

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Klinikdirektorin: Prof. Dr. med. Tanja N. Fehm

**Der Phänotyp der Lymphknotenmetastasen bei der Erstdiagnose  
als Prädiktor der Phänotypen Diskrepanz zwischen dem  
Primärtumor und Rezidiv**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Elena Bensmann**

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Eugen Ruckhäberle

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

## **Widmung**

Diese Arbeit widme ich meiner Tante, Sofya Bashkina,  
und meinen Eltern, Frida und Dr. Felix Bensman,  
die mich auf meinem Weg stets unterstützt haben.

## Zusammenfassung

Die personalisierte adjuvante Therapie des Mammakarzinoms basiert auf der Blockade der Signalwege der Rezeptoren ER und HER-2.

Daher hat die Anwesenheit der Rezeptoren prädiktive Bedeutung für die Wahl der adjuvanten zielgerichteten Therapie.

Durch die adjuvante Therapie kann in vielen Fällen eine Metastasierung verhindert werden. In der klinischen Praxis wird dazu der Rezeptorstatus des Primärtumors (P) herangezogen, obwohl inzwischen unstrittig ist, dass der Rezeptorstatus in Lymphknotenmetastasen (LK), Fernmetastasen (M) und deren wahrscheinlichen Vorläufern, CTC und Mikro Metastasen, diskordant sein kann. Da in vielen Fällen neben der Pathologie des Primärtumors auch diejenige der synchronen Lymphknotenmetastasen zur Verfügung stehen, wird in dieser Arbeit untersucht, ob die Einbeziehung des Rezeptorstatus der Lymphknotenmetastasen zu einer Verbesserung der Prädiktion geeignet ist.

Dazu wurden aus einem Kollektiv von 289 Patienten, die im Zeitraum 1.6.96 - 15.11.11 im Bethesda Klinikum, Mönchengladbach, behandelt wurden, eine Gruppe von 105 Patienten ausgewählt für die Daten zur Pathologie, insbesondere der Rezeptorstatus von ER und PR für Primarius, Lymphknotenmetastase und Fernmetastasen vorlagen. Für 97 dieser 105 Patienten lagen gleichzeitig auch die Daten für den HER-2 Rezeptor vor. In der retrospektiven Analyse der untersuchten Fälle wurde die relative Häufigkeit der 8 möglichen Konstellationen des Rezeptorstatus je Rezeptor in P, LK, M untersucht. Die Datenanalyse der Rezeptoren ER und HER-2 zeigte, dass bei diskordanter Lymphknotenmetastase der Rezeptorstatus der Metastase gehäuft ebenfalls diskordant war. Die Kombination „P pos., LK neg., M neg.“ trat für die Rezeptoren ER und HER-2 mit einer relativen Häufigkeit von 54% bzw. 90% auf. Die Kombination P neg., LK. pos., M pos. trat mit einer Häufigkeit von 63% bzw. 67% auf.

Für die adjuvante Therapie wäre daher insbesondere eine diskordant positive Lymphknotenmetastase ein starker prädiktiver Hinweis auf einen potenziell vorhandenen ER bzw. HER-2 Rezeptor. Das könnte eine adjuvante Therapie rechtfertigen, die nach derzeitigen Leitlinien nicht indiziert ist.

## Abstract

The personalized treatment of breast cancer hinges on the blocking of the signaling pathways of the ER and HER-2 receptors. Therefore, the expression of the receptors is the major predictive marker for the targeted adjuvant therapy.

The adjuvant therapy is a proven approach to significantly reduce the risk of relapse and metastasis.

In clinical practice, the receptor status of the primary tumor is used to direct the specific therapy even though it is well established, that the receptor status may be discordant between primary tumor (P), lymph node metastasis (LK) and distant metastasis (M) as well as their presumed predecessors like CTC's and micro metastases.

In most cases, not only the receptor status of the primary tumor but also the status of synchronous lymph node metastases is known. This study investigates whether the consideration of the receptor status of lymph node metastases in addition to the receptor status of the primary tumor may improve prediction.

The analysis originated from a data base of 289 patients who were treated for metastasized breast cancer in Bethesda Hospital, Mönchengladbach, in the period between 1.6.96 - 15.11.11. 105 patients, whose medical records contained comprehensive pathological data, especially the receptor status for ER, PR in P, LK and M, were selected from the data base. For 97 of those patients, the HER-2 receptor status was also available. The retrospective analysis evaluated the relative frequency of occurrence of the 8 possible combinations of the ER, PR and HER-2 receptor status in P, LK and M. It turned out, that a discordant lymph node metastasis was often associated with an equally discordant distant metastasis. The combination „P pos., LK neg., M neg.“ for ER and HER-2 was found in 54% and 90% of all cases respectively. The combination P neg., LK. pos, M pos. was found in 63% and 67% of all cases respectively.

The most significant conclusion is that the majority of cases which had the combination of a receptor negative primary tumor and a receptor positive lymph node later developed an equally receptor positive distant metastasis.

This group of patients could potentially benefit from an adjuvant therapy which would not be considered according current guidelines.

# Inhaltsverzeichnis

<b>WIDMUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
1.1 Subtypen des Mammakarzinoms .....	9
1.1.1 Hormonrezeptoren .....	10
1.1.2 Das Onkoprotein HER-2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2) .....	11
1.1.3 Therapeutische Zielstruktur auf dem Beispiel von dem Onkoprotein HER-2.....	11
1.2 Zusammenwirken der tumorbiologischen Charakteristika .....	13
1.3 Prognose und Prädiktion; Modelle der Krebsentstehung .....	14
1.3.1 Prognose.....	14
1.3.2 Prädiktion .....	15
1.3.3 Überschneidungen von prognostischen und prädiktiven Markern.....	15
1.3.4 Theorien zur Krebsentstehung und deren Bedeutung für Diskordanzen in der Tumorbiologie zwischen Primärtumor, Lymphknotenmetastase und Rezidiv .....	16
1.3.5 Modelle der Krebsentstehung .....	18
1.4 Der Prozess der Metastasierung und Rezidiv Entwicklung.....	20
1.4.1 Änderungen des Rezeptorstatus in CTC (zirkulierende Tumorzellen), DTC (disseminierte Tumorzellen) und Mikrometastasen im Prozess der Metastasierung und Rezidiventwicklung.....	20
1.5 Die Bedeutung der Konkordanz bzw. Diskordanz der Tumorbiologie für die Behandlung des Mammakarzinoms .....	21
1.5.1 Die Bedeutung der Konkordanz und Diskordanz des Hormonrezeptorstatus für die Behandlung des Mammakarzinoms .....	21
1.5.2 Die Bedeutung der Konkordanz und Diskordanz des HER-2-Status für die Behandlung des Mammakarzinoms .....	22
1.6 Zielsetzung .....	24
1.7 Hypothesen .....	24
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
2.1 Darstellung des Untersuchungskollektivs .....	25
2.2 Ausführungen zu den Probeentnahmen und den tumorbiologischen Analysen.....	26
2.3 Statistische Analyse.....	27

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>28</b>
3.1.	Demographische Charakteristika .....	28
3.1.1	Alter der Patienten.....	28
3.1.2	Tumorcharakteristika, Erkrankungsstadium, Therapie der untersuchten Patientinnen .....	28
3.1.3	Erkrankungsstadium und Verteilung der Rezidive, Therapie .....	32
3.2	Prädiktion der Tumorbiologie der Lymphknotenmetastase für das Auftreten eines Rezidivs .....	32
3.3	Konkordanz der Tumorbiologie zwischen Primärtumor, LK-Metastase und Rezidiv.....	36
3.4	Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse .....	37
3.5	Einfluss der Rezidiv-Lokalisation (lokal versus distant).....	38
3.6	Einfluss der Therapie .....	40
3.7	Einfluss des Zeitpunktes der Metastasierung .....	41
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>43</b>
4.1	Diskordanzen auf der Rezeptor-Ebene .....	43
4.1.1	Diskordanz beim HER-2 Rezeptor .....	44
4.1.2	Diskordanz beim ER-Rezeptor .....	45
4.2	Prädiktive Bedeutung des Rezeptorstatus.....	46
4.3	Prädiktive Bedeutung des Rezeptorstatus in der klinischen Praxis .....	47
4.4	Verbesserung der Prädiktion durch Berücksichtigung der Biologie der Lymphknotenmetastase .....	47
4.5	Kritische Betrachtung der vorliegenden Untersuchung .....	49
4.5.1	Genauigkeit der HER-2 Bestimmung .....	49
4.5.2	Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse .....	51
4.5.3	Grundsätzliche Fehlerquellen .....	52
4.6	Klinische Relevanz .....	52
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b> .....	<b>56</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>66</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

ABBILDUNG 1 CONSORT-DIAGRAMM PATIENTEN-SELEKTION.....	25
ABBILDUNG 2: ALTERSVERTEILUNG DER UNTERSUCHTEN STICHPROBE; (N= 105).....	28
ABBILDUNG 3: TUMORCHARACTERISTIKA BEI ERSTERKRANKUNG, TUMORBIOLOGIE DES PRIMÄREN MAMMAKARZINOMS, DER PRIMÄREN LYMPHKNOTENMETASTASE(N) UND DES REZIDIVS/METASTASE DER GESAMTSTICHPROBE (N= 105) .....	30
ABBILDUNG 4: HISTOLOGISCHE TYPISIERUNG DES PRIMÄRTUMORS DER 105 UNTERSUCHTEN FÄLLE. ....	30
ABBILDUNG 5 DIFFERENZIERUNGSGRAD DES PRIMÄRTUMORS. ....	30
ABBILDUNG 6 VERTEILUNG DER NODALPOSITIVEN PATIENTINNEN AUF RISIKOGRUPPEN .....	31
ABBILDUNG 7: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER T-STADIEN.....	31
ABBILDUNG 8: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES NODALSTATUS .....	31
ABBILDUNG 9: EXPRESSION DES ESTROGENREZEPTORS IM KRANKHEITSVERLAUF BEI REZEPTORPOSITIVEM PRIMÄRTUMOR.....	34
ABBILDUNG 10 VERTEILUNG DER REZEPTORSTATUS IN DER GRUPPE.....	35
ABBILDUNG 11: STATISTISCHE ANALYSE DER PEARSON-VERTEILUNG.....	37
ABBILDUNG 12: EINFLUSS DER ART DER METASTASIERUNG (LOKAL VS. DISTANT) AUF DIE PRÄDIKTION (ER).....	38
ABBILDUNG 13: EINFLUSS DER ART DER METASTASIERUNG (LOKAL VS. DISTANT) AUF DIE PRÄDIKTION (HER-2) .....	39
ABBILDUNG 14: VERLUST DES ER IM REZIDIV BEI ER-POSITIVEM PRIMÄRTUMOR .....	40
ABBILDUNG 15: VERLUST DER HER-2-ÜBEREXPRESSION IM REZIDIV BEI HER-2 POSITIVEM PRIMÄRTUMOR .....	40
ABBILDUNG 16: HÄUFIGKEIT DER UNTERSCHIEDLICHEN KOMBINATIONEN DES ER- REZEPTORSTATUS BEI UNTERSCHIEDLICHEN ZEITPUNKTEN DER METASTASIERUNG .....	41
ABBILDUNG 17: HÄUFIGKEIT DER UNTERSCHIEDLICHEN KOMBINATIONEN DES HER-2- REZEPTORSTATUS .....	42
ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER HÄUFIGKEITEN DER 4 MÖGLICHEN P-LK KOMBINATIONEN FÜR HER-2 MIT LITERATURWERTEN (AITKEN ET AL., 2010) (SIMON ET AL., 2001) .....	50

# 1 Einleitung

Die adjuvante systemische Therapie in Verbindung mit loko-regionären Eingriffen ist der derzeitige Standard bei der Behandlung von Brustkrebs. Zu den obligatorischen Faktoren für die Auswahl des Typs der adjuvanten Therapie gehört die Bestimmung des Rezeptorstatus für den Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptor (PR) und den HER-2 Rezeptor. (Harbeck et al., 2010).

Unterschiedliche Strategien, die die rezeptorgekoppelte Signalübertragung deaktivieren, sind in der Lage das Tumorwachstum zu verlangsamen oder sogar ganz zu stoppen. Daher ist die Kenntnis des Rezeptorstatus (ER, PR HER-2) für die personalisierte Behandlung der Brustkrebserkrankung von herausragender Bedeutung. Zusätzlich zum Rezeptorstatus werden auch weitere molekulare Marker (Ki-67- und PD-L1-Status, PIK3CA- und BRCA-Mutationen) je nach Erkrankungsstadium herangezogen.

Es ist bekannt, dass der Rezeptorstatus zwischen Primarius, synchronen und asynchronen Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen unterschiedlich sein kann, bzw. sich im Krankheitsverlauf verändert. (C Yeung 1 2016, Sabrina Rossi 1 2015 Oct., Ongaro E1, 2018 Apr.) Die möglicherweise auftretende Diskordanz im Rezeptorstatus zwischen den verschiedenen Tumormanifestationen in der Brust bzw.- im axillären Lymphknoten und im Entstehungsort des Rezidivs bzw. der Metastase kann unterschiedliche Behandlungsansätze erforderlich machen.

**Die Ausprägung dieser Diskordanzen in einem spezifischen Patientinnen Kollektiv zu analysieren und sich daraus ableitende Schlussfolgerungen bezüglich der diagnostischen und therapeutischen Vorgehensweise zu formulieren, ist Ziel dieser Arbeit.**

## 1.1 Subtypen des Mammakarzinoms

Die Hormon- und HER-2-Rezeptoren als tumorbiologisch bestimmbare Grundcharakteristika der Tumorzelle werden als Surrogat Parameter der molekularen Klassifikation des Mammakarzinoms als einer heterogenen und komplexen Erkrankung verstanden (Weigelt and Reis-Filho, 2009). In einer entscheidenden Arbeit erstellten die Autoren (Charles M. Perou et al., 2000) ein Expressionsprofil von über 8102 Genen von Mammakarzinomen von 42 Patienten und den zugehörigen Lymphknotenmetastasen vor und nach Chemotherapie. Auf dieser Basis wurde ein sog. „intrinsisches“ Set von Genen identifiziert, das zwischen den einzelnen Tumoren bzw. Patienten maximale Unterschiede

aufweist, aber innerhalb der Tumorzellen einer Patientin ähnlich strukturiert ist. Durch hierarchisches Clustern wurden vier Mammakarzinom Typen identifiziert. Zusammen mit den obengenannten Genclustern für bestimmte Zelltypen wurden die Tumortypen unterteilt in ER positiv/luminal, Basalzelltyp, ERBB2+ Typ und „normal breast-like“, (Charles M. Perou et al., 2000) [3]. Es ist inzwischen umstritten, ob der Subtyp „normal breast-like“ existiert, das wird aber von der Arbeitsgruppe um Sorlie weiterhin vertreten (Christian Fougner, 14 April 2020). Die prognostische Bedeutung dieser Typenunterteilung wurde in weiteren Arbeiten bestätigt (Sorlie et al., 2003).

Für die Therapieentscheidung in der primären Situation werden in der klinischen Praxis prognostische Marker, die histologische Klassifikation (Grading), die TNM- Klassifikation und darin vor allem der Lymphknotenstatus zum Zeitpunkt der Primärdiagnose, die Tumorbiologie (ER, PR, HER-2) und die Proliferationsrate (Ki-67) verwendet.

### **1.1.1 Hormonrezeptoren**

In etwa 75% aller Brustkrebserkrankungen ist der ER nachweisbar; bei postmenopausalen Patienten etwas häufiger als bei jüngeren Frauen. Die ER-Überexpression ist also altersabhängig und korreliert mit einem geringeren Grading, niedrigerer Proliferation, geringerer Aneuploidie, geringerer HER-2 Überexpression und, prognostisch relevant, mit einem signifikant geringeren Metastasierungs- und Rezidivrisiko. Die Expression des PR steht unter dem Einfluss des ER, daher wurde das Vorhandensein des PR teilweise als Indikator für einen funktionierende ER-Signalweg interpretiert (Horwitz and McGuire, 1978). Ein ER-positives, PR-negatives Mammakarzinom wird als ein aggressiverer Subtyp als der Subtyp ER/PR-positiv betrachtet (Maggie Chon U. Cheang 2012). Laut aktuellen Leitlinien wird der immunhistochemische Nachweis von ER und/oder PR in  $\geq 1\%$  der Tumorzellen als ER-Positivität betrachtet. Früher wurde der cut-off von 10% angewandt. Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom zeigen eine bessere Prognose in den ersten 5 Jahren der Erkrankung im Vergleich zu den Patientinnen mit hormonrezeptornegativem Tumor (Dunnwald, 2007).

**Von besonderer Relevanz ist jedoch nicht die prognostische, sondern die prädiktive Bedeutung des Hormonrezeptorstatus, aus der sich die folgenden grundsätzlichen Behandlungsmöglichkeiten ergeben:**

Bei prämenopausalen Patientinnen besteht die endokrine Therapie aus der Gabe des kompetitiven Rezeptorantagonisten Tamoxifen ggf. in Kombination mit einem GnRH-Analogon bzw. Exemestan in Kombination mit GnRH-Analogon. Bei den

postmenopausalen Patientinnen wird unter Berücksichtigung der Differenzierung zwischen invasiv-duktales oder invasiv-lobulärer Differenzierung der switch von Tamoxifen nach 2-3 Jahren zu einem Aromataseinhibitor oder ein Aromataseinhibitor upfront verordnet.

### **1.1.2 Das Onkoprotein HER-2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2)**

HER = (Human Epidermal growth factor Receptor)-2 ist eine Transmembran-Tyrosin-Kinase aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (epidermal growth factor receptor/EGFR) (Wolff et al., 2007). Die EGF-Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung malignen Zellwachstums durch Wirkung auf wichtige Zellprozesse wie Proliferation, Adhäsion, Beweglichkeit und Zellüberleben (Bublil and Yarden, 2007), (Sliwkowski, 2001). Slamon et al. fanden 1987 bei der Untersuchung von 189 primären Brusttumoren in 30% der Fälle eine Amplifikation von HER-2 um den Faktor 2 bis über 20.

**Die Amplifikation von HER-2 ist ein signifikanter prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und die Zeit bis zum Rezidiv** (DJ Slamon, 1987).

Die Amplifikation oder Überexpression werden als Aktivierungsmechanismen von Her-2 diskutiert. Angaben zum Anteil der HER-2-überexprimierenden Tumoren an der Gesamtzahl der Mammakarzinome schwanken von 30% in den ersten Untersuchungen (DJ Slamon, 1987) bis 22,2% (Ross et al., 2009).

