große Gruppen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen bzgl. Überleben oder rezidivfreiem Intervall.

In einer Studie aus Japan (Kato et al., 2002) an 422 Fällen von Mammakarzinomen ergab sich für die Quantifizierung der Apoptosezahlen keine prognostische Signifikanz, bezogen auf das Langzeitüberleben bzw. das Rezidiv-freie Überleben der Patientinnen, für die zum Teil ein Beobachtungszeitraum von mehr als 20 Jahren ausgewertet werden konnte. Leider stand die Arbeit nur als Abstrakt zur Verfügung, so dass Grenzwerte für niedrige oder hohe Werte bzw. Angaben zu Charakteristika der Tumoren etc. nicht wiedergegeben werden können. Prognostisch führend waren u.a. der Mitoseindex und der Nekrosegrad.

Ähnlich wurde in einer Arbeit aus den USA (Berardo et al., 1998), in der 979 Fälle von Mammakarzinomen mit Lymphknoten-, aber ohne Fernmetastasen berücksichtigt wurden,

kein Einfluss der per TUNEL-Methode markierten apoptotischen Zellen auf das Überleben festgestellt. Dabei wurde als Grenzwert zwischen niedrig und hoch 1% angesetzt, bezogen auf mindestens 100 untersuchte Tumorzellen. Viel mehr lässt sich aus dieser Arbeit, in der die Quantifizierung der Apoptosezahl aber nur einen Seitenaspekt darstellte, nicht ablesen; allerdings waren die Ergebnisse zur Apoptose mit prognostisch ungünstigen Faktoren (Verlust der Hormonrezeptorexpression, Zahl befallener Lymphknoten) korreliert.

# Zusammenfassende Beurteilung der Apoptoseanwendung beim Mammakarzinom und ergänzende Ansätze

Die Diskussion der prognostisch ausgerichteten Publikationen zeigt, wie heterogen die Erfahrungen der einzelnen Arbeitsgruppen mit Apoptose-bezogenen Prognoseparametern sind, was sicher mit erklärt, warum sich diese bislang nicht durchgesetzt haben. Von der Zahl her überwiegen dabei zwar die Arbeiten, die in hoher Apoptose eine Größe mit schlechter Prognose sehen; inhaltlich und von ihrem Design her sehen aber auch die Arbeiten mit gegenteiligem Ergebnis nicht schlechter aus. Klar ist, dass die sehr verschiedenen Grenzziehungen für "niedrig" oder "hoch" ebenso nicht zum Vertrauen in diese Größen beitragen können - es ergibt sich hier die Überlegung, dass die Bestimmung der Apoptose nicht ausreichend standardisiert sein könnte.

Auf methodische Probleme mit der TUNEL-Methode wurde vor einigen Jahren bereits einmal gezielt eingegangen (Miedlich, 2015). Am Beispiel des Rattenhodens wurde der Einfluss der Fixation auf die durch Auszählung am Schnittpräparat erhobenen Apoptosezahlen bestimmt und in den Gesamtzusammenhang methodischer Voruntersuchungen anderer Arbeitsgruppen gestellt. Zusammenfassend sind diverse methodische Einflussgrößen zu bedenken (siehe dortiges Kapitel 4.1), die sich letztendlich bei retrospektiven klinischen Studien, die an bereits vorhandenen Materialien vorgenommen werden, aber nicht berücksichtigen lassen und wohl der Standardisierung der Ergebnisse im Weg stehen. Für solche Studien ist im Grunde nur möglich, an dem zur Verfügung stehenden Gewebe möglichst genau die Vorgaben der gewerblich erhältlichen TUNEL-Kits einzuhalten und alle Proben möglichst gleichartig zu behandeln.

Eine andere Frage wäre, ob sich an den morphologischen Kriterien zur Erkennung einer apoptotischen Zelle, die in den Arbeiten, an denen am HE-Schnitt ausgezählt wurde, eine

Standardisierung ermöglichen ließe. Definitiv angegeben wurden sie beispielsweise von der Arbeitsgruppe von Jan Peter Baak (damals Amsterdam), die bereits durch ihre methodischen Arbeiten zur Standardisierung der Mitosequantifizierung hervorgetreten war. In einer Studie an verschiedenen Mammaläsionen mit paralleler Mitose- und Apoptosequantifizierung wurde unter Doppelbefundung jeder Zelle durch zwei Untersucher wie folgt vorgegangen (Mommers et al., 1999):

"Strict morphological criteria were used to identify mitotic and apoptotic cells and these were counted only when both observers agreed. (...)

Apoptotic cells had retracted and often eosinophilic cytoplasm, condensation of nuclear chromatin, either at the nuclear membrane (earliest phase), throughout the nucleus, or in round nuclear fragments (latest phase). It concerned isolated cells. To deal with necrosis if present, at least one normal epithelial cell had to be in between the necrotic area and the apoptotic cell, before the apoptotic cell was included."

Inhaltlich ließ sich zeigen, dass die durchschnittlichen Zahlen für Mitosen und Apoptosen bei gutartigen Mammaläsionen am geringsten sind und danach bei steigender tumorbiologischer Wertigkeit anderer Läsionen jeweils ansteigen (Mommers et al., 1999); dies galt auch für einen von ihnen vorgeschlagenen neuen Parameter, den M/A-Quotienten, bei dem Mitosezahl und Apoptosezahl in einem Quotienten in Beziehung gesetzt werden. Weiter verfolgt wurde dieser Ansatz aber nicht; insbesondere in der oben erwähnten prognostischen Arbeit aus dem Folgejahr wurde er überraschenderweise nicht verwendet und somit nicht klinisch erprobt (De Jong et al., 2000).

Eine aktuelle Arbeit aus Indonesien (Shintia et al., 2016) bietet noch einen interessanten neuen klinischen Ansatz, der in der aktuellen Medizin mit mehr und individuelleren therapeutischen Vorgehensweisen weiterführen könnte. Sie bezieht sich auf die Aussagekraft der TUNEL-Methodik beim Mammakarzinom im Vergleich von Untersuchungen an 42 prätherapeutischen Biopsien und späteren Resektaten nach neoadjuvanter Chemotherapie, also mit einem neuen und bisher noch nicht vorgenommenen Studiendesign. Bestimmt wurde ein mittlerer Wert für TUNEL-positive Tumorzellen, bezogen auf die Gesamtzahl der Tumorzellen. Die Auswertung erfolgte in Kombination mit einem Tumorregressionsscore nach Miller-Payne (MP), der in Deutschland allerdings ungebräuchlich ist: Dabei wird bei der Erstellung des MP-Scores der Rückgang der Tumorzellularität ("*tumour cellularity*") im Vergleich von Biopsie und Resektat in fünf Kategorien (0%, 1-30%, 30-90%, 90-99%, 100% [= Komplettremission]) geschätzt. In einem "modifizierten Miller-Payne-Score" (MMP) wurden dann Veränderungen in der Tumorzellularität zwischen beiden Präparaten der Patientin und der Apoptosewert am Resektat zusammengeführt. Soweit sich die komplexen Darstellungen in der Publikation nachvollziehen lassen, bestanden zwischen den Apoptosewerten und einer Tumorremission kein erkennbarer Zusammenhang. Dennoch liegt hier ein Ansatz vor, der gegebenenfalls noch einmal anhand eines größeren und besser definierten Fallkollektivs und einfacheren Auswertemethoden weiterverfolgt werden sollte.

### 4.6 Ausblick: Aktuelle Ansätze zur weiteren Prognoseverbesserung von Mammakarzinomen

Mammakarzinome stehen nach wie vor im Mittelpunkt onkologischer Forschung. Trotz ihrer vergleichsweise jetzt schon guten Gesamtprognose, verglichen mit der der meisten anderen malignen Tumorentitäten, stellen sie allein schon ihrer Häufigkeit wegen die klinischonkologische Medizin vor große Herausforderungen in Diagnostik und Therapie. So stellt das Mammakarzinom mit 69.220 Neuerkrankungen pro Jahr, bezogen auf die aktuellen Zahlen von 2014, nicht nur 30,5% aller Malignome bei Frauen, sondern ist auch noch fast 2,5-mal so häufig wie der zweithäufigste maligne Tumor der Frau, das kolorektale Karzinom, mit seinen 27.890 Neuerkrankungen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017). Außerdem sind, anders als bei vielen anderen Karzinomen, auch relativ gesehen häufiger jüngere Menschen von 64 Jahren im Vergleich zu kolorektalen Karzinomen oder Pankreaskarzinomen (jeweils 75 Jahre) niederschlägt (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Zurinomen der Pankreaskarzinomen (jeweils 75 Jahre) niederschlägt (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017).

