

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

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

Klinische und methodische Aspekte der Quantifizierung der PCNA-
Immunhistochemie am Mammakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von
Anna Elisabeth Grawe
2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Monika Hampl

Meiner Mutter gewidmet

Zusammenfassung

Der Nachweis von Prognosefaktoren im Tumorgewebe ist bei Mammakarzinomen für die Planung adjuvanter Therapieansätze von großer Bedeutung. Ziel dabei ist es, durch ihre Bestimmung eine verlässliche Aussage über den zu erwartenden Krankheitsverlauf zu erhalten und eine möglichst individuelle Therapieentscheidung zu treffen. Dabei spielen neben Bestimmungen von Rezeptoren auch Proliferationsmarker eine Rolle. In unserer Studie wurden eine quantitative und eine semiquantitative Auswertung der Expression des Proliferationsmarkers PCNA von Mammakarzinomen vorgenommen und mit klinischen bzw. methodischen Aspekten korreliert.

Die Untersuchung wurde an Präparaten von 114 Patientinnen vorgenommen, die an einem primär unilateralen Mammakarzinom erkrankt waren. Alle Patientinnen wurden Leitlinien-gerecht operativ und adjuvant behandelt. Das Follow-Up der Patientinnen umfasste > 10 Jahre; am Ende des Beobachtungszeitraums waren 62 Patientinnen nach 5,2 +/- 5,3 [SD] Jahren verstorben. Die PCNA-Immunhistochemie wurde gemäß einem Standardprotokoll durchgeführt und in zwei unabhängigen Arbeitsgängen quantitativ (Zählung von positiven und negativen Tumorzellen in 20 Gesichtsfeldern von 40x-Objektivvergrößerung, mittlere analysierte Zellzahl: 1657 +/- 508 [SD]) bzw. semiquantitativ (Schätzung einer prozentualen Positivität im Tumorgewebe) ausgewertet. Danach erfolgten eine univariate und eine multivariate Überlebensanalyse sowie methodische Auswertungen.

Stärkste Überlebensprädiktoren waren das Tumorstadium nach TNM ($p < 0,0001$, Wilcoxon-Breslow-Test), der Lymphknotenstatus pN ($p < 0,0001$), das morphologische Grading ($p = 0,0010$), die Mitoserate ($p = 0,0003$) und der Progesteronrezeptorstatus (PR) ($p=0,0142$). Sowohl bei Zählung, als auch bei Schätzung der PCNA-Expression in drei Gruppen ergaben sich jeweils gut voneinander getrennte Überlebenskurven, die für die Schätzung auch statistisch signifikant unterschiedlich waren ($p = 0.0116$). In der multivariaten Analyse (Cox-Modell) ergab sich im Besonderen eine hohe prognostische Signifikanz im Zusammenwirken von pN und PR ($p < 0,0001$); der Einfluss von PCNA erwies sich multivariat als nicht ausreichend relevant. Außerdem wurde untersucht, ob die PCNA-Immunhistochemie zur Stratifizierung von Mammakarzinomen "Luminal A" oder "Luminal B" geeignet sein könnte. Hier zeigte sich im Vergleich zu bereits vorliegenden Daten zum Proliferationsmarker MIB-1 (Ki-67) eine vergleichbare Eignung, bezogen auf das 95%-Konfidenzintervall bei Untersuchung der interspezifischen Reproduzierbarkeit. Entsprechend sind für PCNA ähnliche Probleme in der Zuverlässigkeit der Tumorzuzuordnung zu erwarten wie sie für MIB-1 auch bestehen.

Der Einsatz von Proliferationsmarkern beim Mammakarzinom beschränkt sich weitgehend auf MIB-1 (Ki-67), auch wenn dieser Marker methodisch nicht unumstritten ist. Die hier erprobte alternative Verwendung von PCNA belegte zwar in der univariaten Überlebensanalyse eine gewisse prognostische Relevanz, die aber multivariat nicht bestätigt werden konnte. Soll der Marker eingesetzt werden, so ist die semiquantitative Schätzung des Ergebnisses offenbar ausreichend. Wie die Prognostik an Mammakarzinomen in der Zukunft aussehen wird, ist heute noch offen und hängt insbesondere von Entwicklungen in der Molekularpathologie ab.

Abstract

The clinical evidence of prognostic factor in mamma carcinoma tissue is of prime importance for planning the adjuvant therapy. Its determination shall contribute to a more reliable prognosis of the course of the disease and to make therapy as individual as possible. The focus lies on the determination of hormone receptor expression (Estrogen, Progesterone and HER-2/neu) and proliferation markers. In this study a quantitative and a semi-quantitative determination of the proliferation marker PCNA from mamma carcinoma tissue were analyzed and correlated with methodic aspects.

The research was based on 114 slides from 113 primary, unilateral breast cancers. All patients were treated according to guidelines with surgery or adjuvant therapy.

At the end of the patient follow-up period, which was on average more than 10 years long, 62 patients passed away after 5,2 +/- 5,3 (SD) years. The PCNA immunohistochemistry was done by standard protocol and evaluated in two independent ways: quantitative (by counting positive and negative tumor cells in 20 high-power-fields by 40x lens magnification, average analyzed cell number: 1657 +/- 508 (SD)) and semi-quantitative (by estimating of the percentage positivity in tumor tissue). Afterwards an univariate and a multivariate survival analysis, as well as, a methodical evaluation followed.

The strongest survive predictors were the tumor stage by TNM-Classification ($p < 0,0001$, Wilcoxon-Breslow-Test), the lymph node stage pN ($p < 0,0001$), the morphological grading ($p=0,0010$), the mitosis rate ($p=0,0003$), and the progesterone receptor status (PR) ($p=0,0142$). Both counting and estimating the PCNA expression in three groups, produced well separated survival curves, which statistically, in case of the estimation ($p=0,0116$), were significantly distinct. Particularly the multivariate analysis (Cox-Model) resulted in a high prognostic significance in interaction of pN and PR ($p < 0,0001$), whereas the multivariate of the impact of PCNA proved to be as not relevant enough. It was additionally analyzed, if the PCNA immunohistochemistry is suitable for risk stratification of mamma carcinoma in *luminal A* or *luminal B*. In comparison to the already existing dates of the proliferation marker MIB-1 (KI-67), it showed a comparable suitability, referred to the 95%-confidence interval by examination of the interspecific reproducibility. Therefore, the same problems in reliability can be expected for tumor assignment for PCNA as they already exist for MIB-1.

The use of proliferation markers for mamma carcinoma is mostly limited to MIB-1 (KI-67), although this marker isn't undisputed. Admittedly, the here tested alternative use of PCNA verified a prognostic relevance in the univariate survival analysis but could not be validated in the multivariate analysis. To actually use this marker, a semiquantitative estimation of the result is obviously enough. How the prognostics of mamma carcinoma will develop, is still open today and depends especially on the development in molecular pathology. If the newly tested, expensive multigene tests are really more than only a molecular reproduction of the immunohistochemistry, will become clear in long follow up studies.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
ADH	atypische duktaile 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.	<i>bidestillata</i>
BMDP	Name des verwendeten Statistikprogramms
bp	Basenpaar
BRCA1 / BRCA2	<i>Breast Cancer 1-</i> bzw. <i>-2-Gen</i> , Tumorsuppressorgene
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i> , membrangebundene Glykoproteine
CD44	Oberflächenprotein, Adhäsionsprotein
ced-3, ced-4, ced-9	<i>Caenorhabditis elegans death gene</i> , Zelltod-Gene
Chi ²	Chi-Quadrat[-Test], gängiges statistisches Testverfahren
1D	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
2D	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	duktales Carcinoma in situ
dest.	<i>destillata</i> , destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Deoxyuridin-Triphosphat
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , Enzymgekoppelter Immunchemischer Test
ER	Östrogenrezeptor
Fas	membranständiger Rezeptor
FEA	flache Epithelatybie der Milchgänge
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GATA-3	Transkriptionsfaktor
GnRH-Analoga	Analoga des Neurohormons Gonadotropin-Releasing-Hormon
Gy	Gray
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2/neu	Menschlicher Epidermaler Wachstumsrezeptor Faktor 2
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
IAPs	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i> , Apoptoseproteininhibitor
ICE	<i>interleukin-1-beta converting enzyme</i> , Cysteinprotease
IgM	Immunglobulin M
KP	<i>Kernpleomorphie</i>
L	Bezeichnung für Lymphspalteninvasion in der TNM-Klassifikation
1L	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
2L	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
LIN3	Carcinoma lobulare in situ

M	Mittelwert
MP4/MP5	Multiparameter
4M	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
min.	Minute
MIT	Mitoserate
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomograph
NST	<i>no special type</i>
p53	Tumorsuppressorgen/-protein
p	Wahrscheinlichkeit
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor type 1</i> , Enzym, hemmt die Fibrinolyse
PAS	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i> , Färbetechnik in der Histologie
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i> , 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)
S3	höchstmögliches Qualitätsmerkmal einer Leitlinie der AWMF (Stufen: S1, S2k, S2e, S3)
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
Smac	<i>Second Mitochondria-derivated Activator of caspase</i> , mitochondriales Protein, kann die Apoptose verstärken, indem es an XIAP bindet und dessen Bindung an Caspasen verhindert
sog.	sogenannt
T	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	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> , Zytokin, induziert Apoptose
TRM	Tumorregister München
TUNEL	<i>terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> , Nachweisverfahren apoptotischer Zellen
TV	<i>television</i> , hier: TV-Bildanalyse, d.h. Bildanalyse am von einer Kamera auf einen Monitor übertragenen Bild
UICC	<i>Union of International Cancer Control</i> , eigentlich <i>Union internationale contre le cancer</i>
ÜLW	Überlebenswahrscheinlichkeit
uPA	Plasminogen Aktivator vom Urokinasetyp

V	Bezeichnung der Blutgefäßinvasion in der TNM-Klassifikation
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organisation</i>
x	Bezeichnung der Abszisse im Koordinatensystem
x	-fach; z.B. 40-fache Vergrößerung (40x)
XIAP	<i>x-linked inhibitor of apoptosis</i> , Protein, Apoptoseinhibitor
y	Bezeichnung der Ordinate im Koordinatensystem
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2	Ätiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms	2
1.3	Prognosefaktoren	4
1.3.1	Klassische Prognosefaktoren: Stadium und Gradierung	4
1.3.2	Morphologie-basierte tumorbiologische Faktoren	6
1.3.3	Proliferations-assoziierte Faktoren	7
1.4	PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)	9
2	Ziel der Untersuchung und Ethikvotum	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Material	12
3.2	Methoden	12
3.2.1	TNM-Klassifizierung	12
3.2.2	Malignitätsgradierung	15
3.2.3	Hormonrezeptorstatus	16
3.2.4	Immunhistochemische Bestimmung der PCNA-Expression	17
3.2.4.1	Herstellung der Präparate	17
3.2.4.2	Auswertung der immunhistochemischen PCNA-Expression	18
3.3	Statistik	19
4	Ergebnisse	21
4.1	Allgemeine Daten	21
4.2	Univariate Überlebensanalyse	21

4.2.1	TNM-Klassifikation und ihre Komponenten	21
4.2.2	Gradierung und ihre Komponenten	26
4.2.3	Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus	30
4.2.4	PCNA-basierte Parameter	32
4.3	Multivariate Überlebensanalyse: Cox-Modell	34
4.4	Korrelation PCNA-bezogener Parameter untereinander	36
4.5	Interspezifische Reproduzierbarkeit	38
4.5.1	Interspezifische Reproduzierbarkeit der PCNA-Bestimmung	38
4.5.2	Vergleich der interspezifischen Reproduzierbarkeit der PCNA- und der KI-67-Bestimmung	39
4.5.3	Kursorischer Vergleich der Ergebnisse für PCNA und KI-67	40
5	Diskussion	41
5.1	Prognosefaktoren beim Mammakarzinom	41
5.2	Prognosefaktoren beim Mammakarzinom als prädiktiver Marker	43
5.3	Diskussion eigener Ergebnisse	44
5.4	PCNA-Expression als prognostischer Marker: Literaturüberblick	48
5.5	Proliferationsmarker im Vergleich: Mitoserate, KI-67 und PCNA	52
5.6	Aktuelle Entwicklungen in der Prognostik des Mammakarzinoms	57
6	Literatur	64

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Mit ca. 1,7 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr war das Mammakarzinom, bezogen auf die Zahlen von 2012, die häufigste maligne Krebserkrankung der Frau weltweit (Torre et al. 2017). Gleiches gilt auch für Deutschland, wo 2016 von fast 230.000 Tumorneuerkrankungen bei Frauen etwa 30% auf ein Mammakarzinom entfielen, gefolgt von kolorektalen Karzinomen (11,8%) und Lungenkarzinomen (8,2%) (RKI 2019). Diese Zahlen entsprechen in etwa auch bei uns der für Mitteleuropa angegebenen Inzidenz von 96,0 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen und Jahr (Torre et al. 2017).

Während bezogen auf die ganze Welt im Jahr 2012 520.000 Todesfälle pro Jahr geschätzt werden (Torre et al. 2017), was einer Quote von gut 30% entspricht, sterben in Deutschland etwas weniger Patientinnen an ihrem Tumorleiden, nämlich gut 27%: Auf 68.950 Neuerkrankungen kamen 2016 18.570 Todesfälle, womit das Mammakarzinom mit zu den häufigsten Todesursachen bei Frauen gehört und in der aktuellen Krebstodesstatistik der Frauen mit einem Anteil von 17,6% noch vor dem Lungenkarzinom (15,6%) auf Platz 1 steht (RKI 2019).

Die Altersverteilung der Mammakarzinome ist breit gefächert. Schon junge Frauen zwischen 20 und 30 Jahren können betroffen sein, obwohl die relativen Erkrankungszahlen mit steigendem Alter zunehmen. 45% der Neuerkrankungen treten in der Altersgruppe von 40 bis 69 Jahren auf, für die inzwischen in Form des Mammographie-Screenings eine Krebsvorsorgeoption besteht. Nach der Einführung der Möglichkeit in dieser Altersgruppe, alle zwei Jahre zur Mammographie zu gehen, ist die Zahl der diagnostizierten Mammakarzinome zunächst deutlich gestiegen und ging danach wieder etwas zurück. Dabei wurden auch eine vergleichsweise höhere Zahl von frühen Fällen gefunden; außerdem wurde im Laufe der Jahre gerade in der Zielgruppe des Mammographie-Screenings die Zahl fortgeschrittener Tumoren niedriger (Simbrich et al. 2016).

1.2. Ätiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Die formale Ätiologie des Mammakarzinoms ist immer noch Bestandteil aktueller Forschungen und gilt als noch weitgehend ungeklärt. Die verschiedenen Theorien der Tumorphathogenese (zusammengefasst bei Sun et al. 2017) ergeben offenbar noch keine klare Konstellation, die sich auf alle Fälle von Mammakarzinomen beziehen ließe.

Es gibt allerdings recht gut definierte Risikofaktoren, die sich häufig bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom finden und somit möglicherweise das Entstehen des Tumors begünstigen oder auch bedingen. Inwieweit ihr Vorliegen kausal ist oder nur ein Epiphänomen repräsentiert, ist dabei nicht immer klar herauszuarbeiten.

Genetische Disposition

Bei 25% - 30% der Patientinnen mit einem Mammakarzinom geht man von einer familiären Belastung aus. Gibt es einen positiven Fall von Mammakarzinom, Zervixkarzinom oder Ovarialkarzinom in der Familie bei Verwandten ersten Grades, so ist das Erkrankungsrisiko um das ca. 1,75-fache erhöht, bei zwei oder mehr positiven Fällen oder wenn die Verwandte mit < 45 Jahren Alter erkrankte, um das ca. 2,5-fache, bezogen auf die britische *Generations Study*, eine prospektive Kohortenstudie, in die fast 104.000 Frauen einbezogen waren und in der 1.733 Fälle von Mammakarzinomen aufgetreten waren (Brewer et al. 2017).

Mammakarzinom-Patientinnen mit positiver Familienanamnese wird heute eine genetische Untersuchung nach den Kriterien des "Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs" empfohlen. Dafür sind acht Konstellationen von in der Familienanamnese eruierbaren Mamma- und / oder Ovarialkarzinomen herausgearbeitet worden, die in der S3-Leitlinie des Mammakarzinoms in der Empfehlung 3.30 wiedergegeben sind (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). In ca. einem Viertel dieser Fälle wiederum finden sich in der Keimbahn Veränderungen im BRCA-1- bzw. im BRCA-2-Gen, die somit die wichtigsten Mutationen in der Gruppe der hereditären Mammakarzinome repräsentieren. Bei einer Mutation des BRCA-1- oder des BRCA2-Gens steigt ab dem 40. Lebensjahr die Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken, jedes Jahr prozentual an. Das lebenslange Risiko, an einem Mammakarzinom zu

erkranken, liegt bei diesen Frauen bei 60-70% (Ditsch et al. 2017). Auch andere Gene mit erhöhtem Brustkrebsrisiko sind inzwischen identifiziert, so dass vermutlich die Zahl genetisch aufgeklärter Fälle von Mammakarzinomen bei positiver Familienanamnese in Zukunft noch steigen wird (Ditsch et al. 2017).

Hormonelle Faktoren

Dass hormonelle Faktoren beim Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, eine Rolle spielen, ist schon lange bekannt (zur historischen Perspektive siehe Horn und Vatten 2017). Insbesondere frühe Menarche (< 12 Jahre), höheres Alter bei der Geburt des ersten Kindes oder Kinderlosigkeit, sowie eine späte Menopause (> 54 Jahre) zählen zu den anerkannten Risikofaktoren für Brustkrebs (Dumitrescu und Cotarla 2009).

Genauere Zahlen hierzu wurden insbesondere durch eine Meta-Analyse, die Daten zu mehr als 118.000 Patientinnen mit Mammakarzinom einschloss, erhoben (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2012): Jedes Jahr, das die Menarche früher einsetzt, erhöht demnach das Lebensrisiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, um 2,9%, jedes Jahr, das die Menopause später eintritt, um 5%. Eine große norwegische Kohortenstudie an gut 58.000 Patientinnen ermittelte im Vergleich zur Geburt des ersten Kindes vor dem 20. Lebensjahr zu nach dem 35. Lebensjahr ein erhöhtes relatives Risiko von 1,54, das bis ins hohe Alter erhöht blieb (Horn et al. 2013).

Auch die perimenopausale Hormonersatztherapie ist heutzutage umstritten, weil sie zu einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos führt, und erfolgt unter strengerer Risiko-Nutzen-Abschätzung als früher. Frauen ab 60 Jahren sollen nur unter strengen Indikationen mit der Hormonersatztherapie behandelt werden. Das Risiko der Frauen, bei denen eine Hormonersatztherapie Anwendung fand, ist im Vergleich zu den Frauen, die nie eine solche Therapie bekommen haben, um den Faktor 1,66 erhöht, wobei sich zwei Jahre nach Absetzung der Therapie das Risiko wieder relativiert (Sui et al. 2017). Mit einem restriktiveren Umgang mit der Hormonersatztherapie wurde ein Rückgang der Inzidenz von Mammakarzinomen in den USA im Jahr 2003 um 7% retrospektiv begründet (Ravdin et al. 2007), wobei die Studie aber kontrovers diskutiert wurde.

Lebensstil

Im Laufe der Zeit ist der Lebensstil zu einem immer wichtigeren Faktor in der Krebsentstehung geworden, der auch bei Mammakarzinomen eine Rolle spielt und auf den auch schon in den vergangenen Jahrzehnten fundierte Erkenntnisse vorlagen (Gerber 2001). Nach wie vor gelten Übergewicht mit einhergehender ungesunder Ernährung, mangelnder Bewegung und regelmäßigem Alkoholkonsum sowie Nikotinabusus als mit einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos verbunden; eine gesunde Lebensweise („low-fat diet“, Nahrungsfettreduktion, regelmäßiger Sport) hingegen kann das Risiko senken; zur detaillierteren aktuellen Darstellung sei auf Maurer et al. (2017) verwiesen.

1.3. Prognosefaktoren

Mammakarzinome zeigen insgesamt einen sehr heterogenen Verlauf. Zum einen kommen nicht wenige Fälle vor, in denen Patientinnen nach dem Abschluss der Primärtherapie nie wieder von ihrem Tumorleiden behelligt werden, also aus der Retrospektive vieler postoperativer Jahre als geheilt gelten können. Zum anderen aber gibt es Patientinnen, die im Laufe der Zeit ossäre und / oder viszerale Metastasen (insbesondere in Leber, Lunge oder Gehirn) entwickeln und dann Folgetherapien benötigen, trotz derer viele von ihnen nach unterschiedlich langem Verlauf an der Tumorerkrankung sterben. Schließlich gibt es Verläufe, in denen sich das Tumorgewebe über eine disseminierte Lymphangiome in die Umgebung ausbreitet und dann zu einem *Cancer en cuirasse* führt.

Bei diesen sehr unterschiedlichen Chancen und Risiken sind Prognosefaktoren von großer Bedeutung, auf deren Basis man versuchen möchte, den klinischen Verlauf prospektiv zu schätzen und adjuvante Therapieansätze und auch die soziopsychologische Führung der individuellen Patientin gut begründet durchzuführen.

1.3.1 Klassische Prognosefaktoren: Stadium und Gradierung

Die drei wichtigsten Prognosefaktoren sind beim Mammakarzinom nach wie die Tumorgöße, der Lymphknotenstatus, und das Vorliegen von Metastasen, also die drei Faktoren, die in der TNM-Klassifikation zusammengefasst werden. Sie haben nach

Empfehlungen der *Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ) den höchsten Evidenzgrad und gelten somit als zuverlässige Parameter für den Krankheitsverlauf. Die Erhebung dieser Größen ist obligat, wobei dabei bildgebende Daten (insbesondere Mammographie und Schnittbild-basierte Metastasensuche) und morphologische Untersuchungsergebnisse der Histologie zusammengeführt werden.

Die Größe des Mammakarzinoms korreliert signifikant mit dem Lymphknotenstatus. So ist ein axillärer Lymphknotenbefall wahrscheinlicher, je größer der Tumor ist. Ebenfalls ist die Prognose schlechter, je größer der Tumor ist. Selbst nach 20 Jahren spielt die Größe des Tumors in Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit noch eine Rolle: Patientinnen, deren axillären Lymphknoten befallen sind, verfügen eine vier- bis achtmal höhere Mortalität als die mit einem negativen Nodalstatus (Soerjomataram et al. 2008).

Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist die Tumorgradierung. Sie wird nach wie vor basierend auf dem Gradierungssystem von Bloom und Richardson (1957) vorgenommen, das allerdings 1991 durch Modifikationen und Präzisierungen der Auswertung der einzelnen Parameter besser standardisiert wurde (Elston und Ellis 1991) und von der WHO auch in der aktuellen Zusammenstellung zu Mammatumoren explizit zur Anwendung empfohlen wird (Rakha et al. 2019). Beurteilt werden dabei in einem Punkte-Score, der in Material und Methoden wiedergegeben ist, die Fähigkeit des Tumorgewebes zur Bildung von Tubuli (histologisches Kriterium), ferner werden die Kernpleomorphie (zytologisches Kriterium) und die Zahl der Mitosen (proliferationskinetisches Kriterium) herangezogen.

Die prognostische Validität des Gradings wird in der S3-Leitlinie den Empfehlungen der AGO vorausgesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie 2020, AGO 2020). Allerdings erfordert die Verwendbarkeit im klinischen Alltag auch eine gute interspezifische Reproduzierbarkeit zwischen zwei oder mehr Untersuchern. Die interspezifische Reproduzierbarkeit lag beim klassischen Grading nach Bloom und Richardson an größeren Studien mit bis zu 496 Fällen bei ca. 70% (Champion und Wallace 1971, Theissig et al. 1990). In einer frühen Studie nach der Modifikation aus dem Jahr 1995, an der Elston und Ellis beteiligt waren, ergab sich eine Steigerung der interspezifischen Reproduzierbarkeit auf 82% (Kappa = 0.72) (Robbins et al. 1995). Andererseits bilden andere Arbeiten auch starke Schwankungen der Gradierungen ab; beispielsweise erreichten vier Pathologen im Vergleich zu einem Referenzstandard an 100 Fällen

deutliche unterschiedliche Übereinstimmungen von 54% bis 81% (Zhang et al. 2010). In einer weiteren Arbeit ergaben sich Übereinstimmungen zwischen fünf bis sieben Pathologen an insgesamt 72 Fällen, die in verschiedenen Phasen eines Projektes vergleichend gradiert worden waren, von 67% bis 74% (Meyer et al. 2005). Die Erwartungen, die in Bezug auf eine höhere Reproduzierbarkeit an die Modifikation des alten Gradings geknüpft wurden, haben sich somit insgesamt nicht recht erfüllt.

1.3.2 Morphologie-basierte tumorbiologische Faktoren

Als Ergänzung zu diesen klassischen Größen des Stagings und des Gradings werden Prognosefaktoren hinzugezogen, von denen man sich Aussagen zur Tumorbiologie verspricht. Hierzu gehören insbesondere der Hormonrezeptorstatus für Östrogen (ER) und Progesteron (PR) und die HER2/neu-Expression, die heute im Tumorgewebe überwiegend immunhistochemisch bestimmt werden. Die Ergebnisse ihrer Bestimmungen lassen nicht nur Rückschlüsse auf die Prognose der Patientin zu, sondern eröffnen auch therapeutische Abzweige in der Entscheidung über adjuvante Therapieverfahren.