### **1.1.3 Therapeutische Zielstruktur auf dem Beispiel von dem Onkoprotein HER-2**

Die HER-2-Expression ist der prädiktive Marker für den Einsatz einer HER-2-gerichteten Therapie.

In der metastasierten Situation wurde durch die Hinzunahme einer HER-2 gerichteten Therapie eine Verlängerung des Gesamtüberlebens erreicht. In der adjuvanten Situation wurde die Rückfallquote und Sterbewahrscheinlichkeit um bis zu 50% gesenkt (Edward H. Romond and Victor G. Vogel, 2005), (Martine J. Piccart-Gebhart, 2005)

**Der HER-2 Status ist prädiktiv bezüglich der gegen den HER-2 Rezeptor- und Signalweg gerichteten Therapie mit Antikörpern** (Trastuzumab, Pertuzumab) und small molecules (z.B. Lapatinib, Neratinib und Tucatinib) sowie Wirkstoffkonjugaten (TDM-1).

Die ER+/PR- Tumoren haben eine um 50% höhere Rate von HER-2 Überexpression im Vergleich mit ER+/PR+ Tumoren. ER+/PR- Tumoren haben häufiger Lymphknotenmetastasen, sind größer und häufiger aneuploid. 30% der ER+ / PR- Tumoren sind HER-2 positiv, während ER+/PR+ Tumoren nur in 10% der Fälle eine HER-2-Überexpression zeigen (Arpino et al., 2005). Die retrospektive Analyse von 584 Patienten (prämenopausal, Tamoxifen Behandlung) bestätigte die Ergebnisse von Arpino et al. (Arpino et al., 2005) in mehreren Punkten, nämlich eine inverse Relation von PR-Status und HER-2 Überexpression in Patienten mit einem Alter über 45 Jahren. Ebenso hatten Patienten mit dem Tumorstatus ER+ / HER-2 + eine schlechtere Prognose. Eine HER-2 Überexpression erwies sich als negativer prognostischer Faktor für ER+/Tamoxifen-unbehandelte Tumoren (Ryden et al., 2008). Obwohl damit die Diskussion über die Interaktion zwischen der Signalkaskade der HER-2 Rezeptoren und der Estrogen und Progesteron Rezeptoren nicht abgeschlossen ist, spielen die Überlegungen zur Tamoxifen Resistenz HER-2 überexprimierender Tumoren in der klinischen Praxis zurzeit keine Rolle.

**Die Ausprägung dieser tumorbiologischen Charakteristika bestimmt sowohl die Prädiktion als auch die Prognose.**

Eine HER-2 Überexpression ist ein Marker für eine schlechtere Prognose bei Brustkrebs (Jeffrey S. Ross, 1998) Dennoch ist die Studienlage nicht eindeutig. Insbesondere der Nachweis durch eine IHC-Färbung an Paraffinschnitten galt lange Zeit als nicht ausreichend zuverlässig und war daher Gegenstand von vielen Untersuchungen (Michael F. Press, 2005). Ross et al haben daher seit Beginn der Untersuchungen von HER-2 die verfügbaren Studien zusammengestellt und als Metaanalyse ausgewertet. Inzwischen umfasst die Aufstellung 107 Studien mit insgesamt 39.730 Patienten und lässt folgende Schlussfolgerung zu: " Mit deutlicher Mehrheit sind Veränderungen der HER-2 Expression auf genetischer, mRNA- und Proteinebene mit einer schlechten Prognose sowohl bei LK-negativem als auch LK-positivem Brustkrebs verknüpft (Ross et al., 2009). 95 (88%) der 107 Studien ergaben, dass die Amplifikation des HER-2-Gens oder die Überexpression des HER-2 Proteins in univariater oder multivariater Analyse prognostische Bedeutung für den Krankheitsverlauf haben. In 68 (73%) der 93 Studien mit multivariater Datenanalyse ist die ungünstige prognostische Bedeutung des HER-2 Gens, der mRNA oder des Proteins unabhängig von allen anderen prognostischen Variablen. Nur in 13 (12%) der Studien konnte keine Korrelation zwischen dem HER-2 Status und dem "clinical outcome" hergestellt werden. Dennoch ist die Interpretation der Studien dadurch erschwert, dass die meisten teilnehmenden Patienten verschiedene Varianten der systemischen adjuvanten Therapie erhielten. Der reine prognostische Wert der HER-2 Überexpression in Abwesenheit jeder Form der adjuvanten Therapie ist daher nicht vollständig geklärt (Ross

et al., 2009) (DJ Slamon, 1987). Slamon et al. beschrieben HER-2 in ihrem Grundsatzartikel als signifikanten Prognoseparameter sowohl für das Gesamtüberleben als auch für die Zeit bis zum Rezidiv unabhängig von anderen prognostischen Faktoren. Allerdings untersuchten sie nur LK-positive Fälle und nur Primärtumore, aber nicht den Zusammenhang der HER-2 Amplifikation mit dem ER- oder PR-Status. Eine Korrelation wurde nur zwischen HER-2 Amplifikation und LK-positiven Fällen festgestellt.

Weitere Untersuchungen ergaben zunächst, dass die HER-2-Überexpression bzw. -Amplifikation kein unabhängiger Prognoseparameter ist. Bei LK-negativen Fällen wurde keine Korrelation zur Erkrankungsprognose festgestellt. Allerdings wurde die prognostische Bedeutung für LK-positive Fälle bestätigt. Hohe Korrelationen wurden hingegen mit histopathologisch definierten aggressiven Karzinomen und starker Zellproliferation gefunden. Multivariate Analysen zeigen, dass die Anzahl positiver Lymphknoten, der PR- und ER Level, sowie die Tumorgroße signifikante Ko-Variablen sind (Ake Borg, 1990). Mehrere Studien von Press et al. ergaben dann auch für nodal negative Tumoren eine prognostische Signifikanz der HER-2 Überexpression (Press, 1993, 2002). In der Folge wurde der Zusammenhang zwischen HER-2 Überexpression und einer aggressiven histopathologischen Klassifizierung auch als negativer prognostischer Faktor in Krebsvorstufen beschrieben (Azadeh Stark, 2000).

## **1.2 Zusammenwirken der tumorbiologischen Charakteristika**

Grundsätzlich sind an der Signaltransduktion von ER, PR und HER-2 sehr viele Proteine und Faktoren beteiligt, die eine komplexe Feinregulierung der Zelle ermöglichen, wobei die Signalwege untereinander verbunden sind. Umgekehrt bietet dieser Mechanismus der Krebszelle eine Vielzahl von Möglichkeiten um durch Überexpression, Mutationen oder Botenstoffe aus der Zellumgebung einzelne Signalwege an- oder abzuschalten oder zu umgehen.

In diesem Zusammenhang werden diskutiert (Osborne and Schiff, 2011), (Arpino et al., 2008):

- 1) Die wechselseitige Beeinflussung der ER und des HER-2 Signalweges durch Hoch- oder Herunterregulieren von Elementen des jeweils anderen Signalweges oder durch direkten Eingriff in den anderen Signalweg (Gutierrez et al., 2005)
- 2) Agonistische Wirkung der Östrogenrezeptormodulators Tamoxifen auf bestimmte Zellen und Gewebe bzw. bei HER-2 Überexpression (Shou et al., 2004).

- 3) Die Anti-Östrogen Therapie ist zytostatisch und zytotoxisch im Labormodell und führt zum Abbruch der Mitose. Deregulierung oder Mutationen von Genprodukten in der Signalkette der östrogenabhängigen Mitoseregulation können Resistenzen hervorrufen.
- 4) Der Verlust der PR-Expression geht i.A. mit einer schlechteren Prognose einher und wurde mit einer erhöhten Aktivität des HER-2 Signalweges in Verbindung gebracht.

**Zusammengefasst sind ER, PR und HER-2 die wichtigsten prädiktiven Marker der anti-Hormontherapie bzw. der gegen HER-2 gerichteten Therapie.**

Die jeweilige prädiktive Bedeutung wird allerdings durch weitere Proteine der entsprechenden Signalwege mit ebenfalls prädiktiven Eigenschaften moduliert. Da das Zusammenspiel aller dieser Faktoren noch nicht abschließend bekannt ist und insbesondere in der klinischen Praxis noch nicht routinemäßig ausgewertet wird, ist die prädiktive Bedeutung von ER, PR und HER-2 mit Einschränkungen zu beurteilen. Die Einschränkungen zeigen sich in der Praxis als „de novo“ und erworbene Resistenzen, die zurzeit noch nicht erklärt oder vorhergesagt werden können.

## **1.3 Prognose und Prädiktion; Modelle der Krebsentstehung**

### **1.3.1 Prognose**

**Die Prognose** ist eine Aussage über die voraussichtliche weitere Entwicklung des Krankheitsverlaufs eines Individuums. Da 90% der Todesfälle am Mammakarzinom auf den Folgen der Metastasierung beruhen (Gupta and Massague, 2006), **ist die wichtigste prognostische Einzelfrage, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Metastasierung auftreten wird und innerhalb welchen Zeitraums.** In Abhängigkeit von der Prognose werden Therapien indiziert.

Bis heute besteht ein hoher Unsicherheitsfaktor bezüglich der Prognoseeinschätzung; daher ist davon auszugehen, dass grundsätzlich eine Überbehandlung der Patientinnen mit Mammakarzinom vorgenommen wird. Es wird davon ausgegangen, dass 40-50% der Patientinnen mit frühem Mammakarzinom langfristig Metastasen entwickeln, aber nahezu 100% systemtherapeutisch neoadjuvant oder adjuvant behandelt werden (Weigelt et al., 2005).

### 1.3.2 Prädiktion

Prädiktion bedeutet die relative Vorhersage eines Effektes aufgrund einer therapeutischen Intervention. Aktuell werden beim Mammakarzinom die ER/PR-Rezeptoren als Prädiktoren für die Wirksamkeit der Antiöstrogen-Therapie und das Onkoprotein HER-2 als Target für die Antikörpertherapie mit HER-2-gerichteten Antikörpern aufgeführt.

Die **Identifikation prädiktiver Marker oder Signaturen ist erheblich komplexer als die von prognostischen Markern** (hier und im Folgenden (Borst and Wessels, 2010)). Von besonderer Wichtigkeit ist, dass bei den derzeit verwendeten prädiktiven Markern die phänotypische Ausprägung anhand immunhistochemischer Quantifizierungen dargestellt wird und nicht deren Funktionalität, sodass schon bei der Primärdiagnose eine Vielzahl von Resistenzmechanismen vorliegen können.

### 1.3.3 Überschneidungen von prognostischen und prädiktiven Markern

Obwohl Prognose und Prädiktion klar definierte Begriffe sind, gibt es eine Reihe von Grenzfällen, bei denen diagnostische Marker nicht eindeutig als prognostische oder als prädiktive Marker klassifiziert werden können. Ganz grundsätzlich gilt das für alle prognostischen Marker, mit deren Hilfe eine Klassifizierung in „high risk of recurrence“ und „low risk of recurrence“ vorgenommen wird, denn damit ist automatisch eine Aussage über die Notwendigkeit und erhoffte Wirksamkeit einer adjuvanten Therapie verbunden (Borst and Wessels, 2010). Insbesondere sind die Überexpression des Östrogen- bzw. Progesteronrezeptors einerseits und die von HER-2 andererseits sowohl ein prognostischer Marker, die in Genexpressionsanalysen verwendet werden, aber auch Prädiktoren für die Wirksamkeit einer Antihormon- bzw. HER-2 gerichteten Therapie. Die Verhältnisse werden dadurch noch komplexer, dass die Überexpression des ER und von HER-2 eine notwendige Bedingung für die Wirksamkeit einer entsprechenden Therapie sind, aber keine hinreichende, da nämlich in beiden Fällen unabhängig von der Überexpression Resistenzen auftreten können, die den Therapieerfolg verhindern.

Relevant in diesem Kontext ist die **Diskordanz**.

Untersuchungen mit CGH (Comparative genomic hybridization) weisen darauf hin, dass primäre Brusttumore aus mehreren genetisch unterschiedlichen, räumlich getrennten Zellpopulationen bestehen. Primärtumoren und die zugehörigen Metastasen weisen

oftmals eine divergente klonale Entwicklung auf, was für eine frühe Metastasierung im Verlauf der Karzinogenese spricht (Torres et al., 2007). Weitere Vergleiche der Primärtumoren mit Lymphknotenmetastasen und distanten Metastasen durch IHC und FISH kommen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass der HER-2 Status zwischen Primärtumor und Lymphknoten konkordant ist, sich aber zu distanten Metastasen hin diskordant entwickelt, und zwar dahingehend, dass die HER-2 Überexpression in den meisten Fällen stark zunimmt (Regitnig et al., 2004), (S. M. Edgerton, 2003). Santinelli et. al wiesen in einer prospektiven Studie mit FISH und IHC an 119 Patienten insgesamt eine Diskordanz von 21,5% nach, und zwar ebenfalls vorwiegend in Richtung auf eine Zunahme der HER-2 Expression vom Primärtumor hin zur Metastase. Die Einzelanalyse der in 4 Gruppen aufgeteilten Fälle ergab eine Diskordanz von 6,7% bei synchronen Lymphknoten Metastasen, 13,3% bei lokalen und 28,6 % bei Fernmetastasen. Die Autoren empfehlen daher eine Überprüfung des HER-2 Status in den Metastasen (Santinelli et al., 2008). Die gleiche Empfehlung wird auch in einer retrospektiven Untersuchung mit IHC an 382 Patienten ausgesprochen, in der ebenfalls eine ausgeprägte Diskordanz zwischen Primärtumor und Metastasen festgestellt wurde; allerdings im Unterschied zu den vorgenannten Untersuchungen mit einer Tendenz zum Verlust der HER-2 Überexpression in den Metastasen (Lower et al., 2009).

**Die Diskordanz tumorbiologischer Faktoren ist somit ein häufig untersuchtes Phänomen in der Weiterentwicklung der Krebserkrankung.**

Verschiedene Modelle der Krebsentwicklung stellen Erklärungsversuche der Diskordanz-Entwicklung dar:

#### **1.3.4 Theorien zur Krebsentstehung und deren Bedeutung für Diskordanzen in der Tumorbiologie zwischen Primärtumor, Lymphknotenmetastase und Rezidiv**

Krebszellen unterscheiden sich von den übrigen Zellen eines Organismus durch eine Vielzahl von Eigenschaften, die den folgenden Kategorien zugeordnet werden können:

- „Sustained proliferative signaling (Fortführung proliferativer Signalwege)
- evading growth suppressors (Umgehen von Wachstumssuppressoren)
- activating invasion and metastasis (Aktivierung von Invasion und Metastasen)
- enabling replicative immortality (Befähigung zur replikativen Unsterblichkeit)

- inducing angiogenesis and (Induktion der Angiogenese)

- resisting cell death“ (Resistenz gegen Zelltod) (hier und im Folgenden:(Hanahan and Weinberg, 2011)

Krebszellen entstehen aus normalen Zellen des Organismus durch tiefgreifende Veränderungen der Zellregulation bzw. der zugrundeliegenden genetischen und phänotypischen Konstitution. Die genetischen Veränderungen umfassen Punktmutationen, Translokationen, Deletionen und Amplifikationen einzelner Gene, Microsatelliten Instabilität sowie den Verlust von Telomer DNA und damit verbunden eine allgemeine karyotypische Instabilität, die sich in Amplifikation, Verlust und Rekombination von Chromosomen und Chromosomensegmenten äußert (Negrini et al., 2010), (Hanahan and Weinberg, 2011). Zellen eines Klons (i.e. genetisch identisch) haben unterschiedliche Phänotypen in verschiedenen Umgebungen bzw. an verschiedenen räumlichen Positionen eines Tumors. Mit der Veränderung der Zellumgebung ändert sich somit auch die Krebszelle, was als phänotypische Plastizität bezeichnet wird (Marusyk and Polyak, 2010). Durch die hohe genetische Instabilität und die phänotypische Plastizität sind Krebszellen in der Lage sich höher zu differenzieren, aber auch höhere Differenzierung wieder zu verlieren. Zellen mit dem Charakter von Stammzellen können sich zu epithelähnlichen Zellen entwickeln und umgekehrt. Dieser Mechanismus, der insbesondere für den Prozess der Metastasierung diskutiert wird, ist die EMT/MET (epidermale-mesenchymale Transition/mesenchymale-epidermale Transition). Die Möglichkeiten zur Differenzierung lassen aber auch Raum für die verschiedenen Theorien des Ursprungs der Krebsentstehung. Krebszellen können durch eine Dedifferenzierung aus Zellen z.B. des Epithels hervorgehen, umgekehrt könnten Stammzellen des Epithels die Vorläufer der Krebszellen sein. Die EMT wird als ein wichtiges Merkmal des Prozesses der Metastasierung angesehen und beinhaltet den Erwerb eines migratorischen mesenchymalen Phänotyps. In vielen epithelialen Tumoren ist EMT bzw. der Verlust von Differenzierung an der invasiven Grenze sichtbar und vermittelt wahrscheinlich die zelluläre Ablösung und Metastasierung (Visvader and Lindeman, 2008).

Die Sichtweise, dass ein Tumor aus verschiedenen differenzierten Zellen eines einzelnen Klons besteht, ist vermutlich zu vereinfachend. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass sich in der ursprünglichen Zellpopulation, durch die oben beschriebenen genetischen und phänotypischen Veränderungen relativ schnell verschiedene Subklone bilden, die unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Proliferation, Apoptose, Metastasierungsfähigkeit, Immortalität usw. haben. Es entsteht analog zur Darwin'schen Evolutionslehre ein Prozess von Selektion und Entwicklung (Marusyk and Polyak, 2010). Spätestens ab diesem Zeitpunkt bilden aber auch Zellen nicht tumorösen Ursprungs einen Teil des

Tumors, wie z.B. Zellen des Immunsystems, tumorinfiltrierende Lymphozyten oder Zellen von Blutgefäßen, die im Rahmen der Neo-Angiogenese einwandern. Auch diese Zellen reagieren, wenn auch wahrscheinlich geringer als die Tumorzellen, mit Änderungen ihres Phänotyps auf die geänderte Umgebung.