Legt man die prognostisch relevanten Größen Stadium, Grading und prädiktive Marker zugrunde, so kann man die Bestrebungen, die in die Zukunft gerichtet sind, wie folgt beschreiben:

#### Tumorstadium: Ansätze zur Erkennung von Mammakarzinomen in früheren Stadien

In der Diagnostik werden weiterhin die Bestrebungen darauf gerichtet sein, Mammakarzinome noch eher zu finden als bisher. Sofern man dabei an die Palpation der Brust als erste Methode denkt, gibt es allerdings letztendlich eine Untergrenze für auffällige Befunde zwischen 0,5 cm und 1 cm (Heywang-Köbrunner and Schreer, 2015), unterhalb derer ein Mammatumor häufig ohne auffälligen Tastbefund bleiben wird.

Inwieweit es möglich sein wird, die immer noch vorkommenden größeren Tumoren an Zahl zu verringern, wird von mehreren Faktoren abhängen. Sicher ist dabei sinnvoll, kontinuierlich Aufklärungsarbeit bzgl. der Selbstpalpation der Patientinnen zu leisten. Eine Schlüsselrolle wird dabei den gynäkologischen Praxen zukommen, in denen ein Großteil der verdächtigen Mammaläsionen entdeckt bzw. zur Abklärung gebracht wird. Allerdings können dort auch nur diejenigen Patientinnen behandelt werden, die sich dort vorstellen. Interessant zu wissen wäre, ob bei Frauen, die schon lange keine Mammauntersuchung mehr hatten, größere Mammakarzinome aufgefunden werden als bei Frauen, die regelmäßiger an der Krebsvorsorge teilnehmen. Daten hierzu waren nicht zu ermitteln - es gibt aber Ergebnisse aus Mecklenburg-Vorpommern für ein gut vergleichbares Thema, nämlich die Ausdehnung von Zervixkarzinomen, bezogen auf die Teilnahme der Patientinnen an der Krebsvorsorge (Marquardt et al., 2011): Bei der Aufarbeitung von 617 Zervixkarzinomen zeigte sich dort, dass bei Frauen, die regelmäßig ("regular") oder wenigstens unregelmäßig ("irregular") an der Krebsvorsorge teilgenommen hatten, häufiger weniger fortgeschrittene Tumoren vorkamen als bei Frauen, die gar nicht zur Krebsvorsorge gegangen waren ("none"). Innerhalb der Tumoren im Stadium pT1a1/pT1a2 betrug der Anteil von Frauen mit Teilnahme an der Krebsvorsorge 65,4%, im Stadium pT1b 52,8%, im Stadium pT2 28,7%, im Stadium pT3 12,6% und im Stadium pT4 8,2%. Fasst man die Ergebnisse in nur zwei Gruppen zusammen, so beträgt der Anteil im Stadium pT1 58,6% und im Stadium pT2-pT4 17,8%. Ähnliche Resultate wären auch für Mammakarzinome vorstellbar.

Dass über die Zeit die Tumorgrößen bei Entdeckung kleiner geworden sind, wird auch für Deutschland allgemein angenommen, ist aber nur wenig in Vergleichsstudien belegt. In einer Kooperation der Universitätsfrauenkliniken Berlin und München lag die durchschnittliche histologisch gemessene Tumorgröße für konsekutiv gesammelte Fälle von invasiven Mammakarzinomen in einem ersten Kollektiv von 1981-1985 bei 24,7 mm (n = 849), im zweiten Kollektiv von 1986-1990 hingegen bei 20,5 mm (n = 807); dieser Unterschied war im t-Test statistisch signifikant (p < 0,0001) (Harms, 2004). Daten aus unserer Arbeitsgruppe an allerdings kleineren Vergleichskollektiven bestätigen diesen Rückgang. Im oben bereits erwähnten Patientenkollektiv aus der RWTH Aachen aus der zweiten Hälfte der 70er Jahre, das 104 Fälle umfasste, betrug die durchschnittliche Tumorgröße 29 mm, in einem zweiten, das im Jahr 2004 am Universitätsklinikum Mainz (n = 128) konsekutiv zusammengestellt wurde, lag sie statistisch signifikant deutlich niedriger (p < 0,0001), nämlich bei 20 mm (Nolte, 2012).

Da diese eher kleinen Vergleichsstudien nicht ausreichend repräsentativ und zum Teil auch nicht mehr aktuell genug erschienen, sind wir an das Tumorregister München mit der Bitte herangetreten, dass aus dem dortigen Datensatz entsprechende jährliche Zahlen generiert würden. Diese Zahlen, im Dezember 2018 zur Verfügung gestellt, sind nunmehr auch auf der Homepage des Tumorregisters verfügbar (Tumorregister München 2018b): Sie beziehen sich auf die Jahre 1998 bis 2016 und schließen 66.255 Fälle ein, dabei pro Jahr zwischen 1.902 und 4.367 Fällen. Es zeigte sich, dass die Werte für den Median und für den Mittelwert der Tumorgröße im genannten Zeitraum annähernd konstant waren und sich höchstens noch ein minimaler Trend nach unten abzeichnet: Die Medianwerte lagen von 1998-2014 bei 18 mm, ab 2015 bei 17 mm; der mittlere Mittelwert über die untersuchten Jahre von 22,3 mm wurde in den Jahren 2015 und 2016 mit 21,8 mm und 21,6 mm etwas unterschritten. Dies bedeutet, dass die Erwartungen, die man mit der verbesserten Diagnostik bzgl. einer früheren Tumorerkennung verbindet, nicht mehr zu hoch sein sollten und Reduktionen von Tumorgrößen von mehreren Millimetern, anders als in den Jahrzehnten zuvor, in absehbarer Zeit wohl nicht mehr gelingen werden.

Die Bedeutung der Verkleinerung der Tumorgröße liegt dabei kaum in der besseren Beherrschbarkeit der lokalen Tumorkontrolle, sondern in der Korrelation zwischen Tumorgröße und Metastasierungsrisiko und damit dem Risiko einer systemisch manifesten Tumorausbreitung. Hierzu sei auf neuere Zahlen aus der Frauenklinik des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart verwiesen. Bezogen auf 754 Fälle von Mammakarzinomen mit bekannter Tumorgröße, von denen 550 keinen Lymphknotenbefall aufwiesen (pN0, 73,0%), 163 einen Befall des bzw. der Sentinel-Lymphknoten zeigten (21,6%) und 41 darüber hinaus auch Tumor-positive Non-Sentinel-Lymphknoten aufwiesen (5,4%), ergaben sich durchschnittliche Tumorgrößen für alle 754 Fälle von 19,3 mm, für die beiden lymphatisch metastasierten Gruppen hingegen von 23,1 mm bzw. 24,7 mm (Scheurer, 2013). Für die Fälle der Gruppe pN0 lässt sich aus einer tabellarischen Darstellung in der Studie eine durchschnittliche Tumorgröße von ca. 17,5 mm rekonstruieren. Diese Daten belegen, dass wenige Millimeter ausschlaggebend sein können über den Ausfall von pN, dem nach wie vor wichtigsten prognostischen Parameter, und dass sich entsprechend der diagnostische "Kampf" um jeden Millimeter Primärtumorgröße trotz der Tatsache, dass (siehe oben) die Maße in den letzten Jahren stagnieren, lohnt.

### Tumorgradierung und Bestimmung der Routinemarker ER, PR, Her-2/neu und Ki-67: Erhebung bewährter, aber wissenschaftlich ausgereizter Größen

Ist ein Tumor bioptisch gesichert bzw. operativ entfernt, so würde sich auch in Zukunft zunächst die Bestimmung von für die Therapiewahl wichtigen Routinemarkern anschließen. Das Grading selber erscheint dabei durch die vor ca. 25 Jahren vorgenommene Modifikation von Elston und Ellis, welche zu einer besseren Objektivierung, Validierung und Reproduzierbarkeit beigetragen hat, am Ende seiner Entwicklung angekommen zu sein. Außerdem ist nicht absehbar, dass die derzeitigen Bestimmungen der vier Marker ER, PR, Her-2/neu und Ki-67 in Bälde abgelöst würden. Auch in absehbarer Zukunft dürften durch sie Mammakarzinome im Rahmen der Primärdiagnostik in der Zusammenschau mit Stagingvariablen prädiktiv charakterisiert werden. Denkbar wäre dabei, dass ihre morphologische Bestimmung durch molekulare Verfahren abgelöst oder ergänzt wird; zumindest halten die unten besprochenen Multigentests entsprechende Bestimmungen mit vor.