Im Jahr 2000 wurden in einem Nature-Artikel aus molekularpathologischen Ergebnissen morphologische Subtypen entwickelt (Perou et al. 2000), die die gängigen Profile der Markerexpressionen abbilden:

- Luminal-A-Karzinome: ER positiv und / oder PR positiv, niedrige Proliferationsrate
- Luminal-B-Karzinome: ER positiv und / oder PR positiv, erhöhte Proliferationsrate
- basal-like Karzinome: ER negativ, PR negativ, HER2/neu negativ (auch als "triple negativ" bezeichnet)
- HER2 positive Karzinome

Die Klassifizierung in diese Subtypen wird von vielen Pathologien und Kliniken angewandt, hat sich aber nicht flächendeckend durchgesetzt. Konsens ist allerdings, dass die Expressionsprofile der Marker, die in die Klassifikation eingehen, Konsequenzen für die Wahl der adjuvanten Therapien haben. In der aktuellen WHO-

Klassifikation der Mammakarzinome von 2019 werden allerdings abweichend die vier möglichen Expressionsmuster unterschieden, die sich aus den Expressionsmöglichkeiten für den Östrogenrezeptor bzw. für HER2/neu ergeben (Rakha et al. 2019). Auf den Progesteronrezeptor oder die Proliferationsrate wird dort in diesem Zusammenhang nicht eingegangen.

Die gängigen Vorgaben zur adjuvanten Therapie sind aktuell in der S3-Leitlinie für Mammakarzinome (Leitlinienprogramm 2020) und in den "Guidelines Breast" der AGO dargestellt (AGO 2020) und wurden kürzlich in einem Übersichtsartikel von Schmidt, der sich aber auch mit experimentellen oder noch rein Studien-basierten Ansätzen befasst, übersichtlich zusammengestellt (Schmidt 2020): Hauptstandbeine bleiben weiterhin die endokrine Antihormon-Therapie bei Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen bzw. chemotherapeutische Ansätze, insbesondere bei Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinomen, sowie der Einsatz von Antikörpern wie Trastuzumab und Pertuzumab bei HER2/neu-Positivität. Auf neuere, teilweise noch experimentelle Ansätze soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Klar ist aber, dass die onkologische Medizin nicht stehenbleibt, sondern sich insbesondere auf der Basis molekularbiologische Erkenntnisse dynamisch weiterentwickelt, so dass experimentelle Ansätze von heute durchaus zu etablierten Therapieschemata in der Zukunft gehören könnten.

Zusammenfassend kann man bezogen auf die oben dargestellten tumorbiologischen Faktoren sagen, dass Patientinnen mit Tumor der Kategorie Luminal A eine nur wenig bessere Langzeitprognose als mit einem Tumor Luminal B haben; Patientinnen mit Triple-negativen Tumoren schneiden deutlich schlechter ab, Patientinnen mit Hormonrezeptor-negativen und HER-2/neu-positiven Tumoren am schlechtesten (siehe Carey et al. 2006, Yang und Polley 2019).

1.3.3 Proliferations-assoziierte Faktoren

Marker zur Abschätzung der Zellteilungsaktivität werden bereits seit längerem zur Abschätzung der Prognose von Krankheitsverlauf und Überlebenswahrscheinlichkeit

herangezogen und spielen auch bei der Unterscheidung zwischen Luminal A und Luminal B eine Rolle.

Klassischerweise sind Aussagen über die Proliferation von Geweben bereits über die Bestimmung der Mitoserate am HE-Schnitt möglich. Hierfür gibt es heute gerade auch für Mammakarzinome standardisierte Vorgaben, mit denen methodische Probleme in der Bestimmung der Mitoserate behoben werden sollten. Dabei geht es insbesondere um die Definition von Mitosen in Abgrenzung gegenüber Apoptosen und um die Festlegung, dass Mitosen in Hotspots und üblicherweise an der Wachstumsfront der Tumoren gezählt werden sollen (Baak et al. 1985). Außerdem ist das Bewusstsein dafür geschärft worden, dass die Gesichtsfeldgröße bei der Mitosequantifizierung angegeben werden muss bzw. gewonnene Werte auf eine Standardgröße hin adjustiert werden müssen (Ellis und Whitehead 1981, Biesterfeld 1997, Tan und Ellis 2019).

Zum Stand des Jahres 2004 wurden die Ergebnisse von fast 40 Studien, in denen sich ganz überwiegend eine klare prognostische Relevanz der Bestimmung der Mitoserate zeigte, übersichtlich zusammengefasst (van Diest et al. 2004); seitdem hinzu gekommene Publikationen haben diese generelle Aussage bestätigt.

Als zweite Methode ist die immunhistochemische Bestimmung der Proliferationsfraktion im Einsatz, bei der in einer Antigen-Antikörper-Reaktion, deren Reaktionsprodukt später in einen Farbstoff umgesetzt wird, die Antigen-tragenden Zellkerne markiert werden. Dabei wird üblicherweise ein an Paraffinschnitten verwendbarer Antikörper gegen das Antigen Ki-67 angewandt. Das Ergebnis der Immunreaktion wird in 5%- oder 10%-Schritten semiquantitativ geschätzt und als Prozentwert angegeben. Daneben gibt es auch quantitative Ansätze durch Zählung oder Bildanalyse, die sich bisher aber nicht durchgesetzt haben.

Bis vor kurzem war die Bestimmung der Ki-67-Proliferationsrate als lediglich fakultativ angesehen worden und galt nicht als obligat, da methodische Einschränkungen stärker berücksichtigt wurden. Sie betrafen die fehlende Vergleichbarkeit der Werte zwischen verschiedenen Laboren, die unterschiedlichen Cut-Off-Levels für die Gruppierung der Patientinnen und begründete Zweifel an der Reproduzierbarkeit der Untersuchung. Erst in der letzten Modifikation der S3-Leitlinie für das Mammakarzinom, also nach Konzeption unserer Studie, wurde die Bestimmung der Proliferationsrate wirklich

empfohlen, bezogen auf eine semiquantitative Schätzung von < 10%, 10%-25% und > 25% (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Andererseits war die prognostische Validität in der Mehrzahl der Studien gegeben, wie eine Meta-Analyse über 41 Arbeiten aus dem Jahr 2015, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird, darlegte (Petrelli et al. 2015).

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde die PCNA-Expression als Variable für die Bestimmung der Proliferationsfraktion angewandt. Im Gesamtzusammenhang der verschiedenen Markerapplikationen an unserem Patientengut sollte die PCNA-Expression im Kontext der Ki-67-Expression und der Quantifizierung der Mitosezahl interpretiert werden. Da es sich bei letzteren Anwendungen um eigene Teilstudien handelt, ist dieses im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich. Im Folgenden sollen wesentlichen Aspekte zu PCNA vorgestellt werden.

1.4. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

Das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) ist ein Protein, das in der Zelle an einer Vielzahl von Aufgaben beteiligt ist. Es ist aus 261 Aminosäuren zusammengesetzt, das Molekulargewicht beträgt etwa 28,7 kDa. In seiner Struktur ist PCNA aus drei identischen Untereinheiten, sogenannten Homotrimeren, gebildet, die zu einem Ring zusammengesetzt sind und über 12 α -Helices von symmetrischem Aufbau verfügen, welche an DNA binden können.

Entdeckt wurde PCNA in den späten 70er Jahren von Miyachi et al., die aus Seren von mit Lupus erythematodes erkrankten Patienten einen Antikörper isolierten, der mit nukleären Antigenen proliferierender Zellen reagierte (Miyachi et al. 1978). Bravo und Celis beschrieben unabhängig davon 1980 ebenfalls ein Protein, das sich vor allem in der S-Phase des Zellzyklus verstärkt mittels Gelelektrophorese nachweisen ließ und das sie zunächst Cyclin nannten, bezugnehmend auf die ringförmige Struktur (Bravo und Celis 1980). Später konnte gezeigt werden, dass Cyclin mit PCNA identisch ist (Mathews et al. 1984), woraufhin sich die Bezeichnung PCNA allgemein durchsetzte.

PCNA spielt eine wichtige Rolle bei der Replikation der eukaryotischen DNA. Während der Replikation umgibt das PCNA die DNA ringförmig und ist für die Verlängerungsphase der DNA von Notwendigkeit. Es dient dabei der DNA-Polymerase δ als Hilfs-

protein, indem es durch seine Ringklemmenstruktur ihre Dissoziation von der DNA unterbindet, und gilt daher als entscheidender Faktor dafür, dass während der S-Phase des Zellzyklus eine schnelle und ungestörte Replikation der DNA möglich ist.

Inzwischen ist geklärt, dass PCNA nicht nur als Prozessivitätsfaktor für DNA-Polymerasen fungiert, sondern auch in viele weitere Prozessen im Zellstoffwechsel eingebunden ist, zum Beispiel in den Erhalt der Integrität des Genoms, indem es an Reparaturprozessen bei DNA-Schäden beteiligt ist. Als mit von PCNA vermittelte Mechanismen gelten dabei Fehlpaarungsreparatur, Strangbruch-induzierte Replikationen, Basen-Exzisionsreparatur, Nukleotid-Exzisionsreparatur und Transläsions-synthese. Ferner wird offenbar die Regulation von metabolischen DNA-Prozessen durch posttranslationale Modifikation des PCNA-Proteins mit bewirkt. Eine detaillierte Darstellung dieser Aufgaben würde allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen; hierzu sei auf einen neueren Review (Boehm et al. 2016) bzw. auf das aktuelle Datenblatt des *National Center of Biotechnology Information* in Bethesda (NCBI 2021) verwiesen.

Da die Aufgaben von PCNA mit der Proteinbiosynthese zusammenhängen, überrascht nicht, dass das Auftreten von PCNA im Zellkern stark davon abhängt, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet (Kurki et al. 1986): So steigt die Expression von PCNA in der G₁-Phase langsam an und hat in der Synthesephase (S-Phase) ihr Maximum, so dass man die PCNA auch als Marker für diese Phase im Allgemeinen bezeichnen kann. In der G₂/M-Phase sinkt der PCNA-Gehalt wieder. Insofern ist verständlich, dass man versucht hat, die Expression von PCNA als Maß für Proliferation zu nutzen. Hierzu wurden gewerbliche Antikörper, insbesondere der Antikörper PC10, entwickelt, mit denen sich mit immunhistochemischen Verfahren eine PCNA-Positivität von Zellen durch ein kernbindendes Farbsignal dokumentieren lässt. Dieses Verfahren ist auch in der hier vorliegenden Studie angewandt worden (zur Methodik siehe Kapitel 3).

Die komplexe Stellung von PCNA in verschiedenen wesentlichen Prozessen in der Zelle lässt auch daran denken, das PCNA-Protein in Zukunft möglicherweise auch als Target für individualisierte Tumortheraeutika zu nutzen. Diese Überlegung ist derzeit Gegenstand von Untersuchungen an Zelllinien und in Tierexperimenten; der Stand der Forschung hierzu wurde 2020 aktuell zusammengefasst (Cardano et al. 2020).

2. Ziel der Untersuchung und Ethikvotum

Der Nachweis von Prognosefaktoren im Tumorgewebe ist nach wie vor zur Therapieplanung, zum Therapiemonitoring und zur Prognosestellung von großer Bedeutung. Durch ihre Bestimmung soll eine möglichst genaue Aussage über die Prognose und den Krankheitsverlauf getroffen werden und, soweit möglich, letztendlich eine individuelle Therapieentscheidung gefunden werden.

Am eigenen Patientengut wurde eine Studie von konsekutiven Fällen von Mamma-karzinomen aufgelegt, die zum Ziel hat, diverse morphologisch detektierbare Variable auf ihre prognostische Relevanz allein oder in gemeinsamer Anwendung zu testen. Dabei wurden die verschiedenen Anwendungen einzeln in wissenschaftlichen Studien vorgenommen.

Eine dieser Studien, die hier vorgestellt wird, ist, den prognostischen Einfluss vom Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) im Hinblick auf das Gesamtüberleben univariat und multivariat zu testen. Dabei soll insbesondere geklärt werden, ob PCNA als ein unabhängiger prognostischer und prädiktiver Faktor zur Prognosestellung und Therapieentscheidung hinzugezogen werden kann, wenn man die Expression dieses Markers genauer schätzt als üblich bzw. wenn man die Expression durch Auszählen positiver und negativer Zellen quantifiziert. Außerhalb der als Doktorarbeit angelegten Studie sollten die Ergebnisse mit denen ähnlicher Ansätze zu Ki-67 und zur Mitoserate zusammengeführt werden. Ein Vergleich mit den Ergebnissen eines zweiten Untersuchers an einer repräsentativen Stichprobe soll Aussagen über die Reproduzierbarkeit und damit über die Zuverlässigkeit (Reliabilität) der Ergebnisse liefern.

Arbeitshypothese ist, dass die Schätzung und die quantitative Bestimmung der Proliferationsrate zu ähnlichen, aber nicht deckungsgleichen Ergebnissen bzgl. Validität und Reliabilität der Bestimmung der PCNA-Expression führen. Ziel unter diesem Aspekt ist, zu einer Wichtung der Ergebnisse zu gelangen und eine Handlungsanweisung für Anwendungen in der Krankenversorgung geben zu können.

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

3. Material und Methoden

3.1. Material

Das Patientenkollektiv umfasste 114 aufeinander folgend gesammelte Fälle von Mammakarzinomen von Frauen und umschloss einen Beobachtungszeitraum von mehr als 10 Jahren und teilweise bis zu 12 Jahren. Bei allen Patientinnen lag erstmalig ein primäres, unilaterales, invasiv-duktales (heute: NOS-Typ) oder invasiv-lobuläres Karzinom vor; frühere maligne Erkrankungen bestanden nicht. Alle Patientinnen wurden gemäß den zur Zeit der Fallakquise aktuellen stadienorientierten operativen und adjuvanten Konzepten therapiert. In den meisten Fällen wurde brusterhaltend operiert; einige fortgeschrittenere Tumoren mussten per Mastektomie operativ angegangen werden. Eine seinerzeit übliche Axilladisektion des Level I wurde standardmäßig mit durchgeführt. Abhängig vom Stadium und der Ausprägung der Hormonrezeptoren wurden eine adjuvante Chemotherapie, eine Strahlentherapie bzw. eine Antihormontherapie bzw. Kombinationen mehrerer Ansätze adjuvant appliziert.

Die Fälle stammten aus dem Institut für Pathologie der RWTH Aachen. Routinemäßig wurden das Tumorstadium gemäß der TNM-Klassifikation, das Tumorgrading nach der Modifikation von Elston und Ellis (1991) sowie der Hormonrezeptorstatus ermittelt, letzterer sowohl biochemisch, als auch immunhistochemisch. Die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse werden hier nicht behandelt, da sie Teil eines eigenen auswärtigen Promotionsprojektes sind.

3.2. Methoden

3.2.1. TNM-Klassifikation

Diese Arbeit verwendet die Stadieneinteilung nach den Vorgaben der 5. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) (UICC 1987). Klassifiziert werden die postoperative Größe des Primärtumors (T bzw. pT), der

postoperative Lymphknotenstatus (N bzw. pN) und klinisch-bildgebende Ergebnisse bzgl. Fernmetastasen (M).

Da manche Gruppen in der TNM-Klassifikation nicht oder nur sehr schwach besetzt waren, wurde zur Auswertung unserer Studie die TNM-Klassifikation vereinfacht, was in den folgenden Tabellen 3.2.1.1 - 3.2.1.4 in der Spalte "Kategorie in der Studie" dargestellt ist. Die Tabellen gehen dabei zum Teil hier modifiziert, auf die Arbeit von Achterfeld (2019) zurück, die am gleichen Kollektiv erfolgte.

Tabelle 3.2.1.1: Klassifikation der Tumorgröße pT in der TNM-Klassifikation von Mamma-karzinomen (modifiziert nach Achterfeld 2019)

pT nach TNM	Definition	Kategorie in der Studie
pT0	kein Tumor nachweisbar	---
pTis	Carcinoma in situ, kein invasiver Tumor	---
pT1	Tumorgröße ≤ 2 cm	pT1
pT1mi	Mikroinvasion bis 0,1 cm 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	Tumorgröße > 5 cm	pT3
pT4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut	pT4
pT4a	Ausdehnung auf die Brustwand	---
pT4b	Ödem oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust	pT4
pT4c	Kriterien von pT4a und pT4b zusammen	pT4
pT4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom	pT4

Tabelle 3.2.1.2: Klassifikation des Lymphknotenstatus pN in der TNM-Klassifikation von Mammakarzinomen (modifiziert nach Achterfeld 2019)

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

Tabelle 3.2.1.3: Klassifikation des Fernmetastasenstatus M in der TNM-Klassifikation von Mammakarzinomen (nach Achterfeld 2019)

M nach TNM	Definition	Kategorie in der Studie
M0	keine Fernmetastasen nachgewiesen	M0
M1	Fernmetastasen nachgewiesen	M1

Das aus den drei Einzelkategorien pT, pN und M resultierende Gesamtstadium der TNM-Klassifikation ist wie folgt definiert bzw. für die Studie wie folgt vereinfacht:

Tabelle 3.2.1.4: UICC-Gesamtstadium der TNM-Klassifikation von Mammakarzinomen (nach Achterfeld 2019)

Stadium nach UICC	TNM-Konstellationen	Kategorie in der Studie
0	pT0, pN0, M0 und pTis, pN0, M0	---
I	pT1, pN0, M0	I
IIa	pT1, pN1, M0 und pT2, pN0, M0	II
IIb	pT2, pN1, M0 und pT3, pN0, M0	II

Tabelle 3.2.1.4 (Fortsetzung): UICC-Gesamtstadium der TNM-Klassifikation von Mammakarzinomen (nach Achterfeld 2019)

Stadium nach UICC	TNM-Konstellationen	Kategorie in der Studie
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

3.2.2 Malignitätsgradierung

Das histomorphologische Grading umfasst die Kriterien der Tubulusbildung, der Kernpleomorphie und der Mitoserate, zunächst entwickelt von Bloom und Richardson (1957) und inzwischen international anerkannt modifiziert nach Elston und Ellis (1991). Alle drei Variablen werden semiquantitativ in ihrer Ausprägung geschätzt und mit einem Score-Wert von 1, 2 oder 3 bewertet (zu Details der Kriterien und der Auswertung siehe Tabelle 3.2.2.1). Aus der Addition der drei Einzelscores ergibt sich dann ein Punktwert zwischen 3 und 9, der in das Grading als G1 (3-5 Punkte), G2 (6-7 Punkte) und G3 (8-9 Punkte) umgesetzt wird (Tabelle 3.2.2.2).

Tabelle 3.2.2.1: Komponenten des WHO-anerkannten modifizierten Gradings von Mammakarzinomen nach Elston und Ellis (1991). Die Kategorisierung der Mitoserate nach Tan und Ellis (2019) bezieht sich auf 10 Gesichtsfelder mit 400x-facher Endvergrößerung bei einem Gesichtsfeld-durchmesser von 0,45 mm (Sehfeldzahl 18), entsprechend einer Gesamtfläche von 1,59 mm².

Score-Wert	Tubulusbildung	Kernpolymorphie	Mitoserate
1	> 75%	gering	0-5
2	10% - 75%	mäßig	6-11
3	< 10%	stark	ab 12

Tabelle 3.2.2.2: WHO-anerkanntes modifiziertes Grading für Mammakarzinome nach Elston und Ellis (1991).

Grading	Summe der Score-Werte der Grading-Komponenten	Interpretation
G1	3, 4 und 5	gut differenziert
G2	6 und 7	mäßig differenziert
G3	8 und 9	gering differenziert

Das Grading wird heute nicht nur bei invasiv-duktalem Mammakarzinomen angewandt (NOS-Typ), sondern auch bei invasiv-lobulären Karzinomen, für die es primär eigentlich nicht gedacht war.

3.2.3 Hormonrezeptorstatus

Biochemische Analyse

Die biochemische Analyse wurde als Teil der primären Krankenversorgung in einem spezialisierten Labor der Frauenklinik der RWTH Aachen an einem im Institut für Pathologie identifizierten Tumoranteil vorgenommen, der unfixiert und unter Einhaltung einer Kühlkette eingesandt worden war. Zur Anwendung gelangte dann ein Ligandenbindungs-Assay (*Dextran-Coated Charcoal Assay*, DCC). Im Detail wurde im homogenisierten Zytosol die Konzentration freier Rezeptoren für ³H-markiertes 17 β -Östradiol für den Östrogenrezeptor bzw. für ³H-markiertes R5020 für den Progesteronrezeptor untersucht. Positivität wurde für eine Konzentration von ≥ 10 fmol / mg Protein für den Östrogenrezeptor bzw. ≥ 20 fmol / mg Protein für den Progesteronrezeptor angenommen.

Immunhistochemische Analysen

Die immunhistochemische Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors nach einem Standardprotokoll und die Auswertung nach dem in Deutschland üblichen Remmele-Score ist Teil eines eigenen Promotionsprojektes und kann daher im Rahmen der hier vorgelegten Studie nicht berücksichtigt werden.

3.2.4 Immunhistochemische Bestimmung der PCNA-Expression

3.2.4.1 Herstellung der Präparate

Pro Fall wurde ein Paraffinblock mit repräsentativem Tumoranteil ausgewählt. Von jedem der Blöcke wurden mehrere dünne Schnitte (4 µm) mit einem Schlittenmikrotom angefertigt und auf zur besseren Haftung silanisierte und mit Poly-L-Lysin behandelte Objektträger aufgezogen. Dann wurden die Schnitte über 24 Stunden bei 37°C getrocknet. Vor dem eigentlichen Färben wurden sie nochmals für 30 Minuten in einem 60°C warmen Brutschrank gestellt.

Da die anzufärbenden Schnitte noch paraffiniert waren, mussten sie für den folgenden Färbevorgang erst entparaffiniert werden. Für diesen Schritt wurden sie dreimal für jeweils 5 Minuten in Xylol inkubiert. Hieran schloss sich die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten Inkubation in 70%, 96% und zweimal 100% Äthanol) an. Danach wurden die Präparate für jeweils dreimal 5 Minuten in PBS-Lösung gestellt, eine Pufferlösung, die sich gegenüber einer reinen Spülung in destilliertem Wasser als überlegen erwiesen hat. Sie besteht auf 8.00 g NaCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0,20 g KH₂PO₄ und 0.20 g KCl auf 1000 ml Aqua dest., titriert auf einen pH-Wert von 7.6.

Als nächster Schritt folgte die Hemmung der endogenen Peroxidase. Die Schnitte wurden dafür 30 Minuten in ein 1%-iges Gemisch aus 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und reinem Methanol gestellt und danach für je 3 Minuten mit PBS-Pufferlösung gespült.

Anschließend wurde der Primärantikörper, der monoklonale Maus-Antikörper gegen PCNA (DAKO M 879) aufgetragen. Der Primärantikörper wurde mit einer BSA-PBS-Lösung 1:50 verdünnt. Für jeden Schnitt wurde ca. 200 µl des Antikörper-Gemisches benötigt. Die Schnitte wurden dann eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert, so dass die Antikörper sich an die im Zellkern lokalisierten Antigene binden konnten. Danach folgt das dreimalige Abspülen mit PBS-Pufferlösung für jeweils fünf Minuten.

Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Antikörper (goat-anti-mouse Immunotech 0817), mit BSA-PBS-Lösung verdünnt zu 1:400, auf die Schnitte

aufgetragen (pro Schnitt 200 µl) und 45 Minuten in der feuchten Kammer belassen. Anschließend folgte wieder das dreimalige Abspülen mit PBS-Pufferlösung für jeweils fünf Minuten.

Um den Antikörperkomplex sichtbar zu machen, wurden pro Küvette 0,02 g Diaminobenzidin mit 50ml DAB-Gebrauchslösung für mindestens zehn Minuten verrührt. Anschließend wurden 15ml einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugefügt. Die Schnitte wurden für fünf Minuten in dieser Lösung belassen, um eine Braunfärbung zu erreichen.

Nach einer zehnminütigen Wässerung wurden die Schnitte 15 Minuten mit Methylgrün gegengefärbt, zweimal je fünf Minuten in Butanol gespült, für eine Minute in Xylol eingestellt und abschließend mit Kanadabalsam eingedeckt.

3.2.4.2 Auswertung der immunhistochemischen PCNA-Expression

Die Auswertung der Schnitte wurde mit einem Leitz Orthoplan-Mikroskop (Leica, Wetzlar) durchgeführt. Bei der Zählung (= quantitative Auswertung) kam ein 63x-Öbobjektiv zum Einsatz, bei der Schätzung (= semiquantitative Auswertung) ein 10x Objektiv. Das Okular wies eine 10fache Vergrößerung auf. Die Gesichtsfeldflächen beliefen sich bei 630-facher Endvergrößerung auf 0,069mm² und bei 100-facher Endvergrößerung auf 0,708mm².