Vor diesem Hintergrund werden zwei Modelle der Tumorentstehung bzw. der Tumororganisation diskutiert:

### **1.3.5 Modelle der Krebsentstehung**

#### **1.3.5.1 Das stochastische Modell der Krebsentstehung**

Das eine Modell wird als „clonal evolution“ oder „stochastisches Modell“ bezeichnet. In diesem Modell wird der Umstand betont, dass der gesamte Tumor aus einer oder wenigen Zellen hervorgegangen ist, die sich in der Folge ausdifferenziert haben. Experimentell konnte gezeigt werden, dass tumorinduzierende Zellen des Mammakarzinoms zur Differenzierung angeregt werden können bzw. umgekehrt schon differenzierte Zellen zum Stammzelltyp hin verändert werden können (Yu et al., 2007). Insgesamt ergibt sich ein plastisches Bild des Tumors, in dem letztlich alle Zellen in der Lage sind, zu metastasieren. Der Prozess der Metastasierung ist hochgradig stochastisch, d.h. eine erfolgreiche Metastasierung ist selten. Diesem Modell verhaftet ist die Vorstellung, dass die Fähigkeit zur Metastasierung die höchste Stufe der Krebsentwicklung darstellt, die erst nach allen erforderlichen Veränderungen der Zelle erreicht wird.

#### **1.3.5.2 Das Stammzellen Modell der Tumorentstehung**

Das zweite Modell wird von seinen Vertretern bis zu einer Arbeit von Rudolf Virchow 1855 zurückverfolgt (Gilliland, 2005), erlangte aber erst in den letzten 10 Jahren seine Renaissance und ist das derzeit dominierende Modell. Demnach sind die Zellen der frühen Tumorklone den Stammzellen sehr ähnlich (daher CSC: Cancer Stem Cells) wobei eben offen ist, ob sie sich durch Differenzierung aus Stammzellen oder durch De-Differenzierung aus differenzierten Zellen ableiten (Visvader and Lindeman, 2008). In diesem Modell behält ein Teil der Tumorzellen ihre Stammzeleigenschaften, während die anderen Krebszellen durch Differenzierung aus den CSC entstehen. Im Zuge dieser Differenzierung findet auch ein Großteil der Proliferation statt. Der erste Nachweis von Stammzellen in soliden Tumoren gelang anhand von Biopsien aus primären menschlichen Mammakarzinomen

und Metastasen, die in Mäuse transplantiert wurden. Die entstehenden Tumoren zeigten eine differenzierte Organisation aus verschiedenen Zellpopulationen, die dem Originaltumor ähnlich war (Muhammad Al-Hajj\*, 2003). Obwohl auch im Stammzellenmodell eine Dedifferenzierung möglich ist, ist die Vorstellung die, dass der Tumor aus relativ wenigen CSC besteht, sowie aus einer großen Menge verschieden differenzierter Tumorzellen, die zusammen mit nicht-Tumorzellen die Masse des Tumors ausmachen. Die Tumorzellen sind aus evolutionärer Sicht Sackgassen, auch wenn sie noch zu massiver Proliferation befähigt sind, während die Stammzellen einerseits die Fähigkeit zur Metastasierung haben und andererseits in der Lage sind, einen Tumor in seiner komplexen genotypischen und phänotypischen klonalen Zusammensetzung neu zu generieren bzw. nach weitgehender Zerstörung z.B. durch eine Chemotherapie in ähnlicher Weise differenziert wieder aufzubauen.

Das Modell wird als Stammzellenmodell bezeichnet bzw. als hierarchisches Modell, da die Stammzellen an der Spitze der Tumororganisation stehen. Das Stammzellenmodell hat gegenüber dem klonalen Modell zwei wesentliche Implikationen bezüglich Metastasierung und Therapie. Erstens können die Stammzellen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Krebsentstehung - und zwar noch vor der Entwicklung des Primärtumors - metastasieren. Zweitens haben Stammzellen eine geringe Teilungshäufigkeit und eine geringe phänotypische Differenzierung und sind somit bezüglich Ihrer Oberflächenantigene, Rezeptorausstattung etc. anders geartet als die Masse der Tumorzellen. Weiterhin sind die Stammzellen nicht notwendig monoklonal. Hier liegt insbesondere auch die Schnittfläche zwischen dem hierarchischen und stochastischen Modell: bis zum Einsetzen der Tumordifferenzierung und des Tumorwachstums haben die Stammzellen bereits einen Teil der klonalen Diversifizierung des stochastischen Modells durchlaufen.

Für die Krebstherapie bedeuten diese Hypothesen, dass die (erste Welle der) Metastasierung bei Erstdiagnose bereits stattgefunden haben könnte, und dass die adjuvante Therapie zwar die Masse der Tumorzellen erreicht und auch zu deren Vernichtung beiträgt, nicht aber zwangsläufig die CSC. Denn die CSC können sich über Ihre geringe Teilungsrates der Chemotherapie/Strahlentherapie und über ihre Stammzeleigenschaften (und potenzieller polyklonaler Differenzierung) der Antihormon- und Antikörpertherapie entziehen (Visvader and Lindeman, 2008).

### **1.3.5.3 Veränderung zwischen Primärtumor und Rezidiv auf molekularer Ebene**

Das stochastische Modell der Tumorentstehung erklärt nur zu einem gewissen Grad die Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastasen. Nach dem Stammzellenmodell ist

hingegen mit großer Wahrscheinlichkeit mit Unterschieden zu rechnen. Eine CGH-Analyse von 29 primären Mammakarzinomen und den zugehörigen asynchronen Metastasen ergab eine Ähnlichkeit in 20 Fällen, 9 Metastasen zeigten völlig unterschiedliche genetische Profile auf chromosomaler Ebene (Tuula Kuukasjärvi, 1997). Auf der molekularen Ebene identifizierte eine vergleichende Sequenzanalyse des kompletten Transkriptoms und des Genoms eines ER-positiven lobulären Karzinoms und einer 9 Jahre nach der Erstdiagnose entnommenen Metastasen Biopsie insgesamt 32 somatischen Mutationen. Davon waren 19 Mutationen im Primärtumor nicht vorhanden, was eine erhebliche Entwicklung im Krankheitsverlauf darstellt, i.e. die Metastase kann sich genetisch deutlich vom Primärtumor unterscheiden (Shah et al., 2009). Eine Analyse des Genoms von 20 primären duktalem Karzinomen mit FACS (Zellsortierer) und CGH identifizierte zunächst massive chromosomale Veränderungen und eine Vielzahl von Deletionen und Amplifikationen. Insbesondere zeigte die Ploidie dieser Tumoren eine enorme Komplexität. Die Kartierung der Mutationen gestattete die Erstellung eines Stammbaums. Während einige Tumoren weitgehend monoklonal waren, zeigten andere Tumoren eine polyklonale Struktur, d.h. bestimmte Mutationen während der Progression hatten zur Entstehung genetisch unterschiedlicher Subpopulationen geführt, die teilweise einzelne räumlich Bereiche des Gesamttumors exklusiv besetzten, teilweise aber auch gemischt mit anderen Subpopulationen auftraten (Navin et al., 2010). Die Untersuchung ist eine Begründung für die bekannte Tatsache, dass Biopsien aus verschiedenen Bereichen eines Tumors genetisch und phänotypisch heterogen sein können (Yu-Jie Shi et al., 2017).

Andererseits wurde beim Vergleich verschiedener Genexpressionsprofile eine hohe Übereinstimmung zwischen Primärtumor und Metastasen festgestellt (Weigelt et al., 2005).

## **1.4 Der Prozess der Metastasierung und Rezidiv Entwicklung**

### **1.4.1 Änderungen des Rezeptorstatus in CTC (zirkulierende Tumorzellen), DTC (disseminierte Tumorzellen) und Mikrometastasen im Prozess der Metastasierung und Rezidiv Entwicklung**

Die genetischen Profile von einzelnen disseminierten Tumorzellen sind hochgradig unterschiedlich (Klein et al., 2002). Entsprechend lässt sich bereits in frühen Stadien des Mammakarzinoms Diskordanz zwischen Primärtumor und disseminierten Zellen nachweisen (Ignatiadis et al., 2008). Die Diskordanz tritt sowohl zwischen Primarius und CTC's als auch innerhalb der CTC Population auf (B. A. S. Jaeger 2017). Eine HER-2

Überexpression kann in CTC's unabhängig von der Therapie erworben werden oder verlorengehen (Munzone et al., 2008). Auch für die metastasierte Situation wurden Untersuchungen zu Konkordanz bzw. Diskordanz des Rezeptorstatus vorgenommen. Knochenmarkmetastasen bzw. deren Vorläufer zeigten sowohl für ER als auch für HER-2 Diskordanz zum Primärtumor (Amir et al., 2008), (Aurilio et al., 2013). Diskordante Ergebnisse zwischen Serum Level von HER-2 und dem HER-2 Status von CTC in metastasierten Patienten (Fehm et al., 2007) zeigen einerseits die prädiktiven Potenziale aber andererseits auch die Schwierigkeiten der CTC-Analyse.

## **1.5 Die Bedeutung der Konkordanz bzw. Diskordanz der Tumorbiologie für die Behandlung des Mammakarzinoms**

### **1.5.1 Die Bedeutung der Konkordanz und Diskordanz des Hormonrezeptorstatus für die Behandlung des Mammakarzinoms**

Studien haben gezeigt, dass Hormonrezeptoren mit dem Fortschreiten der Krebserkrankung häufig geringer exprimiert werden und das Metastasen im Vergleich zum Primärtumor in 15-30% den Rezeptorstatus wechseln, und zwar mit zunehmendem Verlust des ER im Krankheitsverlauf (Arslan C, 2010).

Allerdings schwanken die Angaben über die Ausprägung der Diskordanz. Eine retrospektive Studie zeigte einen Wechsel des Rezeptorstatus von ER pos. nach ER neg. in 7,2% der Fälle, und von ER-neg. nach ER-pos. in 3,4%. Beim Progesteron Rezeptor wurde ein Wechsel von positiv zu negativ in 27,5% der Fälle, umgekehrt in 10,2% der Fälle beobachtet, dabei war der Wechsel jeweils in distanten Metastasen häufiger als im Lokalrezidiv (Bogina et al., 2011) In einer prospektiven Studie wurden folgende Diskordanzen ermittelt: ER in 12,6%, PR in 31,2 % und HER-2 in 5,5% der Fälle. **Daraus resultierte eine Änderung der Therapieempfehlung in 14,2% der Fälle.** Weitere retrospektive Studien zeigten sogar deutlich höhere Diskordanz Raten, in 27% Wechsel von ER-pos. zu ER-neg. und 8% von ER-neg. zu ER-pos. Bezüglich des PR wechselten 38% von PR-pos. zu PR-neg. und 5% wurden PR pos. (Karlsson et al., 2010).

Pusztai et al. (Pusztai et al., 2010) nennen drei mögliche Gründe für Diskordanz:

- biologische Änderungen auf zellulärer Ebene
- heterogener Tumor aus unterschiedlichen Subpopulationen mit lokal unterschiedlichem Rezeptorstatus und

- Messfehler.

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Messergebnisse besteht in der Suppression des ER durch Tamoxifen z.B. durch klonale Selektion. Allerdings wurde auch bei Patienten, die keine adjuvante Therapie erhielten, eine Diskordanz bei der Metastasierung festgestellt: von 50 untersuchten Tumoren waren 35 (70%) ER pos. In 12 Fällen (34%) ging ER in der Metastase verloren, in keinem Fall gab es einen Wechsel von ER neg. nach pos. Bezüglich des PR waren 30 (60%) Patienten primär PR pos., davon wurden 12 (40%) in der Metastase PR negativ (Tuula Kuukasjärvi, 1996). In der bereits oben zitierten Arbeit von Bogina et al., 2011 (Bogina et al., 2011) wurde ebenfalls kein Einfluss der endokrinen Therapie auf den Rezeptorstatus festgestellt. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die verabreichten Therapien zur Diskordanz im Phänotyp führen kann, zum Beispiel unter der Chemotherapie mit Antrazyklinen bzw. Taxanen wird weniger Konkordanz bei ER-Rezeptor beobachtet, unter der Endokrinen Therapie kann es zu PR-Verlust kommen (CONSTANZE VOGEL, Mai 2019).

### **1.5.2 Die Bedeutung der Konkordanz und Diskordanz des HER-2-Status für die Behandlung des Mammakarzinoms**

**Erste Untersuchungen führten zu der Annahme, dass sich die HER-2 Überexpression bereits in einem sehr frühen Stadium der Krebsentstehung manifestiert und dann im Primärtumor und den Metastasen relativ konkordant bleibt.**

Hierzu passte die Erkenntnis, dass die Überexpression mit einer Genamplifikation einhergeht. Die Konservierung des einmal etablierten HER-2-Status wurde als gegeben angenommen, obwohl einzelne Fälle eine Diskordanz zeigten (Lacroix et al., 1989). Zu ähnlichen Ergebnissen führte auch die Untersuchung potenzieller Unterschiede verschiedener Metastasen aus Autopsie-Befunden von 30 Patienten, nämlich einer „relativ“ stabilen HER-2 Expression über die Zeit und einer „allgemeinen“ Kongruenz zwischen verschiedenen Metastasen (Gloria A. Niehans, 1993). Hinter allem stand die Annahme, dass Metastasen Klone einzelner Zellen aus dem Primärtumor sind und somit ein einmal manifestierter Expressionsstatus „gewöhnlich“ konserviert wird, wenn auch einzelne Änderungen des HER-2 Status vom positiven Primärtumor zur HER-2 negativen Metastase dokumentiert wurden (W. FRASER SYMMANS, 1994). In weiteren Untersuchungen wurden mit IHC ebenfalls keine (Bozzetti et al., 2003), (Chikako Shimizu, 2000), oder nur geringe Diskordanz gemessen (Gong et al., 2005), (Bui, 2000). Obwohl in einigen Untersuchungen bis zu 100% Konkordanz ermittelt wurde, gibt es in den oben genannten

Studien auch diskordante Fälle. Diese werden aber als Ausnahmen des grundsätzlich konkordanten Status interpretiert (Gancberg et al., 2002) oder aber durch erneutes Testen wieder korrigiert (Tapia et al., 2007). In der Literatur mehren sich die Berichte über eine Diskordanz des HER-2 Status zwischen Primärtumor und verschiedenen Metastasen. Ein Überblick gibt eine Metaanalyse aus 26 Studien bis zum Jahr 2009 mit insgesamt 2520 Patienten. Die Analyse zeigt eine durchschnittliche Abweichung im HER-2 Status von 5,5% (3,6-8,5%) zwischen Primärtumor und Metastasen. Eine bereits oben beschriebene Tendenz wird in dieser Übersicht bestätigt, nämlich die Zunahme der Diskordanz mit dem Fortschreiten der Erkrankung: Distant Metastasen haben ausgeprägtere Abweichungen (11,5% (6,9 – 18,6%)) als Lymphknotenmetastasen (4,1% (2,4% - 7,2%)) oder Fällen der Kombination aus Lymphknotenmetastasen und Metastasen differenter Lokalisationen (3,3% (2,0% - 5,6%)) – jeweils bezogen auf den Status des Primärtumors. Bei metachronen Metastasen ist die Abweichung höher als bei synchronen Metastasen. Tendenziell ist eine Veränderung in Richtung Erwerb einer HER-2 Überexpression festzustellen (Houssami et al., 2011).

**Richter et al. (Richter S, 2011) fanden in einer Metaanalyse über 62 Studien von 2005 bis 2010 eine durchschnittliche Diskordanz von 16% für den Neuerwerb einer HER-2 Überexpression in den Metastasen und einen Verlust der Überexpression in 6% der Fälle und ziehen daraus die Schlussfolgerung, dass fast einem Viertel aller Patienten eine effektive Therapie mit Trastuzumab nicht gegeben wurde.**

Eine Untersuchung von Xiao et al. (Xiao et al., 2011) zum Einfluss von Trastuzumab auf den Rezeptorstatus ergab eine Diskordanz in 15% der Fälle (Verlust der HER-2 Überexpression) in der Testgruppe und der Kontrollgruppe und damit unabhängig von der Anwendung von Trastuzumab.

**Jensen et al. (Jensen et al., 2012) fanden Diskordanzen beim ER und HER-2 zwischen dem Primärtumor und den zugehörigen asynchronen Metastasen in 12% (14/118) und 9% (10/114) der Fälle. Die Autoren halten daher Biopsien von Rezidiven und Metastasen zur besseren Anpassung der Therapie für erforderlich.**

Sehr ähnliche Ergebnisse zeigt die Untersuchung von Amir et al. (Amir et al., 2008). Die Diskordanz in ER, PR, und HER-2 zwischen dem Primärtumor und der Metastase betrug 16%, 40%, bzw. 10%.

**Eine Biopsie führte bei 14% der Patienten zu einer Änderung der Therapie.**

**Die vorgenannten und weitere Untersuchungen wurden 2018 von Schrijver et. al in einem Review und Metanalyse zusammengefasst. Auf der Basis der 39 Studien, die**

aus der Grundgesamtheit von 5521 relevanten Veröffentlichungen ausgewählt wurden, ergibt sich folgendes Bild. Für die Rezeptoren ER, PR und HER-2 gibt es eine deutliche Diskordanz zwischen Primarius und distanten Metastasen, dabei ist der Verlust der Rezeptoren in der Metastase, insbesondere bei PR und HER-2 häufiger als die Konversion von rezeptornegativ zu -positiv. Die einzelnen Untersuchungen finden ebenfalls deutlich unterschiedliche Diskordanzraten für ER, PR, and HER-2, Die Bandbreite beträgt 3%–54% für ER, 5%–78% für PR, and 0%–34% für HER-2. Die Gründe hierfür können vielschichtig sein, es wurden prospektive und retrospektive Untersuchungen einbezogen, die Kohorten unterscheiden sich bezüglich Alter, Rasse und anderen Merkmalen, meistens sind die Studien sehr klein, die Patienten erhielten verschiedene systemische Therapien, es werden verschiedene Grenzwerte für Rezeptorpositivität verwendet, es wurden verschiedene Nachweisverfahren (e.g. FISH und SISH) verwendet. Die statistische Auswertung über alle 39 Einzelstudien ergibt folgende Diskordanzraten zwischen Primarius und distanter Metastase: Positiv nach negativ ER 22.5%, PR 49.4%, HER-2 21.3% und negativ nach positiv ER 21.5%, PR 15.9%, HER-2 9.5%. Die Gesamtdiskordanz beträgt 19.3%, 30.9%, und 10.3% für ER, PR und HER-2 (Willemijne A. M. E. Schrijver, 05 January 2018).