#### Entwicklung neuer prädiktiver Ansätze in der Molekularpathologie

Dass es dennoch weiterer Bemühungen für den klinischen Alltag bedarf, die Gewebe- bzw. zellbezogene Diagnostik von Mammakarzinomen weiter zu verbessern, hat damit zu tun, dass die bisherigen prognostischen und prädiktiven Größen trotz aller prognostischer Aussagekraft immer wieder durch überraschende Verläufe in Frage gestellt werden. Ihre Aussagen sind hochvalide für Patientengruppen, bilden aber nicht in jedem Fall prospektiv zu erwartende Verläufe bei der individuellen Patientin ab. So liegen zum Beispiel in den aktuellen Tumordaten des Tumorzentrums München für 1998-2016 (Tumorregister München, 2018a)

das absolute (beobachtete) bzw. das relative 10-Jahres-Überleben beim Mammakarzinom im Stadium pT1c pN0 M0 (n = 17.575) bei sehr guten 86,8% bzw. 98,3%. Sie bedeuten aber dennoch, dass ca. 15.255 Patientinnen nach 10 Jahren noch leben, in einem Kontrollkollektiv von gleich alten Frauen ohne Mammakarzinom es aber noch ca. 15.519 Überleber gäbe - dieser Überschlagsrechnung folgend läge somit das Überleben in dieser günstigsten Tumorgruppe mit "fast normaler Lebenserwartung" eben doch immer noch um mehr als 250 Frauen niedriger, für die man dann folgerichtig einen Tumor-bedingten Tod postulieren müsste. Auf der anderen Seite überleben auch Patientinnen in schlechten Prognosegruppen, so dass auch in diesen Gruppen statistische Aussagen nur bedingt einen individuellen Verlauf voraussagen lassen: Selbst bei Frauen, die bereits bei der Erstdiagnose Fernmetastasen aufwiesen, sich also im Stadium T\_N\_M1 befanden (n = 3.092), ergaben sich noch absolute (beobachtete) bzw. relative 10-Jahres-Überlebensraten von 10,1% bzw. 12,3% (Tumorregister München, 2018a).

Allein aus solchen Zahlen heraus sind weitere Parameter wünschenswert, die die Prognose und das Therapieansprechen von Patientinnen mit Mammakarzinomen noch besser beschreiben. Hierfür kommen in der heutigen Zeit in erster Linie molekulare Größen in Betracht. Zum derzeitigen Stand (Ende 2018) gibt es beim Mammakarzinom aber bisher nur wenige klinisch nutzbare molekulargenetische Ansätze, anders als beispielsweise beim Lungenkarzinom, wo heute mit molekularen Bestimmungen von Mutationen im EGFR-Gen oder von Translokationen bei EML4-Alk, MET, ROS-1 oder B-raf viele therapierelevante Veränderungen am Tumorgewebe erhoben werden können, oder beim kolorektalen Karzinom, bei denen immunhistochemische Analysen zum Mikrosatellitenstatus ein molekulares Grading (*low grade* versus *high grade*) ermöglichen.

Multigentestungen beim Mammakarzinom, die bei therapeutischen Planungen eingesetzt werden können und helfen sollen, ein Rezidivrisiko oder ein Risiko für Fernmetastasierung zu bestimmen, stehen nur Patientinnen mit einer bestimmten Fallkonstellation zur Verfügung und sind teilweise auch insofern umstritten, als die in ihnen getroffene Zuordnungen zwischen verschiedenen Tests nicht deckungsgleich sind (Bartlett et al., 2016) und ein Fall abhängig vom konkret angewandten Multigentest durchaus einmal in einer *low risk*-Gruppe, ein anderes Mal in einer *high risk*-Gruppe landen könnte: In einem Vergleich von fünf solcher Multigentests an mehr als 300 Fällen von Mammakarzinomen ergab sich eine komplette

Übereinstimmung für alle fünf Tests von 39,4%, für vier von fünf Tests (also Abweichung in einem Testergebnis) von weiteren 22,2% - 27,8%. Für Cohen's Kappa als Bewertungssystem ergaben sich Werte zwischen  $\kappa = 0,39$  und  $\kappa = 0,55$ , was einer mittleren Übereinstimmung ("*moderate agreement*") entspricht. In dem verbleibenden ca. einem Drittel der Fälle ergaben sich stärkere Abweichungen, was letztendlich bedeutet, dass die Zielsetzung der Tests, einen therapeutischen Abzweig für oder gegen eine Chemotherapie als Teil der adjuvanten Therapie zu eröffnen, für nicht wenige Fälle scheitert.

Konkret sieht die derzeit gültige S3-Leitlinie in den "Evidenz-/konsensbasierten Empfehlungen" unter Nr. 4.31 Multigentests nur bei nodal-negativen Karzinomen (pN0) vor, wenn "*bei Frauen mit einem ER/PR-positiven, HER2-negativen, nodal-negativen invasiven Mammakarzinom die konventionellen Prognoseparameter einschließlich Ki-67 keine ein-deutige Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie erlauben*". Welcher Multigentest zu wählen ist, wird von der S3-Leitlinie nicht vorgegeben. Hier helfen allerdings die Vorgaben der *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), basierend auf Anwendungen des MammaPrint-Tests an 6.693 Patientinnen und einem Literaturreview aus dem Jahr 2017. Dabei wurde beschrieben, wem wann welcher Test hilft, aber auch, wann kein Test durchgeführt werden sollte, und zwar basierend auf einem Expressionsmuster von ER, PR und Her-2/neu sowie klinischen Risikofaktoren, die letztendlich auch Tumorstadium und grading umfassen (Krop et al., 2017). Ähnliche Angaben liegen von dort auch für andere Multigentests, uPA/PAI-1 und Immunhistochemie vor (Harris et al., 2016).

Andere molekularpathologische Testungen sind bei Mammakarzinomen noch nicht in der Routine eingesetzt. Führt man aber eine Literaturrecherche in der Datenbank *Pubmed* (Adresse: <u>www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</u>) beispielsweise zu dem Begriffspaar "*breast cancer*" und "*next generation sequencing*" durch, so ergeben sich allein für die Jahre 2017 und 2018 bereits 277 Treffer (Abrufdatum: 14.12.2018), so dass an der wissenschaftlichen Analyse möglicher molekularer Marker mit modernen Methoden kein Mangel ist.

Besonderer Bedarf wäre dabei an Markern, die helfen würden, Therapien gegen eine besondere heimtückische Eigenschaft von Mammakarzinomen zu entwickeln, nämlich Spätmetastasen auszubilden, wobei krankheitsfreie Intervalle von mehr als 10 oder 20 Jahren vorkommen. Entsprechend kann keine Patientin jemals wirklich sicher sein, geheilt zu sein - anders als bei anderen häufigen Tumorentitäten, beispielsweise kolorektalen Karzinomen oder Endometriumkarzinomen, wo ein 5-jähriges tumorfreies Intervall praktisch mit Heilung gleichzusetzen ist. Für diese Spätmetastasen werden lange Zeit biologisch ruhende, im Blut zirkulierende Tumorzellen bzw. Tumorzellklone verantwortlich gemacht. Es wäre daher hilfreich, diese einmalig oder auch im zeitlichen Verlauf, z.B. über das Verfahren der *liquid biopsy*, molekular zu analysieren (zum aktuellen Stand siehe (Polasik et al., 2017, 2018) und in der Folge Medikamente zu entwickeln, die diese Tumorzellen zerstören oder auf Dauer unterdrücken könnten, bevor sie zu manifesten Metastasen geführt haben. Weitere medikamentöse Ansätze wären auch für eine bessere Behandlung einer Meningeosis carcinomatosa vonnöten, die üblicherweise mit einem schlechten klinischen Verlauf verbunden ist.

Dabei sind Optimismus und Zuversicht sicher auf der einen Seite für diejenigen individuellen Patienten angebracht, denen später solche Therapie helfen könnten. Sieht man andererseits, wie wenig die moderne Diagnostik und Therapieumsetzung beim Lungenkarzinom, wo man in der molekularpathologischen Routinediagnostik wesentlich weiter ist, bezogen auf alle Patienten gebracht hat, so kehrt schnell wieder Bescheidenheit ein. Trotz aller Bemühungen und der Durchführung multipler molekularer Testungen mit späterem Einsatz zielgerichteter Medikamente ist es dort, den Zahlen des Robert-Koch-Institutes folgend, innerhalb der zwölf letzten verfügbaren Jahre (2000 im Vergleich zu 2012) lediglich gelungen, das relative 5-Jahres-Überleben von ca. 13,5% auf ca. 17,5% zu erhöhen (Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015). Beim Mammakarzinom hingegen hat sich in dieser Zeit das relative 5-Jahres-Überleben von 76% auf 88% erhöht, obwohl die Methoden der diagnostischen Routinediagnostik quasi unverändert geblieben sind.