Pro Präparat wurden, um an eine repräsentative Zahl an gemessenen Zellen zu gelangen, jeweils acht tumorzellreiche Gesichtsfelder untersucht. Im Durchschnitt wurden dabei pro Fall 1657+/- 508 (SD) Zellen erfasst.

Bestimmung der PCNA-Expression durch semiquantitative Schätzung

Die semiquantitative Auswertung erfolgte bei jedem Präparat zuerst, um kein durch die Zählung beeinflusstes Ergebnis zu erhalten. Die Schnitte wurden bei einer 100fachen Endvergrößerung im Bereich des Tumorgewebes frei durchgemustert. Anschließend wurden die immun-positiven Zellkerne prozentual zu den immun-negativen Zellkernen über das gesamte Schnittpräparat geschätzt ("PC Rate S"), wobei eventuell inhomogene oder fokus-artige Hotspots nicht separat berücksichtigt wurden. Es

wurden als Schätzvorgaben < 5%, 5% - 10%, 10% - 20%, 20% - 50% und > 50% gemacht; aufgrund der Datenverteilung und der schwachen Besetzung gerade der höheren Gruppen wurden für die statistische Auswertung drei Gruppen mit Schätzwerten von < 5% (n = 73), 5% - 10% (n = 18) und > 10% (n = 18) gebildet.

Bestimmung der PCNA-Expression durch quantitative Zählung

Die quantitative Auswertung erfolgte nach der Schätzung. In acht zufällig ausgesuchten tumorzellreichen Gesichtsfeldern der Präparate wurde bei 635-facher Endvergrößerung die Anzahl der immun-positiven, sowie die die Anzahl der immun-negativen Zellkerne gezählt. Anschließend wurde aus den Ergebnissen der prozentuale Mittelwert errechnet ("PC Rate Z"). Die Zahlenwerte für PC Rate Z wurden nach 1:2:1-Quantilisierung in drei Gruppen im Verhältnis 29:57:28 in die Statistik eingebracht.

3.3 Statistik

Die statistischen Untersuchungen wurden mit dem Programmpaket BMDP (Unterprogramme 1D, 1L, 2D, 2L, 4F, 4M, 6D) des Department of Biomathematics (BMDP) der University of California, Statistical Software Inc., Los Angeles, USA vorgenommen (Dixon 1981).

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. (BMDP 1D, BMDP 2D).

Beziehungen zwischen kategorisierten Parametern wurden in Mehr-Felder-Tafeln dargestellt und mit dem Pearson Chi²-Test (BMDP 4F) auf statistische Signifikanz getestet. Außerdem wurden beim Vergleich mehrerer nicht kategorisierter Parameter Korrelationskoeffizienten bestimmt (BMDP 6D).

Univariate Überlebensanalysen erfolgten unter Berechnung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Kaplan und Meier 1958), die mit dem Wilcoxon-Breslow-Test auf

statistische Signifikanz überprüft wurden (BMDP 1L). Angeschlossen wurden multivariate Überlebensanalysen mit einem Cox-Modell (Cox 1972) im "forward stepping"-Modus (BMDP 2L).

Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein α -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.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeine Daten

Es liegen Daten von insgesamt 114 Patientinnen vor. Die jüngste Patientin war bei Diagnosestellung 32 Jahre alt, die älteste 95. Das mittlere Alter betrug 60,2 Jahre, der Median bei 59. Das mittlere Überleben der Patientinnen lag bei 7,5 Jahren. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug 65,8%, die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 46,6% (Abbildung 4.1.1). Am Ende des Beobachtungszeitraumes lebten noch 52 Patientinnen mit einem Follow-Up von jeweils > 10 Jahren. Gestorben waren nach im Mittel 5,3 +/- 5,2 (SD) Jahren 62 Patientinnen.

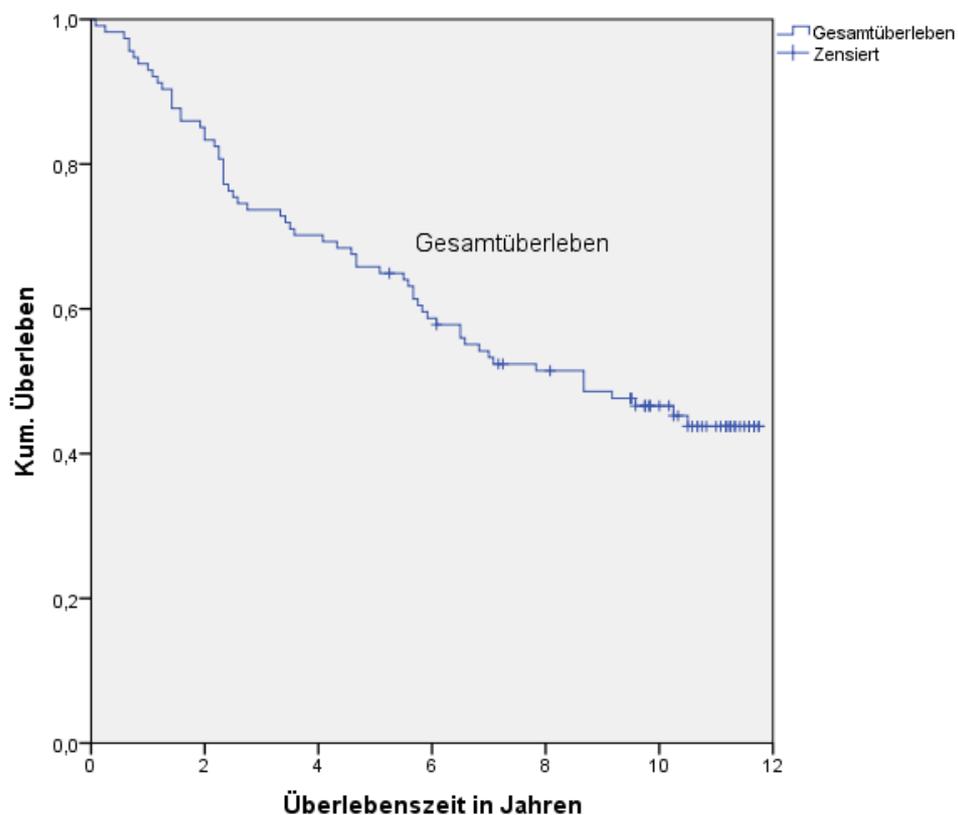


Abb. 4.1.1: Gesamtüberleben der 114 Patientinnen

4.2 Univariate Überlebensanalyse

4.2.1 TNM-Klassifikation und ihre Komponenten

Die Tumorgröße (pT), der Lymphknotenstatus (pN) und das Vorhandensein von Metastasen (pM) korrelieren genauso mit dem Überleben der Patientinnen wie das postoperative Tumorstadium (pTMN). Die Überlebenswahrscheinlichkeit nimmt signifikant mit fortschreitendem Tumorstadium ab (Tab. und Abb. 4.2.1.1 - 4.2.1.3). In

einem Fall lagen keine Angaben zu pN und M vor, so dass sich die Berechnungen zu pN, M und damit auch zu pTNM jeweils nur auf 113 Fälle statt auf 114 Fälle beziehen.

Postoperative Tumorgröße (pT)

Tabelle 4.2.1.1: Überleben in Beziehung zur Tumorgröße (pT) ($p = 0,0026$)

pT	1	2	3	4
Anzahl der Patienten	22	67	17	8
verstorbene Patienten	7	38	11	6
mittl. Überleben (Jahre)	9,4	7,7	5,6	3,9
5-Jahres-ÜLW (%)	86,4	70,1	41,2	25,0
10-Jahres-ÜLW (%)	67,9	44,7	35,3	25,0

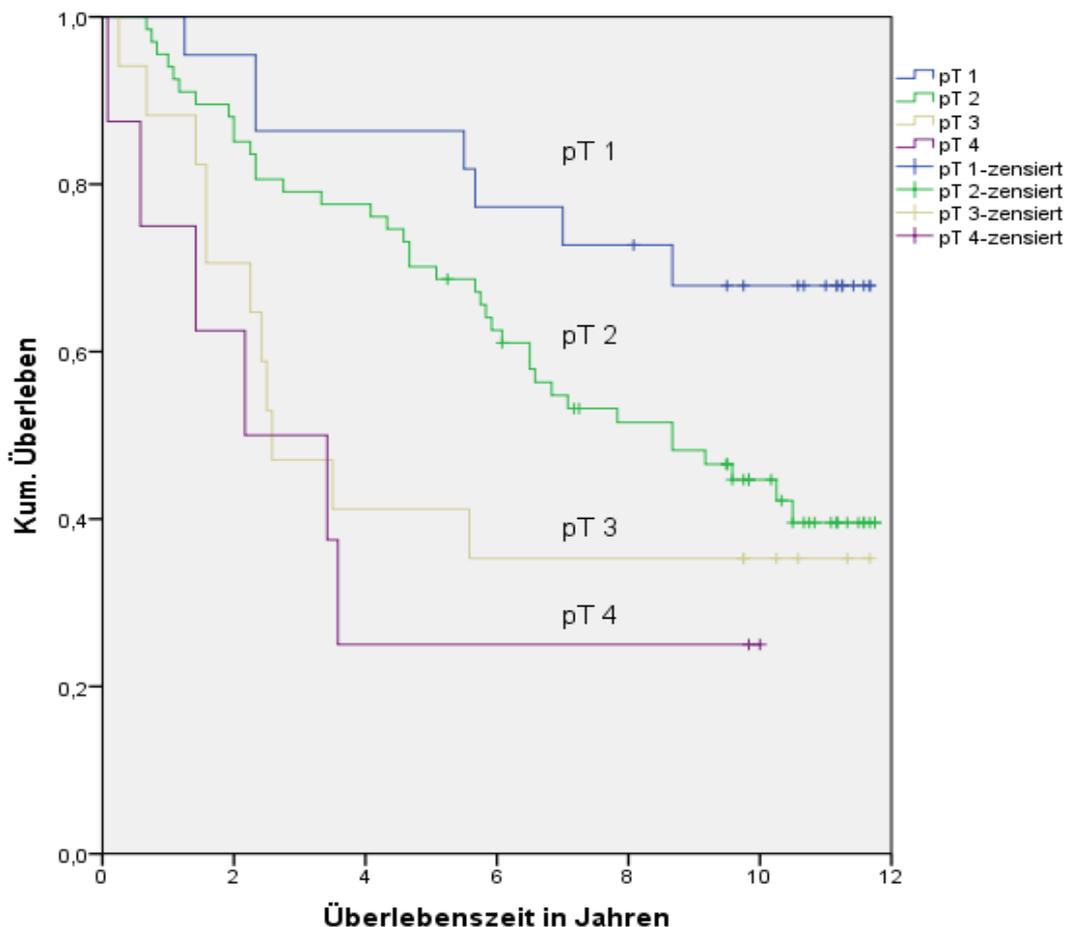


Abb. 4.2.1.1: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Tumorgröße (pT)

Postoperativer Lymphknotenstatus (pN)

Tabelle 4.2.1.2: Überleben in Beziehung zum Lymphknotenstatus (pN) ($p < 0,0001$)

pN	0	1
Anzahl der Patienten	61	52
verstorbene Patienten	23	47
mittl. Überleben (Jahre)	9,1	5,0
5-Jahres-ÜLW (%)	80,3	41,0
10-Jahres-ÜLW (%)	65,0	22,0

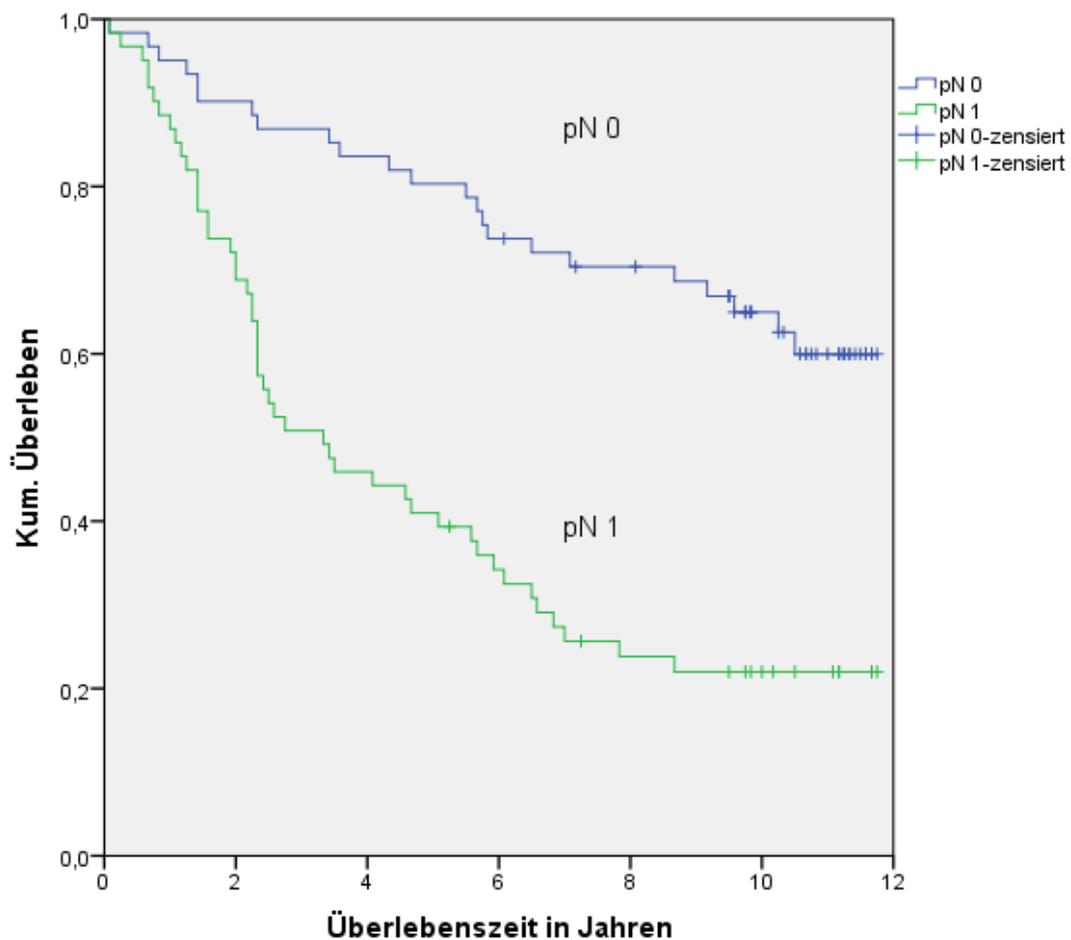


Abb. 4.2.1.2: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für den Lymphknotenstatus (pN)

Postoperative Fernmetastasierung (pM)

Tabelle 4.2.1.3: Überleben in Beziehung zur Fernmetastasierung (M) ($p = 0,0016$)

pM	0	1
Anzahl der Patienten	105	8
verstorbene Patienten	54	8
mittl. Überleben (Jahre)	7,8	3,6
5-Jahres-ÜLW (%)	68,6	25,0
10-Jahres-ÜLW (%)	49,8	0,0

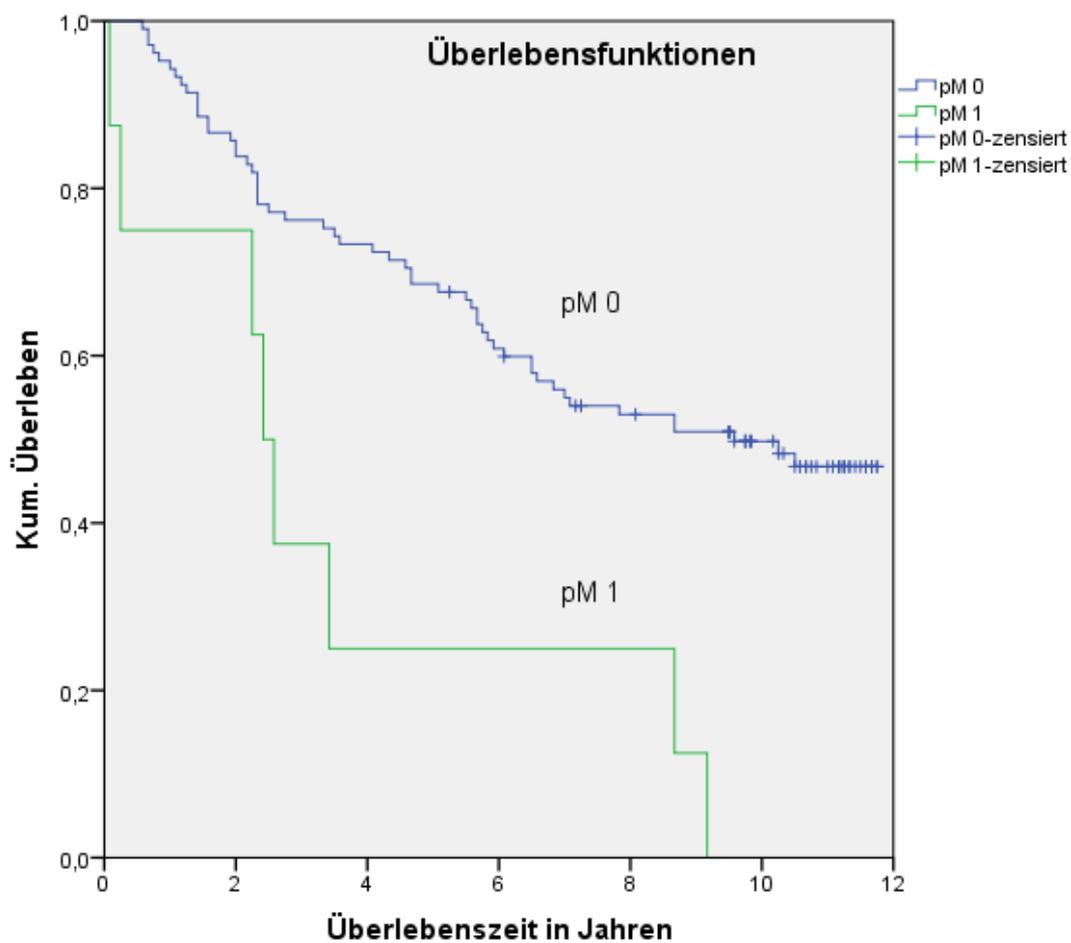


Abb. 4.2.1.3: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Fernmetastasierung (pM)

Postoperatives Tumorstadium (pTMN)

Tabelle 4.2.1.4: Überleben in Beziehung zum Staging (pTNM) ($p < 0,0001$)

pTNM	1	2	3	4
Anzahl der Patienten	16	75	14	8
verstorbene Patienten	3	40	11	8
mittl. Überleben (Jahre)	10,3	7,9	4,3	3,6
5-Jahres-ÜLW (%)	93,8	70,7	28,6	25,0
10-Jahres-ÜLW (%)	81,3	48,2	21,4	0,0

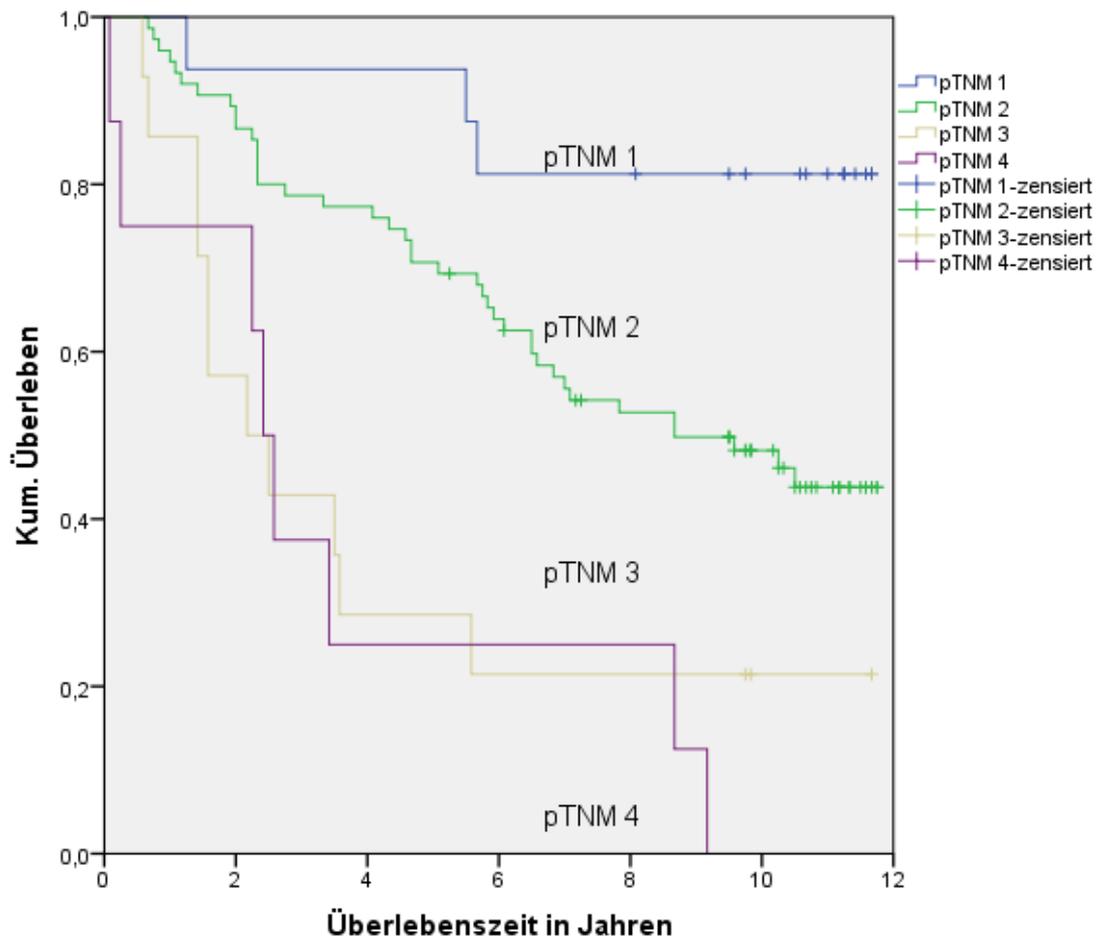


Abb. 4.2.1.4: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Staging (pTNM)

4.2.2 Gradierung und ihre Komponenten

Im Folgenden sind die drei Gradingkomponenten tubuläre Differenzierung (TD), Kernpleomorphie (KP) und Mitoserate (MIT) in Bezug auf das Überleben dargestellt, ebenso das aus ihnen gebildete Grading (G). Die Überlebensunterschiede sind mit Ausnahme von TD statistisch signifikant (Tab. bzw. Abb. 5.2.2.1 - 5.2.2.4).