## 1.6 Zielsetzung

Die Zielsetzung der hier vorgelegten Arbeit besteht darin, aus den tumorbiologischen Charakteristika des Mammakarzinoms bei Ersterkrankung und der primären Lymphknotenmetastase(n) von Patientinnen mit nodal-positivem Mammakarzinom **prädiktive Aussagen** zur Tumorbiologie sich später entwickelnder lokoregionärer Rezidive und/oder Fernmetastasen abzuleiten.

## 1.7 Hypothesen

1. Das gesicherte Auftreten einer Diskordanz der tumorbiologischen Charakteristika zwischen Primarius und primärer Lymphknotenmetastase(n) ist prädiktiv für Veränderungen tumorbiologischer Charakteristika späterer lokoregionärer Rezidive und/oder Fernmetastasen.

2. Die nachgewiesene Konkordanz zwischen Primarius und primärer Lymphknotenmetastase(n) ist prädiktiv für die Konstanz tumorbiologischer Charakteristika späterer lokoregionärer Rezidive und/oder Fernmetastasen.
3. Eine nachweisbare Diskordanz der tumorbiologischen Charakteristika zwischen Primarius und primärer Lymphknotenmetastase(n) ist von erheblicher prädiktiver und prognostischer Bedeutung und bestimmt die Behandlungsstrategie bereits bei der Erstdiagnose.
4. Die Bestimmung der tumorbiologischen Charakteristika aus der Brustläsion und der Lymphknotenmetastase ist methodisch einfach, valide und lässt sich unproblematisch in die klinische Praxis überführen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Darstellung des Untersuchungskollektivs

Die Untersuchung wurde retrospektiv anhand einer Datenbank des Krankheitsverlaufs von 289 metastasierten Patienten, die am Brustzentrum Niederrhein des evangelischen Krankenhauses Bethesda aufgrund einer Brustkrebserkrankung im Zeitraum vom 1.6.96 bis zum 15.11.2011 behandelt wurden, durchgeführt. Die Follow up Daten wurden bis 4/2012 erfasst. Ein positives Ethikvotum der Universität Köln liegt vor.

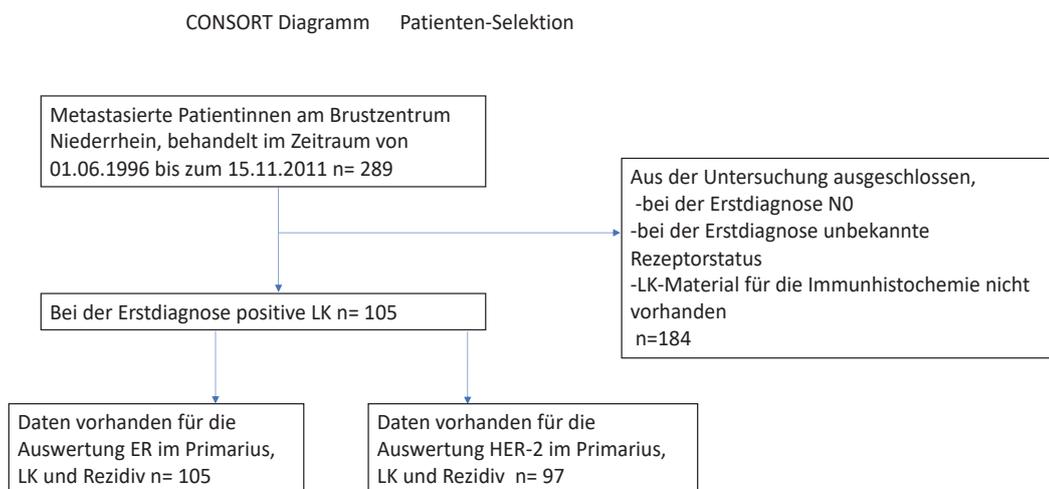


Abbildung 1 CONSORT-Diagramm Patienten-Selektion

Die Information über die Histologie des Primarius, Lymphknotenmetastasen und Rezidiv lag bei 105 Patientinnen vor. Von den ursprünglich 289 Patienten wurden diese 105 Patientinnen in die Untersuchung einbezogen.

Untersucht wurden die klassischen tumorbiologischen Faktoren Östrogen- und Progesteron Rezeptor-Status (ER und PR) und die Expression des Onkoproteins HER-2 im Primarius, in den tumorbefallenen Lymphknoten bei Ersterkrankung im Vergleich zur Tumorlokalisation der nachfolgend aufgetretenen Tumorrezidive (Lokalrezidiv oder Fernmetastase).

Für die Auswertung bezogen auf die Fragestellung wurden Angaben zur Tumorbiologie des Primärtumors, der Lymphknotenmetastasen und des Rezidivs (Lokalrezidiv, distante Metastasen) benötigt.

Die Daten konnten für insgesamt 105 Patientinnen nahezu vollständig erhoben werden; bei lediglich 8 Patientinnen fehlt die Angabe zum HER-2 Status des Primärtumors. Demzufolge wurden nur 97 der 105 Patienten in die Analyse des HER-2 Status einbezogen. Bei der Analyse des ER- und PR-Status wurde in 4 Fällen der Status des zweiten anstelle des ersten Rezidivs für die Auswertung verwendet; davon in 3 Fällen (ER und PR), da der ER-Status des ersten Rezidivs nicht bekannt war, und in einem Fall (ER), weil beim erneuten Rezidiv noch ein Rezeptorwechsel nach „positiv“ stattfand. Für die Auswertung des HER-2 Status wurde in einem Fall der Rezeptorstatus des zweiten Rezidivs herangezogen da ebenfalls ein Rezeptorwechsel nach „positiv“ stattfand.

## **2.2 Ausführungen zu den Probeentnahmen und den tumorbiologischen Analysen**

Die Proben wurden durch eine offen-chirurgische oder minimal-invasive Biopsie gewonnen. Die entnommenen Gewebeproben wurden nach den geltenden Standards fixiert und untersucht. Auf Basis der gefärbten Präparate wurde der Differenzierungsgrad des Tumors ermittelt (Grading nach Elston, Ellis) (I.O.Ellis, 1991) und die Bestimmung der tumorbiologischen Faktoren vorgenommen. Die Nachweisreaktionen wurden automatisiert auf der Station Ventana Benchmark XT durchgeführt. Für die Nachweisreaktionen wurden die Protokolle und Reagenzien bzw. Antikörper von Ventana verwendet:

- Estrogen Rezeptor: CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1)
- Progesteron Rezeptor: CONFIRM anti-PR (1E2)

- HER-2 Rezeptor: PATHWAY anti-HER-2 (4B5)

Der Hormonrezeptorstatus wurde dabei nicht nach der Färbungsintensität, sondern nach der Anzahl (Angabe in %) der gefärbten Zellen beurteilt. Der Grenzwert entspricht den ASCO-Empfehlungen (1% der Zellen werden gefärbt) (Hammond et al., 2010) bzw. den St. Gallen Empfehlungen; ER-Positivität liegt bei Nachweis unabhängig von seiner Ausprägung vor (Goldhirsch et al., 2009). Der HER-2 Rezeptorstatus wurde in Übereinstimmung mit den ASCO-Richtlinien ermittelt (Wolff et al., 2007). Als positives Analyseergebnis für eine HER-2 Überexpression wurde eine IHC-Färbung von 3+ als einheitliche, intensive Membranfärbung von > 30% der Zellen eines invasiven Tumors gewertet. Bei einem Score von 2+ bzw. allgemein bei nicht eindeutigem Ergebnis wurde ein weiterer Nachweis durch eine Hybridisierungsreaktion durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine SISH (Silver in situ Hybridisation), ebenfalls auf der Station Ventana Benchmark XT nach Standardprotokoll unter Verwendung des Kits „760-098 ultraView SISH DNP Detection Kit“ durchgeführt wurde. Ein SISH-Analyseergebnis von mehr als sechs HER-2 Gen Kopien pro Nucleus oder eine SISH-Ratio (HER-2 Gensignale vs. Chromosom 17 Signale) von mehr als 2,0 wurde als positives Ergebnis gewertet. Der SISH-Test ist negativ bei weniger als 4 HER-2 Gen Kopien pro Nucleus oder einer SISH-Ratio von weniger als 2.0. Uneindeutige Ergebnisse im SISH-Test wurden nochmals überprüft und nach gleichen Kriterien befundet.

Die Bestimmung der Immunhistochemie wurde in einem vollautomatischen DAKO-Färbeautomaten durchgeführt (Omnis der Firma DAKO) und die SISH auf einem Vollautomaten (Benchmark der Firma Ventana). Die Färbeprotokolle, die Kontrolle der Färbequalität, sowie die Auswertung (ER, PR, HER-2 und HER-2-SISH) ist durch eine externe Qualitätskontrolle im Rahmen von Ringversuchen gewährleistet.

## **2.3 Statistische Analyse**

**Bei der Datenerfassung wurden folgende Faktoren dokumentiert: Geburtsdatum der Patientin, Datum der Erstdiagnose, TNM-Charakteristika, Ergebnisse der Immunhistochemischen Untersuchung (Östrogen-Rezeptor, Progesteron-Rezeptor, HER-2 Status) jeweils im Primärtumor, der simultanen Lymphknotenmetastase und im Rezidiv. Alle Daten wurden in einer Excel-Tabelle zusammengeführt und bei der Analyse entsprechend sortiert. Für die Anschaulichkeit der Auswertung wurde wie in der Darstellung**

Abbildung 9 zeigt, ein Entwicklungsbaum gezeichnet. Konkordanzen und Diskordanzen wurden mittels Pearson Koeffizienten unter Zuhilfenahme des Programms SPSS überprüft. In der statistischen Auswertung wurde ich durch Dr. Oleg Gluz unterstützt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. Demographische Charakteristika

##### 3.1.1 Alter der Patienten

Das Alter der Patienten bei Diagnosestellung lag zwischen 30 und 80 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 56 Jahre. Die Altersverteilung ist in Abbildung 2 dargestellt.

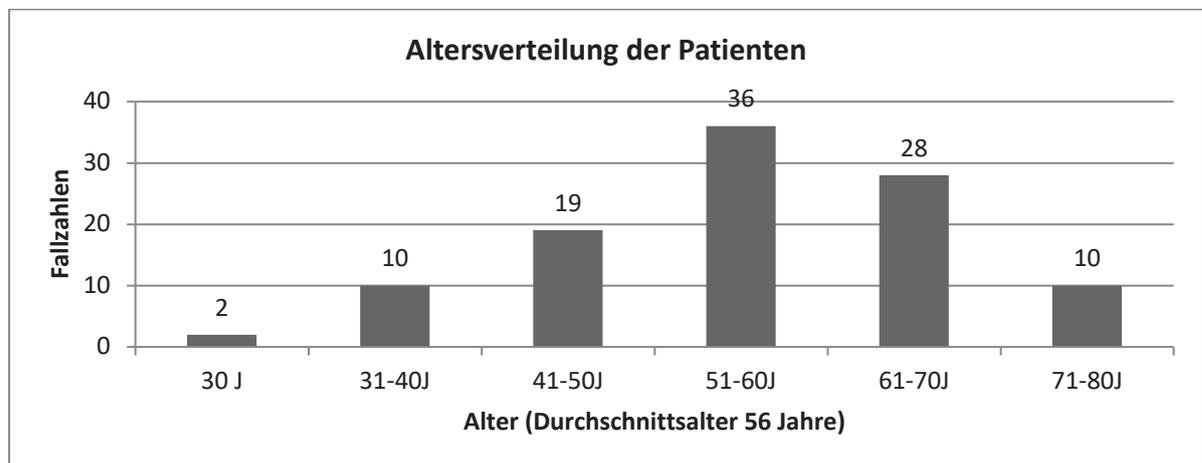


Abbildung 2: Altersverteilung der untersuchten Stichprobe; (n= 105)

##### 3.1.2 Tumorcharakteristika, Erkrankungsstadium, Therapie der untersuchten Patientinnen

Die Baseline Charakteristika der untersuchten Patientinnen zeigt die

Abbildung 3. Die Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8 zeigen die Tumorcharakteristika der Primärtumoren der 105 untersuchten Patientinnen.

	N	%
<b>Histologie</b>	105	
invasiv duktal	59	56,19%
invasiv-lobulär	13	12,38%
Andere	6	5,71%

duktulo-lobulär	2	1,9%
n.a.	25	23,8%
<b>Tumorstadium</b>		
T1	32	30,48%
T2	33	31,43%
T3-4	7	6,67%
ypT0	1	0,95%
ypT1	9	8,57%
ypT2	14	13,33%
ypT3-4	6	5,71%
n.a.	3	2,86%
<b>Nodalstatus</b>		
pN1	38	36,19%
pN2	11	10,48%
pN3	30	28,57%
ypN1	9	8,57%
ypN2	8	7,62%
ypN3	8	7,62%
n.a.	1	0,95%
<b>Grading</b>		
G1	0	0
G2	29	27,62%
G3	62	59,05%
n.a.	14	13,33%
<b>Tumorbiologie Primarius</b>		
ER pos	74	70,48%
PR pos	66	62,86%
Her-2 pos	21	21,65%
<b>Tumorbiologie Lymphknoten</b>		
ER pos	69	65,71%
PR pos	49	46,66%
Her-2 pos	17	17,53

<b>Tumorbiologie</b>		
<b>Rezidiv/Metastase</b>		
ER pos	68	64,76%
PR pos	52	49,52%
Her-2 pos	28	28,87%

Abbildung 3: Tumor Charakteristika bei Ersterkrankung, Tumorbiologie des primären Mammakarzinoms, der primären Lymphknotenmetastase(n) und des Rezidivs/Metastase der Gesamtstichprobe (n= 105)

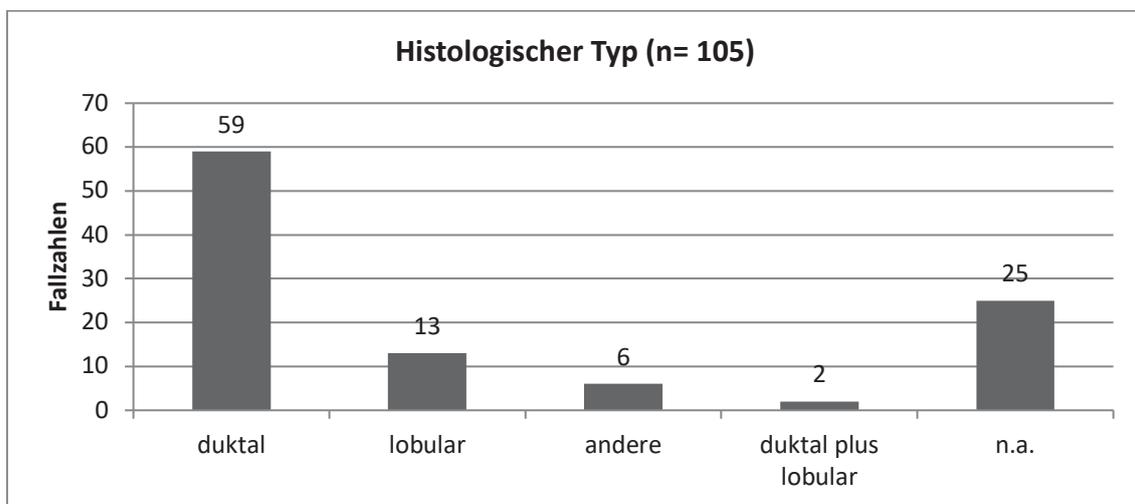


Abbildung 4: Histologische Typisierung des Primärtumors der 105 untersuchten Fälle.

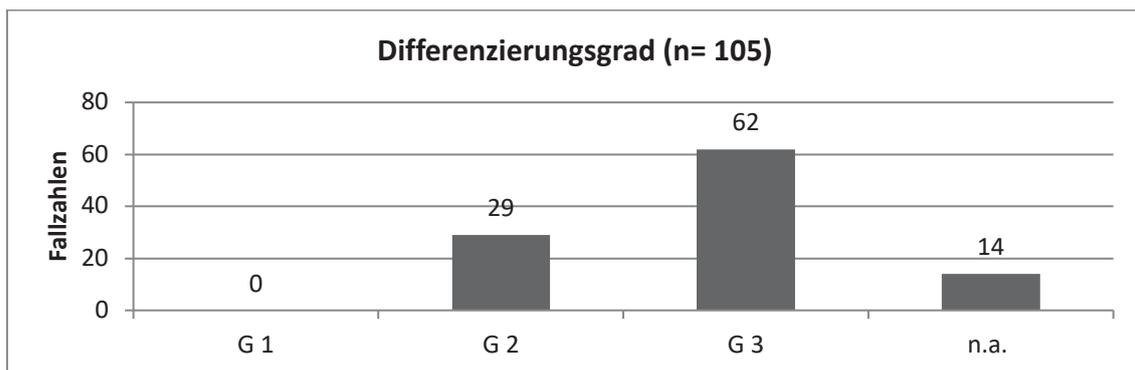


Abbildung 5 Differenzierungsgrad des Primärtumors.