#### Aktuelle therapeutische Entwicklungen: San Antonio 2018

Dass sich im therapeutischen Bereich vieles tut, auch wenn sich in der Pathologie selber in den letzten Jahren bezüglich der Mammakarzinom-Diagnostik wenig verändert hat, lässt darauf schließen, dass im Moment vor allem Pathologie-ferne Konzepte oder Übertragungen von Erkenntnissen bei anderen Tumorentitäten auf das Mammakarzinom in den Entwicklungen der Onkologie eine wichtige Rolle spielen.

Im Folgenden sollen die aktuellen Studien kursorisch erwähnt werden, die in zwei Übersichten des im Dezember 2018 abgehaltenen, weltweit wohl bedeutendsten Kongresses zu Mammakarzinomen, dem "*San Antonio Breast Cancer Symposium*" (SABCS), im Detail erläutert wurden; von diesen gehörten sieben zu nicht-fernmetastasierten "frühen" Mammakarzinomen und zwei zu fernmetastasierten "fortgeschrittenen" Mammakarzinomen. Die Studien belegen, wie breit einerseits die therapeutischen Bemühungen im Bereich der Onkologie angelegt ist und wie klein andererseits dennoch die einzelnen Schritte des therapeutischen Erfolges sind, und lassen erahnen, wohin die onkologische Therapie derzeit tendiert.

Die Überschriften bei den frühen Mammakarzinomen lauteten (Pohlmann, 2019a):

- "T-DM1 eine post-neoadjuvante Option bei non-pcR": Patientinnen mit einem Residualtumor [= non-pcR] profitieren nach neoadjuvanter Chemotherapie und Anti-HER2-Therapie von einer post-neoadjuvanten Weiterbehandlung mit Trastuzumab Emtansin und verfügen über ein signifikant niedrigeres Rezidivrisiko als Patientinnen mit Trastuzumab-Behandlung (KATHERINE-Studie,1.486 Patientinnen mit Her2-/neu-positivem Mammakarzinom).
- "pCR als Tool zur Therapiesteuerung": Eine pathologisch bestätigte Komplettremission [= pCR] ist speziell bei Triple-negativen und bei HER2-positiven Mammakarzinomen eine prognostische Variable für die weitere Wahl adjuvanter Therapien (Metaanalye, über 27.000 Patientinnen).
- "EBCTCG-Metaanalyse bestätigt erweiterte adjuvante endokrine Therapie": Die erweiterte endokrine Therapie mit einem Aromatasehemmer verbessert signifikant das rezidivfreie Überleben postmenopausaler Patientinnen mit Hormonrezeptor- positivem Mammakarzinom und Lymphknotenbefall (EBCTCG-Metaanalyse, ca. 25.000 Datensätze).
- "Prävention mit niedrig dosiertem Tamoxifen?": Niedrig dosiertes Tamoxifen (5mg/d) reduziert signifikant das Rezidivrisiko für ein invasives Mammakarzinom. Zudem bessere Verträglichkeit als bei Prophylaxe mit 20mg/d Tamoxifen (TAM01- Studie, 500 Fälle).

- "Adjuvante Capecitabin-Gabe bei TNBC?": Patientinnen mit Triple-negativem Mammakarzinom [= TNBC], die primär operiert wurden, profitieren postoperativ nicht von einer Capecitabin-Therapie im Gegensatz zu neoadjuvant behandelten, Anthrazyklin-/Taxan-resistenten Patienten (GEICAM-Studie, ca. 875 Fälle).
- "SUCCESS C: Gesunde Lebensführung unterstützen": Ein gesunder Lebensstil kann bei Patientinnen mit frühem Mammakarzinom dazu beitragen, das Rezidivrisiko zu senken. Eine individuelle und konsequente Lebenstiländerung mit Bewegung und Gewichtsabnahme kann als therapiebegleitende Maßnahme nutzen (SUCCESS-C-Studie, 2.292 Fälle).
- "Kardiovaskuläres Risiko schon während der Therapie reduzieren": Patientinnen, die während der adjuvanten Behandlung ein kardiovaskuläres Trainingsprogramm absolvieren, profitieren im weiterem Therapie- und Krankheitsverlauf durch weniger Müdigkeit und eine bessere Lebensqualität (EBBA-II- Studie, 545 Fälle).

#### Bei den fortgeschrittenen Mammakarzinomen wurde berichtet (Pohlmann, 2019b):

- "IMpassion 130: PD-L1-Expression ≥ 1% als Prädiktor": Neue adjuvante Erstlinientherapie für Triplenegative metastasierte Mammakarzinome mit Atezolizumab / nab-Paclitaxel bei immunhistochemisch gesicherter PD-L1-Positivität von ≥ 1% der Tumor-infiltrierenden Immunzellen mit Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens von 15,5 Monate auf 25,0 Monate (IMpassion 130-Studie, 900 Patientinnen Fälle)
- "SOLAR-1: Schafft Alpelisib es in den klinischen Alltag?": Für Hormonrezeptor-positive, Her-2negative Mammakarzinome ergab sich bei PIK3CA-Mutation ein signifikant höheres medianes Überleben von 11,0 Monaten bei Gabe von Fulvestrant und Alpelisib im Vergleich zu 5,7 Monaten bei Fulvestrant und Placebo; diese Ergebnisse werden als "noch nicht reif [für den klinischen Einsatz], aber vielversprechend" angesehen (SOLAR-1-Studie, 572 postmenopausale Patientinnen bzw. auch Männer mit Mammakarzinom).