Tubuläre Differenzierung (TD)

Tabelle 4.2.2.1: Überleben in Beziehung zur tubulären Differenzierung (TD) ($p = 0,1721$)

TD	1	2	3
Anzahl der Patienten	5	32	62
verstorbene Patienten	1	15	39
mittl. Überleben (Jahre)	9,7	8,1	6,7
5-Jahres-ÜLW (%)	80,0	71,9	56,5
10-Jahres-ÜLW (%)	80,0	55,5	37,9

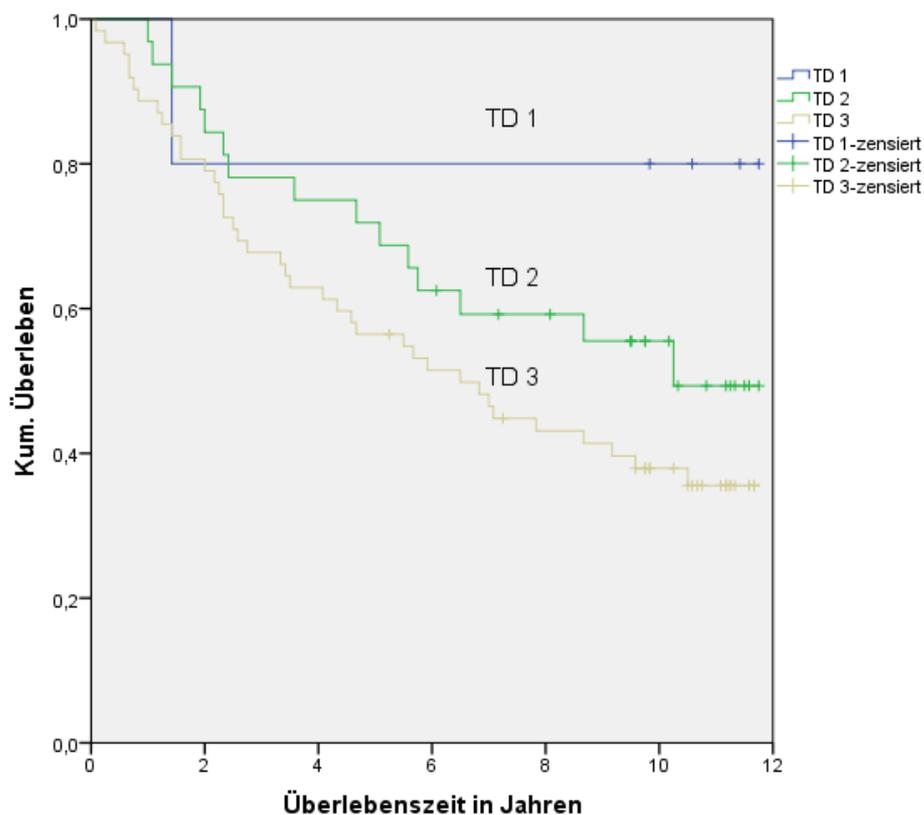


Abb. 4.2.2.1: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur tubulären Differenzierung (TD)

Kernpleomorphie (KP)

Tabelle 4.2.2.2: Überleben in Beziehung zur Kernpleomorphie (KP) ($p = 0,0251$)

KP	1	2	3
Anzahl der Patienten	10	44	50
verstorbene Patienten	3	20	33
mittl. Überleben (Jahre)	9,5	8,4	6,2
5-Jahres-ÜLW (%)	80,0	75,0	52,0
10-Jahres-ÜLW (%)	70,0	53,8	37,0

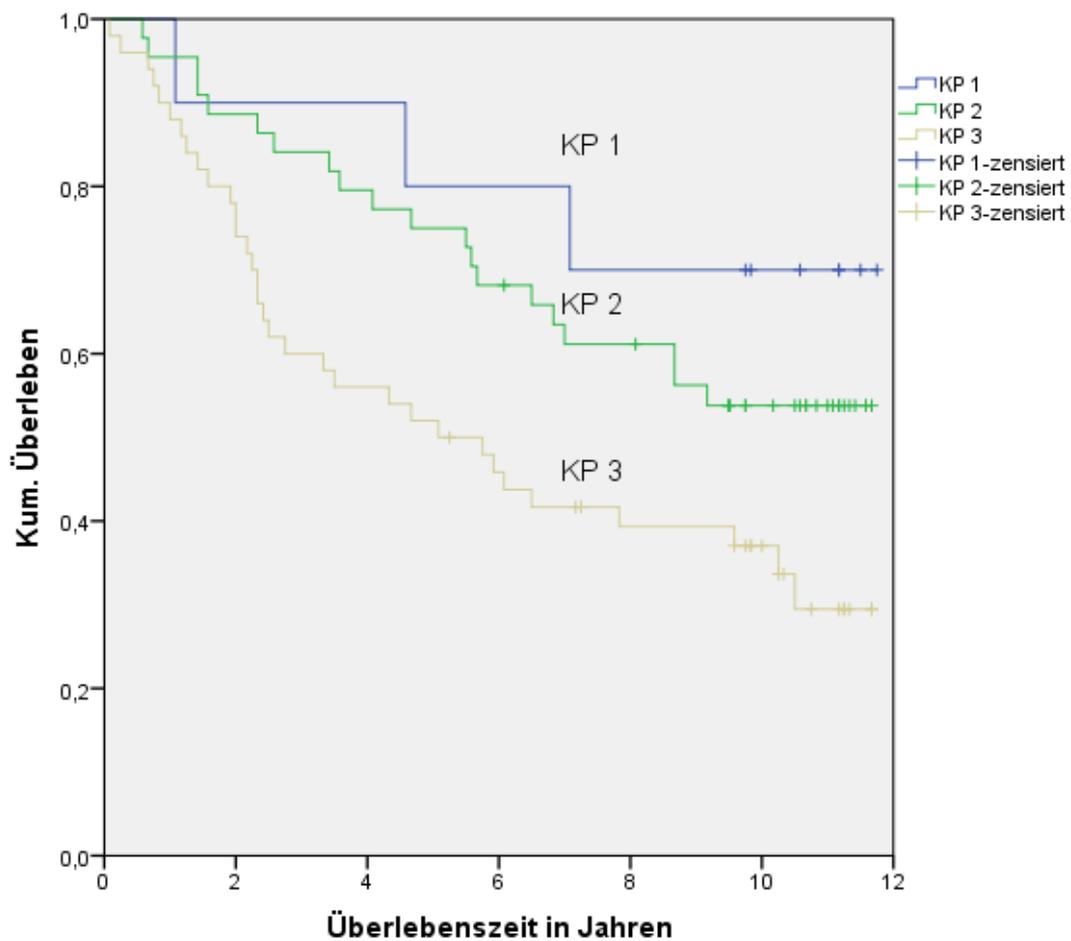


Abb. 4.2.2.2: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Kernpleomorphie (KP)

Mitoserate (MIT)

Tabelle 4.2.2.3: Überleben in Beziehung zur Mitoserate (MIT) ($p = 0,0003$)

MIT	1	2	3
Anzahl der Patienten	50	38	15
verstorbene Patienten	20	23	12
mittl.Überleben (Jahre)	8,7	7,1	4,2
5-Jahres-ÜLW (%)	76,0	63,2	26,7
10-Jahres-ÜLW (%)	61,4	38,4	26,7

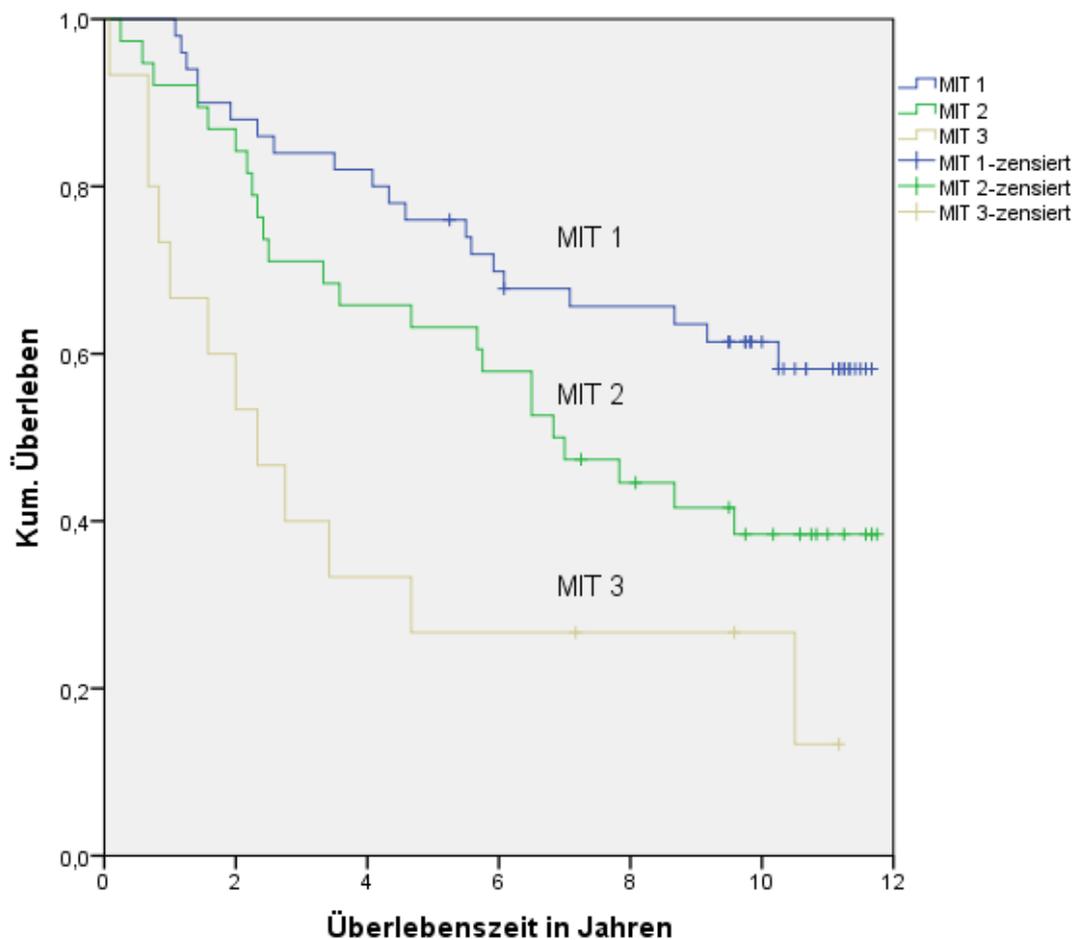


Abb. 4.2.2.3: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Mitoserate (MIT)

Grading (G)

Tabelle 4.2.2.4: Überleben in der Beziehung zum Grading ($p = 0,0010$)

Grading	1	2	3
Anzahl der Patienten	22	56	35
verstorbene Patienten	7	28	26
mittl. Überleben (Jahre)	9,1	8,2	5,4
5-Jahres-ÜLW (%)	77,3	73,2	45,7
10-Jahres-ÜLW (%)	67,9	51,1	27,4

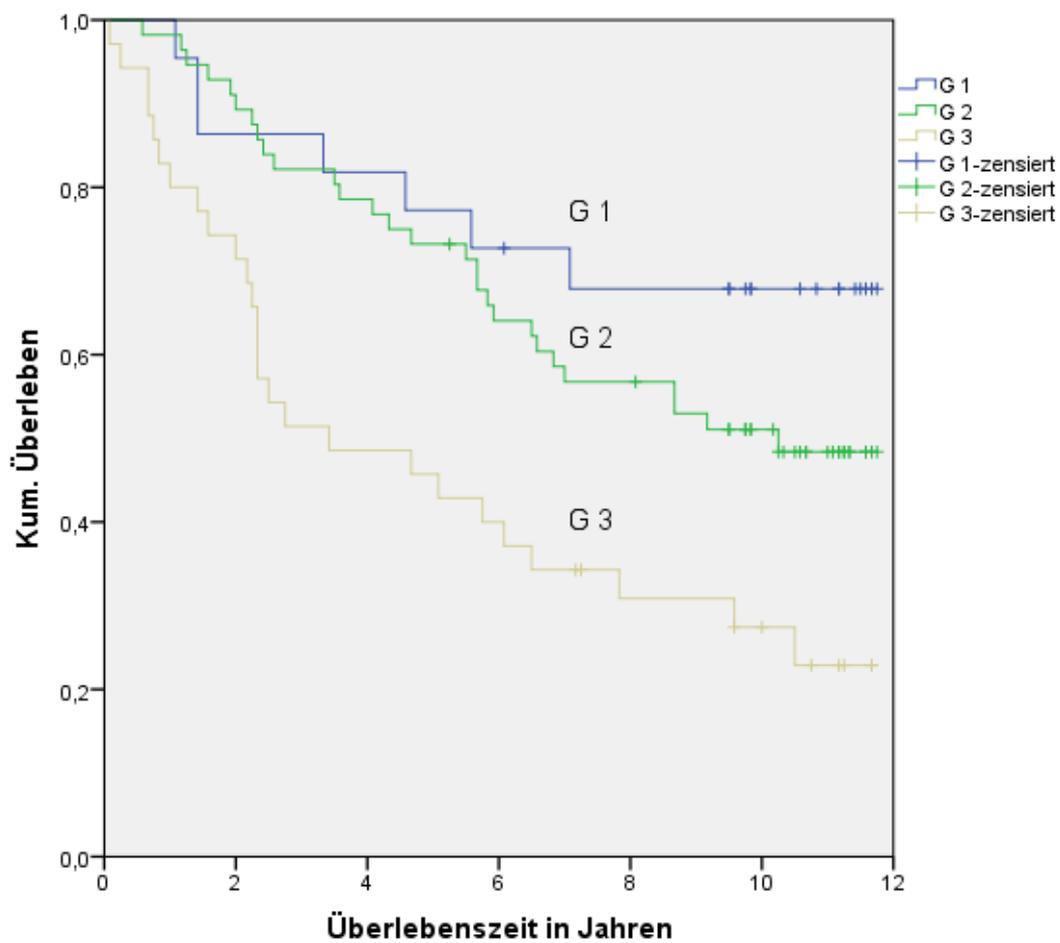


Abb. 4.2.2.4: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Grading

4.2.3 Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus

Patientinnen, deren Progesteronrezeptor-Status positiv bestimmt wurde, haben ein signifikant besseres Überleben als Patientinnen mit negativem PR-Status. Hingegen korreliert ein positiver Östrogenrezeptorstatus zwar im Trend, aber nicht signifikant mit der Überlebenschance (Tab. und Abb. 4.2.3.1 - 4.2.3.2).

Progesteronrezeptorstatus (PR)

Tabelle 4.2.3.1: Überleben in Beziehung zum Progesteronrezeptorstatus ($p = 0,0142$)

PR	Negativ	Positiv
Anzahl der Patienten	55	59
verstorbene Patienten	35	27
mittl. Überleben (Jahre)	6,5	8,4
5-Jahres-ÜLW (%)	54,5	76,3
10-Jahres-ÜLW (%)	39,5	53,1

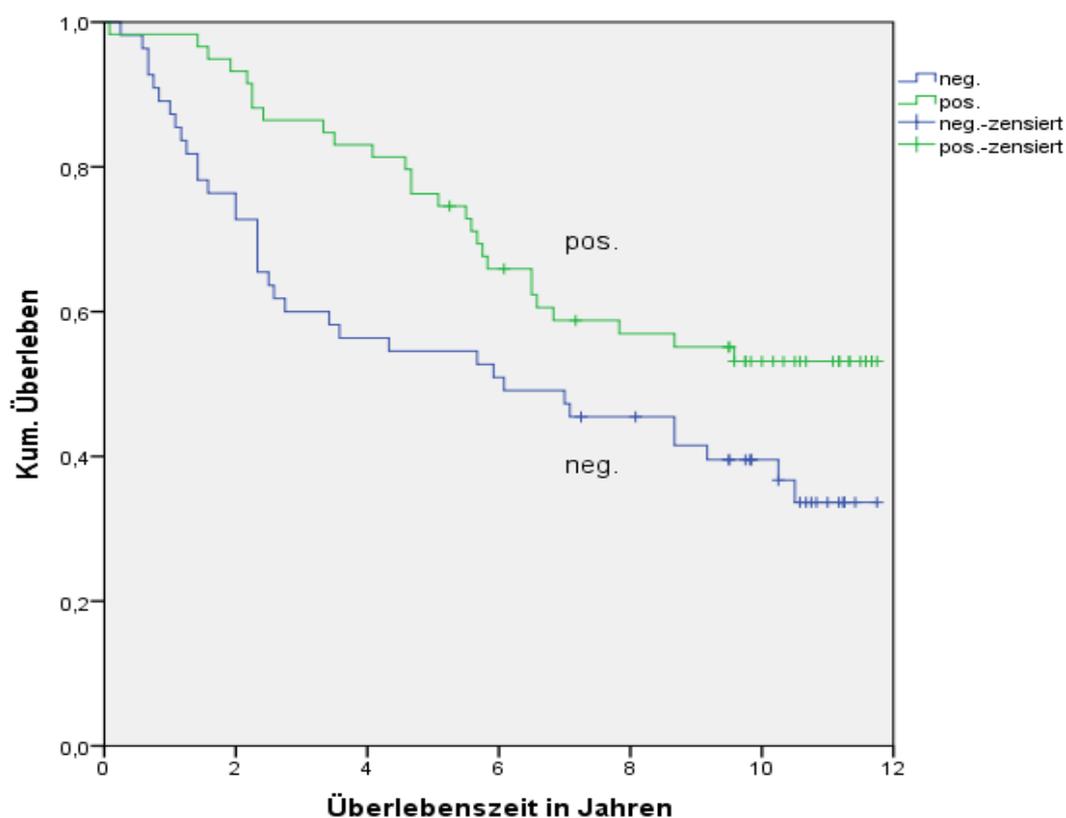


Abb. 4.2.3.1: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Progesteronrezeptorstatus

Östrogenrezeptorstatus (ER)

Tabelle 4.2.3.2: Überleben in Beziehung zum Östrogenrezeptorstatus ($p = 0,1185$)

ER	Negativ	Positiv
Anzahl der Patienten	28	86
verstorbene Patienten	16	46
Mittl. Überleben (Jahre)	6,5	7,8
5-Jahres-ÜLW (%)	53,6	69,8
10-Jahres-ÜLW (%)	42,3	48,0

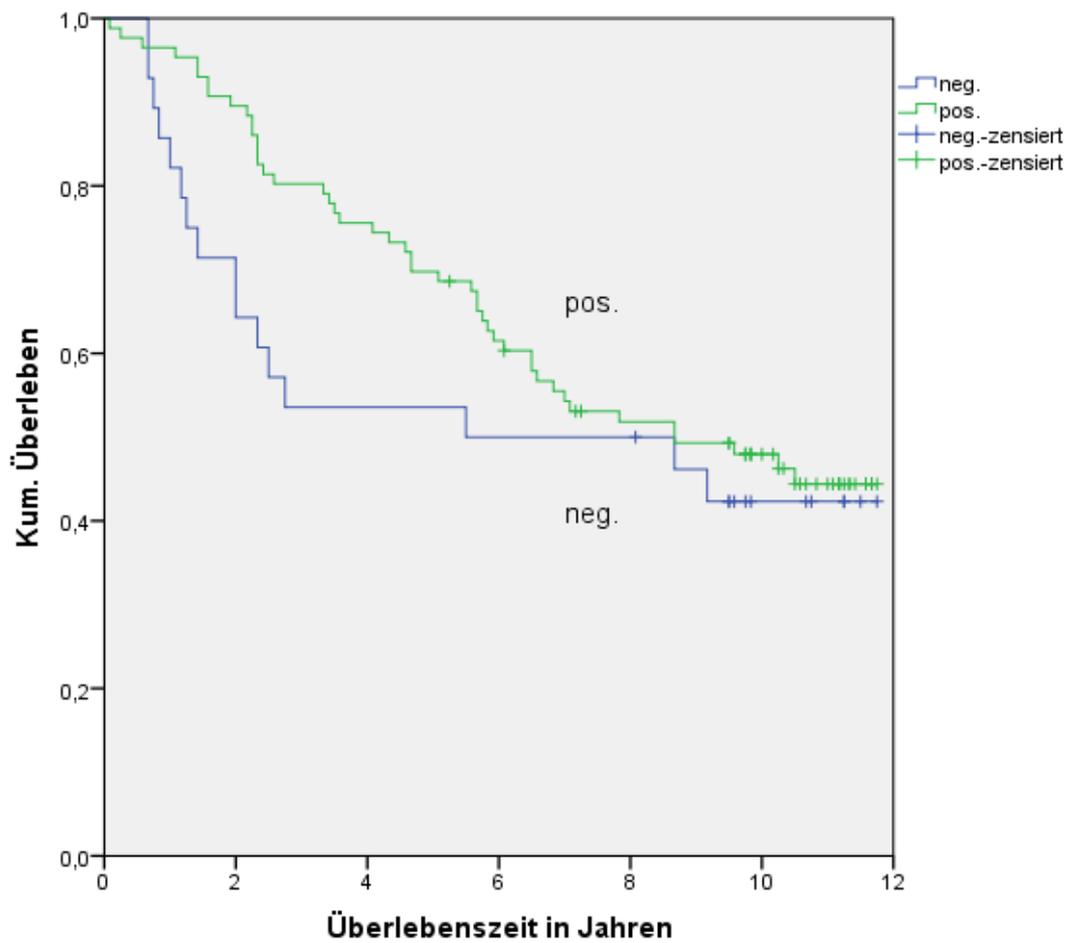


Abb. 4.2.3.2: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Östrogenrezeptorstatus

4.2.4 PCNA-basierte Parameter

Die Ergebnisse der PCNA-basierten Parameter belegen in den Überlebenskurven graphisch einen Einfluss der PCNA-Expression auf das Überleben, der aber statistisch nur für die Schätzung signifikant war ($p = 0,0116$) (Tab. und Abb. 4.2.4.1 - 4.2.4.2).

Tabelle 4.2.4.1: Überleben in Beziehung zur PC Rate Z ($p = 0,1063$)

PC Rate Z	1	2	3
Anzahl der Patienten	29	57	28
verstorbene Patienten	14	31	17
Mittl. Überleben (Jahre)	8,9	7,4	6,2
5-Jahres-ÜLW (%)	82,8	66,7	46,4
10-Jahres-ÜLW (%)	53,1	46,8	39,0

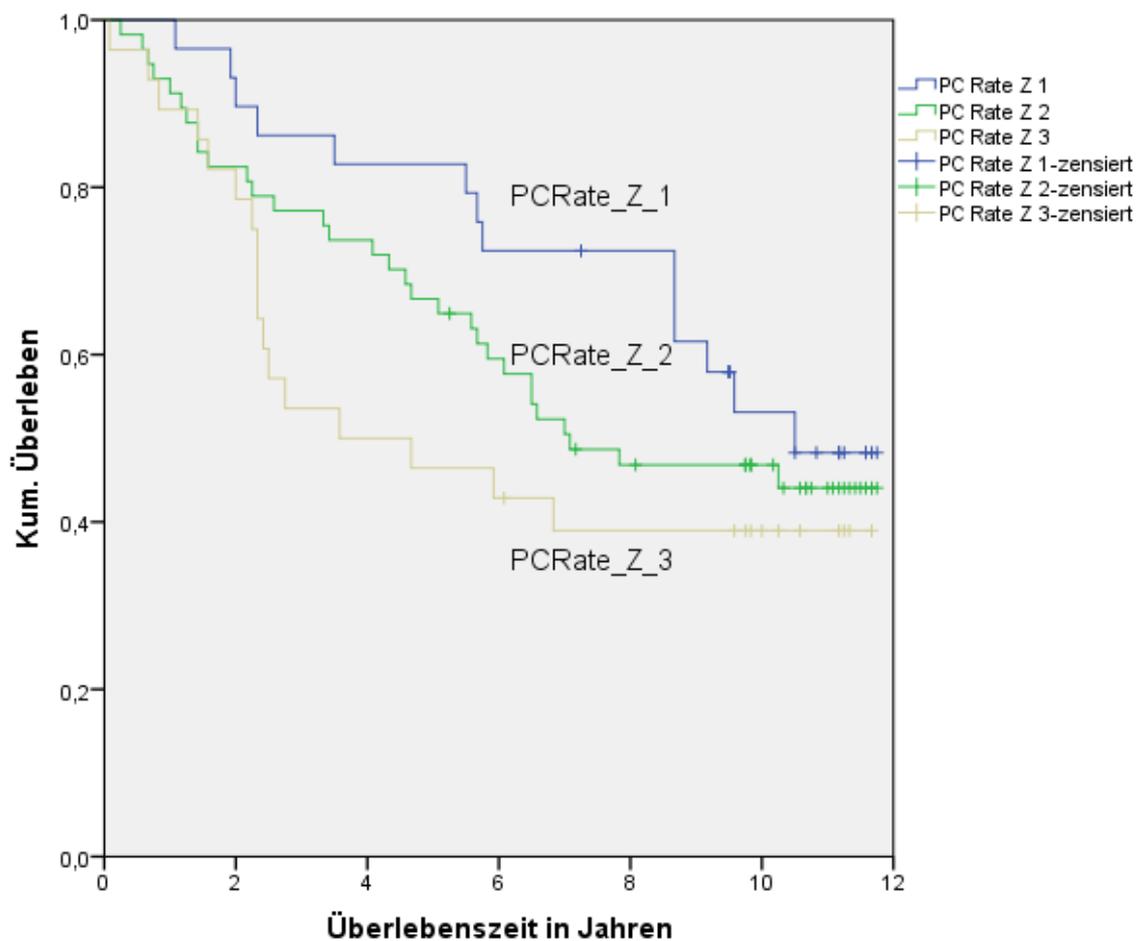


Abb. 4.2.4.1: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zu PC Rate Z

Tabelle 4.2.4.2: Überleben in Beziehung zu PC Rate S ($p = 0,0116$)

PC Rate S	< 5%	5% - 10%	> 10%
Anzahl der Patienten	73	18	23
verstorbene Patienten	35	11	16
Mittl. Überleben (Jahre)	8,3	6,8	5,3
5-Jahres-ÜLW (%)	75,3	61,1	39,1
10-Jahres-ÜLW (%)	53,7	37,5	30,4

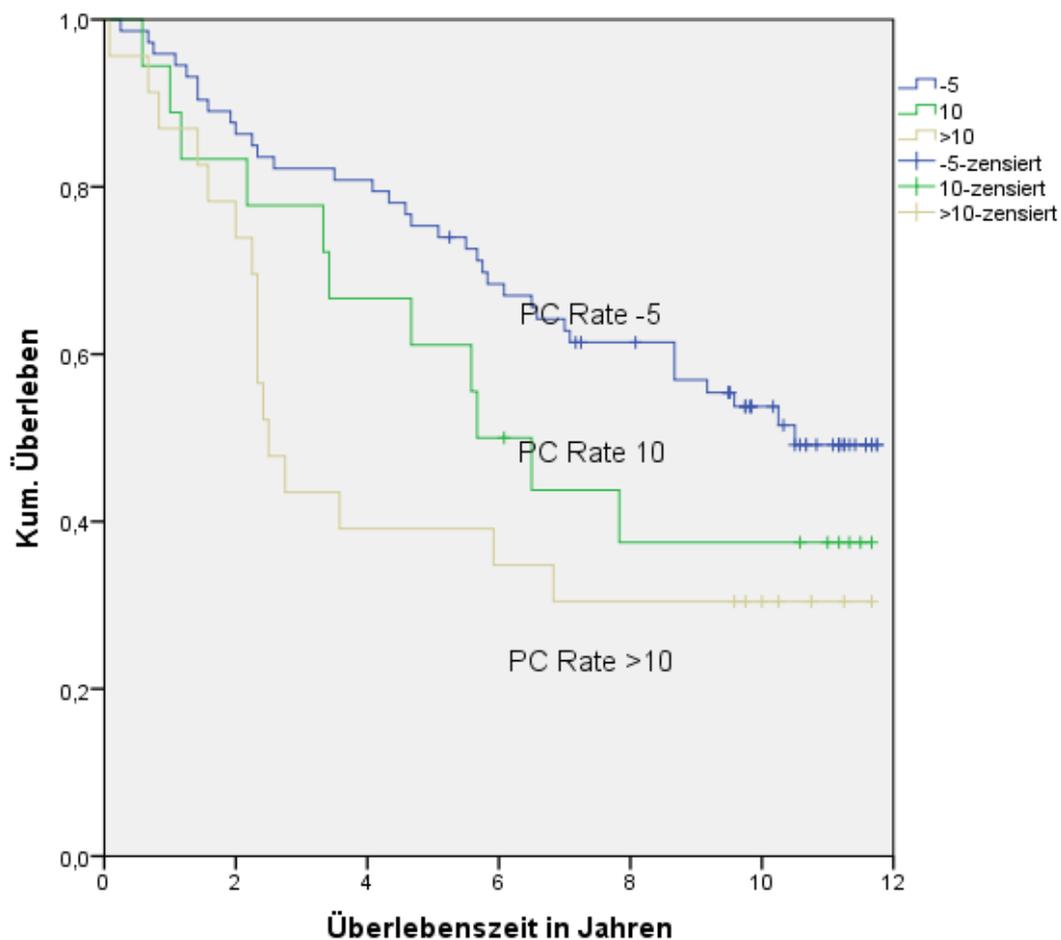


Abb. 4.2.4.2: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zu PC Rate S

In der Zusammenschau lassen sich an den Überlebenskurven Unterschiede in der Aussagekraft insofern vermuten, dass sie bei der Schätzung (PC Rate S) auch nach 10 Jahren weniger stark angenähert verlaufen als bei der Zählung (PC Rate Z).