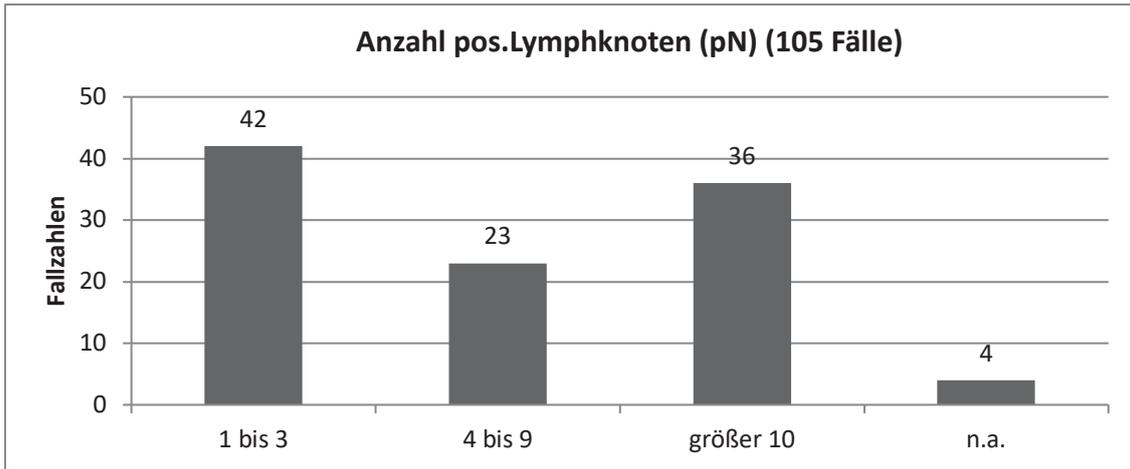


Abbildung 6 Verteilung der nodalpositiven Patientinnen auf Risikogruppen

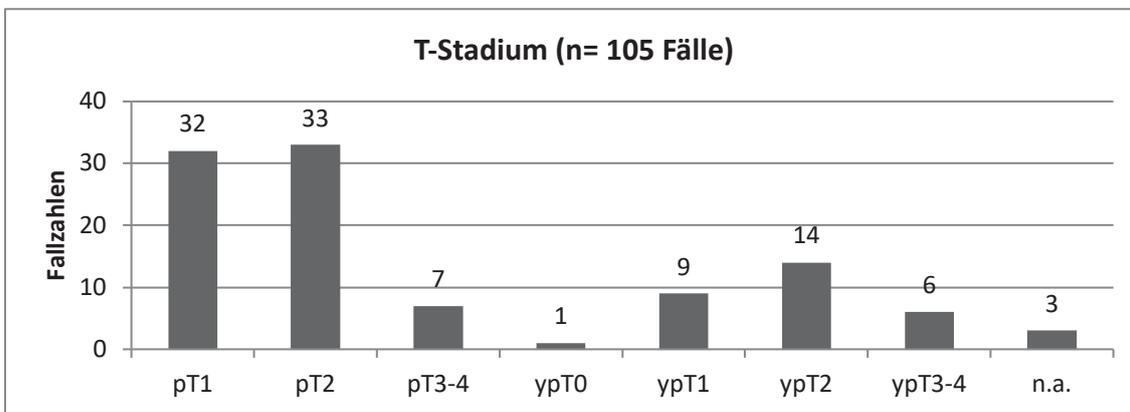


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der T-Stadien.

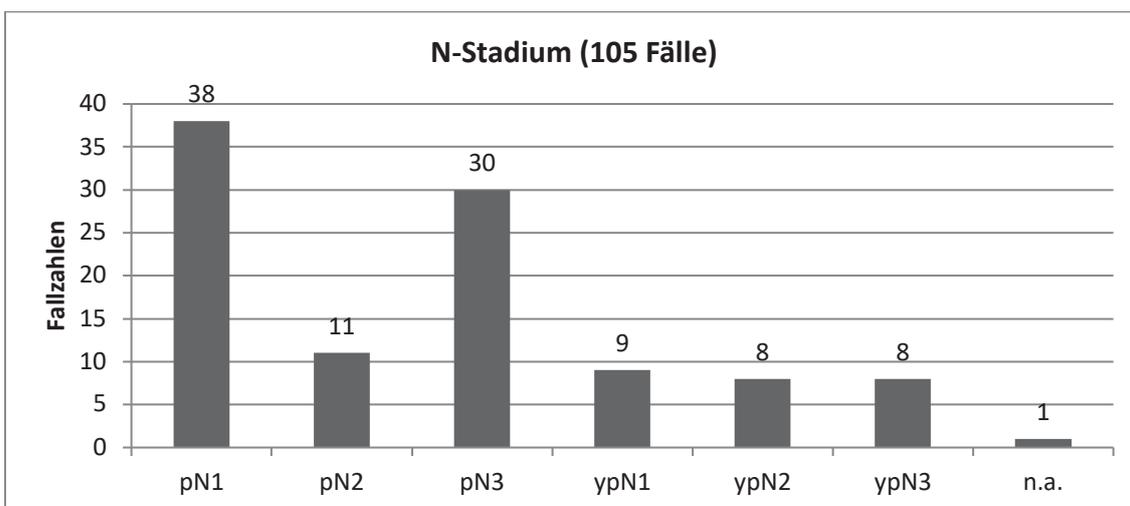


Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung des Nodalstatus

### 3.1.3 Erkrankungsstadium und Verteilung der Rezidive, Therapie

Bei 14 Patientinnen (13,3%) lag eine primär-metastasierte Erkrankung vor, 91 Patienten (86,8%) waren sekundär metastasiert. Es wurden sowohl Patientinnen mit Lokalrezidiv (n= 50) als auch mit Fernmetastasen (n= 55) in die Untersuchung einbezogen. Von 74 ER-positiven Patientinnen erhielten 60 Patienten (81%) eine endokrine Therapie, davon 34 (45,9%) mit Tamoxifen, 22 (29,7%) mit Aromataseinhibitoren und vier (5,4%) erhielten beide Therapien sequenziell. Von 21 HER-2 positiven Patientinnen erhielten 10 (47,6%) eine Therapie mit Trastuzumab und eine Patientin (4,7%) mit Lapatinib.

## 3.2 Prädiktion der Tumorbiologie der Lymphknotenmetastase für die Tumorbiologie eines Rezidivs

Nach Auswertung der tumorbiologischen Charakteristika ER, PR und HER-2 des Primärtumors (P), der synchronen Lymphknotenmetastasen (LK) und des Rezidivs (M) wurden alle betrachteten Fälle (ER, PR n= 105; HER-2 n= 97) jeweils einer der 8 möglichen Kombinationen aus den drei möglichen Tumorquellen (P, LK, M) und der Ausprägung rezeptorpositiv bzw. -negativ zugeordnet (

*Abbildung 9*). Diese Einteilung erfolgte für ER, PR und HER-2 separat. Auf Basis der o.g. Einteilung der einzelnen Fälle (Patientinnen) wurden Verteilungsmuster mit den jeweiligen Häufigkeiten der Fälle konstruiert.

*Abbildung 9* zeigt exemplarisch die mögliche Verteilung für einen ER-positiven Primarius. Bezogen auf die tumorbiologischen Charakteristika des Primärtumors, der Lymphknotenmetastase und des Rezidivs ergeben sich vier Ausprägungskombinationen bezüglich des ER-Status (+++), (++-), (+-+) und (+--).

Bei Betrachtung des Primärtumors und des Rezidivs hatten von 74 Patienten mit ER-positiven Primärtumoren insgesamt 13 (18%) ein diskordantes, also rezeptornegatives, Rezidiv. Die Diskordanz zwischen Lymphknoten und Rezidiv betrug 16% (12/74). Wenn hingegen der Rezeptorstatus der Lymphknoten als Prädiktionskriterium zum Rezeptorstatus des Primarius kombiniert wird, ergeben sich deutlich höhere Wahrscheinlichkeiten für die Prädiktion des Rezeptorstatus des Rezidivs.

Patienten mit einer tumorbiologisch zum Primärtumor konkordanten Lymphknotenmetastase hatten eine 10%-ige Wahrscheinlichkeit für ein diskordantes Rezidiv. Dagegen hatten Patienten mit einer tumorbiologisch zum Primärtumor diskordanten Lymphknotenmetastase in 54% der Fälle ein tumorbiologisch diskordantes Rezidiv. Die *Abbildung 10* zeigt die gesamten Untersuchungsergebnisse in absoluten

Zahlen und als prozentuale Änderungshäufigkeiten. Wie vorstehend beschrieben, gestattet die Einbeziehung der Lymphknotenbiologie die Bildung von Untergruppen der betroffenen Patienten, die gegenüber der allgemein in der Literatur beschriebenen Frequenz eines Rezeptorwechsels zwischen Primärtumor und Metastase erhöhte Wahrscheinlichkeiten für ein diskordantes bzw. konkordantes Rezidiv haben. Insbesondere ist die tumorbiologische Diskordanz zwischen der Lymphknotenmetastase und späterer Metastase, sowohl für den ER als auch für die HER-2-Expression geringer (Abbildung 10 C), als die tumorbiologische Diskordanz zwischen dem Primärtumor und der späteren Metastase (Abbildung 10 B).

**Die Prädiktion bezüglich des Rezeptorstatus und der HER-2-Expression eines späteren Rezidivs wird demzufolge durch die gesonderte Untersuchung der Tumorbiologie der Lymphknotenmetastase entscheidend verbessert.** Die Zahlen legen nahe, dass der ER/HER-2 Rezeptorstatus der Lymphknotenmetastase eine höhere Prädiktion des ER/HER-2 Rezeptorstatus des Rezidivs hat als der Rezeptorstatus des Primarius.

Die Prädiktion wird nochmals deutlich verbessert, wenn Primarius und Lymphknotenmetastase gemeinsam betrachtet werden (siehe auch Abbildung 10 D). Bei Konkordanz des Rezeptorstatus von Primarius und Lymphknotenmetastase liegt die Wahrscheinlichkeit eines diskordanten Rezeptorstatus des Rezidivs bei ER und HER-2 Rezeptor bei lediglich 9 bis 10 % (die Veränderung im HER-2 Rezeptor vom negativen Primarius und Lymphknoten zum positiven Rezidiv ist allerdings 19%). Bei bereits zwischen dem Primarius und simultanen Lymphknotenmetastasen vorliegender Diskordanz im ER und HER-2 Status ist in über 50% der Fälle der Rezeptorstatus des Rezidivs konkordant zum Rezeptorstatus des Lymphknotens.

### Expression des Estrogenrezeptors

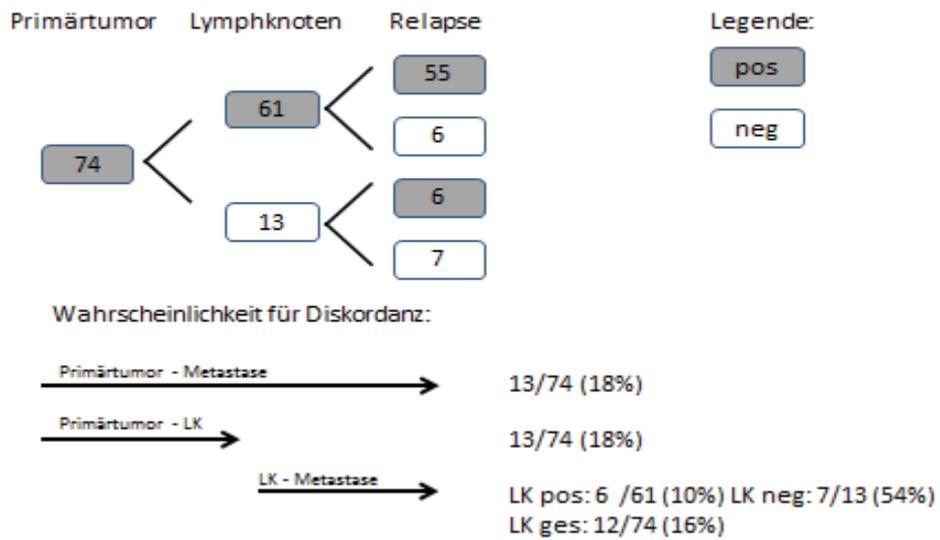


Abbildung 9: Expression des Estrogenrezeptors im Krankheitsverlauf bei rezeptorpositivem Primärtumor.

Bei konkordanter Tumorbiologie der Lymphknotenmetastasierung zum Primarius verringert sich die Wahrscheinlichkeit für ein tumorbiologisch diskordantes Rezidiv von 18% auf 10%. Im Fall einer diskordanten Lymphknotenmetastase steigt die Wahrscheinlichkeit von 18% auf 54%.

### Diskordanz P - LK - M

					# Fälle			
		P	LK	M	ER	PR	HER-2	
A)	pos	pos	pos	55	31	10		
	pos	pos	neg	6	11	1		
	pos	neg	pos	6	12	1		
	pos	neg	neg	7	10	9		
	neg	pos	pos	5	4	4		
	neg	pos	neg	3	3	2		
	neg	neg	pos	2	5	13		
	neg	neg	neg	21	29	57		
				105	105	97	Summe Patienten	
B)	pos		neg	18%	33%	48%	Prädiktion Diskordanz P-M	
	neg		pos	23%	22%	22%	Prädiktion Diskordanz P-M	
	pos/neg		pos/neg	19%	29%	28%	Prädiktion Diskordanz P-M Gesamt	
C)		pos	neg	13%	29%	18%	Prädiktion Diskordanz LK-M	
		neg	pos	22%	30%	18%	Prädiktion Diskordanz LK-M	
		pos/neg	pos/neg	16%	30%	18%	Prädiktion Diskordanz LK-M Gesamt	
D)	pos	pos	neg	10%	26%	9%	Prädiktion Diskordanz P/LK-M	
	pos	neg	neg	54%	45%	90%		
	neg	pos	pos	63%	57%	67%		
	neg	neg	pos	9%	15%	19%		

Abbildung 10 Verteilung der Rezeptorstatus in der Gruppe

A) Fallzahlen (n) für die 8 möglichen Ausprägungen des Rezeptorstatus des Primärtumors (P), der synchronen Lymphknotenmetastase (LK) und des Rezidivs (M).

B) Häufigkeitsverteilung der diskordanten Fälle des Rezidivs (M) in Bezug auf den Rezeptorstatus des Primärtumors (P).

C) Häufigkeitsverteilung der diskordanten Fälle (M) in Bezug auf den Rezeptorstatus des Lymphknotens (LK).

Die Diskordanz bei ER und HER-2 ist geringer als bei B) (Diskordanz Primärtumor – Rezidiv). Die Prädiktion ist gegenüber B) verbessert.

D) Häufigkeitsverteilung der diskordanten Fälle (M) in Bezug auf die Konkordanz oder Diskordanz der Rezeptorstatus zwischen den Lymphknotenmetastasen und Primärtumor.

Durch die Analyse von P/LK können Untergruppen mit veränderten Wahrscheinlichkeiten einer diskordanten Entwicklung separiert werden. Dadurch wird die Prädiktion gegenüber C) nochmals verbessert. Es wurden nur die Werte für die Diskordanz P-M bzw. P/LK-M

berechnet. Die Konkordanz Werte können aus den Daten unter A) berechnet werden und verhalten sich komplementär zu den Diskordanz Werten.

### **3.3 Konkordanz der Tumorbiologie zwischen Primärtumor, LK-Metastase und Rezidiv**

Die Berechnung der Konkordanz der Tumorbiologie zwischen Primärtumor, LK-Metastasierung und Rezidiv erfolgte mittels Pearson- Korrelationstest (Abbildung 11). Die Korrelation zwischen dem ER-Status im Primärtumor und dem ER-Status in der LK-Metastase ist hoch signifikant (0,544;  $p < 0,001$ ); ebenso wie die Korrelation zwischen dem ER-Status im Primärtumor und dem Rezidiv (0,571; ( $p < 0,001$ )). Zwischen dem ER-Status in der LK-Metastase und dem Rezidiv besteht eine hoch-signifikante Korrelation 0,639. ( $p < 0,001$ ).

Damit besteht eine höhere (signifikante) Korrelation zwischen dem ER-Status der LK-Metastase und dem Rezidiv im Vergleich zur Korrelation des ER-Status des Primärtumors und dem Rezidiv. Für den PR-Status findet sich eine moderat signifikante Korrelation zwischen dem Primarius und der LK-Metastase (0,475;  $p < 0,001$ ).

Die Korrelation zwischen dem PR-Status des Primarius und dem Rezidiv beträgt 0,462;  $p < 0,001$ . Die Korrelation zwischen dem PR-Status der LK-Metastase und dem Rezidiv ist geringer ausgeprägt (0,425;  $p < 0,001$ ).

Der HER-2 Status im Primarius zeigte eine moderat-signifikante Korrelation zum HER-2 Status in der LK-Metastase (0,482,  $p < 0,001$ ) und eine geringe Korrelation zum HER-2 Status des Rezidivs (0,280,  $p = 0,005$ ).

Interessanterweise war jedoch der HER-2-Status der LK-Metastasierung deutlich stärker mit dem HER-2-Status des Rezidivs als der des Primarius-HER-2-Status assoziiert (0,580,  $p < 0,001$  gegenüber 0,280,  $p = 0,005$ ).

Korrelationen													
		er	pr	her2	tnbc	er_LK	pr_LK	HER2_LK	TNBC_LK	er_relapse	pr_relapse	HER2_relapse	TNBC_relapse
er	Korrelation nach Pearson	1	,809**	-,149	-,780**	,544**	,396**	-,204	-,394**	,571**	,414**	-,037	-,443**
	Signifikanz (2-seitig)		,000	,146	,000	,000	,000	,037	,000	,000	,000	,713	,000
	N	105	105	97	97	105	105	105	105	102	101	102	105
pr	Korrelation nach Pearson	,809**	1	-,182	-,622**	,491**	,475**	-,258**	-,355**	,419**	,462**	-,091	-,355**
	Signifikanz (2-seitig)	,000		,075	,000	,000	,000	,008	,000	,000	,000	,364	,000
	N	105	105	97	97	105	105	105	105	102	101	102	105
her2	Korrelation nach Pearson	-,149	-,182	1	-,268**	-,191	-,148	,482**	-,058	-,131	-,116	,283**	-,033
	Signifikanz (2-seitig)	,146	,075		,008	,061	,147	,000	,575	,204	,264	,005	,747
	N	97	97	97	97	97	97	97	97	95	94	95	97
tnbc	Korrelation nach Pearson	-,780**	-,622**	-,268**	1	-,427**	-,280**	-,101	,495**	-,450**	-,334**	-,198	,536**
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,008		,000	,005	,325	,000	,000	,001	,054	,000
	N	97	97	97	97	97	97	97	97	95	94	95	97
er_LK	Korrelation nach Pearson	,544**	,491**	-,191	-,427**	1	,676**	-,310**	-,754**	,639**	,540**	-,064	-,467**
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,061	,000		,000	,001	,000	,000	,000	,520	,000
	N	105	105	97	97	105	105	105	105	102	101	102	105
pr_LK	Korrelation nach Pearson	,396**	,475**	-,148	-,280**	,676**	1	-,274**	-,509**	,387**	,425**	-,040	-,327**
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,147	,005	,000		,005	,000	,000	,000	,692	,001
	N	105	105	97	97	105	105	105	105	102	101	102	105
HER2_LK	Korrelation nach Pearson	-,204	-,258**	,482**	-,101	-,310**	-,274**	1	-,248	-,228	-,349**	,580**	-,127
	Signifikanz (2-seitig)	,037	,008	,000	,325	,001	,005		,011	,021	,000	,000	,196
	N	105	105	97	97	105	105	105	105	102	101	102	105
TNBC_LK	Korrelation nach Pearson	-,394**	-,355**	-,058	,495**	-,754**	-,509**	-,248	1	-,409**	-,338**	-,279**	,568**
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,575	,000	,000	,000	,011		,000	,001	,004	,000
	N	105	105	97	97	105	105	105	105	102	101	102	105
er_relapse	Korrelation nach Pearson	,571**	,419**	-,131	-,450**	,639**	,387**	-,228	-,409**	1	,713**	-,117	-,720**
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,204	,000	,000	,000	,021	,000		,000	,243	,000
	N	102	102	95	95	102	102	102	102	102	101	102	102
pr_relapse	Korrelation nach Pearson	,414**	,462**	-,116	-,334**	,540**	,425**	-,349**	-,338**	,713**	1	-,228	-,542**
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,264	,001	,000	,000	,000	,001	,000		,022	,000
	N	101	101	94	94	101	101	101	101	101	101	101	101
HER2_relapse	Korrelation nach Pearson	-,037	-,091	,283**	-,198	-,064	-,040	,580**	-,279**	-,117	-,228	1	-,341**
	Signifikanz (2-seitig)	,713	,364	,005	,054	,520	,692	,000	,004	,243	,022		,000
	N	102	102	95	95	102	102	102	102	102	101	102	102
TNBC_relapse	Korrelation nach Pearson	-,443**	-,355**	-,033	,536**	-,467**	-,327**	-,127	,568**	-,720**	-,542**	-,341**	1
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,747	,000	,000	,001	,196	,000	,000	,000	,000	
	N	105	105	97	97	105	105	105	105	102	101	102	105

\*\* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.  
\* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Abbildung 11: Statistische Analyse der Pearson-Verteilung

### 3.4 Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse

Bei der Auswahl der Patientendaten wurden distante und lokale Rezidive berücksichtigt und sowohl primär als auch sekundär metastasierte Fälle einbezogen. Ein Teil der Patienten erhielt zielgerichtete Therapien, Chemotherapie oder Strahlentherapie. Alle Therapieformen hätten die tumorbiologischen Faktoren der Rezidiv-Manifestation beeinflussen können und somit auf die oben gezeigten Untersuchungsergebnisse zur Prädiktion der Tumorbiologie der Lymphknotenmetastase zum Zeitpunkt der Ersterkrankung Einfluss nehmen können.