Verschiedene Ansätze aus Chemotherapie, Strahlentherapie, Hormontherapie etc. greifen also bei therapeutischen Erkenntnisgewinnungen und Fortschritten ineinander und tragen Mosaikstein-artig zu besseren Optionen für die Betroffenen bei. Auch wenn die diagnostische Pathologie dabei bei einigen Studien nicht oder nur indirekt beteiligt ist, so kann man dennoch sicher davon ausgehen, dass insbesondere kommende genetische und molekularpathologische Erkenntnisse auch in die Anstrengungen der gynäkologischen Onkologie und Pharmakologie eingehen werden, diese therapeutisch umzusetzen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Aihara, M., Truong, L.D., Dunn, J.K., Wheeler, T.M., Scardino, P.T., Thompson, T.C., 1994. Frequency of apoptotic bodies positively correlates with Gleason grade in prostate cancer. Hum. Pathol. 25, 797–801.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2013. Essential cell biology. Garland Science.
- Allan, D.J., Howell, A., Roberts, S.A., Williams, G.T., Watson, R.J., Coyne, J.D., Clarke, R.B., Laidlaw, I.J., Potten, C.S., 1992. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. J. Pathol. 167, 25–32.
- Ameisen, J.C., Estaquier, J., Idziorek, T., 1994. From AIDS to Parasite Infection: Pathogen-Mediated Subversion of Programmed Cell Death as a Mechanism for Immune Dysregulation. Immunol. Rev. 142, 9–51.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D.P., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, Å., 2003. 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. 72, 1117–1130.
- Arpino, G., Weiss, H., Lee, A.V., Schiff, R., De Placido, S., Osborne, C.K., Elledge, R.M., 2005. Estrogen receptor–positive, progesterone receptor–negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. J. Natl. Cancer Inst. 97, 1254–1261.
- Arriagada, R., Rutqvist, L.E., Skoog, L., Johansson, H., Kramar, A., 1992. Prognostic factors and natural history in lymph node-negative breast cancer patients. Breast Cancer Res. Treat. 21, 101–109.
- Ashwell, J.D., Berger, N.A., Cidlowski, J.A., Lane, D.P., Korsmeyer, S.J., 1994. Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. Immunol. Today 15, 147–151.
- Atkinson, E.N., Brown, B.W., Montague, E.D., 1986. Tumor Volume, Nodal Status, and Metastasis in Breast Cancer in Women. J. Natl. Cancer Inst. 76, 171–178.
- Barres, B.A., Hart, I.K., Coles, H.S.R., Burne, J.F., Voyvodic, J.T., Richardson, W.D., Raff, M.C., 1992. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. Cell 70, 31–46.
- Bartlett, J.M.S., Bayani, J., Marshall, A., Dunn, J.A., Campbell, A., Cunningham, C., Sobol, M.S., Hall, P.S., Poole, C.J., Cameron, D.A., Earl, H.M., Rea, D.W., Macpherson, I.R., Canney, P., Francis, A., McCabe, C., Pinder, S.E., Hughes-Davies, L., Makris, A., Stein, R.C., 2016. Comparing Breast Cancer Multiparameter Tests in the OPTIMA Prelim Trial: No Test Is More Equal Than the Others. JNCI J. Natl. Cancer Inst. 108.
- Berardo, M.D., Elledge, R.M., Moor, C. de, Clark, G.M., Osborne, C.K., Allred, D.C., 1998. bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc. 82, 1296–1302.
- Biesterfeld, S., 1997. Methodische Aspekte bei der standardisierten Beurteilung der mitotischen Aktivität von Tumorgeweben. Pathol. 18, 439–444.
- Biesterfeld, S., 1989. DNA-Malignitätsgradierung des Mammakarzinoms (Med.Diss.). Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- Bilik, R., Mor, C., Wolloch, Y. 'acov, Dintsman, M., 1986. Histopathologic high risk factors influencing the prognosis of patients with early breast cancer (T1N0M0). Am. J. Surg. 151, 460–464.
- Bloom, H.J.G., Richardson, W.W., 1957. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. Br. J. Cancer 11, 359–377.
- Brandt, A., Lorenzo Bermejo, J., Sundquist, J., Hemminki, K., 2010. Breast cancer risk in women who fulfill high-risk criteria: at what age should surveillance start? Breast Cancer Res. Treat. 121, 133–141.
- Buell, P., 1973. Changing Incidence of Breast Cancer in Japanese-American Women. J. Natl. Cancer Inst. 51, 1479–1483.
- Burek, M.J., Oppenheim, R.W., 1996. Programmed Cell Death in the Developing Nervous System. Brain Pathol. 6, 427–446.
- Campeau, P.M., Foulkes, W.D., Tischkowitz, M.D., 2008. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. Hum. Genet. 124, 31–42.
- Carter, C.L., Allen, C., Henson, D.E., 1989. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 63, 181–187.
- Champion, H.R., Wallace, I.W.J., 1971. Breast Cancer Grading. Br. J. Cancer 25, 441–448.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R., Dixit, V.M., 1997. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: A Molecular Framework for Cell Death. Science 275, 1122–1126.
- Chinnaiyan, A.M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D.A., Shanaiah, M., Chenevert, T.L., Ross, B.D., Rehemtulla, A., 2000. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 1754–1759.
- Chlebowski, R.T., Kuller, L.H., Prentice, R.L., Stefanick, M.L., Manson, J.E., Gass, M., Aragaki, A.K., Ockene, J.K., Lane, D.S., Sarto, G.E., 2009. Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. N. Engl. J. Med. 360, 573–587.
- Coates, A. S., Winer, E. P., Goldhirsch, A., Gelber, R. D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.-J., André, F., Baselga, J., Bergh, J., Bonnefoi, H., Burstein, H., Cardoso, F., Castiglione-Gertsch, M., Coates, Alan S., Colleoni, M., Curigliano, G., Davidson, N.E., Di Leo, A., Ejlertsen, B., Forbes, J.F., Galimberti, V., Gelber, Richard D., Gnant, Michael, Goldhirsch, Aron, Goodwin, P., Harbeck, N., Hayes, D.F., Huober, J., Hudis, C.A., Ingle, J.N., Jassem, J., Jiang, Z., Karlsson, P., Morrow,

M., Orecchia, R., Kent Osborne, C., Partridge, A.H., de la Peña, L., Piccart-Gebhart, M.J., Pritchard, K.I., Rutgers, E.J.T., Sedlmayer, F., Semiglazov, V., Shao, Z.-M., Smith, I., Thürlimann, Beat, Toi, M., Tutt, A., Viale, G., von Minckwitz, G., Watanabe, T., Whelan, T., Winer, Eric P., Xu, B., 2015. Tailoring therapies improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Ann. Oncol. 26, 1533–1546.

- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. Lancet Oncol. 13, 1141–1151.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. The Lancet 347, 1713–1727.
- Cox, D., 1972. Regression models and life-tables JR Statist Soc B 34: 187-220.
- De Jong, J.S., Van Diest, P.J., Baak, J.P.A., 2000. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. Br. J. Cancer 82, 368.
- Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (Eds.), 2008. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. München.
- Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Gesellschaft für Senologie e.V., Zertifizierungskommission Brustkrebszentren, 2017. Jahresbericht der zertifizierten Brustkrebszentren.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2012. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. The lancet 379, 432–444.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2011. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. Lancet 378, 1707–1716.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. The Lancet 366, 2087–2106.
- Easton, D.F., 1999. How many more breast cancer predisposition genes are there. Breast Cancer Res 1, 14–17.
- Ellis, H.M., Horvitz, H.R., 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. Cell 44, 817–829.
- Ellis, R.E., Yuan, J., Horvitz, H.R., 1991. Mechanisms and Functions of Cell Death. Annu. Rev. Cell Biol. 7, 663–698.

- Elston, C.W., Ellis, I.O., 1991. 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 19, 403–410.
- Etzrodt, A., Jung, H., Schweissfurth, C., Tolxdorff, T., Lamberti, G., 1983. Die Beziehung der Steroid-Hormon-Rezeptoren zum axillären Lymphknotenbefall beim Mammakarzinom. Geburtshilfe Frauenheilkd. 43, 726–731.
- Ferguson, D.J., Anderson, T.J., 1981. Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast. Br. J. Cancer 44, 177–181.
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R.G., Deutsch, M., Fisher, E.R., Jeong, J.-H., Wolmark, N., 2002. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. N. Engl. J. Med. 347, 1233–1241.
- Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Fisher, E.R., Cruz, A.B., Foster, R., Gardner, B., Lerner, H., Margolese, R., Poisson, R., Shibata, H., Volk, H., 1983. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. Cancer 52, 1551–7.
- Fisher, B., Dignam, J., Tan-Chiu, E., Anderson, S., Fisher, E.R., Wittliff, J.L., Wolmark, N., 2001. Prognosis and Treatment of Patients With Breast Tumors of One Centimeter or Less and Negative Axillary Lymph Nodes. J. Natl. Cancer Inst. 93, 112–120.
- Fisher, B., Slack, N.H., Bross, I.D.F., Cooperating Investigators, 1969. Cancer of the breast: Size of neoplasm and prognosis. Cancer 24, 1071–1080.
- Freedman, L.S., Edwards, D.N., McConnell, E.M., Downham, D.Y., 1979. Histological grade and other prognostic factors in relation to survival of patients with breast cancer. Br. J. Cancer 40, 44–55.
- Frisch, S.M., Francis, H., 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J. Cell Biol. 124, 619–626.
- Gaglia, P., Bussone, R., Caldarola, B., Lai, M., Jayme, A., Caldarola, L., 1987. The correlation between the spread of metastases by level in the axillary nodes and disease-free survival in breast cancer. A multifactorial analysis. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 23, 849–854.
- Galea, M.H., Blamey, R.W., Elston, C.E., Ellis, I.O., 1992. The Nottingham prognostic index in primary breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 22, 207–219.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. 119, 493–501.
- Giuliano, A.E., McCall, L., Beitsch, P., Whitworth, P.W., Blumencranz, P., Leitch, A.M., Saha, S., Hunt, K.K., Morrow, M., Ballman, K., 2010. Locoregional Recurrence After Sentinel Lymph Node Dissection With or Without Axillary Dissection in Patients With Sentinel Lymph Node Metastases: The American College of Surgeons Oncology Group Z0011 Randomized Trial. Trans. Meet. Am. Surg. Assoc. 128, 12–21.

- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., Senn, H.-J., Panel members, 2011. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann. Oncol.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thurlimann, B., Senn, H.-J., Panel Members, 2007. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. Ann. Oncol. 18, 1133– 1144.
- González-Cámpora, R., Ruiz, M.R.G., Ramírez, F.V., Martín, J.J.R., Santos, J.M.F., Martos, M. del M.R., Pascual, A.G., 2000. Apoptosis in breast carcinoma. Pathol.-Res. Pract. 196, 167–174.
- Green, D.R., Scott, D.W., 1994. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. Curr. Opin. Immunol. 6, 476–487.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C., 1994. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. Cancer Res. 54, 4855–4878.
- Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartwieg, E., Horvitz, H.R., Hengartner, M.O., 1999. Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline. Development 126, 1011–1022.
- Haag, P., Hanhart, N., Müller, M., 2003. Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach.
- Haake, A.R., Polakowska, R.R., 1993. Cell death by apoptosis in epidermal biology. J. Invest. Dermatol. 101, 107–112.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, 646–674.
- Harbeck, N., Kates, R.E., Look, M.P., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G.M., Krüger, A., Kiechle, M., Jänicke, F., Schmitt, M., Foekens, J.A., 2002. Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (n = 3424). Cancer Res. 62, 4617–4622.
- Harms, G., 2004. Fortschritte in der Früherkennung des Mammakarzinoms in den Jahren 1981-1990 (Med.Diss.). Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Harris, L.N., Ismaila, N., McShane, L.M., Andre, F., Collyar, D.E., Gonzalez-Angulo, A.M., Hammond, E.H., Kuderer, N.M., Liu, M.C., Mennel, R.G., Van Poznak, C., Bast, R.C., Hayes, D.F., 2016. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. J. Clin. Oncol. 34, 1134–1150.
- Haviland, J.S., Owen, J.R., Dewar, J.A., Agrawal, R.K., Barrett, J., Barrett-Lee, P.J., Dobbs,
  H.J., Hopwood, P., Lawton, P.A., Magee, B.J., Mills, J., Simmons, S., Sydenham,
  M.A., Venables, K., Bliss, J.M., Yarnold, J.R., 2013. The UK Standardisation of
  Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment

of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. Lancet Oncol. 14, 1086–1094.

Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770–776.

- Hengartner, M.O., Ellis, R., Horvitz, R., 1992. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. Nature 356, 494–499.
- Hengartner, M.O., Horvitz, H.R., 1994. Programmed cell death in Caenorhabditis elegans. Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 581–586.
- Heywang-Köbrunner, S.H., Schreer, I., 2015. Bildgebende Mammadiagnostik: Untersuchungstechnik, Befundmuster, Differenzialdiagnose und Interventionen. Georg Thieme Verlag.
- Hickman, J.A., 1992. Apoptosis induced by anticancer drugs. Cancer Metastasis Rev. 11, 121–139.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., 1991. p53 mutations in human cancers. Science 253, 49–53.
- Hooper, M.L., 1994. The role of the p53 and Rb-1 genes in cancer, development and apoptosis. J. Cell Sci. 1994, 13–17.
- Horvitz, H.R., 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans. Cancer Res. 59, 1701s–1706s.
- Horwitz, K.B., McGuire, W.L., 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. Steroids 25, 497–505.
- Houssami, N., Ciatto, S., Macaskill, P., Lord, S.J., Warren, R.M., Dixon, J.M., Irwig, L., 2008. Accuracy and Surgical Impact of Magnetic Resonance Imaging in Breast Cancer Staging: Systematic Review and Meta-Analysis in Detection of Multifocal and Multicentric Cancer. J. Clin. Oncol. 26, 3248–3258.
- Houssami, N., Macaskill, P., Marinovich, M.L., Dixon, J.M., Irwig, L., Brennan, M.E., Solin, L.J., 2010. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. Eur. J. Cancer 46, 3219–3232.
- Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C., 1997. Programmed Cell Death in Animal Development. Cell 88, 347–354.
- Jänicke, F., Prechtl, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., Sweep, C.G.J.F., Selbmann, H.-K., Graeff, H., Schmitt, M., 2001. Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial in High-Risk, Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients Identified by Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. JNCI J. Natl. Cancer Inst. 93, 913–920.
- Jeremias, I., Reinhardt, D., Debatin, K.M., 2001. Fehlregulation von Apoptose als Grundlage für Krankheit. HNO 49, 673–683.

- Kalogeraki, A., Karvela-Kalogeraki, I., Petraki, P.E., Zois, I., Tamiolakis, D., Stathopoulos, E.N., 2011. Apoptosis and cell proliferation correlated with tumour grade in peritoneal fluids of patients with serous ovarian cancer. Cytopathology 22, 383–386.
- Kaplan, E.L., Meier, P., 1958. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. J. Am. Stat. Assoc. 53, 457–481.
- Katalinic, A., Lemmer, A., Zawinell, A., Rawal, R., Waldmann, A., 2009. Trends in Hormone Therapy and Breast Cancer Incidence -Results from the German Network of Cancer Registries. Pathobiology 76, 90–97.
- Kato, T., Kameoka, S., Kimura, T., Tanaka, S., Nishikawa, T., Kobayashi, M., 2002. p53, mitosis, apoptosis and necrosis as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. Anticancer Res. 22, 1105–1112.
- Kaufmann, M., Hortobagyi, G.N., Goldhirsch, A., Scholl, S., Makris, A., Valagussa, P., Blohmer, J.-U., Eiermann, W., Jackesz, R., Jonat, W., Lebeau, A., Loibl, S., Miller, W., Seeber, S., Semiglazov, V., Smith, R., Souchon, R., Stearns, V., Untch, M., Minckwitz, G. von, 2006. Recommendations From an International Expert Panel on the Use of Neoadjuvant (Primary) Systemic Treatment of Operable Breast Cancer: An Update. J. Clin. Oncol. 24, 1940–1949.
- Kelsey, J.L., 1979. A review of the epidemiology of human breast cancer. Epidemiol. Rev. 1, 74–109.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. Br. J. Cancer 26, 239–257.
- Kett, K., Szilagyi, K., Anga, B., Kett, A.G., Kiralyfalvi, K., 2002. Axillary lymph drainage as a prognostic factor of survival in breast cancer. Lymphology 35, 161–170.
- Krijnen, P.A.J., Simsek, S., Niessen, H.W.M., 2009. Apoptosis in diabetes. Apoptosis 14, 1387–1388.
- Krop, I., Ismaila, N., Andre, F., Bast, R.C., Barlow, W., Collyar, D.E., Hammond, M.E., Kuderer, N.M., Liu, M.C., Mennel, R.G., Van Poznak, C., Wolff, A.C., Stearns, V., 2017. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 35, 2838–2847.
- Krueger, B.K., Burne, J.F., Raff, M.C., 1995. Evidence for large-scale astrocyte death in the developing cerebellum. J. Neurosci. 15, 3366–3374.
- Kuriyama, H., Lamborn, K.R., O'Fallon, J.R., Iturria, N., Sebo, T., Schaefer, P.L., Scheithauer, B.W., Buckner, J.C., Kuriyama, N., Jenkins, R.B., 2002. Prognostic significance of an apoptotic index and apoptosis/proliferation ratio for patients with high-grade astrocytomas. Neuro-Oncol. 4, 179–186.
- Lakhani, S.R., 2012. WHO classification of tumours of the breast. International Agency for Research on Cancer.

Lakhani, S.R., Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J., World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2012. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon IARC 4.

Lane, D.P., 1992. p53, guardian of the genome. Nature 358, 15–16.

- Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe e.V. (Eds.), 2017. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.0, 2017 AWMF Registernummer: 032-045OL. Zuckerschwerdt, München.
- Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe e.V. (Eds.), 2012. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms: Langversion 3.0, Aktualisierung 2012, AWMF-Register-Nummer: 032-045OL. Zuckschwerdt, München.
- Leoncini, L., Del Vecchio, M.T., Megha, T., Barbini, P., Galieni, P., Pileri, S., Sabattini, E., Gherlinzoni, F., Tosi, P., Kraft, R., Cottier, H., 1993. Correlations Between Apoptotic and Proliferative Indices in Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas. Am. J. Pathol. 142, 755–763.
- Leung, S.C.Y., Nielsen, T.O., Zabaglo, L., Arun, I., Badve, S.S., Bane, A.L., Bartlett, J.M.S., Borgquist, S., Chang, M.C., Dodson, A., Enos, R.A., Fineberg, S., Focke, C.M., Gao, D., Gown, A.M., Grabau, D., Gutierrez, C., Hugh, J.C., Kos, Z., Lænkholm, A.-V., Lin, M.-G., Mastropasqua, M.G., Moriya, T., Nofech-Mozes, S., Osborne, C.K., Penault-Llorca, F.M., Piper, T., Sakatani, T., Salgado, R., Starczynski, J., Viale, G., Hayes, D.F., McShane, L.M., Dowsett, M., 2016. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. Npj Breast Cancer 2, 16014.
- Lipponen, P., 1999. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. Endocr. Relat. Cancer 6, 13–16.
- Lipponen, P., Aaltomaa, S., Kosma, V.-M., Syrjänen, K., 1994. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. Eur. J. Cancer 30, 2068–2073.
- Lipponen, P.K., Aaltomaa, S., 1994. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. J. Pathol. 173, 333–339.
- Liu, S., Edgerton, S.M., Moore, D.H., Thor, A.D., 2001. Measures of Cell Turnover (Proliferation and Apoptosis) and Their Association with Survival in Breast Cancer. Clin. Cancer Res. 7, 1716–1723.
- Look, M.P., van Putten, W.L.J., Duffy, M.J., Harbeck, N., Christensen, I.J., Thomssen, C., Kates, R., Spyratos, F., Fernö, M., Eppenberger-Castori, S., Sweep, C.G.J.F., Ulm, K., Peyrat, J.-P., Martin, P.-M., Magdelenat, H., Brünner, N., Duggan, C., Lisboa, B.W., Bendahl, P.-O., Quillien, V., Daver, A., Ricolleau, G., Meijer-van Gelder, M.E., Manders, P., Fiets, W.E., Blankenstein, M.A., Broët, P., Romain, S., Daxenbichler, G., Windbichler, G., Cufer, T., Borstnar, S., Kueng, W., Beex, L.V.A.M., Klijn, J.G.M., O'Higgins, N., Eppenberger, U., Jänicke, F., Schmitt, M., Foekens, J.A., 2002. Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its

Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. JNCI J. Natl. Cancer Inst. 94, 116–128.