4.3 Multivariate Überlebenszeitanalyse: Cox-Modell

Die multivariate Lebenszeitanalyse erfolgte unter Zuhilfenahme des Cox-Modelles. Es wurde untersucht, welchen Beitrag die klassischen Prognosefaktoren, das Grading, der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, sowie die Werte der PCNA Zählung (PC Rate Z) und der PCNA Schätzung (PC Rate S) zur Prognose leisten. Darüber hinaus wurden alle Faktoren auf ihre Unabhängigkeit geprüft. Wichtig hierbei ist, dass nur voneinander weitestgehend unabhängige Prognosefaktoren in das Cox-Modell aufgenommen wurden.

In Tabelle 4.3.1 sind die Ausgangsbedingungen für die Variablen der multivariaten Analyse wiedergegeben.

Tabelle 4.3.1: Multivariates Cox-Modell; n = 113; Ausgangsbedingungen (vor Schritt 1)

Variable	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
pN	17,15		<0,0001
Grading	12,18		0,0005
pT	10,52		0,0012
PR	4,97		0,0258
PC Rate S	3,56		0,0591
PC Rate Z	2,40		0,1217
ER	0,90		0,3417

Im ersten Schritt wurde der Lymphknotenstatus ($p < 0,0001$) in das Cox-Modell aufgenommen, da dieser Prognosefaktor durch den niedrigsten p-Wert die höchste univariate Relevanz aufweist (Tab. 4.3.2).

Tabelle 4.3.2: Multivariates Cox-Modell, n = 113; Schritt: 1

Variable	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
pN		17,15	>0,0001
PR	8,10		0,0044
pT	7,14		0,0075
Grading	5,99		0,0144
ER	3,95		0,0468
PC Rate S	0,67		0,4136
PC Rate Z	0,38		0,5396

Im zweiten Schritt wurde der Progesteronrezeptorstatus ($p = 0,0044$) aufgenommen, da dieser Faktor nun die zweithöchste univariate Relevanz aufweist. In den Schrittent

drei und vier die Tumorgröße ($p=0,0016$) und das Grading ($p = 0,291$) (Tabellen 4.3.3 bis 4.3.5).

Tabella 4.3.3: Multivariates Cox-Modell, n = 113; Schritt 2

Variable	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
pN		20,28	0,0001
PR		8,10	0,0044
pT	10,00		0,0016
Grading	5,76		0,0164
ER	0,92		0,3367
PC Rate S	0,75		0,3856
PC Rate Z	0,72		0,3977

Tabella. 4.3.4: Multivariates Cox-Modell, n = 113; Schritt 3

Variable	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
pN		18,88	>0,0001
PR		10,96	0,0009
pT		10,00	0,0016
Grading	4,76		0,0291
ER	1,94		0,1636
PC Rate Z	0,02		0,8868
PC Rate S	<0,01		0,9666

Tabella 4.3.5: Multivariates Cox-Modell, n = 113; Endsituation nach Schritt 4

Variable	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
pN		12,45	0,0004
PR		10,87	0,0010
pT		9,01	0,0027
Grading		4,76	0,0291
ER	1,21		0,2709
PC Rate Z	0,47		0,4927
PC Rate S	0,40		0,5278

Nach dem vierten Schritt verfügt kein Faktor mehr über eine ausreichend hohe univariate Relevanz ($p < 0,10$). Somit wird auch kein weiterer Faktor in das Cox-Modell aufgenommen. Die folgende Tabelle 4.3.6 zeigt die statistischen Kenndaten in dem

sich entwickelnden Cox-Modell. Die Chi²-Werte für das globale Chi² steigen hierbei von 17,74 auf 46,29. Diese Erhöhung steht für die Relevanz des Cox-Modells.

Tabelle 4.3.6: Multivariates Cox-Modell, n = 113; schrittweise Entwicklungsübersicht zu den statistischen Kenngrößen.

Schritt	Improvement Chi ²	p-Wert	Global Chi ²	p-Wert
1: pN	17,15	<0,001	18,01	< 0,001
2: PR	8,10	0,004	25,92	< 0,001
3: pT	10,01	0,002	35,14	< 0,001
4: Grading	4,76	0,029	40,59	< 0,001

Zusammenfassend kann man sagen, dass die PCNA-basierten Parameter univariat eine Bedeutung haben, multivariat zu den bereits bekannten Größen jedoch keine ergänzenden Informationen hinzufügen.

4.4 Korrelation PCNA-bezogener Parameter untereinander

Die Korrelation zwischen den PCNA-bezogenen Messparametern sind in Tabelle 4.4.1 dargestellt. Dabei wurde PC Rate Z im Verhältnis 1:2:1 quantilisiert und für PC Rate S feste Grenzen verwendet.

Tabelle 4.4.1: Beziehung zwischen der PCNA Schätzung und der PCNA Zählung (p < 0,0001)

PC Rate S	≤ 5%	5%- 10%	> 10%	Total
PC Rate Z				
≤ 0,46%	29	0	0	29
0,46% - 11,44%	44	13	1	58
> 11,44%	1	5	22	28
Total	74	18	23	115

Als Kongruenz errechnet sich hier 64 / 115 (= 55,7%) bei einer Abweichung um eine Gruppe in 50 Fällen (= 43,5%) und um zwei Gruppen in einem Fall (= 0,9%).

Die Bestimmung der Mess- und Schätzwerte muss prinzipiell unabhängig von der Zahl erfasster Tumorzellen sein, um einen *Bias* auszuschließen. Die Tabellen 4.4.2 und 4.4.3 belegen, dass dieses Qualitätskriterium in der durchgeführten Studie eingehalten wurde. Die Zahl der Tumorzellen wurde ebenfalls 1:2:1 in drei Gruppen quantilisiert.

Table 4.4.2: Beziehung zwischen der PC Gesamt und der PCNA Zählung (p = 0,2211)

PC Gesamt				
PC Rate Z	≤ 1315	1315 – 1944	> 1944	Total
≤ 0,46%	7	17	5	29
0,46% - 11,44%	12	27	19	58
> 11,44%	10	14	4	28
Total	29	58	28	115

Die Kongruenz liegt nach 1:2:1-Quantilisierung der Werte bei 38 / 115 (= 33,0%) bei einer Abweichung um eine Gruppe in 62 Fällen (= 53,9%) und um zwei Gruppen in 15 Fällen (= 13,0%), so dass sich hier eine mehr oder wenige unkorrelierte Darstellung ergibt.

Table 4.4.3: Beziehung zwischen der PC Gesamt und der PCNA Schätzung (p = 0,4357)

PC Gesamt				
PC Rate S	≤ 1315	1315 – 1944	> 1944	Total
≤ 5%	17	39	18	74
5% - 10%	3	9	6	18
> 10%	9	10	4	23
Total	29	58	28	115

Ebenso unkorreliert ist die Beziehung zwischen den Schätzwerten und der Zahl untersuchter Tumorzellen. Die Kongruenz beträgt 30 / 115 (= 26,1%) bei einer Abweichung um eine Gruppe in 58 Fällen (= 50,4%) und um zwei Gruppen in 27 Fällen (= 23,5%).

Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Vergleiche sind in Tabelle 4.4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4.4: Korrelationsmatrix zwischen PCNA-bezogenen Parametern

	PC Rate Z	PC Rate S	PC Gesamt
PC Rate Z	---		
PC Rate S	0,928	---	
PC Gesamt	-0,125	-0,080	---

Die Werte für die Korrelationskoeffizienten belegen noch einmal den eindeutigen Zusammenhang zwischen den Zähl- und Schätzwerten ($r = 0,928$) sowie die Unabhängigkeit beider Werte von der Zahl der erfassten Tumorzellen ($r = -0,125$ und $r = -0,080$).

4.5. Interspezifische Reproduzierbarkeit

Die methodischen Aspekte unserer Studie bezogen sich auf die interobserver Variabilität der Bestimmung der PCNA Expression, wobei hier der Vergleich zu Ki-67 gezogen werden soll. Gerade Ki-67 hat trotz seines stetigen Einsatzes in der Mammaprognostik das Problem, dass seine Reproduzierbarkeit angezweifelt wird. Geklärt werden sollte hier, ob die PCNA-Expression zu ähnlichen, besseren oder schlechteren Ergebnissen kommt.

4.5.1. Interspezifische Reproduzierbarkeit der PCNA-Bestimmung

Die folgende Tabelle 4.5.1 zeigt in einer Übersicht die Kennwerte für die Untersuchung der interdisziplinären Reproduzierbarkeit. Bezogen auf die Zellzahl ergeben sich in der ersten Messreihe ein Mittelwert von 1732, in der zweiten von 1670. Diese Ergebnisse waren im t-Test nicht signifikant unterschiedlich.

Ebenso unterschieden sich die Werte im t-Test nicht signifikant von denen der Gesamtstudie, die ähnliche Mittelwerte und Streumaße aufwies. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,883$. Bezogen auf die PCNA-positiven Zellen wurden in der ersten Zählung ein Mittelwert von 6,0%, in der zweiten von 5,24% erzielt, mit Höchstwerten zwischen 30 und 40%. Die Korrelation war hier noch höher bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,906$.

Tabelle 4.5.1: Tabellarische Übersicht zur interspezifischen Reproduzierbarkeit der PCNA-Expression von 20 Fällen

Variable	Mittelwert ± SD	Geringster Wert	Höchster Wert	Korrelationskoeffizient
Zellzahl				
1.Zählung	1732 ± 546	1093	3284	
2.Zählung	1670 ± 480	987	3127	r = 0,883
PCNA-positiv				
1.Zählung	6,0% ± 10,9%	0,0%	43,1%	
2.Zählung	5,2% ± 8,8%	0,0%	31,7%	r = 0,906

4.5.2. Vergleich der interspezifischen Reproduzierbarkeit der PCNA- und der Ki-67-Bestimmung

Da in der Ki-67-Studie keine Reproduzierbarkeitsaspekte separat behandelt worden waren, kann hier ein Vergleich der Werte zur interspezifischen Reproduzierbarkeit an 20 identischen Fällen dargestellt werden, ohne das Problemfeld der wissenschaftlichen Zweitverwertung zu berühren. Die entsprechenden Werte zeigt Tabelle 4.5.1. Bei den Datenverteilungen fällt auf, dass die Mittelwerte für Ki-67 (11,5% bzw. 13,1%) etwa doppelt so hoch liegen wie die für PCNA (6,0% bzw. 5,2%), dass aber bei den Maximalwerten vergleichbare Werte erhoben wurden. Der Korrelationskoeffizient der jeweils 1. und 2. Zählung ist für PCNA mit $r = 0,906$ zwar höher als bei Ki-67, aber auch dort mit $r = 0,811$ bereits recht hoch.

Tabelle 4.5.1: Tabellarische Übersicht zum Vergleich der interspezifischen Reproduzierbarkeit der PCNA-Expression und der Ki-67-Expression von 20 identischen Fällen

Variable	Mittelwert ± SD	Geringster Wert	Höchster Wert	Korrelationskoeffizient
Ki-67-positiv				
1.Zählung	11,5% ± 9,7%	0,11%	28,0%	
2.Zählung	13,1% ± 10,7%	1,26%	36,9%	r = 0,811
PCNA-positiv				
1.Zählung	6,0% ± 10,9%	0,0%	43,1%	
2.Zählung	5,2% ± 8,8%	0,0%	31,7%	r = 0,906

4.5.3 Cursorischer Vergleich der Ergebnisse für PCNA und Ki-67

Wegen der Problematik der wissenschaftlichen Zweitverwertung können auch prognostische Ergebnisse zur Bestimmung der Ki-67-Expression hier nur cursorisch präsentiert werden. Die folgenden Überlebenskurven zeigen den direkten Vergleich der Auszählung der PCNA- und der Ki-67-Expression nach 1:2:1-Quantilisierung für ein 8-Jahres-Intervall (Abb. 4.5.3.1). Grund dafür ist, dass die Ki-67-Daten bisher noch nicht auf den verlängerten Beobachtungszeitraum bezogen wurden. Die Überlebenskurven für Ki-67 spreizen dabei weiter auf, so dass sich schon graphisch eine höhere prognostische Aussagekraft im Vergleich zu PCNA vermuten lässt. In einem mit Stadienparametern, Grading und Hormonrezeptor-Expression durchgeführten Cox-Modell wurde Ki-67 im Unterschied zu PCNA aufgenommen.

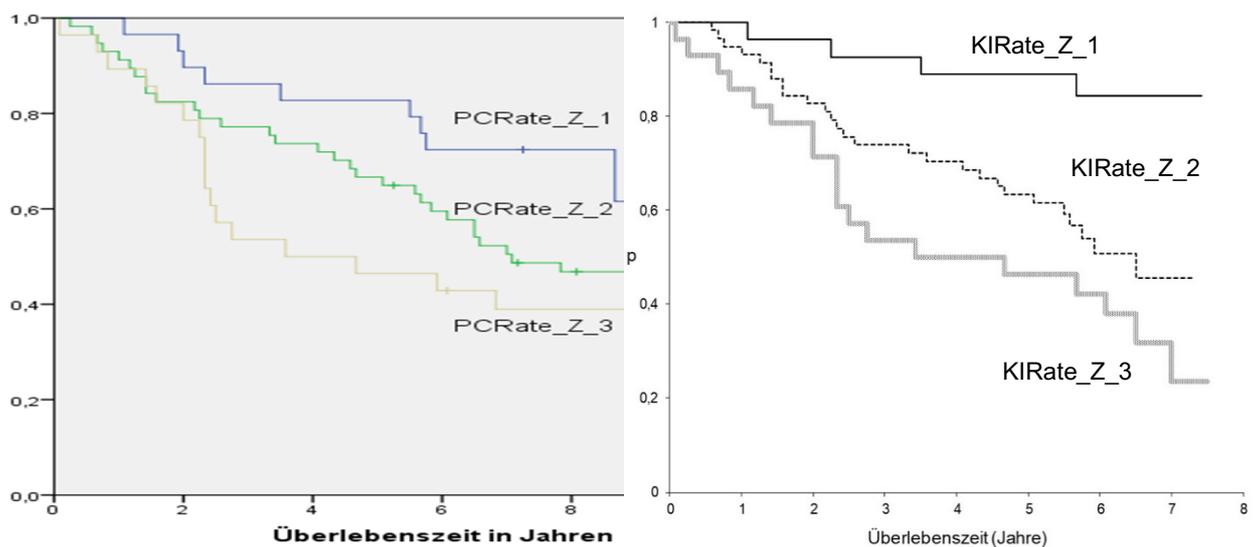


Abb. 4.5.3.1: Gegenüberstellung der Überlebenskurven für die quantitative Auszählung der PCNA-Expression (PC Rate Z, links, diese Arbeit) und der Ki-67-Expression (KI Rate Z, rechts, eigenes Projekt) für einen 8-Jahres-Verlauf

5. Diskussion

5.1 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Brustkrebs ist insbesondere in Mitteleuropa und den USA die mit ca. 30% aller Fälle mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen; weltweit liegt der Anteil mit ca. 24% etwas niedriger, aber immer noch sehr hoch (Bray et al. 2019). Allein schon die Zahlenangabe eines Lebensrisikos von ca. 1:8, das für Deutschland (RKI 2019) und Mitteleuropa angegeben wird, lässt erkennen, wie epidemiologisch gravierend diese Erkrankung insgesamt ist.

Aufgrund der hohen Fallzahlen sterben insgesamt viele Frauen an einem Mammakarzinom, obwohl die Prognose dieser Tumorentität inzwischen weit überdurchschnittlich gut ist. Die aktuellen Daten der deutschen Krebsstatistik (RKI 2019), in denen die Fälle der Jahre 2015 und 2016 zusammengefasst sind, zeigen, dass das 5-Jahres- und das 10-Jahres-Überleben aller Tumorfälle bei Frauen bei 58% bzw. 47% liegt, während Frauen mit Mammakarzinomen inzwischen 79% bzw. 66% erreichen. Damit liegt das Mammakarzinom bei insgesamt in die Statistik aufgenommenen ca. 30 Entitäten bezogen auf Tumoren von Frauen auf Platz 4 hinter nicht-melanotischem Hautkrebs, malignen Melanomen und Schilddrüsenkarzinomen und im Wesentlichen gleichauf mit dem M. Hodgkin. Dieses scheinbar günstige Ergebnis darf aber nicht vergessen machen, dass dennoch 18.570 Frauen im Jahr 2016 an einem Mammakarzinom verstorben sind, also der Einwohnerzahl einer deutschen Kleinstadt entsprechend.

Die Stellschrauben, anhand derer eine weitere Verbesserung der Prognose von Mammakarzinomen gelingen könnte, orientieren sich zum einen an beeinflussbaren Prognosefaktoren und an besseren, spezifischeren Therapeutika. Nur bei den Frauen, die bekannte Keimbahnmutationen für ein Mammakarzinom aufweisen, wäre darüber hinaus auch eine Primärprophylaxe über operative Eingriffe denkbar. Marker, die vor einem Manifestwerden eines Tumorleidens über Blut-, Speichel- oder Urintests auf der Basis der Bestimmung freizirkulierender Tumor-DNA oder tumorspezifischer Proteine nachgewiesen werden können, gibt es bislang noch nicht für die klinische Routine.

Von den Prognosefaktoren sind allerdings die meisten nicht von außen beeinflussbar. Tumortyp, Tumordifferenzierung, Ausstattung mit morphologisch oder molekular zu erhebenden prädiktiven Markern und die Empfindlichkeit des Tumorgewebes gegen Hormone, Immuntherapeutika oder Chemotherapeutika sowie die Strahlensensibilität folgen der individuellen Tumorbilogie, die man nicht steuern kann.

Nur beim Tumorstadium, das allerdings wiederum den wichtigsten Prognosefaktor darstellt, sind über die Zeit Verbesserungen der Prognose zu erreichen gewesen. Dies liegt insbesondere daran, dass letztendlich eine Korrelation zwischen Größe des Primärtumors und dem Risiko einer Lymphknoten- und / oder Fernmetastasierung besteht. Zahlen aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart an ca. 750 Fällen unterstützen diese Annahme (Scheurer et al. 2013): Während Mammakarzinome im Lymphknotenstadium pN0 im Durchschnitt ca. 17,5 mm groß waren, maßen diejenigen mit Lymphknotenbefall im Durchschnitt 23,1 mm (ausschließlich Sentinel-Befall) bzw. 24,7 mm (auch Non-Sentinel-Befall). Bedenkt man, dass Patientinnen mit einem positiven Nodalstatus eine vier- bis achtmal höhere Mortalität aufweisen als solche mit einem negativen Nodalstatus (Soerjomataram et al. 2008), so wird klar, wie wichtig es epidemiologisch ist, die Quote von Fällen im Stadium pN0 gegenüber pN1-pN3 zu erhöhen, und wie wichtig es für die individuelle Patientin ist, selber im Stadium pN0 diagnostiziert zu werden.

Sicher ist in diesem Zusammenhang sehr hilfreich, dass in den letzten Jahrzehnten die Teilnahme von Frauen an gynäkologischen Vorsorgemaßnahmen gestiegen ist und dass auch die Selbstpalpation der Brust für viele Frauen heute eine Normalität darstellt. Insgesamt belegen Studien, dass Primärtumoren der Mamma in den letzten 40 Jahren im Durchschnitt kleiner diagnostiziert werden. So konnte in einem Projekt der Universitätsfrauenkliniken in Berlin und München an zwei Kollektiven von jeweils mehr als 800 Patientinnen gezeigt werden, dass die mittlere Tumorgröße 1981-1985 noch bei knapp 25 mm lag, 1986-1990 aber nur noch bei 20,5 mm (Harms et al. 2004). Aktuelle Zahlen vom Tumorzentrum München aus den Jahren 1998 bis 2016, die sich auf mehr als 66.000 Fälle beziehen, lassen aber erkennen, dass inzwischen keine weitere signifikante Verringerung der Tumorgröße mehr zu erwarten ist (Tumorregister München 2018).

Als mediane Tumorgröße wurde dort für die Jahre 1998-2014 ein Wert von jeweils 18 mm angegeben, für 2015 und 2016 dann von 17 mm, so dass jetzt ein gewisses Plateau eingetreten zu sein scheint. In der Interpretation dieser Daten sei auf Achterfeld (2019) verwiesen, die folgerte, "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", jedenfalls nicht auf der Basis heute zur Verfügung stehender klinisch-bildgebender Abläufe.

5.2 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom als prädiktive Marker

Der wirklich weitere Verlauf einer Tumorerkrankung lässt sich naturgemäß nicht sicher voraussagen, auch nicht durch Prognosefaktoren, die aus den Krankengeschichten vieler früherer Patienten abgeleitet werden. Sie helfen aber, einen möglichen Krankheitsverlauf statistisch valide zu schätzen. Dabei bleibt ihre Aussagekraft immer relativ und bildet letztendlich nur Wahrscheinlichkeiten ab. Prognosefaktoren, die einen bestimmten Verlauf eindeutig anzeigen, gibt es beim Mammakarzinom nicht. Dies gilt selbst für die Komponenten des TNM-Stadiums, die als die stärksten Prognostikatoren gelten: Es gibt nämlich durchaus Fälle, in denen Frauen mit einer Konstellation als T1N0 Metastasen bekommen und früh sterben, und ebenso Fälle, in denen sich trotz eines Stadiums von z.B. T4N2 ein Langzeitüberleben ergibt. Diese scheinbar paradoxen Verläufe sind letztendlich Ausdruck der Individualität des jeweiligen Tumorgewebes in der Zusammenschau mit Patientenfaktoren wie z.B. immunologischer Parameter.

Prognosefaktoren dienen bei Mammakarzinomen aber nicht allein dem Ziel, etwas über die Überlebenswahrscheinlichkeit oder die Länge eines rezidivfreien Intervalls auszusagen, sondern haben zumindest teilweise auch prädiktiven Charakter. Dies bedeutet, dass von ihrer Konstellation therapeutische Entscheidungen abhängig gemacht werden, da sie vor der Gabe entsprechender Medikamente Aufschluss über das Ansprechen des Tumors auf eine bestimmte Therapieform und den zu erwartenden Krankheitsverlauf geben können. Dies gilt sowohl für das Stadium des Primärtumors

bzw. die Tumorgröße, als auch für die Hormonrezeptorexpression und den Her-2/neu-Status.

Die Proliferationsrate, die in dieser Arbeit angesprochen wird, war bisher noch nicht wirklich prädiktiv, was Therapieplanungen betrifft. In letzter Zeit wird aber in manchen Fällen zwischen der Diagnosesicherung per Stanze und der operativen Therapie eine medikamentöse Therapie mit Letrozol begonnen, einem Aromatasehemmer, mit welchem die basierte Umwandlung von Androgenen in Östrogen gehemmt werden soll. Diese Medikation soll sich proliferationshemmend auf das Tumorgewebe auswirken; folgerichtig wird in solchen Fällen dann seitens der Frauenkliniken nach einer erneuten Bestimmung der Proliferationsrate und nach dem Vergleich der beiden Werte in der Stanze und im Resektat nachgefragt.