Um ein solchen Einfluss jedoch auszuschließen, wurden jeweils die Fälle mit einem bestimmten Merkmal den Fällen ohne dieses Merkmal gegenübergestellt. In diesen Vergleichen konnte kein Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse nachgewiesen werden.

### 3.5 Einfluss der Rezidiv-Lokalisation (lokal versus distant)

Bei der Metastasierung werden lymphogene und hämatogene Metastasierung unterschieden (Pantel and Brakenhoff, 2004) (Detmar, 2014) wobei die hämatogene Metastasierung einen deutlich komplexeren Vorgang darstellt. Im Vergleich zwischen regionären und distanten Metastasen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung der Fallzahlen (vergl. Abbildung 12 (ER) und Abbildung 13 (HER-2)). Daher ist eine Verzerrung der Untersuchungsergebnisse durch die gemeinsame Auswertung der lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen nicht wahrscheinlich. Interessanterweise kam die Veränderung vom HER-2 negativen Primärtumor zur HER-2-Positivität sowohl im Lymphknoten bei der Primärerkrankung als auch in der Metastase nur im Zusammenhang mit dem distanten Rezidiv vor. Allerdings ist die Zahl von 4 Fällen zu gering, um an dieser Stelle statistisch belegbare Aussagen zu treffen.

P	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg											
LK	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg											
M	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg											
									Summe										
Nur Brust	15	1	1	3	2	3	0	3	28	54%	4%	4%	11%	7%	11%	0%	11%	21%	
nur LK	2	0	0	0	0	0	1	2	5	40%	0%	0%	0%	0%	0%	20%	40%	20%	
Brust und distant	4	1	1	0	0	0	0	2	8	50%	13%	13%	0%	0%	0%	0%	25%	13%	
LK und distant	5	0	0	2	0	0	0	2	9	56%	0%	0%	22%	0%	0%	0%	22%	22%	
n.a.	8	2	0	0	0	0	0	1	11	73%	18%	0%	0%	0%	0%	0%	9%	18%	
nur distant	21	2	4	2	3	0	1	11	44	48%	5%	9%	5%	7%	0%	2%	25%	18%	
Gesamt	55	6	6	7	5	3	2	21	105										
Lokal	17	1	1	3	2	3	1	5	33	52%	3%	3%	9%	6%	9%	3%	15%	21%	
Distant	38	5	5	4	3	0	1	16	72	53%	7%	7%	6%	4%	0%	1%	22%	18%	
Gesamt	55	6	6	7	5	3	2	21	105										

Abbildung 12: Einfluss der Art der Metastasierung (lokal vs. distant) auf die Prädiktion (ER)

Die einzelnen Spalten der Tabelle zeigen die Zusammenhänge zwischen den acht möglichen Kombinationen des Rezeptorstatus (P-LK-M) und Lokalrezidiven, Fernmetastasen bzw. deren Kombinationen für den ER.

Die linke Hälfte der Abbildung 12 zeigt die absoluten Zahlen und die rechte Hälfte der Abbildung die prozentuale Verteilung, jeweils bezogen auf die Zeilensumme. Die prozentualen Abweichungen der Einzelwerte je Spalte der rechten Tabelle sind ein Maß für die relative Häufigkeit der einzelnen Rezeptorstatus-Kombinationen in Abhängigkeit von der Art der Metastasierung. Die Zusammenfassung im unteren rechten Teil (farblich hinterlegt) zeigt, dass die Häufigkeit einzelner Kombinationen des Rezeptorstatus für Lokalrezidive und Fernmetastasen weitgehend gleich verteilt ist. Die Verteilung der diskordanten Fälle (Summe der diskordanten Rezeptorkombinationen zwischen P und M) zeigt ebenfalls keinen Unterschied zwischen Lokalrezidiven und Fernmetastasen.

P	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg										
LK	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg										
M	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg										
									Summe									
Nur Brust	3	0	0	2	0	0	4	16	25	12%	0%	0%	8%	0%	0%	16%	64%	24%
nur LK	0	0	0	1	0	1	0	2	4	0%	0%	0%	25%	0%	25%	0%	50%	25%
Brust und distant	2	0	0	1	0	0	0	3	6	33%	0%	0%	17%	0%	0%	0%	50%	17%
LK und distant	0	0	0	0	3	0	1	4	8	0%	0%	0%	0%	38%	0%	13%	50%	50%
n.a.	0	0	0	1	0	0	3	7	11	0%	0%	0%	9%	0%	0%	27%	64%	36%
nur distant	5	1	1	4	1	1	5	25	43	12%	2%	2%	9%	2%	2%	12%	58%	26%
Gesamt	10	1	1	9	4	2	13	57	97									
Lokal	3	0	0	3	0	1	4	18	29	10%	0%	0%	10%	0%	3%	14%	62%	24%
Distant	7	1	1	6	4	1	9	39	68	10%	1%	1%	9%	6%	1%	13%	57%	29%
Gesamt	10	1	1	9	4	2	13	57	97									

Abbildung 13: Einfluss der Art der Metastasierung (lokal vs. distant) auf die Prädiktion (HER-2)

Die einzelnen Spalten der Abbildung 13 zeigen die Zusammenhänge zwischen den acht möglichen Kombinationen des Rezeptorstatus (P-LK-M) und Lokalrezidiven, Fernmetastasen bzw. deren Kombinationen für HER-2. Die linke Hälfte zeigt die absoluten Zahlen und die rechte Hälfte die prozentuale Verteilung, jeweils bezogen auf die Zeilensumme. Die prozentualen Abweichungen der Einzelwerte je Spalte der rechten Tabelle sind ein Maß für die relative Häufigkeit der einzelnen Rezeptorstatus Kombinationen in Abhängigkeit von der Art der Metastasierung. Die Zusammenfassung im unteren rechten Teil (farblich hinterlegt) zeigt, dass die Häufigkeit einzelner Kombinationen des Rezeptorstatus für Lokalrezidive und Fernmetastasen weitgehend gleich verteilt ist. Die Verteilung der diskordanten Fälle (Summe der diskordanten Rezeptorkombinationen zwischen P und M) zeigt ebenfalls keinen Unterschied zwischen Lokalrezidiven und Fernmetastasen. Eine Ausnahme bildet die Kombination P-LK-M / neg-pos-pos. Hier sind alle Fälle ausschließlich bei Fernmetastasen zu finden. Angesichts der geringen Fallzahl (4) ist dieser Sachverhalt aber statistisch nicht belastbar.

### 3.6 Einfluss der Therapie

In der hier dargestellten Untersuchung wurde das Vorliegen einer Diskordanz bezüglich des Rezeptorstatus zwischen dem rezeptorpositiven Primärtumor und rezeptornegativen Rezidiv für Patienten mit bzw. ohne Therapie verglichen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht (Abbildung 14 und Abbildung 15). Interessanterweise ist sowohl für ER als auch für HER-2 der Verlust der Rezeptorexpression unter Therapie geringer als ohne Therapie. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die angewandten adjuvanten Therapien die Häufigkeitsverteilung des Rezeptorwechsels nicht beeinflusst haben.

#### ER: Diskordanz unter Therapie (Anzahl Fälle)

	Primärtumor	Metastase	
ER positiv	74	61	
davon erhielten Tamoxifen	34		
davon erhielten AI (Tamoxifen und AI)	22		
	4		
endokrine Therapie gesamt	60	50	83%
keine endokrine Therapie gesamt	14	11	79%

Abbildung 14: Verlust des ER im Rezidiv bei ER-positivem Primärtumor

Nach endokriner Therapie waren noch 83% der Fälle ER-pos.; ohne endokrine Therapie waren noch 79% der Fälle ER-pos. Die endokrine Therapie hat somit keinen Einfluss auf den Verlust des ER-Rezeptors.

#### HER-2: Diskordanz unter Therapie (Anzahl Fälle)

# Fälle	Primärtumor	Metastase	
HER-2 pos	21	11	
davon erhielten Trastuzumab	11		
davon erhielten Lapatinib	1		
Therapie gesamt	12	7	58%
keine Therapie	9	4	44%

Abbildung 15: Verlust der HER-2-Überexpression im Rezidiv bei HER-2 positivem Primärtumor

Nach Therapie mit HER-2-gerichteter Therapie durch Trastuzumab bzw. Lapatinib waren noch 58% der Fälle ER pos.; ohne Therapie waren noch 44% der Fälle ER pos.

### 3.7 Einfluss des Zeitpunktes der Metastasierung

Die Einbeziehung von sowohl primär als auch sekundär metastasierten Patienten hatte keinen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse. Die relativen Häufigkeiten der 8 möglichen Rezeptorkonstellationen (P-LK-M) sind annähernd gleich. Größere prozentuale Abweichungen sind durch die sehr geringe Fallzahl (14) bei den primär metastasierten Patienten zu erklären und daher nicht aussagekräftig. Die Kombination aus einer weitgehenden Übereinstimmung zwischen primär und sekundär metastasierten Patienten sowie der Anteil der primär metastasierten Fälle von nur 13% schließen eine Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse weitgehend aus. (Abbildung 16)

P	LK	M	sek. mtast	prim. mtast	sek. mtast	prim. mtast
pos	pos	pos	48	7	53%	50%
pos	pos	neg	6	0	7%	0%
pos	neg	pos	5	1	5%	7%
pos	neg	neg	6	1	7%	7%
neg	pos	pos	3	2	3%	14%
neg	pos	neg	3	0	3%	0%
neg	neg	pos	2	0	2%	0%
neg	neg	neg	18	3	20%	21%
Summe			91	14	100%	100%

Abbildung 16: Häufigkeit der unterschiedlichen Kombinationen des ER-Rezeptorstatus bei unterschiedlichen Zeitpunkten der Metastasierung

Die einzelnen Spalten der Tabelle zeigen die Häufigkeit der acht möglichen Kombinationen des Status (P-LK-M) des ER-Rezeptors bei primär vs. sekundär metastasierten Patienten.

Die in % ausgedrückte relative Häufigkeit zeigt keine Unterschiede zwischen der primär metastasierten und der sekundär metastasierten Situation.

P	LK	M	sek mtast	prim mtast	sek mtast	prim mtast
pos	pos	pos	9	1	11%	7%
pos	pos	neg	1	0	1%	0%
pos	neg	pos	1	0	1%	0%
pos	neg	neg	9	0	11%	0%
neg	pos	pos	3	1	4%	7%
neg	pos	neg	2	0	2%	0%
neg	neg	pos	12	1	14%	7%
neg	neg	neg	46	11	55%	79%
Summe			83	14	100%	100%

*Abbildung 17: Häufigkeit der unterschiedlichen Kombinationen des HER-2-Rezeptorstatus*

Die einzelnen Spalten der Tabelle (Abbildung 17) zeigen die Häufigkeit der acht möglichen Kombinationen des Status (P-LK-M) des HER-2 Rezeptors bei primär vs. sekundär metastasierten Patienten.

Die in % ausgedrückte relative Häufigkeit zeigt keine Unterschiede zwischen der primär metastasierten und der sekundär metastasierten Situation.

## 4 Diskussion

Brustkrebs ist eine heterogene und komplexe Erkrankung (Weigelt and Reis-Filho, 2009). Zielgerichtete („targeted“) Therapien haben in den letzten Jahren wesentlich zur Verbesserung der Behandlung von Brustkrebs beigetragen. Unter zielgerichteter Therapie versteht man das gezielte Eingreifen in molekulare Regulationsmechanismen des Tumorwachstums, der Proliferation, der Metastasierung und der Neoangiogenese (Harbeck et al., 2010). Die ersten und unverändert bedeutendsten zielgerichteten Therapien bestehen in der Blockierung des ER-Rezeptor- und des HER-2-Signalweges. Etwa 75% aller primären Mammakarzinome exprimieren den Östrogenrezeptor (Musgrove and Sutherland, 2009), (Osborne and Schiff, 2011) und etwa 20% zeigen eine Überexpression des HER-2-Rezeptors (Ross et al., 2009). Der Nachweis des ER und des PR bzw. einer Überexpression von HER-2 gemäß den Richtlinien und Leitlinien (online Dokument: Kommission Mamma / Leitlinien & Empfehlungen / Leitlinien und Stellungnahmen / AGO-Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologischen Onkologie) indiziert eine endokrine bzw. HER-2-gerichtete Therapie.

Hier stellt sich die Frage nach der Prädiktion des Therapieerfolgs unter mehreren Aspekten:

- Ausrichtung der Therapie auf den Rezeptorstatus des Primarius
- Einbeziehung in die Therapie-Empfehlung aufgrund des Rezeptorstatus der simultanen Lymphknotenmetastasen
- Einschätzung der Wahrscheinlichkeit des Rezeptorwechsels (Konkordanz oder Diskordanz des Rezeptorstatus) zwischen Primarius und simultaner Lymphknotenmetastase).

### 4.1 Diskordanzen auf der Rezeptor-Ebene

Ein wesentliches Charakteristikum von Tumoren ist ihre hohe genetische und phänotypische Instabilität (Hanahan and Weinberg, 2011). Der Chromosomensatz kann sich ändern, es können Gene amplifiziert werden, aber auch verloren gehen. Die Expression einzelner Gene kann supprimiert aber auch verstärkt werden. Unter dem Einfluss des Mikroenvironments und der Konkurrenz verschiedener Subklone eines Tumors können bestimmte Phänotypen entstehen und auch wieder verschwinden. Unter bestimmten Bedingungen (also Mutationen an anderen Stellen des Signalweges) kann eine rezeptorpositive Zellpopulation offensichtlich auch ohne den ER, PR oder HER-2

Rezeptor oder bei dessen Blockade weiter bestehen oder sogar proliferieren. Der triple negative Typ zeigt, dass ER, PR und HER-2 nicht in jedem Fall essenziell für das Tumorwachstum sind.

#### 4.1.1 Diskordanz beim HER-2 Rezeptor

Praktisch alle neueren Untersuchungen zum HER-2-Status in Metastasen und Lokalrezidiven zeigen eine Diskordanz der Tumorbiologie im Vergleich zum Status der primären Tumoren (Botteri et al., 2012), (Amir et al., 2008), (Xiao et al., 2011), (Bogina et al., 2011), (Amir et al., 2012), (Lower et al., 2009), (Santinelli et al., 2008), (Tapia et al., 2007), (Regitnig et al., 2004). Die Metaanalyse von Houssami et al. (Houssami et al., 2011) ergibt eine durchschnittliche Diskordanz für den HER-2 Rezeptorstatus von 11,5% (6,9 – 18,6%). Eine Metaanalyse (Willemijne A. M. E. Schrijver, 05 January 2018) fasst die Ergebnisse zusammen.

**Dementsprechend empfehlen viele Studien die Überprüfung der Tumorbiologie der Metastasen mit dem Ziel einer Verbesserung der Prädiktion (Jensen et al., 2012), (Amir et al., 2008), (Lower et al., 2009), (Amir et al., 2012), (Botteri et al., 2012) und zwar sowohl in der primär als auch der sekundär metastasierten Situation (Santinelli et al., 2008).**

Untersuchungen des HER-2-Status von Lymphknotenmetastasen ergaben allerdings nur gering- (Gancberg et al., 2002) bis mäßig diskordante Ergebnisse (Santinelli et al., 2008). In der Übersicht von Houssami et al. (Houssami et al., 2011) beträgt der durchschnittliche Wert der HER-2-Diskordanz zwischen Primarius und Lymphknotenmetastase 4,1% (2,4% - 7,2%).

Es gibt nur wenige Hinweise in der Literatur, in denen der Lymphknotenstatus bei Primärerkrankung zur Prädiktion herangezogen wird. Aitken et al. bestimmten die Tumorbiologie in einer retrospektiven Untersuchung von 385 Patienten im Primärtumor und in 211 gepaarten Lymphknoten mit Hilfe quantitativer Immunofluoreszenz. Für HER-2 (190 Fälle) wurde ein Wechsel von HER-2 negativ nach positiv in 7,4%, von positiv nach negativ in 1,5% der Fälle festgestellt. **Die Autoren empfehlen die Einbeziehung der Bestimmung des Rezeptorstatus der Lymphknoten in die Therapieentscheidung, da insbesondere HER-2-negative Primärtumoren HER-2-positivität in den simultanen Lymphknoten-Metastasen aufwiesen** und somit u.U. eine zielgerichtete Therapie nicht indiziert wurde. (Aitken et al., 2010).