- Lukong, K.E., 2017. Understanding breast cancer The long and winding road. BBA Clin. 7, 64–77.
- Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U., MM Basso, S., 2013. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. Curr. Med. Chem. 20, 596–604.
- Marquardt, K., Büttner, H.H., Broschewitz, U., Barten, M., Schneider, V., 2011. Persistent Carcinoma in Cervical Cancer Screening: Non-Participation Is the Most Significant Cause. Acta Cytol. 55, 433–437.
- Martin, S., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Andersen, J.A., van Schie, R., LaFace, D.M., Green, D.R., 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J. Exp. Med. 182, 1545–1556.
- Marty, M., Cognetti, F., Maraninchi, D., Snyder, R., Mauriac, L., Tubiana-Hulin, M., Chan, S., Grimes, D., Antón, A., Lluch, A., 2005. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2–positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. J. Clin. Oncol. 23, 4265–4274.
- McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M., 2000. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ 321, 624–628.
- Melchers, F., Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama, H., Ghia, P., Andersson, J., 1995. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. Curr. Opin. Immunol. 7, 214–227.
- Meredith, J.E., Fazeli, B., Schwartz, M.A., 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. Mol. Biol. Cell 4, 953–961.
- Metcalfe, K., Lubinski, J., Lynch, H.T., Ghadirian, P., Foulkes, W.D., Kim-Sing, C., Neuhausen, S., Tung, N., Rosen, B., Gronwald, J., 2010. Family history of cancer and cancer risks in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. J. Natl. Cancer Inst.
- Miedlich, A., 2015. Eine methodenkritische Studie zum histochemischen Nachweis der Apoptose mittels TUNEL im Hodengewebe der Wistarratte (Med.Diss.). Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Miller, E., Lee, H.J., Lulla, A., Hernandez, L., Gokare, P., Lim, B., 2014. Current treatment of early breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy. F1000Research 3.
- Minckwitz, G. von, Untch, M., Blohmer, J.-U., Costa, S.D., Eidtmann, H., Fasching, P.A., Gerber, B., Eiermann, W., Hilfrich, J., Huober, J., Jackisch, C., Kaufmann, M., Konecny, G.E., Denkert, C., Nekljudova, V., Mehta, K., Loibl, S., 2012. Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes. J. Clin. Oncol. 30, 1796– 1804.

- Mommers, E.C., van Diest, P.J., Leonhart, A.M., Meijer, C.J., Baak, J.P., 1999. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. Breast Cancer Res. Treat. 58, 163–169.
- Niikura, N., Masuda, S., Kumaki, N., Xiaoyan, T., Terada, M., Terao, M., Iwamoto, T., Oshitanai, R., Morioka, T., Tuda, B., Okamura, T., Saito, Y., Suzuki, Y., Tokuda, Y., 2014. Prognostic Significance of the Ki67 Scoring Categories in Breast Cancer Subgroups. Clin. Breast Cancer 14, 323–329.
- Nolte, C., 2012. Prognostische Validierung komplexer morphologischer Parameter an Mammakarzinom-Kollektiven (Med.Diss.). Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
- Oltval, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death. Cell 74, 609–619.
- Osborne, C.K., 1998. Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. N. Engl. J. Med. 339, 1609–1618.
- Osmond, D.G., 1993. The turnover of B-cell populations. Immunol. Today 14, 34–37.
- Palmer, E., 2003. Negative selection clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. Nat. Rev. Immunol. 3, 383–391.
- Parton, M., Dowsett, M., Smith, I., 2001. Studies of apoptosis in breast cancer. Br. Med. J. 322, 1528.
- Petrelli, F., Barni, S., 2012. Meta-analysis of concomitant compared to sequential adjuvant trastuzumab in breast cancer: the sooner the better. Med. Oncol. 29, 503–510.
- Petrelli, F., Viale, G., Cabiddu, M., Barni, S., 2015. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. Breast Cancer Res. Treat. Dordr. 153, 477–491.
- Pohlmann, B.-K., 2019a. SABCS 2018. Wegweisende Daten beim frühen Mammakarzinom. Trillium Krebsmedizin 28, 25-29.
- Pohlmann, B.-K., 2019b. SABCS 2018: Aktuelle Daten beim fortgeschrittenen Mammakarzinom. Trillium Krebsmedizin 28, 30-31.
- Polakowska, R.R., Piacentini, M., Bartlett, R., Goldsmith, L.A., Haake, A.R., 1994. Apoptosis in human skin development: Morphogenesis, periderm, and stem cells. Dev. Dyn. 199, 176–188.
- Polasik, A., Tzschaschel, M., Schochter, F., de Gregorio, A., Friedl, T.W.P., Rack, B., Hartkopf, A., Fasching, P.A., Schneeweiss, A., Müller, V., Huober, J., Janni, W., Fehm, T., 2017. Circulating Tumour Cells, Circulating Tumour DNA and Circulating MicroRNA in Metastatic Breast Carcinoma – What is the Role of Liquid Biopsy in Breast Cancer? Geburtshilfe Frauenheilkd. 77, 1291–1298.
- Polasik, A., Tzschaschel, M., Schochter, F., Friedl, T.W.P., Rack, B., Hartkopf, A., Fasching, P.A., Schneeweiss, A., Müller, V., Huober, J., Janni, W., Fehm, T., 2018. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: clinical relevance and biological potential. Curr Opin Obstet Gynecol.

- Rassow, J., Deutzmann, R., Netzker, R., Hauser, K., 2012. Duale Reihe Biochemie. Georg Thieme Verlag.
- Remmele, W. (Ed.), 1997. Pathologie 4: Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Remmele, W., Stegner, H.E., 1987. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. Pathologe 8, 138–140.
- Robert Koch-Institut, die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Eds.), 2017. Krebs in Deutschland für 2013/2014, 11th ed. Berlin.
- Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Eds.), 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012, 10th ed. Berlin.
- Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Eds.), 2010. Krebs in Deutschland 2005/2006, 7th ed.
- Roodi, N., Bailey, L.R., Kao, W.-Y., Verrier, C.S., Yee, C.J., Dupont, W.D., Parl, F.F., 1995. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. 87, 446–451.
- Rosen, P.P., Groshen, S., Saigo, P.E., Kinne, D.W., Hellman, S., 1989. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. J. Clin. Oncol. 7, 1239–1251.
- Ross, R.K., Paganini-Hill, A., Wan, P.C., Pike, M.C., 2000. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. J. Natl. Cancer Inst. 92, 328–332.
- Savill, J., 1997. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Br. Med. Bull. 53, 491–508.
- Scheurer, L.K., 2013. Der prognostische Wert von klinischen Parametern und Tumoreigenschaften für einen metastatischen Befall von axillären Non-Sentinel-Lymphknoten beim Mammakarzinom (Med.Diss.). Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Schlappack, O.K., Braun, O., Maier, U., 1985. Report of two cases of male breast cancer after prolonged estrogen treatment for prostatic carcinoma. Cancer Detect. Prev. 9, 319– 322.
- Schöndorf, T., Göhring, U.-J., Becker, M., Hoopmann, M., Schmidt, T., Rützel, S., Rein, D.T., Ulrich, U., Fechteler, R., Bersch, A., Mallmann, P., Valter, M.M., 2004. High Apoptotic Index Correlates to p21 and p27 Expression Indicating a Favorable Outcome of Primary Breast Cancer Patients, but Lacking Prognostic Significance in Multivariate Analysis. Pathobiology 71, 217–222.
- Schumacher, M., Schmoor, C., Sauerbrei, W., Schauer, A., Ummenhofer, L., Gatzemeier, W., Rauschecker, H., 1993. The prognostic effect of histological tumor grade in nodenegative breast cancer patients. Breast Cancer Res. Treat. 25, 235–245.