Klar ist, dass auch die Prognosemarker dem ständigen wissenschaftlichen Wandel unterliegen. So sind heute immunhistochemische Marker wie CD44 oder p53 nicht mehr oder kaum noch in Verwendung. Gleiches gilt für die inzwischen fast obsolet gewordene Bestimmung von uPa/PAI-1, die aufgrund der Tatsache, dass sie unter Einhaltung einer Kühlkette an Frischmaterial durchgeführt werden musste, sehr aufwendig war. Hinzu gekommen sind auf der anderen Seite erste Parameter und Tests, die Informationen über molekularpathologischen Eigenschaften des Tumors geben. Diese werden sicher in der Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen, sofern sie Informationen bieten, die über die der klassischen Größen hinausgehen. Darauf wird unten noch eingegangen.

5.3. Diskussion eigener Ergebnisse

Allgemeine Prognosefaktoren

Um eine möglichst genaue Aussage über die Prognose und Therapie der an Brustkrebs erkrankten Patientin treffen zu können, macht es Sinn, verschiedene Parameter zusammenzuziehen und gemeinsam auf die Prognose der Patientin zu beziehen. Die Ermittlung dieser Faktoren, prä- und postoperativ, sollen eine Einschätzung zur Prognose geben und helfen, die richtige Therapie für die Patientin zu finden.

Das Mammakarzinom wird gemäß der TNM-Klassifikation nach Größe (pT), Lymphknotenstatus (pN) und Metastasierung (pM) gemäß den aktuellen Kriterien der UICC-Klassifizierung in verschiedene Stadien eingeteilt. Diese Klassifikation ist nach wie vor wichtigster Ausgangspunkt für Prognostik und Therapieempfehlungen; sie zeigt im Grunde an, welche "Wegstrecke" der Tumor seit seiner Entstehung bereits zurückgelegt hat. Auch in unserer Studie erwiesen sich die Variablen der TNM-Klassifikation als prognostisch besonders aussagekräftig.

In der univariaten Analyse war der Nodalstatus mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,0001$ derjenige Einzelparameter, der auf das Gesamtüberleben bezogen die höchste Signifikanz aufwies und aufgrund dessen auch in der multivariaten Analyse als erster Faktor in das Cox-Modell aufgenommen wurde. Die Tumorgröße (pT) korrelierte in der univariaten Analyse mit $p = 0,0026$ ebenfalls signifikant mit dem Gesamtüberleben. Die postoperative Tumorgröße (pT) fand auch als dritter aufgenommener Faktor multivariat im Cox-Modell Berücksichtigung. Dies bedeutet, dass die Tumorgröße, obwohl sie im unmittelbaren Zusammenhang mit dem Risiko der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen steht, dennoch einen eigenen zusätzlichen prognostischen Wert aufweist. Dass Patientinnen, die bereits bei Diagnosestellung Fernmetastasen aufweisen (pM1), im Schnitt schlechter abschneiden als Patientinnen ohne Fernmetastasen (pM0), erwies sich auch in unserer Studie als prognostisch signifikant ($p = 0,0016$), hat aber bei der erfreulicherweise geringen Zahl von pM1-Fällen keine praktische Bedeutung für die Studie.

Das aus allen drei Einzelgrößen ermittelte postoperative Tumorstadium (pTNM) korrelierte mit $p < 0,0001$ signifikant mit dem Gesamtüberleben. Die Ergebnisse unserer Studie bestätigen somit die Aussagekraft und die Bedeutung der klassischen Prognoseparameter und kommen somit auch einer Qualitätskontrolle unseres Patientenkollektivs gleich.

Das histomorphologische Grading, modifiziert nach Elston und Ellis (1991), gibt an, wie gut bzw. wie schlecht ein Tumor differenziert ist und kann ein wenig als Parameter für die "Geschwindigkeit" angesehen werden, mit dem der Tumor seine oben angesprochene Wegstrecke geht. In unserer Arbeit war das Grading (G) mit $p = 0,0010$ sowohl bei der univariaten als auch bei der multivariaten Analyse signifikant und wurde im Cox-Modell berücksichtigt.

Die Kernpleomorphie (KP) ($p = 0,0251$) und die Mitoserate (MIT) ($p = 0,0003$) sind bei der univariaten Analyse ebenfalls signifikant und mit dem Gesamtüberleben korreliert. Die tubuläre Differenzierung (TD) wies hingegen zwischen den drei Gruppen mit einem Wert von $p = 0,1721$ keine statistische Signifikanz auf. Der graphische Verlauf der Kurven lässt aber erahnen, dass eine mäßige (10-75% = Score 2) und einer geringe (<10% = Score 3) Tubulusausbildung mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Die Ergebnisse belegen insgesamt, dass nach wie vor auch die morphologische Analyse der Tumoreigenschaften in der Mikroskopie einen gehörigen Wert in der Prognostik hat. Auch dieser prognostischen Aussage kommt unter anderem ein Wert in der Qualitätskontrolle des Patientenkollektivs zu.

Die Erhebung des Hormonrezeptorstatus ist ebenfalls unerlässlich für die Therapieentscheidung und Prognoseabschätzung. In unserer Studie war ein positiver Progesteronrezeptorstatus mit einem besseren Gesamtüberleben in der univariaten Auswertung korreliert ($p = 0,0142$). Auch in der multivariaten Analyse wird der Progesteronrezeptorstatus als zweiter Faktor in das Cox-Modell aufgenommen und zeigt damit deutlich die Relevanz als Prognosefaktor. Die wahrscheinlichste Erklärung für seine auch multivariate prognostische Bedeutung ist die nur geringe Korrelation mit dem Lymphknotenstatus. Obwohl es keine direkt gegen den Progesteronrezeptor gerichtete antihormonelle Therapie gibt, ist die besondere prognostische Bedeutung seiner Bestimmung inzwischen akzeptiert und wurde in fünf großen Kohortenstudien universitärer süddeutscher Brustzentren (Freiburg, Heidelberg, Tübingen, Erlangen, München) an fast 8.000 Fällen bestätigt (Salmen 2014, Salmen et al. 2014). Der Östrogenrezeptorstatus zeigte zwar in den Überlebenskurven einen erkennbaren graphischen Trend zur besseren Prognose bei Positivität, das Ergebnis war aber univariat nicht signifikant ($p = 0,1187$). Multivariat wurde der Östrogenrezeptor nicht aufgenommen. Klinisch verfügt der Östrogenrezeptorstatus aber über große Bedeutung, da etwa zwei Drittel aller Mammakarzinome unter dem Einfluss von Östrogen wachsen und die Bestimmung des Hormonstatus wichtig ist für die Entscheidung zu einer Hormontherapie mit Antiöstrogenen (Liedtke et al. 2018, Thill et al. 2019).

Die Auswertung der Hormonrezeptoren erfolgte in dieser Studie nach der biochemischen Methode an Frischmaterial; im Trend ergaben sich aber für die immunhistochemischen, heute üblichen Auswertungen ähnliche Resultate, die aber hier

wiederum unter der Maßgabe der Vermeidung von Zweitverwertungen nicht präsentiert werden können. Aus dem gleichen Grund kann auch die Auswertung von Her-2/neu nicht Gegenstand dieser Studie sein.

PCNA als Prognosefaktor

Sowohl bei Zählung als auch bei Schätzung der PCNA-Expression in drei Gruppen ergaben sich jeweils gut voneinander getrennte Überlebenskurven, die für die Schätzung auch statistisch signifikant unterschiedlich waren ($p = 0.0116$). Es zeigte sich bei beiden Auswertemethoden, dass die Patientinnen mit einer geringeren Anzahl an PCNA-positiven Zellen ein höheres Gesamtüberleben aufwiesen als Patientinnen mit mittlerer und hoher PCNA-Expression.

Die hier erprobte alternative Verwendung von PCNA und auch die mit durchgeführte quantitative Auswertung belegte zwar in der univariaten Überlebensanalyse eine gewisse prognostische Relevanz, die aber multivariat nicht bestätigt werden konnte. In der multivariaten Analyse werden beide PCNA-Auswerteverfahren nicht aufgenommen ($p > 0,10$, dem Grenzniveau für eine Aufnahme), so dass PCNA gegenüber den zuvor aufgenommenen Variablen keine entscheidenden Aspekte mehr zur Gesamtprognose beitragen konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man mit einer Zählung oder Schätzung der PCNA-Expression zu univariaten prognostischen Aussagen gelangen kann, die sich zumindest in sich unterscheidenden Überlebenskurven niederschlagen. Die Parameter waren aber insgesamt zu schwach und auch zu hoch mit Komponenten des Gratings korreliert, um in der multivariaten Analyse im Cox-Modell berücksichtigt werden zu können.

Ohne auf die Daten für Ki-67 einzugehen, lässt sich hier kurz festhalten, dass man mit diesem Marker prognostisch bessere Ergebnisse am gleichen Patientengut belegen konnte, ebenso mit der Quantifizierung der Mitoserate. Da an der Ki-67-Studie selber keine Reproduzierbarkeitsaspekte untersucht wurden, können die nachträglich vorgenommenen Untersuchungen hierzu zum Vergleich mit PCNA herangezogen werden, ohne dass sie das Zweitverwertungsproblem berühren würden.

Die an 20 identischen Fällen erhobenen Daten zeigen, dass die PCNA-Expression im Durchschnitt geringer war als die von Ki-67. In der ersten Auswertung lag der Mittelwert für PCNA bei 6,0%, in der zweiten bei 5,2%, während sich bei Ki-67 Werte von 11,5% und 13,1% ergeben hatten. Der Korrelationskoeffizient beider Messreihen war jeweils gut und lag für PCNA bei $r = 0,906$ und für Ki-67 bei $r = 0,811$. Entsprechend ergaben sich für PCNA etwas höhere Korrelationen und damit eine bessere Reproduzierbarkeit als für Ki-67. PCNA hat somit in unserer Studie eine höhere Reliabilität als Ki-67, aber eine geringere Validität bezüglich der prognostischen Aussagekraft. Der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Markern lag für die Erstbestimmung bei $r = 0.60$.

5.4 PCNA-Expression als prognostischer Marker: Literaturüberblick

Im Folgenden sollen die mit der immunhistochemischen Bestimmung der PCNA-Expression gemachten Erfahrungen in den Zusammenhang der Literatur gestellt werden. Dabei soll zunächst auf Mammakarzinome, danach auf andere Tumorentitäten eingegangen werden.

Mammakarzinome

Der Stand der Literatur zur PCNA-Expression beim Mammakarzinom wurde 2008, also drei Jahre, bevor diese Studienauswertung ursprünglich konzipiert wurde, in einem Review zusammengefasst (Stuart-Harris et al. 2008). Dabei wurden insgesamt 11 Studien seit 1993 herangezogen, in denen 2.677 Fälle untersucht worden waren. Acht der Arbeiten enthielten Aussagen zur Überlebensanalyse ("*overall survival*") und damit zur Prognose. Univariat wurde in sieben Studien ein positiver Einfluss einer geringen gegenüber einer hohen PCNA-Expression im Tumorgewebe auf die Prognose nachgewiesen, in einer nicht. Multivariat wurde in fünf Studien ein positiver Effekt gesehen, in zweien nicht¹, und in einer Studie waren keine Angaben zu multivariaten Analysen gemacht. Die lediglich drei Arbeiten, die auch zum krankheitsfreien Intervall ("*disease-free survival*") Stellung nahmen, zeigten jeweils eine positive univariate und multivariate prognostische Relevanz. Die Interpretation der Daten weist also ins-

¹ In der Arbeit von Stuart-Harris et al. (2008) sind die multivariaten Ergebnisse einer Studie (Schöndorf et al. 2004) falsch wiedergegeben, und zwar als multivariat nicht signifikant, während sie in der Arbeit selber als signifikant angegeben worden sind. Diese Korrektur ist in den obigen Text eingearbeitet.

gesamt auf einen positiven, aber wohl eher schwachen Einfluss einer geringen PCNA-Expression auf die Prognose beim Mammakarzinom hin; hierfür spricht auch die recht niedrige Hazard-Ratio von 1.38 (nach *trim-and-fill*-Adjustierung, siehe hierzu Duval und Tweedie 2000). Dabei sind allerdings immer die Spezifika der einzelnen Arbeiten zu bedenken, sowohl bezogen auf die Wahl der Patientengruppe, als auch auf die Aufteilung der Patienten nach der PCNA-Expression der Tumoren und andere methodische Aspekte. Beispielsweise bezieht sich eine japanische Arbeit mit Darstellung eines positiven Einflusses der PCNA-Expression rein auf Tumoren im Stadium pN0 (Kato et al. 2000). Die Identifikation von pN0-Fällen mit eher schlechter Prognose könnte durchaus zu einer Modifikation der zu planenden adjuvanten Therapien führen. In einer anderen Arbeit wiederum, die univariat keinen signifikanten Einfluss der PCNA-Expression zeigte, dürfte bei $p = 0.07$ aber immerhin ein graphischer Trend zu erkennen gewesen sein; die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven wurden aber nicht präsentiert, vermutlich weil PCNA auch nur einen "Nebenschauplatz" der Studie repräsentierte (Bukholm et al. 2003). Nicht berücksichtigt in dem Review war eine Arbeit an allerdings nur 50 Fällen, in denen sich in den Kaplan-Meier-Kurven ein starker univariater prognostischer Einfluss zeigte (Yang et al. 2007); in einer multivariaten Analyse wurde PCNA aber dort nicht aufgenommen.

Speziell mit Mammakarzinomen beim Mann befassten sich zwei Arbeiten aus der gleichen Arbeitsgruppe mit 27 bzw. 34 Fällen, in der der PCNA-Expression jeweils univariat eine prognostische Bedeutung zukam ($p < 0.002$), während multivariat nur die p53-Expression und die AgNOR-Verteilung im Cox-Modell aufgenommen wurden (Pich et al. 1994, Pich et al. 1996). Zu vermuten ist, dass die Patientengruppen überwiegend identisch waren; die jüngere Arbeit nimmt aber nicht auf diese Frage Bezug.

In einer aktuellen Arbeit mit vorwiegend radiologischer Zielrichtung (Qiu et al. 2020) wurde an 60 Fällen von Mammakarzinomen u.a. herausgestellt, dass der Prozentsatz von Tumorzellen, die für PCNA, Ki-67 oder Cox-2 positiv waren, unabhängig vom Alter der Patientin und von Variablen des Tumorstadium exprimiert wurden. Die PCNA-Expression war korreliert mit der Positivität für p53 ($p < 0.05$) und für HER-2/neu ($p < 0.01$).

Eine eigentliche prognostische Aussage wurde nicht getroffen, da es sich um aktuelle diagnostische Fälle handelte, die mithilfe des DCE-MRI abgeklärt wurden. In einer früheren Arbeit aus der gleichen Arbeitsgruppe (Qiu et al. 2017) mit einem Schwerpunkt auf der mammographischen Karzinomdiagnostik (n = 90) waren die drei Marker ebenfalls angewandt worden, wobei sich dort für PCNA eine signifikante Korrelation mit dem Stadium (I/II vs. III) und mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen ergeben hatte.

Andere Tumorentitäten

Im Folgenden sollen aktuellere klinisch-prognostische Arbeiten zur PCNA-Expression bei wichtigen Tumorentitäten besprochen werden, und zwar beim kolorektalen Karzinom, beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, beim Magenkarzinom und beim Zervixkarzinom.

Eine aktuelle Meta-Analyse zu PCNA-Anwendungen am kolorektalen Karzinom liegt bezogen auf 14 verschiedene Studien aus dem Jahr 2018 aus China vor (Zhou et al. 2018). Bezogen auf 1.372 Patienten war eine hohe PCNA-Expression sowohl in älteren Arbeiten aus den 90er Jahren, als auch in aktuellen Studien von 2016 bis 2017 (Li et al. 2016, Ye et al. 2016, Ho et al. 2017) statistisch signifikant mit niedrigen Überlebensraten sowohl bezogen auf das allgemeine Überleben ($p < 0,001$), als auch bezogen auf Tumor-spezifische Tumorursachen ($p < 0,037$), wohingegen keine klare Assoziation mit dem krankheitsfreien Intervall bestand ($p > 0,05$). Die Autoren schlussfolgerten, dass die Bestimmung der PCNA-Expression als zuverlässiger Prognosemarker dienen könnte. Offenbar hat sich über den langen Zeitraum der berücksichtigten Studien von ca. 20 Jahren kein wesentlicher Effekt durch Wandel in den Therapien eingestellt, durch den die Aussagekraft der PCNA-Expression wesentlich beeinflusst worden wäre. Methodisch gaben sie allerdings zu bedenken, dass die Grenzwerte für "hohe" im Vergleich zu "niedriger" Expression von PCNA innerhalb der Studien nicht vergleichbar waren.

Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom wurde in einer knapp 300 Fälle umfassenden Arbeit aus dem Jahr 2020 ein Dreifachansatz zur PCNA-Analyse vorgenommen, nämlich immunhistochemisch, per Western Blot und per RT-PCR (Ye et al. 2020), so dass hier auf morphologischer Ebene, auf Proteinebene und auf der Ebene der m-

RNA parallel untersucht wurde. Die immunhistochemische PCNA-Expression (niedrig vs. hoch) war univariat signifikant mit dem Überleben der Patienten korreliert. Im multivariaten Cox-Modell erwies sich aber die Proteinexpression des Western Blots als diejenige PCNA-basierte von Methode hoher prognostischer Aussagekraft, gefolgt vom Tumorstadium und vom Tumorgrading. In einer früheren Arbeit war kein prognostischer Einfluss von PCNA auf das Überleben von Lungenkrebspatienten gesehen worden, wobei allerdings in dieser Studie nur Adenokarzinome und überwiegend die eigentlich seltenen Frühstadien berücksichtigt worden waren; 145 der 183 Patienten (= 79,3%) befanden sich im Stadium I (Oka et al. 2011).

Beim Magenkarzinom (Hu et al. 2017) wiederum zeigte sich zum einen eine diagnostische Anwendungsmöglichkeit der PCNA-Immunhistochemie. Während reaktive (11,53% +/- 3.38%) und dysplastische Läsionen (14,34% +/- 4.71%) im Mittelwert (+/- SD) niedrige PCNA-Raten aufwiesen, lagen diese bei Magenkarzinomen etwa drei- bis viermal so hoch (44.50% +/- 9.85%) ($p < 0.0001$). Zum anderen wurde prognostisch ausgewertet; dabei waren die Tumorausdehnung pT, die PCNA-Expression und die E-Cadherin-Expression im Cox-Modell multivariat relevante prognostische Faktoren. Diese prognostischen Ergebnisse stehen dabei aber im Widerspruch zu einer großen, mehr als 800 Patienten umfassenden Studie (Lee et al. 2003), in denen die PCNA-Expression (Grenzwert: 50%) in zwei Gruppen nur marginale Überlebensunterschiede zeigte. In der multivariaten Überlebensanalyse war dort nur das pTNM-Stadium relevant, nicht hingegen Tumorgröße, Tumortyp, Laurén-Klassifikation, PCNA-Expression und verschiedene weitere immunhistochemische Marker. Ähnlich hatte bereits in der Anfangszeit der PCNA-Immunhistochemie eine Arbeit an 90 Fällen keine prognostischen Unterschiede herausarbeiten können (Mangham et al. 1994).

Als viertes Beispiel einer häufigen Tumorentität soll auf das Zervixkarzinom eingegangen werden. Hierzu wiederum liegt ähnlich wie bei den kolorektalen Karzinomen eine Metaanalyse vor, die sich hier auf 15 Studien bezieht (Lv et al. 2016). Es zeigte sich für die PCNA-Expression eine hohe Hazard-Ratio von 4.41, die damit annähernd so hoch war wie die des FIGO-Stadiums mit 4.48; die Autoren gehen insgesamt davon aus, dass die PCNA-Expression hoch mit dem FIGO-Stadium korreliert sein dürfte, ohne dieses abschließend an Zahlen belegen zu können. Falls diese Annahme stimmte, so wäre allerdings davon auszugehen, dass die PCNA-Expression multivariat keine große Bedeutung hätte bzw. ihre Erhebung nicht nötig wäre, da das FIGO-

Stadium der Patientin ohnehin am Ende der morphologischen und bildgebenden Untersuchungen vorliegt. Anders wäre es, wenn die beiden Variablen weniger hoch korreliert wären - dann wäre eher von einem ergänzenden prognostischen Effekt auszugehen.

Auch diagnostische Anwendungen wurden versucht; dazu wurden Ki-67 und PCNA sowohl an gynäkologischen Ausstrichpräparaten (Goel et al. 2005), als auch an histologischen Präkanzerosen (Goel et al. 2013) angewandt: Bei den Ausstrichpräparaten wurde eine lineare Zunahme der Ki-67- und der PCNA-Positivität mit zunehmenden Grad der CIN-Läsion bis hin zu einem Karzinom gefunden, Vergleichbares galt in der Histologie. Es wäre somit denkbar, Ki-67 oder PCNA zur Objektivierung des Grades von CIN-Läsionen einzusetzen, sofern sich hierfür eine klinische Rationale ergäbe.

Weitere Publikationen zu anderen Tumorentitäten oder Präkanzerosen sollen hier nicht besprochen, sondern lediglich exemplarisch genannt werden. So existieren beispielsweise Arbeiten bzw. Metaanalysen und Reviewartikel zu malignen Gliomen (Lv et al. 2015 [Metaanalyse]), zu oralen Dysplasien bzw. zum oralen Lichen ruber (Chiang et al. 2000, da Silva Fonseca et al. 2001), zu Mundhöhlenkarzinomen (Myoung et al. 2006), zu invertierten Papillomen der Nasennebenhöhlen (Mumbuc et al. 2007), zu Larynxkarzinomen (Saraç et al. 1998), zu Ösophaguskarzinomen (Dabrowski et al. 2001), zu Nierenzellkarzinomen (Tejido Sánchez et al. 2001), zu Osteosarkomen (Wang et al. 2017 [Metaanalyse]) und Leberzellkarzinomen (Ma et al. 2016 [Review]), jeweils mit klinisch bzw. prognostisch Bezügen und in den meisten der Artikel auch PCNA-bezogenen aussagekräftigen Resultaten.

5.5 Proliferationsmarker im Vergleich: Mitoserate, Ki-67 und PCNA

Die Quantifizierung der Mitoserate ist die älteste und vom Laboraufwand einfachste Methode, um Aussagen über die Proliferation eines Gewebes zu gewinnen. Dabei müssen allerdings methodische Aspekte bedacht werden, die im täglichen klinischen Alltag aber nicht durchgehend berücksichtigt werden. Dabei geht es insbesondere darum, dass die bereits in den 80er Jahren grundlegend dargestellten methodischen Anforderungen an die Mitosequantifizierung nicht immer eingehalten werden. Damals hatte eine Arbeitsgruppe aus den Niederlanden klare und auch anerkannte Vorgaben gemacht, wie man Mitosefiguren definiert und gegenüber beispielsweise Apoptosen abgrenzt und in welchen Tumorbereichen man Mitosen zählen (bzw. bei semi-

quantitativer Auswertung schätzen) soll (Baak et al. 1985). Außerdem ist das Bewusstsein dafür geschärft worden, dass die Gesichtsfeldgröße bei der Mitosequantifizierung angegeben werden muss bzw. dass gewonnene Werte auf eine Standardgröße hin adjustiert werden müssen (Ellis und Whitehead 1981, Biesterfeld 1997, Tan und Ellis 2019). Die Bezugnahme auf die Gesichtsfeldgröße des mikroskopischen Vergrößerungssystem hat inzwischen auch Eingang in die Modifikationen des morphologischen Gratings (Elston und Ellis 1991) und in die WHO-Klassifikation für Mammakarzinome gefunden (Rakha et al. 2019), weswegen ihre Anwendung im Grunde verbindlich ist. Heute stellt die semiquantitative Bestimmung der Mitoserate einen wichtigen Pfeiler im morphologischen Grading dar. In diversen Studien ist darüber hinaus auch ihre prognostische Relevanz als einzelne Variable beim Mammakarzinom belegt.

Die Mitoserate wird üblicherweise am ohnehin routinemäßig vorliegenden HE-Schnitten bestimmt. Es ist aber prinzipiell auch möglich, Mitosen mit relativ hoher Spezifität immunhistochemisch darzustellen, und zwar mit einem Antikörper gegen Phosphohiston H3 (PHH3). Der Vorteil wird von denjenigen, die diesen Marker wissenschaftlich erprobt haben, in der geringeren Zeit gesehen, die man für die Mitosequantifizierung bräuchte (Voss et al. 2015). Die Korrelationen zwischen dem HE-basierten Zählen und der Auswertung an den immunhistochemischen Präparaten wurden in Studien als gut angesehen, bezogen auf Korrelationskoeffizienten bzw. Kappa-Werte, auch in einer Arbeit an Mammakarzinomen (Zbytek et al. 2013). Eine Arbeitsgruppe aus Utrecht, die sich schon lange mit Mitosen in der Tumorpathologie befasst, fand bei Mammakarzinomen aktuell für die PHH3-Immunhistochemie einen höheren Stellenwert als für Ki-67 oder die HE-basierte Mitosequantifizierung; auch die interspezifische Reproduzierbarkeit erwies sich als etwas höher (Cui et al. 2015, van Steenhoven et al. 2020). Dennoch wird aber in der Routineanwendung PHH3 kaum zum Einsatz kommen, sowohl aus Kostengründen, als auch sicher aus der Gewohnheit der Pathologie heraus, die sich seit Jahren auf Mitosezählung bzw. -schätzung, ergänzt durch einen Proliferationsmarker, im Grunde verlässt. Außerdem ließ sich in einer größeren Meta-Analyse über diverse Tumorentitäten nicht klar ein allgemeiner prognostischer Vorteil der PHH3-Immunhistochemie gegenüber der konventionellen Methode belegen (Hao et al. 2018).