**In der hier vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass eine, bei der Erstdiagnose aufgetretene, Diskordanz der Tumorbiologie zwischen dem Primarius und der simultanen Lymphknotenmetastase die Wahrscheinlichkeit zur Diskordanz beim Rezidiv deutlich erhöht.**

Teilweise wird in der Literatur über die zunehmende Diskordanz und Zunahme der HER-2 positiven Fälle im Krankheitsverlauf berichtet (Santinelli et al., 2008), (Regitnig et al., 2004), (Houssami et al., 2011), (Ruliang Xu, 2002), (S. M. Edgerton, 2003). Dieser Verlauf wird durch unsere Untersuchung bestätigt. Bei der Grundgesamtheit von 97 Patienten war in 21 Fällen der Primärtumor HER-2 positiv; dem standen 28 HER-2 positive Rezidive gegenüber. In der Metaanalyse einer Vielzahl von Arbeiten, die vorgenannten eingeschlossen, (Willemijne A. M. E. Schrijver, 05 January 2018) geht der HER-2 Rezeptor im Krankheitsverlauf tendenziell eher verloren, als dass er sich neu manifestiert. Insofern weichen unsere Ergebnisse an dieser Stelle ab.

#### **4.1.2 Diskordanz beim ER-Rezeptor**

Die Veränderung des Hormonrezeptorstatus zwischen Primärtumor, Lymphknotenmetastase und Rezidiv ist in weit geringerem Umfang untersucht worden als die Veränderung der HER-2 Expression. Arslan et al. und andere Autoren beschreiben Diskordanzen zwischen 15-40% von Primärtumor und Rezidiv (Gutierrez et al., 2005), (Bogina et al., 2011), (Quintana et al., 2008), (Arslan C, 2010).

In der bereits genannten Untersuchung von Aitken et al. wurde bei einer Grundgesamtheit von 194 Fällen ein Wechsel von ER neg. nach ER pos. in 10,3% der Fälle und ein Wechsel von ER pos. zu ER neg. in 18% der Fälle festgestellt (Aitken et al., 2010). In einer anderen Untersuchung wurde eine Diskordanz von 4% gefunden (Jensen et al., 2012). Im Vergleich **ist die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Diskordanz mit 21 von 105 Fällen (20%) deutlich höher.**

ER und PR gehen im Krankheitsverlauf tendenziell verloren (Gutierrez et al., 2005). In dieser Arbeit wurden 74 rezeptorpositive Primärtumoren und 68 rezeptorpositive Rezidive gefunden, entsprechend einem Rückgang der ER Expression von 8 % und somit in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen.

Die eingangs diskutierten technischen Unzulänglichkeiten der präzisen Bestimmung tumorbiologischer Faktoren (Liedtke et al., 2009), (Pusztai et al., 2010), (Ross et al., 2009), (Khoshnoud et al., 2011) sind sicherlich auch für die abweichenden Ergebnisse der einzelnen Arbeiten mit verantwortlich. Es gilt aber mittlerweile als gesichert, dass eine Diskordanz des Rezeptorstatus zwischen Primärtumor, Lymphknotenmetastase und Rezidiv häufig auftritt (Willemijne A. M. E. Schrijver, 05 January 2018).

**Wie auch für den HER-2 Rezeptor wird die erneute Überprüfung des Hormon-Rezeptorstatus der Metastase zur Verbesserung der prädiktiven Voraussagen für die palliative Behandlung empfohlen (Amir et al., 2008), (Jensen et al., 2012).**

## **4.2 Prädiktive Bedeutung des Rezeptorstatus**

Sowohl der Östrogenrezeptor als auch der HER-2 Rezeptor sind prädiktiv für die zielgerichtete Therapie. Allerdings zeigen die Untersuchungen, dass in einigen ER-pos. sowie HER-2 pos. Fällen die Standardtherapie (Tamoxifen oder Aromatasehemmer bzw. Trastuzumab) nicht ihre Wirkung zeigt (Houssami et al., 2011), (Filippo Montemurro, 2006), (Simon et al., 2001). Dies liegt zu 15-30% an erworbenen Resistenzen, die auf den Verlust der Östrogenrezeptorexpression zurückgeführt werden, (Gutierrez et al., 2005) und an molekularen Veränderungen in den Signalwegen, (Ross et al., 2009), (Musgrove and Sutherland, 2009), (Osborne and Schiff, 2011). Obwohl für HER-2 keine vergleichbaren Zahlen vorliegen, besteht aber an der grundsätzlichen Unterscheidung in molekulare Resistenzmechanismen und Resistenz durch Änderung des Rezeptorstatus, z. B. durch klonale Selektion, kein Zweifel (S. R. D. Johnston, 1995). Bei der Untersuchung der HER-2-Rezeptorengruppe konnten über 200 Proteine und zahlreiche weitere Moleküle kartiert werden, die mit der HER-2-Signalübertragung in Verbindung stehen (Oda et al., 2005). Es ist zu vermuten, dass Änderungen, z.B. durch Mutationen, in diesem Signalübertragungs- und Steuerungskomplex geeignet sind, die Blockade des HER-2-Rezeptors oder den Verlust des HER-2-Rezeptors zu kompensieren (Ross et al., 2009), (Musgrove and Sutherland, 2009), (Osborne and Schiff, 2011). Letztlich ist also der Rezeptorstatus zwar der wichtigste prädiktive Faktor und notwendige Voraussetzung für den Therapieerfolg der endokrinen- bzw. der anti-HER-2-Therapie aber für sich genommen nicht in jedem Fall eine hinreichende Voraussetzung, da es weitere prädiktive Faktoren geben muss. Ganz allgemein ist das übergeordnete Ziel

der Forschung bei zielgerichteten Therapien die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen molekulare Targets in Verbindung mit der Verbesserung der Prädiktion.

### **4.3 Prädiktive Bedeutung des Rezeptorstatus in der klinischen Praxis**

Aus klinischer Sicht spielen molekulare Resistenzmechanismen bislang noch eine untergeordnete Rolle, da diese Mechanismen bisher nur unzureichend erforscht und in ein Testsystem überführt werden konnten. Daher ist die Bestimmung des Rezeptorstatus des Primärtumors für die Prädiktion ausschlaggebend **und erfolgt im Rahmen der Erstdiagnose. Diese Vorgehensweise impliziert im Grunde die Annahme der Konkordanz des Rezeptorstatus im weiteren Krankheitsverlauf.**

In Hinblick auf die klinische Praxis ergeben sich sowohl aus unseren Ergebnissen als auch aus der Literatur zwei wichtige Beobachtungen:

- 1) Patienten mit rezeptorpositivem Primärtumor und tumorbiologisch diskordanter Lymphknotenmetastase hatten ein ebenfalls zum Rezeptorstatus des Primarius diskordantes Rezidiv und zwar, bezogen auf den ER Rezeptor in 54% und bezogen auf die HER-2-Expression in 90% aller Fälle. Grundsätzlich wäre in diesen Fällen ein erhöhtes Risiko des Versagens der adjuvanten Therapie zu erwarten.
- 2) Patienten mit rezeptornegativem Primärtumor und rezeptorpositiver Lymphknotenmetastase hatten zu 63% (ER) bzw. 67% (HER-2), ein ebenfalls rezeptorpositives Rezidiv. In dieser Konstellation würden Patienten also überdurchschnittlich von einer zielgerichteten adjuvanten Therapie profitieren, die nach derzeitigen Standards aber nicht in Betracht gezogen werden würde.

### **4.4 Verbesserung der Prädiktion durch Berücksichtigung der Biologie der Lymphknotenmetastase**

Die bereits zitierte Empfehlung zur Überprüfung des Rezeptorstatus von Metastasen bzw. Rezidiven ist der palliativen Behandlungssituation zuzuordnen. Das wichtigste Ziel der adjuvanten Therapie ist, den Metastasierungsprozess zu unterbinden, um zu

verhindern, dass die Krebserkrankung in die systemische Krankheitsphase eintritt (Mostert et al., 2009).

**Die vorliegende Untersuchung zeigt eine weitere Möglichkeit auf, die Prädiktion bereits im Rahmen der Erstdiagnose durch einfache, standardisierte Untersuchungsverfahren zu verbessern.**

Durch die Bestimmung der Tumorbiologie der Lymphknoten, die bei der primären operativen Therapie routinemäßig durchgeführt werden könnte, ließe sich die Diskordanz bzw. Konkordanz im Rezeptorstatus möglicher späterer Metastasen genauer vorhersagen als anhand des Rezeptorstatus des Primärtumors allein.

**Die Tumorbiologie der Lymphknotenmetastase bei der Primärerkrankung erweist sich als exakter und zutreffender für die Prädiktion der Tumorbiologie des Rezidivs als die Tumorbiologie des Primärtumors – dies gilt zumindest für den ER- und HER-2-Status.**

Es gibt zwei weitere Arbeiten, die den Rezeptorstatus des Primärtumors mit den zugehörigen Lymphknoten und gepaarten distanten Metastasen auf Konkordanz bzw. Diskordanz untersuchten. Eine frühere Untersuchung an 31 Patienten zum HER-2 Status des Primärtumors und der zugehörigen Lymphknotenmetastasen und dem späteren Rezidiv ergab eine vollständige Konkordanz für Primärtumor und zugehörigen Lymphknoten und Diskordanz zu distanten Metastasen in 4 von 31 Fällen (Regitnig et al., 2004). Allerdings wurden nur 10 nodal positive Fälle untersucht. Die Ergebnisse sind daher u.U. aufgrund der geringen Anzahl nur beschränkt belastbar. Eine zweite Studie (Jensen et al., 2012) umfasst Daten von 66 Patienten einer prospektiven Untersuchung und archiviertem Material von 53 Patienten. Insgesamt wurden 52 Lymphknotenbiopsien untersucht. Die Diskordanz bei ER und HER-2 betrug 12% (14/118) bzw. 9% (10/114). Wie auch bei Regitnig et al. wurde eine weitgehende Konkordanz zwischen Primärtumor und zugehöriger Lymphknotenmetastase festgestellt (Regitnig et al., 2004). Die Diskordanz zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase liegt mit 4% im statistisch erwarteten Häufigkeitsbereich. Trotzdem kann aus diesen Daten keine prädiktive Aussage zum Rezeptorstatus der distanten Metastasen bzw. Lokalrezidive abgeleitet werden. Dies war aber auch nicht das Ziel der Untersuchung. Andererseits ist die Studie von Jensen durch die Mischung von aktuellen und archivierten Probenmaterial und durch die relativ geringe Anzahl von Lymphknotenbiopsaten mit Bezug auf den Rezeptorstatus der Lymphknoten eingeschränkt.

**Im Gegensatz dazu zeigt die vorliegende Untersuchung eine deutliche Veränderung des Rezeptorstatus in den simultanen LK-Metastasen gegenüber den Primärtumoren.**

Wie von Aitken et al. postuliert, sind die hier gezeigten Daten besonders für Patienten relevant, die im Primärtumor Hormonrezeptor- bzw. HER-2-negativ sind, aber in der Lymphknotenmetastase hormonrezeptor- bzw. HER-2 positiv werden (Aitken et al., 2010). Diese Gruppe hat sowohl für die Hormonrezeptoren als auch für HER-2 eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass der positive Rezeptorstatus auch im Fall einer Metastasierung beibehalten wird (67% HER-2 und 63% ER) beim Vergleich Lymphknoten-Rezidiv, gegenüber 22% bei HER-2 und 23% bei ER beim Vergleich Primärtumor-Rezidiv. Es ist vorstellbar, dass diese Patienten von einer adjuvanten zielgerichteten Therapie profitieren könnten, die nach den gültigen Leitlinien bei hormonrezeptor- bzw. HER-2 negativem Primärtumor nicht empfohlen werden würde. Die Beobachtungen gelten insbesondere für HER-2, da die HER-2 Überexpression im Krankheitsverlauf zunimmt. Nach den in dieser Arbeit ermittelten Daten ist die Wahrscheinlichkeit, dass nach der Kombination rezeptornegativer Primärtumor mit rezeptorpositiver Lymphknotenmetastase auch das Rezidiv rezeptorpositiv ist, für HER-2 mit 66,7% höher als bei ER mit 62,5%. Diese Ergebnisse erfordern Überprüfungen in weiteren Untersuchungen, insbesondere, da andere Arbeitsgruppen (Regitnig et al., 2004, Jensen et al., 2012) eine hohe Konkordanz der Lymphknoten zum Primarius gefunden haben. D.h. die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese einer Verbesserung der Prädiktion durch die Einbeziehung des Rezeptorstatus der Lymphknoten hätte von den anderen Autoren so nicht getroffen werden können.

## **4.5 Kritische Betrachtung der vorliegenden Untersuchung**

### **4.5.1 Genauigkeit der HER-2 Bestimmung**

Mit der Entdeckung des HER-2- und des ER-Signalweges begann auch die Diskussion über die Genauigkeit der Nachweisverfahren (Liedtke et al., 2009), (Pusztai et al., 2010), (Ross et al., 2009), (Khoshnoud et al., 2011).

Pusztai et al. nennen drei Gründe für eine mögliche Diskordanz:

- tatsächlicher Wechsel des Rezeptorstatus,
- begrenzte Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Nachweisverfahren

- „sampling error“ bei Tumoren aus heterogenen Subpopulationen (Pusztai et al., 2010).

Die genannten Punkte werden in der vorliegenden Arbeit ausführlich diskutiert. Da alle Proben der Lymphknoten von einem pathologischen Labor gemäß den gültigen Empfehlungen von ASCO und St. Gallen analysiert wurden, ist diese Fehlerquelle als minimal nach dem heutigen Stand der Technik einzustufen. Allerdings wurde der Rezeptorstatus am Primarius nicht wiederholt, sodass auch über Jahre unterschiedliche Grenzwerte (1 vs. 10% positiven Zellen für den ER) für Positivität eine Fehlerquelle darstellen können. Die Tatsache, dass Tumoren aus sehr heterogenen Zellpopulationen aufgebaut sein können, wurde in dieser Arbeit ebenfalls ausführlich diskutiert (Shah et al., 2009), (Torres et al., 2007), (Navin et al., 2010), (Tuula Kuukasjärvi, 1997). Bei den entsprechenden Arbeiten von Kuukasjärvi et al, 1997, (Shah et al., 2009), (Torres et al., 2007), (Navin et al., 2010) muss einschränkend betont werden, dass sich die Untersuchungen auf sämtliche genetische und phänotypische Veränderungen der Zellen beziehen und nicht nur auf den Rezeptorstatus. Die Veränderungen nur eines genetischen oder phänotypischen Merkmals wie z.B. dem Rezeptorstatus sind deutlich geringer. Einen Einblick in die Intratumorheterogenität von HER-2 gibt die umfangreiche Arbeit von Simon et al. an 196 nodal-negativen und 196 nodalpositiven Primärtumoren und je drei zugehörigen Lymphknotenmetastasen, die mittels FISH und IHC analysiert wurden. FISH und IHC-Ausprägungen zeigten übereinstimmende Ergebnisse in 93,7% der Fälle. Somit liegt die Intratumorheterogenität im Bereich zwischen 2 – 3% (Wu et al., 2008), (Simon et al., 2001), sodass davon auszugehen ist, dass die Intratumorheterogenität unsere Ergebnisse nicht wesentlich beeinflusst hat.

**Vergleich der eigenen Daten zur P-LK Diskordanz mit Aitken et al., 2010 und Simon et al., 2001**

P	LK	Anzahl Fälle			Anzahl Fälle		
		Aitken et al.	Simon et al.	Eigene Daten	Aitken et al.	Simon et al.	Eigene Daten
pos	pos	25	28	11	13%	22%	11%
pos	neg	3	5	10	2%	4%	10%
neg	pos	14	2	6	7%	2%	6%
neg	neg	148	90	70	78%	72%	72%
Summe Patienten		190	125	97	100%	100%	100%

Legende:

P Primärtumor

LK Lymphknotenmetastase

*Abbildung 18: Vergleich der Häufigkeiten der 4 möglichen P-LK Kombinationen für HER-2 mit Literaturwerten (Aitken et al., 2010) (Simon et al., 2001)*

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Häufigkeitsverteilungen entsprechen denen von Aitken et al. und Simon et al. (vergl. Abbildung 18). Ein signifikanter Unterschied ist jedoch in der Ausprägung Primärtumor-positiv zu Lymphknotenmetastase-negativ zu beobachten, für die in dieser Untersuchung hohe Diskordanzen (48%), vergl. Abbildung 10) gezeigt wurden. Ansonsten stützt die weitgehende Übereinstimmung mit Studien, die explizit hochauflösende Verfahren in Kombination mit hohen Fallzahlen zur Bestimmung des HER-2 Status verwendet haben (Aitken et al., 2010), (Simon et al., 2001), die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung.

In Folge der ausgeprägten Diskordanz in den Fällen Primärtumor-positiv zu - Lymphknotenmetastase-negativ ist auch die Gesamt-Diskordanz zwischen Primärtumor und Rezidiv mit 28% ungewöhnlich hoch. Höhere Werte (33% Diskordanz) wurden aber z.B. bei Lower et al. (Lower et al., 2009) beschrieben. Die starken Unterschiede könnten daraus resultieren, dass im Primarius die Rezeptor-Expression nur schwach positiv war.

#### **4.5.2 Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse**

Für die vorliegende Untersuchung wurden retrospektiv Patienten ausgewählt, die in der Zeit von 1996 – 2011 am Brustzentrum Niederrhein behandelt wurden, und für die unter anderem der Rezeptorstatus von ER, PR und HER-2 sowohl für den Primärtumor als auch für gepaarte Lymphknoten und gepaarte Lokalrezidive bzw. distante Metastasen bestimmt wurde. In dieser Situation besteht ein Risiko für Auswahlverzerrungen (selection bias). Es wurden nur Patienten betrachtet, die metastasierten, größtenteils trotz adjuvanter Therapie, also de novo oder erworbene Resistenzen aufwiesen. Die andere Patientengruppe, nämlich diejenigen Patienten, die keine Metastasen bekamen, wurde nicht betrachtet. Die Tumoren dieser Patienten könnten ein anderes genetisches Profil haben als Tumoren mit identischem Rezeptorstatus, die aber nicht metastasieren oder bei denen die Metastasierung durch eine adjuvante Therapie verhindert wurde. Die ermittelten prozentualen Verhältnisse könnten sich bei einer prospektiven Studie verändern.

Wie im Kapitel Ergebnisse beschrieben, konnte allerdings kein Einfluss durch die Therapie und durch die Einbeziehung von sowohl primär als auch sekundär metastasierten Patienten nachgewiesen werden (vergl. Abbildung 16 und Abbildung 17 ). Auch scheinen Lokalrezidive bzw. distante Metastasen keine unterschiedlichen

Häufigkeitsverteilungen zu haben, die insofern die Untersuchungsergebnisse hätten verändern können (vergl. Abbildung 12 und Abbildung 13).