- Shibakita, M., Tachibana, M., Dhar, D.K., Ohno, S., Kubota, H., Yoshimura, H., Kinugasa, S., Masunaga, R., Nagasue, N., 2000. Spontaneous apoptosis in advanced esophageal carcinoma: its relation to Fas expression. Clin. Cancer Res. 6, 4755–4759.
- Shintia, C., Endang, H., Diani, K., 2016. Assessment of pathological response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer using the Miller-Payne system and TUNEL. Malays. J. Pathol. 38, 25–32.
- Silverstein, M.J., Lagios, M.D., Craig, P.H., Waisman, J.R., Lewinsky, B.S., Colburn, W.J., Poller, D.N., 1996. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc. 77, 2267–2274.
- Sinn, H., Schmid, H., Junkermann, H., Huober, J., Leppien, G., Kaufmann, M., Bastert, G., Otto, H., 1994. Histologische Regression des Mammakarzinoms nach primärer (neoadjuvanter) Chemotherapie. Geburtshilfe Frauenheilkd. 54, 552–558.
- Sirvent, J., Aguilar, M., Olona, M., Pelegri, A., Blázquez, S., Gutierrez, C., 2004. Prognostic value of apoptosis in breast cancer (pT1-pT2). A TUNEL, p53, bcl-2, bag-1 and Bax immunohistochemical study. Histol. Histopathol. 19, 759–770.
- Smith, I.E., Dowsett, M., Ebbs, S.R., Dixon, J.M., Skene, A., Blohmer, J.-U., Ashley, S.E., Francis, S., Boeddinghaus, I., Walsh, G., 2005. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. J. Clin. Oncol. 23, 5108–5116.
- Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C., 2010. TNM classification of malignant tumours. John Wiley & Sons.
- Soerjomataram, I., Louwman, M.W.J., Ribot, J.G., Roukema, J.A., Coebergh, J.W.W., 2008. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 107, 309–330.
- Sørensen, H.T., Friis, S., Olsen, J.H., Thulstrup, A.M., Mellemkjaer, L., Linet, M., Trichopoulos, D., Vilstrup, H., Olsen, J., 1998. Risk of breast cancer in men with liver cirrhosis. Am. J. Gastroenterol. 93, 231–233.
- Stamatiadis-Smidt, H., zur Hausen, H., Wiestler, O.D., Gebest, H.-J., 2006. Thema Krebs: 3., Vollständig Überarbeitete und Erweiterte Auflage. Springer.
- Sun, D.Q., Feng, C.H., Böcking, A., Biesterfeld, S., 1994. Principal component analysis. A factor analytical technique for the determination of interobserver variation in histomorphologic tumor grading. Anticancer Res. 14, 1525–1528.
- Tanaka, K., Iwamoto, S., Gon, G., Nohara, T., Iwamoto, M., Tanigawa, N., 2000. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. Clin. Cancer Res. 6, 127–134.
- Tavassoli, F.A., Devilee, P., 2003. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon.

- Teppo, H., Soini, Y., Melkko, J., Koivunen, P., Alho, O.-P., 2003. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: the role of apoptosis, p53, proliferation (Ki-67) and angiogenesis. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 111, 451–457.
- Thompson, C.B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267, 1456–1462.
- Tumorzentrum München (Ed.), 2015. Manual Mammakarzinome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 15th ed. W. Zuckerschwerdt Verlag München.
- Tumorregister München (2018a): ICD-10 C50: Mammakarzinom (Frauen) Survival; <u>https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC50f\_G-ICD-10-C50-Mammakarzi</u> <u>nom-Frauen-Survival.pdf</u> vom 22.8.2018 (abgerufen am 23.11.2018)
- Tumorregister München (2018b): Spezielle Auswertungen zum Mammakarzinom (C50): Tumordurchmesser zeitl. Trend. <u>https://www.tumorregister-muenchen.de</u> <u>spec\_C50f\_08\_20181212\_tudia.pdf</u> vom 12.12.2018 (abgerufen am 14.12.2018)
- Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 1997. TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 5th ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio.
- Untch, M., Jackisch, C., Thomssen, C., Nitz, U., von Minckwitz, G., Kaufmann, M., 2006. MEDIZIN-Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. Dtsch. Arzteblatt-Ärztl. Mitteilungen-Ausg. A 103, 3406–3410.
- Veronesi, U., Cascinelli, N., Mariani, L., Greco, M., Saccozzi, R., Luini, A., Aguilar, M., Marubini, E., 2002. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breastconserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. N. Engl. J. Med. 347, 1227–1232.
- Veronesi, U., Galimberti, V., Zurrida, S., Merson, M., Greco, M., Luini, A., 1993. Prognostic significance of number and level of axillary node metastases in breast cancer. The Breast 2, 224–228.
- Veronesi, U., Paganelli, G., Viale, G., Luini, A., Zurrida, S., Galimberti, V., Intra, M., Veronesi, P., Robertson, C., Maisonneuve, P., others, 2003. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. N. Engl. J. Med. 349, 546–553.
- Villar, E., Redondo, M., Rodrigo, I., García, J., Avila, E., Matilla, A., 2001. bcl-2 Expression and Apoptosis in Primary and Metastatic Breast Carcinomas. Tumor Biol. 22, 137– 145.
- von Boehmer, H., 1994. Positive selection of lymphocytes. Cell 76, 219-228.
- Wagener, C., Müller, O., 2009. Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Georg Thieme Verlag.
- Waters, C.M., 1996. Mechanisms of neuronal cell death. An overview. Mol. Chem. Neuropathol. 28, 145–151.
- Whelan, T.J., Pignol, J.-P., Levine, M.N., Julian, J.A., MacKenzie, R., Parpia, S., Shelley, W., Grimard, L., Bowen, J., Lukka, H., Perera, F., Fyles, A., Schneider, K., Gulavita, S.,

Freeman, C., 2010. Long-Term Results of Hypofractionated Radiation Therapy for Breast Cancer. N. Engl. J. Med. Boston 362, 513–20.

- Wittekind, C., Meyer, H.-J., 2010. TNM: Klassifikation maligner Tumoren, 7. ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Wörmann, B., Aebi, S., Greil, R., Balic, M., Overkamp, F., Rick, O., Samonigg, H., Possinger, K., Decker, T., Fehm, T., Harbeck, N., Krug, B., Wenz, F., Lüftner, D., 2018. Mammakarzinom der Frau, Onkopedia Leitlinien.
- Wyllie, A.H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284, 555–556.
- Yuan, J., 1995. Molecular control of life and death. Curr. Opin. Cell Biol. 7, 211–214.
- Yuan, J., Horvitz, H.R., 2004. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. Cell 116, 53–56.
- Yuan, J., Horvitz, H.R., 1990. The Caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. Dev. Biol. 138, 33–41.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R., 1993. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1β-converting enzyme. Cell 75, 641–652.
- Zhang, G.J., Kimijima, I., Abe, R., Watanabe, T., Kanno, M., Hara, K., Tsuchiya, A., 1997. Apoptotic index correlates to bcl-2 and p53 protein expression, histological grade and prognosis in invasive breast cancers. Anticancer Res. 18, 1989–1998.
- Zhang, Y., Zhu, J., Tang, Y., Li, F., Zhou, H., Peng, B., Zhou, C., Fu, R., 2011. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. Diagn. Pathol. 6, 49.
- Zhou, Z.-R., Mei, X., Chen, X.-X., Yang, Z.-Z., Hou, J., Zhang, L., Yu, X.-L., Guo, X.-M., 2015. Systematic review and meta-analysis comparing hypofractionated with conventional fraction radiotherapy in treatment of early breast cancer. Surg. Oncol. 24, 200–211.
- Zuzarte-Luis, V., Hurle, J.M., 2004. Programmed cell death in the developing limb. Int. J. Dev. Biol. 46, 871–876.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld für das Überlassen dieses interessanten Dissertationsthemas sowie die sehr gute und freundliche Betreuung während jeder Phase dieser Arbeit. Seine Geduld und die bereitwillige Unterstützung als auch die ständige Verfügbarkeit haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonders danke ich meiner Familie, meinen Eltern Theresia und Jürgen sowie meiner Zwillingsschwester Julia für ihre Unterstützung, ihren Rückhalt und das stets offene Ohr. Auch die vielen motivierenden Gespräche haben diese Arbeit unterstützt.

Meinem Freund Nicholas Tasch möchte ich für seine Rücksichtnahme und Motivation danken. Mit Ihm erscheinen auch die weitesten Wege machbar.