Als Alternative oder als Ergänzung zur Mitosezählung werden als Proliferationsmarker insbesondere Paraffin-gängige Antikörper gegen das Antigen Ki-67 eingesetzt, die in

der Literatur und im täglichen diagnostischen Betrieb ebenfalls als Ki-67 oder als MIB-1 bezeichnet werden. Die Eignung der Mitoserate und der Ki-67-basierten Proliferationsrate in der Prognostik des Mammakarzinoms ist in der Literatur bezüglich der Validität verschiedentlich gut belegt; hierzu kann auf eine Meta-Analyse von Petrelli et al. (2015) verwiesen werden, in der auf 41 Arbeiten mit insgesamt mehr als 64.000 Patientinnen eingegangen wurde. Aus 25 Arbeiten ließen sich dabei Daten zum allgemeinen Überleben ableiten. Die gepoolte *Hazard Ratio* (HR) im Vergleich "hoher" zu "niedrigen" Ki-67-Werten lag bei 1,57 ($p < 0,000001$). Bezogen auf 29 Arbeiten, die sich mit dem Rezidiv-freien Überleben befassten, betrug die gepoolte HR 1,50 ($p < 0,00001$). Allerdings zeigten die einzelnen HR-Werte starke Schwankungen, nämlich für das allgemeine Überleben von 0,85 (schwacher inverser Effekt) bis 4,20 (starker Effekt) und für das Rezidiv-freie Überleben von 0,94 (kein Effekt) bis 10,92 (sehr starker Effekt). In der aktuellen S3-Leitlinie in der Version 4.3 (Leitlinienprogramm Onkologie 2020) wird diese Studie stärker gewürdigt als noch in der Version 4.0 (Leitlinienprogramm Onkologie 2017): Insbesondere im Kontext mit neueren prospektiven Arbeiten (Nitz et al. 2014, Sonnenblick et al. 2015, Gluz et al. 2016) wird inzwischen eine "ausreichende Evidenz" gesehen, die Ki-67-Proliferationsrate bei ER- und PR-positiven Tumoren, die HER2-/neu-negativ sind, in die Entscheidung über eine adjuvante Chemotherapie mit "einzubeziehen". Worin diese Einbeziehung liegt bzw. wie man sie objektiviert, ist in der S3-Leitlinie aber nicht ausgeführt.

Nur teilweise gelöste Problemfelder liegen auf dem Gebiet der Standardisierung der Immunhistochemie. So ist es bisher noch nicht gelungen, allgemeine Empfehlungen für die Durchführung der Ki-67-Darstellung zu formulieren, mit denen immunhistometrische Messwerte oder manuelle Zählwerte zwischen verschiedenen Laboren vergleichbar würden. Folge davon ist auch in diversen Studien eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen mehreren Pathologen, insbesondere in mittleren Bereich der Ki-67-Expression - gleiches dürfte auch für PCNA und andere zu quantifizierende Marker in gleichem Maße gelten. Dieses hat allgemein damit zu tun und gilt auch für andere für das Mammakarzinom relevante kernbindende Marker wie ER, PR, PCNA oder GATA-3, dass es nicht nur stark gefärbte und ungefärbte Tumorzellkerne gibt, sondern auch Tumorzellen vorkommen, die mittlere oder schwache Intensitäten des immunhistochemischen Signals aufweisen. Es kann daher durchaus vorkommen, dass ein Untersucher eine bestimmte Kernfärbung bereits als "schon positiv" interpretiert, während ein anderer noch auf "noch negativ" entscheidet.

Andererseits zeigen die eigenen Ergebnisse an 20 Fällen, dass hohe Korrelationen zwischen den Zählergebnissen sowohl für Ki-67, als auch für PCNA von $r > 0,8$ (Ki-67) bzw. $r > 0,9$ (PCNA) prinzipiell möglich sind.

In der Arbeit von Petrelli et al. (2015) wird außerdem kritisiert, wie sehr die Grenzwerte zwischen prognostisch "guten", "mittleren" und "schlechten" Gruppen von Studie zu Studie voneinander abweichen und wie willkürlich die Gruppenbildungen waren. Letzterem könnte man allerdings dadurch abhelfen, dass man wie in unserer PCNA-Studie eine Quantilisierung, mit der die Patienten in definiert große Gruppen eingeteilt werden, vorher festlegen würde. In Frage kämen Einteilungen in drei gleich große Gruppen (1:1:1-Quantilisierung) oder in drei Gruppen, in denen in der Mitte doppelt so viele Patienten liegen wie in den beiden randlichen Gruppen (1:2:1-Quantilisierung), so wie es in unserer Studie realisiert wurde. Letzteres Modell ahmt ein wenig das morphologische Grading nach, bei dem erfahrungsgemäß auch deutlich mehr Fälle als G2 eingeordnet werden als im Vergleich dazu als G1 oder als G3. In der hier vorgelegten Studie beispielsweise waren die drei Gradingausprägungen im Verhältnis 22:56:35 verteilt, damit jedenfalls deutlich näher an einem 1:2:1-Modell als an einem 1:1:1-Modell.

Die Ki-67-Immunhistochemie als Ergänzung der semiquantitativ erhobenen Mitoserate wird inzwischen auch von der aktuellen S3-Leitlinie (Leitlinienprogramm Onkologie 2020) empfohlen, wobei aber das in der Einleitung wiedergegebene Konzept des Luminal A und Luminal B aufgegeben worden. Stattdessen wurde in Empfehlung 4.76 eine neue virtuelle Grenze bei 25% Ki-67-Positivität angesetzt, ab der allgemein ausgedrückt "von einem erhöhten Risiko ausgegangen werden kann", während Schätzwerte zwischen 10% und 25% als in ihrer klinischen Bedeutung unklar angesehen werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Die PCNA-Immunhistochemie ist in den S3-Leitlinien zur Proliferationsbestimmung hingegen nicht genannt, ebenso nicht in dem Manual zum Mammakarzinom des Tumorzentrums München, da offenbar, wie oben ausgeführt, seine prognostische Bedeutung hinter der des Ki-67 steht. Dieser Effekt konnte auch in unserer eigenen Studie im Vergleich am identischen Patientenkollektiv (vgl. Kapitel 4.3) bestätigt werden, sowohl bezogen auf den Verlauf der für PCNA aber auch nicht schlechten

Überlebenskurven, als auch für die statistischen Kenndaten. Entsprechend ergibt sich offenbar kein Bedarf am Einsatz dieses Markers in der Routinediagnostik. Auch wird er wesentlich seltener in wissenschaftlichen Studien eingesetzt als Ki-67, wobei auffällt, dass insbesondere relativ viele der in Kapitel 5.4 ausgewerteten jüngeren Publikationen aus China stammen.

Neben methodischen Problemen in der Durchführung der Untersuchungen muss bezüglich der Vergleichbarkeit der drei Variablen bedacht werden, dass sie, soweit bekannt, zwar sich überschneidende, aber doch verschiedene Abläufe im Zellzyklus abbilden. PCNA ist am stärksten in der G₁- und der S Phase vorhanden. Ki-67 wird in der späten G₁-Phase sowie in der S-Phase und der G₂/M-Phase des Zellzyklus exprimiert und ist bei Zellen in der G₀-Phase nicht vorhanden. Mitosen wiederum entwickeln sich in der G₂/M-Phase. Entsprechend blickt man aus verschiedenen Richtungen auf den identischen Zellzyklus, ähnlich wie man bei einem EKG von verschiedenen Blickwinkeln auf den identischen elektrischen Summenvektor schaut. Inhaltlich darf man somit auf der einen Seite starke Kongruenzen zwischen den Ergebnisse der drei Variablen erwarten, darf sich aber auf der anderen Seite nicht darüber wundern, dass es in manchen klinischen Studien auch zu unterschiedlichen Aussagen kommen kann. Hierfür sei als Beispiel eine Arbeit mit dem selbsterklärenden Titel "*Mitotic count can predict tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer patients while Ki67 score cannot*" genannt (Beelen et al. 2018). Wie hoch die drei Variablen korreliert sind, ist dabei nicht allein aus Kappa-Werten und Korrelationskoeffizienten oder p-Werten ablesbar, sondern gut auch aus graphischen Datenverteilungen ("Punktwolkendiagramme"), die auch die Streuungen der Daten besser erkennen lassen. Als ein Beispiel einer solchen Darstellung sollen zwei modifizierte Abbildungen aus Publikationen wiedergegeben werden (Abb. 5.5.1), bei denen die Datenverteilungen zwischen Ki-67 (Abszisse) und PCNA (Ordinate) jeweils hochsignifikant korreliert waren ($p < 0,001$). Inwieweit die dargestellten Signifikanzen inhaltlich glaubhaft sind, muss bei beiden Abbildungen hinterfragt werden - sowohl eine so exzellente Korrelation wie in der Arbeit von Chaloob et al. (2012) als auch die Zuordnung eines hohen Signifikanzniveaus bei großer Streuung der Wertepaare wie in der Arbeit von Rieger et al. (1993) werfen statistische und inhaltliche Fragen auf (Biesterfeld 2021). Im eigenen Patientengut ergab sich zwischen beiden Markern ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,6$ bei ebenfalls nicht unerheblicher Streuung.

Beispiele hochsignifikanter Korrelationen zwischen Ki-67 (Abszisse) und PCNA (Ordinate)

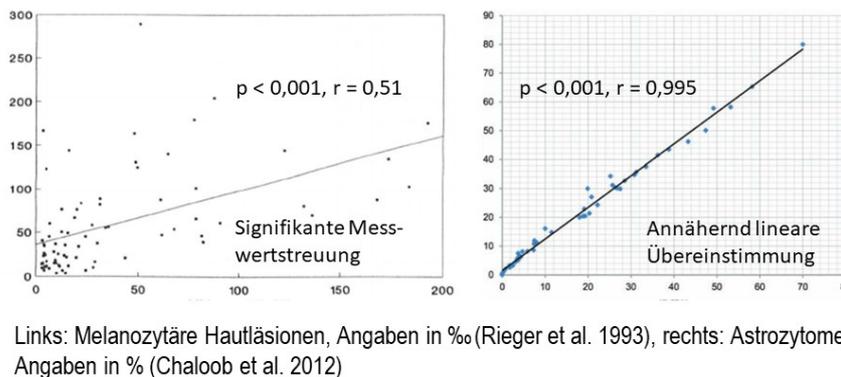


Abb. 5.5.1: Beispiele hochsignifikanter Korrelationen zwischen Ki-67 und PCNA mit fraglicher Relevanz bei sehr großer Streuung (links) bzw. ungewöhnlich hoher Übereinstimmung der Werte (rechts) (Biesterfeld 2021)

5.6. Aktuelle Entwicklungen in der Prognostik des Mamma-karzinoms

Das Risiko eines Rezidivs oder einer Fernmetastasierung lässt sich bis heute nicht für jede Patientin eindeutig bestimmen, ist aber wichtig für Therapieentscheidungen. Dabei unterscheiden viele Prognosefaktoren durchaus zwischen einer Hoch- und einer Niedrigrisikogruppe, dazwischen aber gibt es viele Fälle, denen ein intermediäres Risiko zukommt. Außerdem gibt es, wie oben bereits angesprochen, auch Fälle, die diametral zu dem verlaufen, was man aufgrund des heute bestimmbaren Risikoprofils annehmen würde, beispielsweise Fälle mit Komplettremission nach Chemotherapie, bei denen sich dennoch nach wenigen Monaten eine letztendlich infauste Meningeosis carcinomatosa einstellt, oder Fälle mit hohem Stadium, bei denen im Langzeitverlauf "nie wieder" etwas nachkommt. Entsprechend ist es wichtig, nicht bei dem zu bleiben, was derzeit besteht, sondern weiterzugehen und Neues in der Prognostik zu entwickeln. Dabei müssen neue Entwicklungen auch auf das Ansprechen auf neue Medikamente Bezug nehmen, z.B. aktuell auf die Immuntherapeutika, deren prospektiver Effekt mit der neu entwickelten PDL-1-Immunhistochemie untersucht werden kann. Außerdem sind diese Medikamente bei manchen Tumorentitäten sogar nur bei positiver Immunhistochemie zugelassen.

Ein besonderer Stellenwert wird dabei der molekularen Medizin zukommen, die sich in den letzten Jahren schnell weiterentwickelt hat und aus vielen diagnostischen Abläufen nicht mehr wegzudenken ist. Üblicherweise wird sie dabei nicht statt, sondern in Ergänzung der klassischen Größen eingesetzt. Es wäre auch schwer vorstellbar für die "heutigen" Mediziner, wenn beispielsweise ein PCR-basierter Test eine Aussage über den Lymphknotenstatus träge und eine mikroskopische Analyse nicht mehr für notwendig gehalten würde.

Multigentests

Was in der Mammatumorpathologie derzeit auf diesem Sektor eingesetzt werden kann, sind Multigentests. Sie sollen Aufschluss darüber geben bzw. bei der Entscheidung helfen, ob eine Patientin von einer Chemotherapie profitiert oder von dieser abgesehen werden kann. Entscheidend dafür ist, für wie aggressiv ein Tumor und für wie gut wirksam die zur Diskussion stehende Chemotherapie gehalten wird, also eine Balance zwischen Risiko und Nutzen zu finden. Angewandt werden derzeit im Wesentlichen vier verschiedene, an Paraffinmaterial des Tumors durchführbare Multigentests:

- Oncotype DX®: Untersucht werden 21 verschiedene Gene. Voraussetzung ist, dass der Tumor Hormonrezeptor positiv, nodal negativ und HER2/neu negativ ist und sich im Frühstadium befindet.
Die Zuordnung zu einem Risikoprofil erfolgt dann über die Errechnung eines *Recurrence Scores*, der als Indikator für das Auftreten von Fernmetastasen in den ersten 10 Jahren gilt. Werte unter 18 stehen für ein niedriges Risiko, Werte über 31 für ein hohes.
- Mammaprint®: Bei diesem Test wird die Expression von 70 Genen untersucht und bewertet. Auch hier erfolgt die Einteilung der Patientin in eine Niedrigrisikogruppe und eine Hochrisikogruppe, innerhalb der nächsten fünf oder zehn Jahre an Fernmetastasen zu erkranken. Die Tumoren unterliegen den gleichen Voraussetzungen wie bei OncoType DX. Die internationale Studie Mindacht untersuchte fast 6700 Frauen und teilte sie anhand der Ergebnisse in verschiedene Gruppen ein.
- EndoPredict®: Es werden 8 tumorspezifische Gene untersucht, und zwar drei, die Hinweise auf das Tumorwachstum und auf den möglichen Krankheitsverlauf

der nächsten fünf Jahre geben, sowie fünf, die mit Hormonrezeptoren assoziiert sind und eine Aussage zu dem langfristigen Verlauf liefern sollen. Anwendung findet der Test bei postmenopausalen Frauen, die hormonrezeptorpositiv und HER2/neu negativ getestet wurden und sich im Frühstadium befindet. Das Risiko auf Fernmetastasierung bei alleiniger antihormoneller Therapie und der Nutzen einer Chemotherapie wird unter Einbeziehung der Tumorgöße und des Nodalstatus in prognostischen Scores angegeben, die sich zum einen auf die Langzeitprognose beziehen, aber auch etwas zum Kurzzeitrisko aussagen sollen, in den ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung bei alleiniger endokriner Therapie an Fernmetastasen zu erkranken.

- Prosigna®: Bei diesem Test wird ein 50 Gene umfassender Microarray verwendet, mit dem ein Mammakarzinom in einen von vier Subtypen verschiedener Prognose kategorisiert wird. Ziel des Tests ist, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Fernmetastasen innerhalb von 10 Jahren (unter der Annahme einer fünfjährigen Hormontherapie) zu bestimmen und ist gedacht für postmenopausale Patientinnen in frühen Tumorstadien (pN0 oder bis zu drei befallene Lymphknoten), deren Tumor ER-positiv und HER2/neu-negativ ist.

In der aktuellen S3-Leitlinie (Leitlinienprogramm Onkologie 2020) wird die Anwendung von Multigentests in den Empfehlungen 4.78 und 4.79 allerdings enger gefasst, indem sie ausschließlich für pN0-Fälle als eine ergänzende Untersuchungsoption vorgegeben wird:

"Empfehlung 4.78:

Nur, wenn bei Frauen mit einem ER/PR-positiven, HER2-negativen, nodal-negativen invasiven Mammakarzinom die konventionellen Prognoseparameter einschließlich Ki-67 keine eindeutige Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie erlauben, kann ein methodisch standardisierter und klinisch validierter Multigentest bei der Entscheidung herangezogen werden.

Hinsichtlich des Nutzens der Multigentests besteht jedoch weiterer Forschungsbedarf, da die Studienlage und die Nachbeobachtungszeiten in den vorliegenden Studien noch nichtausreichend sind."

Empfehlung 4.79:

"Wenn ein Multigentest durchgeführt wird, soll nicht mehr als ein Test zur Entscheidungsfindung herangezogen werden."

Zur Begründung sei, da eine genauere Diskussion hier den Rahmen sprengen würde, auf die S3-Leitlinie verwiesen (Kapitel 4.5.4.4, S. 124 ff.). Dabei wird auch auf Bedenken des Institutes für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) Bezug genommen, welche 2016 veröffentlicht worden waren (IQWiG 2016).

In einem Review von Vieira und Schmitt (2018) wurden die Studien, in denen die verschiedenen Multigentests erprobt worden sind, aktuell übersichtlich zusammengestellt. Zusammenfassend kann man sagen, dass heute sowohl Daten aus retrospektiven, als auch zum Teil auch aus prospektiven Studien vorliegen, die aber nicht immer bereits so eindeutig sind, dass Multigentests uneingeschränkt empfohlen werden. Detaillierte ökonomische Überlegungen zu Kosten und Folgekosten bzw. auch -einsparungen für das Gesundheitswesen liegen aktuell aus Großbritannien vor (Harnan et al. 2019).

Ein besonderes Problem stellen allerdings die nur mäßigen Korrelationen dar, die sich zwischen den Multigentests ermitteln ließen. Insbesondere wären hier die Ergebnisse der OPTIMA-Studie (*Optimal Personalised Treatment of early breast cancer using Multiparameter Analysis*) zu nennen, die an 313 Fällen in einem prospektiven Setting vorgenommen wurde und Patientinnen mit frühen, ER-positiven und HER2/neu-negativen Mammakarzinomen einschloss. Angewandt wurden neben dem Oncotype DX®-Test auch die Prosigna®, MammaPrint®, MammaTyper®- und NexCourse Breast®-Tests (Bartlett et al. 2016, Stein et al. 2016). Dabei zeigten sich in der Kappa-Statistik Korrelationen bezüglich der Abschätzung des Risikos eines metastatischen Verlaufs, auf der ja letztendlich die Entscheidung zwischen Gabe und Nicht-Gabe der Chemotherapie beruht, von 0,33 bis 0,60; außerdem wurden an manchen Tests die Zuordnung zu Subtypen verglichen, wobei sich Kappa-Werte zwischen 0,39 und 0,55 ergaben. Insgesamt 31,1% der Fälle waren in mindestens vier der fünf Tests in ihrer Aussage identisch. Diese nur mäßigen Werte lassen abschätzen, dass unterschiedliche Tests zu unterschiedlichen Risikoeinteilungen und damit zu diametral verschiedenen Empfehlungen für oder gegen eine Chemotherapie führen können. Diese Tatsache lässt im Grunde trotz prognostischer Validität am Sinn der Multigentests und insbesondere auch am Sinn der Empfehlung 4.79 der S3-Leitlinie Zweifel zu. Feinsinnig-ironisch findet sich übrigens im Titel der Arbeit von Bartlett et al. (2016) ein konterkariertes Motiv aus der politischen Fabel "Animal Farm" (Orwell

1946), nämlich "No test is more equal than the others", so dass die Probleme offenbar alle Tests etwa gleichsinnig betreffen.

Weitere Entwicklungen: Quantifizierung Tumor-infiltrierender Lymphozyten und Bedeutung disseminierender Tumorzellen im Knochenmark

Andere Gebiete, auf denen mit prognostischem bzw. prädiktivem Anspruch geforscht wird, betreffen unter anderen den Themenkreis der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL), die rein lichtmikroskopisch am HE-Schnitt, also an Routineschnitten aus dem Primärtumor, untersucht werden (Dieci et al. 2018). In den mehr als 3.700 Fälle enthaltenden Gepar-Studien war ein hoher Gehalt an TIL mit höheren Raten für eine Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie korreliert (Denkert et al. 2018), auch wenn ein besseres Überleben nur bei gleichzeitiger HER2/neu-Positivität gefunden wurde; außerdem gibt es Daten, die auf ein besseres Ansprechen auf Immunmodulatoren bei PD-L1-Positivität deuten (Buisseret et al. 2017, Gonzales-Ericsson et al. 2020).

Außerdem wird weiter auf dem Gebiet der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (DTC-BM) und im peripheren Blut geforscht, einem weiten Feld, auf das hier aufgrund seiner Komplexität nicht detailliert eingegangen werden soll. Durch Studien ist belegt, dass ca. 30% der Mammakarzinom-Patientinnen einen positiven Nachweis von DTC-BM haben. Dieser wiederum ist nicht hoch mit anderen Prognoseparametern korreliert, aber mit einer signifikant schlechteren Prognose verbunden (Braun et al. 2005, Hartkopf et al. 2014). Bleibt der DTC-BM-Nachweis nach erfolgter Ersttherapie positiv, so ist auch dieses mit einer schlechteren Prognose verbunden (Janni et al. 2011). Auch die Neigung von Mammakarzinomen zu Spätmetastasen, die noch nach 20-25 Jahren rezidivfreiem Verlauf als Organmetastasen oder Ergusskarzinosen auftreten können, dürfte auf DTC-BM bzw. DTC in peripherem Blut zurückgehen. Die komplexen tumorbiologischen Konzepte hierzu wurden kürzlich in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst, wobei der Titel der Arbeit "*Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization*" bereits auf die Zeit verweist, in der eine klinisch-bildgebende Detektion von Tumorabsiedlungen nicht oder noch nicht möglich ist (Klein 2020). In diese Mechanismen therapeutisch eingreifen zu können, wäre sicher von großem klinischen Belang, um eine manifeste Metastasenbildung möglicherweise auf Dauer unterdrücken zu können.

Insgesamt lässt sich sagen, dass neue morphologische und molekulare Entwicklungen Aussagen bieten können, die für die weiteren adjuvanten Therapieplanungen hilfreich sind, aber dass sie andererseits auch wie alle anderen morphologischen Testungen auch nur Wahrscheinlichkeiten widerspiegeln, die erst an vielen wahren Verläufen über die Jahre auf ihren Wert hin gemessen werden können und selbst dann immer noch Wahrscheinlichkeiten bleiben. Ferner bleiben auch dort methodische Probleme. Außerdem muss bedacht werden, wie sehr im Fluss die konkreten Therapien für die Patientinnen gerade beim Mammakarzinom sind und dass man zumindest zu einem gewissen Teil immer dann, wenn man Langzeitverläufe verfolgt und als Maßstab nimmt, im Grunde ältere, zum Teil veraltete Therapien auf ihren Wert in der Vergangenheit testet. Letztendlich gibt es aber keine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, da die Dynamik der Therapieentwicklung letztendlich nicht vorhergesagt werden kann. Davon zeugen insbesondere auch die Zusammenfassungen des jährlich abgehaltenen *San Antonio Breast Cancer Symposium*, das zuletzt im Dezember 2020 stattfand und auf dem die verschiedenen laufenden oder gerade abgeschlossenen Studien zum Mammakarzinom vorgestellt und im klinisch-therapeutischen und auch prognostischen Kontext beurteilt werden. Für 2019 können die aktuellen Ergebnisse beispielsweise bei Chopra (2020) nachgelesen werden. Dabei wird sowohl auf frühe, als auch auf metastasierte Fälle Bezug genommen. Gerade die Verbesserungen auch für letztere Patientinnengruppe zeigen, dass das Mammakarzinom, ohne dass seine todbringende Potenz beherrscht wäre, schon recht weit auf dem Weg vom infausten Tumorleiden zur chronischen Erkrankung vorangekommen ist. Für das Symposium von Dezember 2020 liegen noch keine Veröffentlichungen vor (Stand: 6.1.2021).

Ebenso wäre wünschenswert, auch in der Früherkennung von Krebs weiter voranzukommen, z.B. durch eine höhere Teilnahmequoten an bestehenden Vorsorgeprogrammen. Für die Zukunft könnte auch denkbar sein, dass durch Blut-, Speichel- oder Urintests freizirkulierende Tumor-DNA oder tumorspezifische Proteine bereits in noch unerkannten bzw. klinisch-bildgebend unerkennbaren Tumorstadien mit diagnostischer Relevanz nachgewiesen werden könnten. So könnten einerseits maligne Veränderung in einem sehr frühen Stadium erkannt werden. Andererseits werden sich auch Erweiterungen des biologischen und des molekulare Markerprofils bei vielen Tumorentitäten ergeben, die möglicherweise helfen können, die bestmögliche Therapie für den Krebspatienten zu finden oder den Erfolg einer bestimmten Therapie präziser vorauszusagen und so auf dem Weg zur individualisierten Tumor-

medizin voranzukommen. Trotz aller Bemühungen sind die molekularpathologischen Eigenschaften vieler Tumoren und auch des Mammakarzinoms aber noch relativ unbekannt oder es gibt schlicht noch keine geeigneten Medikamente, die an den Schwachstellen der Tumorzellen angreifen. Auf diesen Gebieten liegt noch erheblicher Forschungsbedarf.

6. Literatur

Achterfeld Ch: TV-bildanalytische Quantifizierung der TUNEL-Reaktion beim Mamma-karzinom. Med. dent. Diss., Heinrich Heine Universität Düsseldorf, 2019

AGO - Kurzzitierweise für: AGO e. V. in der DGGG e.V. sowie in der DKG e.V.: Guidelines Breast, Version 2020.1D, https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/leitlinien/kommission_mamma/2020/PDF_DE/2020D%2005_Prognostische%20und%20praediktive%20Faktoren_mit%20Literatur.pdf, Version vom 2.3.2020 (abgerufen am 28.1.2021)

Baak JPA, van Dop H, Kurver PHJ, Hermans J: The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985; 56: 374-382

Bartlett JM, Bayani J, Marshall A, Dunn JA, Campbell A, Cunningham C, Sobol MS, Hall PS, Poole CJ, Cameron DA, Earl HM, Rea DW, Macpherson IR, Canney P, Francis A, McCabe C, Pinder SE, Hughes-Davies L, Makris A, Stein RC; OPTIMA TMG. Comparing breast cancer multiparameter tests in the OPTIMA Prelim Trial: No test is more equal than the others. *J Natl Cancer Inst* 2016; 29: 108: djw50

Beelen K, Opdam M, Severson T, Koornstra R, Vincent A, Wesseling J, Sanders J, Vermorken J, van Diest P, Linn S: Mitotic count can predict tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer patients while Ki67 score cannot. *BMC Cancer* 2018; 18: 761

Biesterfeld S: Methodische Aspekte bei der standardisierten Beurteilung der mitotischen Aktivität von Tumorgeweben. *Pathologe* 1997; 18: 439-444

Biesterfeld S: Zurverfügungstellung urheberrechtlich geschützter Bildmaterialien aus dem Bestand des Funktionsbereichs Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, 2021

Boehm EM, Gildenberg MS, Washington MT: The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *Enzymes* 2016; 39: 231-254

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K: A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 793-802

Bravo R, Celis JE: A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 1980; 84: 795-802

Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ: Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 165: 193-200

Buisseret L, Garaud S, de Wind A, Van den Eynden G, Boisson A, Solinas C, Gu-Trantien C, Naveaux C, Lodewyckx JN, Duvillier H, Craciun L, Veys I, Larsimont D, Piccart-Gebhart M, Stagg J, Sotiriou C, Willard-Gallo K: Tumor-infiltrating lymphocyte

composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunol* 2016;;6: e1257452

Bukholm IRK, Bukholm G, Holm R, Nesland JM: Association between histology grade, expression of HsMCM2, and cyclin A in human invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2003; 56: 368-373

Cardano M, Tribiolo C, Prosperi E: Targeting proliferation cell nuclear antigen (PCNA) as an effective strategy to inhibit tumor cell proliferation. *Curr Cancer Drug Targets* 2020; 20: 240-252

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC: Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295: 2492-2502

Chaloob MK, Ali HH, Qasim BJ, Mohammed AS. Immunohistochemical Expression of Ki-67, PCNA and CD34 in Astrocytomas: A Clinicopathological Study. *Oman Med J* 2012; 27: 368-374

Champion HR, Wallace IW: Breast cancer grading. *Br J Cancer* 1971; 25: 441-448

Chiang CP, Lang MJ, Liu BY, Wang LJS, Hahn LJ, Kuo MYP: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. *Oral Oncol* 2000; 36: 353-359

Chopra M: Meeting report 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium: San Antonio, TX, USA, 10–14 December 2019. *Targeted Oncol* 2020; 15: 7-9

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer: Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118.964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* 2012; 13: 1141-1151

Cox DR: Regression models and life-tables. *JR Stat Soc* 1972; 34: 187-220

Cui X, Harada S, Shen D, Siegal GP, Wei S: The utility of phosphohistone H3 in breast cancer grading. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015; 23: 689-695

da Silva Fonseca LM, do Carmo MA. Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Dis* 2001; 7: 344-348

Dabrowski A, Szumiło J, Brajerski G, Wallner G. Proliferating nuclear antigen (PCNA) as a prognostic factor of squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 2001; 56: 59-67

Degenhardt T, Braun M, Harbeck N, Schaller G, Schindlbeck C, Stötzer O: Prognostische und prädiktive Faktoren. In: Tumorzentrum München (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 16. Ausgabe 2017, W. Zuckschwerdt Verlag, München, S. 106-122

Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, Budczies J, Huober J, Klauschen F, Furlanetto J, Schmitt WD, Blohmer JU, Karn T, Pfitzner BM, Kümmel S, Engels K, Schneeweiss A, Hartmann A, Noske A, Fasching

PA, Jackisch C, van Mackelenbergh M, Sinn P, Schem C, Hanusch C, Untch M, Loibl S: Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018; 19: 40-50

Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, Pruneri G, D'Alfonso TM, Demaria S, Castaneda C, Sanchez J, Badve S, Michiels S, Bossuyt V, Rojo F, Singh B, Nielsen T, Viale G, Kim SR, Hewitt S, Wienert S, Loibl S, Rimm D, Symmans F, Denkert C, Adams S, Loi S, Salgado R; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol* 2018; 52: 16-25

Ditsch N, Grill S, Keim S, Zeder-Göß C, Meindl A: Das hereditäre Mammakarzinom. In: Tumorzentrum München (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 16. Ausgabe 2017, W. Zuckschwerdt Verlag, München, S. 123-146

Dixon D.: BMDP statistical software. Department of Biomathematics, University of California, Los Angeles. University of California Press, 1981

Dumitrescu RG, Cotarla I: Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005; 9: 208-221

Duval SJ, Tweedie RL: Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 2000; 56: 455-463

Ellis PSJ, Whitehead R: Mitosis counting - a need for reappraisal. *Hum Pathol* 1981; 12: 3-4, 1981

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

Gerber B: Einfluss von Umwelt, Ernährung und Lebensstil auf das Brustkrebsrisiko. *Dtsch Arztebl* 2001; 98: A 1612-1619

Gluz O, Nitz UA, Christgen M, Kates RE, Shak S, Clemens M, Kraemer S, Aktas B, Kuemmel S, Reimer T, Kusche M, Heyl V, Lorenz-Salehi F, Just M, Hofmann D, Degenhardt T, Liedtke C, Svedman C, Wuerstlein R, Kreipe HH, Harbeck N: West German Study Group Phase III Plan B Trial: First prospective outcome data for the 21-Gene Recurrence Score Assay and concordance of prognostic markers by central and local pathology assessment. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2341-2349

Goel MM, Mehrotra A, Singh, Gupta HP, Misra JS: MIB-1 and PCNA immunostaining as a diagnostic adjunct to cervical Pap smear. *Diagn Cytopathol* 2005; 33: 15-19

Goel MM, Mehrotra A. Immunohistochemical expression of MIB-1 and PCNA in precancerous and cancerous lesions of uterine cervix. *Indian J Cancer* 2013; 50: 200-205

Gonzalez-Ericsson PI, Stovgaard ES, Sua LF, Reisenbichler E, Kos Z, Carter JM, Michiels S, Le Quesne J, Nielsen TO, Laenkholm AV, Fox SB, Adam J, Bartlett JM, Rimm DL, Quinn C, Peeters D, Dieci MV, Vincent-Salomon A, Cree I, Hida AI, Balko JM, Haynes HR, Frahm I, Acosta-Haab G, Balancin M, Bellolio E, Yang W, Kirtani P, Sugie T, Ehinger A, Castaneda CA, Kok M, McArthur H, Siziopikou K, Badve S, Fineberg S, Gown A, Viale G, Schnitt SJ, Pruneri G, Penault-Llorca F, Hewitt S, Thompson EA, Allison KH, Symmans WF, Bellizzi AM, Brogi E, Moore DA, Larsimont D, Dillon DA, Lazar A, Lien H, Goetz MP, Broeckx G, El Bairi K, Harbeck N, Cimino-Mathews A, Sotiriou C, Adams S, Liu SW, Loibl S, Chen IC, Lakhani SR, Juco JW, Denkert C, Blackley EF, Demaria S, Leon-Ferre R, Gluz O, Zardavas D, Emancipator K, Ely S, Loi S, Salgado R, Sanders M; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group: The path to a better biomarker: application of a risk management framework for the implementation of PD-L1 and TILs as immuno-oncology biomarkers in breast cancer clinical trials and daily practice. *J Pathol* 2020; 250: 667-684

Hao Q, Dai C, Deng Y, Xu P, Tian T, Lin S, Wang M, Liu K, Song D, Wu Y, Guo Y, Dai Z: Pooling analysis on prognostic value of PHH3 expression in cancer patients. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 2279-2288

Harnan S, Tappenden P, Cooper K, Stevens J, Bessey A, Rafia R, Ward S, Wong R, Stein RC, Brown J: Tumour profiling tests to guide adjuvant chemotherapy decisions in early breast cancer: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess* 2019; 23: 1-328

Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M, Hahn M, Becker S, Solomayer EF, Brucker SY, Fehm TN, Wallwiener D: Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients - results from a large single-centre analysis. *Eur J Cancer* 2014; 50: 2550-2559

Ho YJ, Lin YM, Huang YC, et al.: Prognostic significance of highYY1AP1 and PCNA expression in colon adenocarcinoma. *BiochemBiophys Res Commun* 2017; 494: 173-180

Horn J, Åsvold BO, Opdahl S, Tretli S, Vatten LJ: Reproductive factors and the risk of breast cancer in old age: a Norwegian cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139: 237-243

Horn J, Vatten LJ: Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer: a historical perspective. *Int J Womens Health* 2017; 9: 265-272

Hu L, Li HL, Li WF, Chen JM, Yang JT, Gu JJ, Xin L: Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and E-cadherin in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 3721-3729

IQWiG (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen): Biomarker-basierte Tests zur Entscheidung für oder gegen eine adjuvante systemische Chemotherapie beim primären Mammakarzinom. Abschlussbericht. IQWiG-Bericht Nr. 457, Version 1.0, 2016, S. 1-225

Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Jückstock J, Borgen E, Rack B, Braun S, Sommer H, Solomayer E, Pantel K, Nesland J, Friese K, Naume B: Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients

predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. Clin Cancer Res 2011; 17: 2967-2976

Juríková M, Danihell L, Polák S, et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. Acta Histochem 2016; 118: 544-552.

Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc 1958; 53: 457-481

Kato T, Kimura T, Miyakawa R, Fujii A, Yamamoto K, Kameoka S, Nishikawa T, Kasajima T: Clinicopathologic study associated with long-term survival in Japanese patients with node-negative breast cancer. Brit J Cancer 2000; 82: 404-411

Klein CA: Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. Nat Rev Cancer 2020; 20: 681-694

Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. Exp Cell Res 1986 166: 209-219

Lee KE, Lee HJ, Kim YH, Yu HJ, Yang HK, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Kim JP: Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. Jap J Clin Oncol 2003; 33: 173-179

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2020: S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, AWMF-Registernummer: 032-045OL, online unter <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am 06.01.2021)

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2017: S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.0, AWMF-Registernummer: 032-045OL, online unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.0/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.0_01.pdf (abgerufen am 6.1.2021)

Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, dalla Palma P, Barbareschi M: PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. J Clin Pathol 1992; 45: 416-419

Li XF, Jiang Z, Gao Y, et al.: Combination of three-gene immunohistochemical panel and magnetic resonance imaging-detected extramuralvascular invasion to assess prognosis in non-advanced rectal cancerpatients. World J Gastroenterol 2016; 22: 8576-8583

Liedtke C, Jackisch C, Thill M, Thomssen C, Müller V, Janni W und AGO Breast Committee: AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2018. Breast Care (Basel) 2018; 13: 196-208

Lv Q, Zhang J, Yi Y, Huang Y, Wang Y, Wang Y, Zhang W: Proliferating cell nuclear antigen has an association with prognosis and risks factors of cancer patients: a systematic review. Mol Neurobiol 2016; 53: 6209-6217

Ma S, Yang J, Li J, Song J: The clinical utility of the proliferating cell nuclear antigen expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2016; 37: 7405-7412

Mangham DC, Rowlands DC, Newbold KM, Reynolds GM, Fielding JW, Hallissey MT: Expression of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma: no evidence for prognostic value. *J Clin Pathol* 1994; 47: 473-474

Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984; 309: 374-376

Maurer S, Kolben T, Niemeyer B, Wolf C: Mammakarzinom-Prävention. In: Tumorzentrum München (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 16. Ausgabe 2017, W. Zuckschwerdt Verlag, München, S. 14-16

Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, Olson N, Russo I, Russo J, Glass A, Zehnbaue BA, Lister K, Parwaresch R for the Cooperative Breast Cancer Tissue Resource: Breast carcinoma malignancy grading by Bloom–Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Modern Pathol* 2005; 18:1067-1078

Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-2234

Mumbuc S, Karakok M, Baglam T, et al.: Immunohistochemical analysis of PCNA, Ki67 and p53 in nasal polyposis and sinonasal inverted papillomas. *J Int Med Res* 2007; 35: 237-241

Myoung H, Kim MJ, Lee JH, Ok YJ, Paeng JY, Yun PY. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35: 1005-1010

NCBI (National Center of Biotechnology Information): Genomes - NCBI Dataset "PCNA - proliferating cell nuclear antigen [*Homo sapiens* (human)]", Gene ID: 5111, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5111?report=full_report. Update vom 25.1.2021 (abgerufen am 28.1.2021)

Nitz U , Gluz O, Huober J, Kreipe HH, Kates RE, Hartmann A, Erber R, Moustafa Z, Scholz M, Lisboa B, Mohrmann S, Möbus V, Augustin D, Hoffmann G, Weiss E, Böhmer S, Kreienberg R, Du Bois A, Sattler D, Thomssen C, Kiechle M, Jänicke F, Wallwiener D, Harbeck N, Kuhn W: Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression. *Ann Oncol* 2014; 25: 1551-1557

Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Iwanami T, Tanaka F: The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res* 2011; 31: 4277-4282

Orwell G: *Animal farm*. Harcourt, Brace and Company, New York, 1946

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning

- PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752
- Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S: 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* 2015; 153: 477-491
- Pich A, Margaria E, Chiusa L, Ponti R, Geuna M: DNA ploidy and p53 expression correlate with survival and cell proliferative activity in male breast carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27: 676-682
- Pich A, Margaria E, Chiusa L: Proliferative activity is a significant prognostic factor in male breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 145: 481-489
- Qiu X, Mei J, Yin J, Wang H, Wang J, Xie M: Correlation analysis between expression of PCNA, Ki-67 and COX-2 and X-ray features in mammography in breast cancer. *Oncol Lett* 2017; 14: 2912-2918
- Qiu X, Wang H, Wang Z, Fu Y, Ying J: Expression of PCNA, Ki-67 and COX-2 in breast cancer based on DCE-MRI image information. *J Infect Public Health* 2020; 13: 2032-2037
- Rabe K, Snir OL, Bossyut V, Harigopal M, Celli R, Reisenbichler ES: Interobserver variability in breast carcinoma grading results in prognostic stage differences. *Hum Pathol* 2019; 94: 51-57
- Rakha EA, Allison KH, Ellis IO, Horii R, Masuda S, Penault-Llorca F, Tsuda H, Vincent-Salomon A: Invasive breast carcinoma. General overview. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board (Hrsg.): *Breast tumours*. IARC, Lyon, 2019, S. 82-101
- Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA: The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*. 2007; 356: 1670-1674
- Rieger E, Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP, Kofler R, Cerroni L, Smolle J, Kerl H: Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. A quantitative immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 229-236
- RKI - Kurzzitierweise für: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 12. Ausgabe, Berlin 2019
- Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, Elston C: Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 1995; 26: 873-879
- Salmen J, Neugebauer J, Fasching PA, Haeberle L, Huober J, Wöckel A, Rauh C, Schuetz F, Weissenbacher T, Kost B, Stickeler E, Klar M, Orłowska-Volk M, Windfuhr-Blum M, Heil J, Rom J, Sohn C, Fehm T, Mohrmann S, Loehberg CR, Hein A, Schulz-Wendtland R, Hartkopf AD, Brucker SY, Wallwiener D, Friese K, Hartmann A, Beckmann MW, Janni W, Rack B: Pooled analysis of the prognostic relevance of progesterone receptor status in five German cohort studies. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 148: 143-151

- Salmen JC: Der Progesteronrezeptor und andere Prognosefaktoren beim Mammakarzinom - eine multizentrische Kohortenstudie. Med. Diss, Universität Ulm, 2014
- Saraç S, Ayhan A, Hosal AS, Kaya S: Prognostic significance of PCNA expression in laryngeal cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1998; 124: 1321-1324
- Schmidt M: Mammakarzinom: Welche Marker bestimmen die systemische Therapie? Trillium Krebsmedizin 2020; 29: 593-599
- Schöndorf T, Göhring UJ, Becker M, Hoopmann M, Schmidt T, Rützel S, Rein DT, Ulrich U, Fichteler R, Bersch A, Mallmann P, Valter MM: 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 2004; 71: 217-222
- Setiawan VW, Monroe KR, Wilkens LR, Kolonel LN, Pike MC, Henderson BE: Breast cancer risk factors defined by estrogen and progesterone receptor status: the multiethnic cohort study. Am J Epidemiol 2009; 169: 1251-1259
- Simbrich A, Wellmann I, Heidrich J, Heidinger O, Hense HW: Trends in advanced breast cancer incidence rates after implementation of a mammography screening program in a German population. Cancer Epidemiol 2016; 44: 44-51
- Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Parkin DM, Ferlay J, Mathers C, Forman D, Bray F: Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. Lancet 2012; 380: 1840-1850
- Sonnenblick A, Francis PA, Azim HA Jr, de Azambuja E, Nordenskjöld B, Gutiérrez J, Quinaux E, Mastropasqua MG, Ameye L, Anderson M, Lluch A, Gnant M, Goldhirsch A, Di Leo A, Barnadas A, Cortes-Funes H, Piccart M, Crown J: Final 10-year results of the Breast International Group 2-98 phase III trial and the role of Ki67 in predicting benefit of adjuvant docetaxel in patients with oestrogen receptor positive breast cancer. Eur J Cancer 2015; 51: 1481-1489
- Stein RC, Dunn JA, Bartlett JM, Campbell AF, Marshall A, Hall P, Rooshenas L, Morgan A, Poole C, Pinder SE, Cameron DA, Stallard N, Donovan JL, McCabe C, Hughes-Davies L, Makris A; OPTIMA Trial Management Group. OPTIMA prelim: a randomised feasibility study of personalised care in the treatment of women with early breast cancer. Health Technol Assess 2016; 20: xxiii-xxix, 1-201
- Stuart-Harris R, Caldas A, Pinder SE, Pharoah P: Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. The Breast 2008; 17: 323-334
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP: Risk factors and preventions of breast cancer. Int J Biol Sci 2017; 13: 1387-1397
- Tan PH, Ellis IO: Introduction to tumours of the breast. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board (Hrsg.): Breast tumours. IARC, Lyon, 2019, S. 6-7
- Tejido Sánchez A, Sánchez Chapado M, Rosino Sánchez A, Passas Martínez J, Bethencourt Codes F, Ruiuz Ramos P, Leiva Glavis Y: Expresión de PCNA y Ki-67 en el adenocarcinoma renal localmente confinado. Relación con diferentes variables histopatológicas y significación pronóstica. Arch Esp Urol 2002; 55: 257-265

Theissig F, Kunze KD, Haroske G, Meyer W: Histological grading of breast cancer. Interobserver reproducibility and prognostic significance. *Pathol Res Pract* 1990; 186: 732-736

Thill M, Jackisch C, Janni W, Müller V, Albert US, Bauerfeind I, Blohmer J, Budach W, Dall P, Diel I, Fasching PA, Fehm T, Friedrich M, Gerber B, Hanf V, Harbeck N, Huober J, Kolberg-Liedtke C, Kreipe HH, Krug D, Kühn T, Kümmel S, Loibl S, Lüftner D, Lux MP, Maass N, Möbus V, Müller-Schimpfle M, Mundhenke C, Nitz U, Rhiem K, Rody A, Schmidt M, Schneeweiss A, Schütz F, Sinn HP, Solbach C, Solomayer EF, Stickeler E, Thomssen C, Untch M, Wenz F, Witzel I, Wöckel A, Ditsch N: AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer: Update 2019. *Breast Care (Basel)* 2019; 14: 247-255

Torre L, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87-108

Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A: Global Cancer in Women: Burden and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017; 26: 444-457

Tumorregister München 2018: Spezielle Auswertungen zum Mammakarzinom (C50): Tumordurchmesser zeitlicher Trend. Online unter der Webadresse https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/spec/spec_C50f_09_20181212_tudia.pdf vom 12.12.2018 (abgerufen am 6.1.2021)

Tumorregister München 2020: Mammakarzinom (Frauen) - Survival: Online unter der Webadresse https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC50f_G-ICD-10-C50-Mammakarzinom-Frauen-Survival.pdf vom 5.11.2020 (abgerufen am 6.1.2021)

van Diest PJ, van der Wall E, Baak JPA: Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 2004; 57: 675-681

van Steenhoven JEC, Kuijer A, Kornegoor R, van Leeuwen G, van Gorp J, van Dalen T, van Diest PJ: Assessment of tumour proliferation by use of the mitotic activity index, and Ki67 and phosphohistone H3 expression, in early-stage luminal breast cancer. *Histopathology* 2020; 77: 579-587

Vieira AF, Schmitt F: An update on breast cancer multigene prognostic tests - emergent clinical biomarkers. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5: 248

Voss SM, Riley MP, Lokhandwala PM, Wang M, Yang Z: Mitotic count by phosphohistone H3 immunohistochemical staining predicts survival and improves interobserver reproducibility in well-differentiated neuroendocrine tumors of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2015; 39: 13-24

Wang X, Wang D, Yuan N, Liu F, Wang F, Wang B, Zhou D: The prognostic value of PCNA expression in patients with osteosarcoma: A meta-analysis of 16 studies. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: e8254

Yang L, Zhu X, Ran L: Correlations of HER-2, PCNA, Bcl-2, and Bax expression to prognosis of breast cancer. *Chin J Cancer (Ai Zheng)* 2007; 26: 756-761

Yang SX, Polley EC: Systemic treatment and radiotherapy, breast cancer subtypes, and survival after long-term clinical follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2019; 175: 287-295

Ye L, Lin ST, Mi YS, et al.: Overexpression of LARP1 predicts poor prognosis of colorectal cancer and is expected to be a potential therapeutic target. *Tumour Biol* 2016; 37: 14585-14594

Ye X, Ling B, Xu H, Li G, Zhao X, Xu J, Liu J, Liu L: Clinical significance of high expression of proliferating cell nuclear antigen in non-small cell lung cancer. *Medicine* (2020) 99: 16

Zbytek B, Cohen C, Wang J, Page A, Williams DJ, Adams AL: Nottingham-defined mitotic score: comparison with visual and image cytometric phosphohistone H3 labeling indices and correlation with Oncotype DX recurrence score. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013; 21: 48-53

Zhang R, Chen H, Wei B, Zhang H, Pang Z, Zhu H, Zhang Z, Fu J, Bu H: Reproducibility of the Nottingham modification of the Scarff- Bloom-Richardson histological grading system and the complementary value of Ki-67 to this system. *Chin Med J* 2010;123(15):1976-1982

Zhou H, Huang T, Xiong Y, Peng L, Wang R, Zhang G: The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. A meta-analysis. *Medicine* 2018, 97: 50

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Stefan Biesterfeld für das Überlassen dieses interessanten Themas, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die aufgebrauchte Zeit und ständige Unterstützung herzlich bedanken. Diese Arbeit wurde in jeder Phase von ihm mit großer Hilfsbereitschaft und Geduld begleitet und konnte nur durch seine engagierte Unterstützung vollendet werden.

Besonders danke ich meiner Mutter Kerstin vom ganzen Herzen für ihre fortwährende Unterstützung und ihre hingebungsvolle Fürsorge, sowie meinem Bruder Philipp für seine wertvollen Ratschläge und seine motivierenden Gespräche.

Meinem Freund Can Berk Aydin danke ich für seine unermüdliche Hilfe und seinen liebevollen Rückhalt beim Erstellen dieser Dissertation und auch sonst in allen Lebenslagen.