### **4.5.3 Grundsätzliche Fehlerquellen**

Der Rezeptorstatus der Metastasen ist nur ein indirekter Rückschluss auf die tatsächliche Entwicklung einer Brustkrebserkrankung. Zwischen der Entstehung eines Mammakarzinoms und der Ausbildung von Metastasen können viele Jahre liegen, in der die Tumorzellen fortwährender genetischer und phänotypischer Änderung unterliegen. Nur ein Teil der Mammakarzinome bildet überhaupt Metastasen aus (Hanahan and Weinberg, 2011). Verschiedene Studien zur Intratumorheterogenität (Navin et al., 2010), (Simon et al., 2001), (Shah et al., 2009) (Torres et al., 2007) aber auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich der Rezeptorstatus im Laufe der Zeit mehrfach ändern kann. Auch der Nachweis von ER oder HER-2 in CTC bedeutet nicht notwendigerweise, dass alle Fernmetastasen denselben Rezeptorstatus aufweisen (Fehm et al., 2007). Der Umstand, dass eine Fernmetastase einen bestimmten Rezeptorstatus aufweist, rechtfertigt nicht den Umkehrschluss, dass dieser Status bereits bei der disseminierten Tumorzelle vorhanden war, aus der die Metastase hervorgegangen ist. Weiterhin kann ein Patient auch verschiedene CTC-Populationen aufweisen, die nicht nur gegenüber dem Primarius, sondern auch untereinander diskordant sind. (B. A. S. Jaeger 2017).

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte dergestalt, dass je Rezeptor (ER, PR und HER-2) Werte für die untersuchten Manifestationen (P, LK, M) verglichen wurden. Anhand der Positivität oder Negativität wurden unterschiedliche Entwicklungsketten aufgezeichnet. Dabei wurde insbesondere festgestellt, dass eine diskordante Lymphknotenmetastase deutlich häufiger zusammen mit einer diskordanten Metastase auftritt als mit einer konkordanten Metastase. Das ist zwar plausibel, aber kein Nachweis für einen kausalen Zusammenhang. Die diskordante Fernmetastase könnte auch durch ein anderes Merkmal, wie z.B. durch den Rezeptorstatus der CTC erklärt werden, das aber noch nicht bekannt bzw. nicht Teil unserer Untersuchung ist.

## **4.6 Klinische Relevanz**

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf einer möglichen Verbesserung der Prädiktion in Bezug auf die Wirksamkeit der adjuvanten Therapie. Dazu wurde der Rezeptorstatus des

Primarius, der synchronen Lymphknotenmetastase und des Rezidivs untersucht. Dabei wurde bezüglich des Rezeptorstatus der Rezeptoren ER und HER-2 festgestellt, dass bei diskordanter Lymphknotenmetastase der Rezeptorstatus der Metastase gehäuft ebenfalls diskordant war. Die Kombination „pos, neg, neg“ trat für die Rezeptoren ER und HER-2 mit einer relativen Häufigkeit von 54% bzw. 90% auf. Die Kombination neg, pos, pos trat mit einer Häufigkeit von 63% bzw. 67% auf.

Also würden Patienten in der Kombination „positiver Primarius und negativer Lymphknoten“ in der Mehrzahl der Fälle eine ebenfalls rezeptornegative Metastase entwickeln, besonders bezüglich HER-2 ist das sehr ausgeprägt, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Anti-HER-2 Therapie weniger erfolgversprechend scheint. Der potenzielle Rezeptorverlust hätte sich in der Lymphknotenmetastase bereits angekündigt.

Umgekehrt deutet eine rezeptorpositive Lymphknotenmetastase nach negativem Primarius darauf hin, dass auch die Fernmetastase mit erhöhter Wahrscheinlichkeit rezeptorpositiv sein wird. Diese Patientengruppe könnte von der Therapie gegen den entsprechenden Rezeptor deutlich profitieren. Nach Stand der Leitlinien würde diesen Patienten die entsprechende adjuvante Therapie vorenthalten werden, wohingegen in 2 Drittel dieser Fälle ein Ansprechen auf die Therapie möglich wäre.

Bei den Ergebnissen fällt weiterhin die Kombination negativer Primarius, negative Lymphknotenmetastase und positive Metastase für den HER-2 Rezeptor auf. 13 von 70 (19%) Patienten hatten in der Metastase doch wieder eine nachgewiesene HER-2 Expression. In Kombination mit den Patienten mit der Konstellation neg, pos, pos gab es insgesamt 17 von 95 (17,5%) Patienten, die bei HER-2 negativem Primärtumor dennoch eine HER-2 positive Metastase manifestierten. Diese Gruppe hätte deutlich von der Anti HER-2 Therapie profitieren können. Diese Ergebnisse sind mit den Erkenntnissen der Destiny BREAST 04 Studie hochgradig kompatibel (Shanu Modi, 2022). Die Studie hat gezeigt, dass die klinische Einstufung als HER-2 negativ nicht die völlige Abwesenheit des Rezeptors bedeutet und die Behandlung mit T-DXd (Trastuzumab-Deruxtecan) einen deutlichen Vorteil bei PFS und OS mit sich bringt. Mit Sicherheit wird es dazu in der Zukunft weitere Untersuchungen geben.

Das Konzept der mehrfachen Bestimmung der Rezeptoren gewinnt eine neue Bedeutung durch die inzwischen zum Standard gehörende endokrine Induktionstherapie mit Aromatasehemmern oder Tamoxifen mit oder ohne ovarielle Suppression über 2-4 Wochen vor der Operation/Re-Biopsie. Primär dient es vor allem der Überprüfung des Proliferationsansprechens durch Ki-67 unter der endokrinen Therapie (Nitz UA, 2022), (Smith I, 2020). Nebenbefundlich können jedoch dadurch auch signifikante Änderungen in

der Rezeptoren Bestimmung identifiziert werden. Hier zeigten Gluz et al. beim Kongress ASCO 2022 eine Analyse aus der WSG-ADAPT Studie, der zufolge in der lokalen und der zentralen Pathologie HER2-negativen Tumoren in ca. 2% doch ein positiver HER2 Status am postendokrinen OP- oder Re-Biopsie Präparat festgestellt werden kann (Gluz O, 2022). Eine noch gravierende Konstellation lässt sich vor allem bei ER-niedriger Expression finden (1-10%). Hier zeigte eine erneute Bestimmung des ER nur in zirka 10% ein übereinstimmendes Ergebnis in der zentralen Pathologie an der 1. Stanzbiopsie oder in der 2. Biopsie nach endokriner Therapie. In den restlichen Fällen lag die Expression in der 2. Bestimmung über 10% oder war komplett negativ. Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass vor allem bei grenzwertigen Befunden oder bei dringender therapeutischer Konstellation (z.B. LK-Befall, aggressives Wachstumsmuster oder fehlende endokrine Empfindlichkeit) eine Re-Bestimmung auf jeden Fall sehr sinnvoll ist.

## **5 Zusammenfassung**

Die Entwicklung einer Krebserkrankung und damit auch des ER, PR und HER-2 Status beginnt mit der Entstehung des Primärtumors und kann sich über die Metastasierung zu einer systemischen Erkrankung ausweiten. Dabei können eine lymphogene Metastasierung und eine hämatogene Metastasierung unterschieden werden (Pantel et al., 2008). Die Metastasierung kann, muss aber nicht bereits ab einem sehr frühen Zeitpunkt der Krebsentwicklung stattfinden (Husemann et al., 2008). Metastasen können sich schnell manifestieren oder als CTC, DTC oder Mikrometastasen über Jahrzehnte inaktiv bleiben. (Hanahan and Weinberg, 2011). Der Rezeptorstatus für Primärtumor und Lymphknotenmetastasen, CTC, DTC, Mikrometastasen, Lokalrezidiven und Fernmetastasen wurde jeweils als Zweierpaar zur Ermittlung von Konkordanz/Diskordanz oder auch einzeln und für sich genommen zur Ermittlung prognostischer Informationen häufig untersucht – mit teilweise stark unterschiedlichen Ergebnissen. Insgesamt gilt aber als gesichert, dass es im Verlauf von Brustkrebserkrankungen in vielen Fällen zu einer Änderung des Rezeptorstatus von ER, PR und HER-2 kommt (Willemijne A. M. E. Schrijver, 05 January 2018). Daher wird in der palliativen Behandlungssituation eine Überprüfung des Rezeptorstatus der Metastase empfohlen.

In der Situation der adjuvanten Behandlung ist der Rezeptorstatus eines potenziellen Fortschreitens der Brustkrebserkrankung nicht bekannt, sondern der Rezeptorstatus

des Primarius wird extrapoliert. Das Ziel dieser Arbeit ist es, anhand des Rezeptor Status von (synchronen / asynchronen) Lymphknotenmetastasen zu einer valideren Prädiktion zu gelangen.

Dazu wurde ein Teil der Entwicklungskette des Mammakarzinoms – nämlich Primarius, LK und Metastase- jeweils für den Rezeptorstatus von ER, PR und HER-2 zusammengesetzt. Dabei zeigte sich insbesondere, dass die Ausprägung „zum Primarius diskordante Lymphknotenmetastase und ebenfalls diskordante Fernmetastase“ sowohl bezogen auf den ER-Rezeptor als auch bezogen auf den HER-2 Rezeptor deutlich häufiger auftritt als andere Kombinationen des Rezeptorstatus von P, LK und M. Das würde nahelegen den Rezeptorstatus des Lymphknotens bei der Festlegung der adjuvanten Therapie zu berücksichtigen. Davon würden insbesondere Patienten profitieren, die im Primarius rezeptornegativ sind, deren rezeptorpositive Lymphknotenmetastase aber einen Hinweis auf eine potenziell vorteilhafte Therapie geben würde. Die gefundenen Häufigkeitsverteilungen legen nahe, dass der Rezeptorstatus des Lymphknotens die Prädiktion verbessern könnte.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass in der Destiny BREAST 04 Studie (Shanu Modi, 2022) festgestellt wurde, dass auch diejenigen Patienten, die nach aktuell gültigen Kriterien rezeptornegativ für HER-2 getestet wurden von einer Anti HER-2 Therapie sowohl bezüglich PFS als auch OS profitiert haben. Offensichtlich ist nach aktueller Definition der Grenzwert der Einstufung Rezeptorpositiv / Rezeptornegativ zu eng gefasst.

Dies leitet über zu grundsätzlichen Fragen der Zuverlässigkeit der Messergebnisse, also den verfügbaren Ausgangsdaten der vorliegenden Arbeit. Im Wesentlichen wurden drei Faktoren herausgestellt. Die verschiedenen Nachweisverfahren (z.B. FISH, IHC) können ebenso wie die Laborpraxis, oder die Probenentnahme (Intratumorheterogenität) zu abweichenden Messwerten führen. Durch die retrospektive Auswahl metastasierter Patienten ergibt sich gegenüber der Gesamtheit der Patienten (also einschließlich der nicht metastasierten Patienten) eine Auswahlverzerrung und drittens kann aufgrund der Art der verfügbaren Daten und ihrer Auswertung keine Kausalität bewiesen werden.

Eine verbesserte Prädiktion - im engeren Sinne eine verbesserte Prädiktion des Rezeptorstatus potenzieller Metastasen und deren Vorläufer - würde die adjuvante Therapie der Brustkrebserkrankung in zweifacher Hinsicht verbessern. Falls das Vorhandensein der Rezeptoren ER, PR und HER-2 mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann, könnte man den betroffenen Patienten die

Nebenwirkungen der rezeptorspezifischen Therapie ersparen, umgekehrt würden diejenigen Patienten profitieren, die nach gängiger Bestimmung des Rezeptorstatus des Primarius keine personalisierte Therapie erhalten hätten, aber aufgrund der verbesserten Prädiktion nun doch für die entsprechende adjuvante Therapie qualifiziert wären.

Mit Berücksichtigung der vorgenannten Einschränkungen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Rezeptorstatus der Lymphknotenmetastasen zur Verbesserung der Prädiktion beitragen könnte.

Obwohl die Ergebnisse auf tumorbiologischer und auf klinischer Ebene intuitiv plausibel sind, kann aufgrund der aktuellen Datenlage nicht bewiesen werden, dass Patienten von der Einbeziehung des Rezeptorstatus der Lymphknoten bei der Festlegung der adjuvanten Therapieempfehlung profitieren würden. Das gilt sogar für die palliative Situation, bei der der Rezeptorstatus des therapeutischen targets bestimmt werden kann. Das Design der erforderlichen (prospektiven) Studien ist ethisch schwer darstellbar.

Eine Hoffnung besteht in der Konvergenz des wachsenden medizinischen Wissens. Zuzug der Destiny BREAST 04 Studie profitieren auch Patienten mit Rezeptorstatus HER-2 negativ von einer T-DXd Therapie. Wenn auch die Herleitung dieser Entdeckung eine andere ist, als die in dieser Arbeit beschriebene Einbeziehung der Rezeptorstatus der Lymphknoten in die Prädiktion, ist die zellbiologische Erklärung möglicherweise zur Deckung zu bringen. Es könnte beispielsweise untersucht werden, ob insbesondere die Patienten der BREAST 04 Studie profitiert haben, die die Kombination „HER-2 negativer Primarius und diskordante (positive) Lymphknotenmetastase“ aufwiesen.

## **6 Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Prädiktion des Verhaltens der Immunhistochemischen Merkmale im Verlauf der Erkrankung der Mammakarzinom Patienten durch die Einbeziehung der Tumorbiologie der Lymphknotenmetastase zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in die Behandlungsstrategie signifikant verbessert wird.

Dies gilt insbesondere für Patienten, deren Primärtumor rezeptornegativ ist und die nach derzeitigem Standard keine zielgerichtete Therapie (endokrin oder anti-HER-2)

erhalten würden, die aber anhand der Lymphknotenbiologie für den Fall einer Metastasierung eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen rezeptorpositiven Phänotyp zeigen. Das gilt insbesondere für HER-2, da der HER-2 positive Phänotyp mit Fortschreiten der Erkrankung häufiger wird.

**Es ist von klinischer Relevanz, die Bestimmung der Immunhistochemie in simultanen Lymphknotenmetastasen bereits bei Erstdiagnose in die klinische Routine zu implementieren, um die adjuvante Therapie für die Patientinnen zu optimieren.**

## Literaturverzeichnis:

- AITKEN, S. J., THOMAS, J. S., LANGDON, S. P., HARRISON, D. J. & FARATIAN, D. 2010. Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. *Ann Oncol*, 21, 1254-1261.
- AKE BORG, A. K. T., HELGI SIGURDSSON, GARY M. CLARK, MARTEN PERNO, SUZANNE A. W. FUQUA, DICK KILLANDER, AND WILLIAM L. MCGUIRE 1990. HER-2/neu Amplification Predicts Poor Survival in Node-positive Breast Cancer. *Cancer Research*, 50, 4332-4337.
- AMIR, E., CLEMONS, M., PURDIE, C. A., MILLER, N., QUINLAN, P., GEDDIE, W., COLEMAN, R. E., FREEDMAN, O. C., JORDAN, L. B. & THOMPSON, A. M. 2012. Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer Treat Rev*, 38, 708-14.
- AMIR, E., OOI, W. S., SIMMONS, C., KAHN, H., CHRISTAKIS, M., POPOVIC, S., KALINA, M., CHESNEY, A., SINGH, G. & CLEMONS, M. 2008. Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 20, 763-8.
- ARPINO, G., WEISS, H., LEE, A. V., SCHIFF, R., DE PLACIDO, S., OSBORNE, C. K. & ELLEDGE, R. M. 2005. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst*, 97, 1254-61.
- ARPINO, G., WIECHMANN, L., OSBORNE, C. K. & SCHIFF, R. 2008. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev*, 29, 217-33.
- ARSLAN C, S. E., AKSOY S, ALTUNDAG K 2010. Variation in hormone receptor and HER-2 status between primary and metastatic breast cancer: review of the literature. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15, 21-30.
- AURILIO, G., MONFARDINI, L., RIZZO, S., SCIANDIVASCI, A., PREDI, L., BAGNARDI, V., DISALVATORE, D., PRUNERI, G., MUNZONE, E., DELLA VIGNA, P., RENNE, G., BELLOMI, M., CURIGLIANO, G., GOLDBIRSCHE, A. & NOLE, F. 2013. Discordant hormone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status in bone metastases compared to primary breast cancer. *Acta Oncol*, 52, 1649-56.
- AZADEH STARK, B. S. H., SCOTT JOENS, DEBRA NOVOTNY, ANN D. THOR, LESTER E. WOLD, MICHAEL J. SCHELL, L. JOSEPH MELTON III, EDISON T. LIU, AND KATHLEEN CONWAY 2000. HER-2/neu Amplification in Benign Breast Disease and the Risk of Subsequent Breast Cancer. *J Clin Oncol* 18, 267-274.
- B. A. S. JAEGER, J. N., U. ANDERGASSEN, C. MELCHER, F. SCHOCHTER, D. MOUARRAWY, G. ZIEMENDORFF, M. CLEMENS, E. V. ABEL, G. HEINRICH, K. SCHUELLER, A. SCHNEEWEISS, P. FASCHING, M. W. BECKMANN, CH. SCHOLZ, T. W. P. FRIEDL, K. FRIESE, K. PANTEL, T. FEHM, W. JANNI, B. RACK 2017. The HER2 phenotype of circulating tumor cells in HER2-positive early breast cancer: A translational research project of a prospective randomized phase III trial. *Plos one*.
- BOGINA, G., BORTESI, L., MARCONI, M., VENTURINI, M., LUNARDI, G., COATI, F., MASSOCCO, A., MANFRIN, E., PEGORARO, C. & ZAMBONI, G. 2011. Comparison of hormonal receptor and HER-2 status between breast primary tumours and relapsing tumours: clinical implications of progesterone receptor loss. *Virchows Arch*, 459, 1-10.
- BORST, P. & WESSELS, L. 2010. Do predictive signatures really predict response to cancer chemotherapy? *Cell Cycle*, 9, 4836-40.
- BOTTERI, E., DISALVATORE, D., CURIGLIANO, G., BROLLO, J., BAGNARDI, V., VIALE, G., ORSI, F., GOLDBIRSCHE, A. & ROTMENSZ, N. 2012. Biopsy of liver metastasis for women with breast cancer: impact on survival. *Breast*, 21, 284-8.
- BOZZETTI, C., PERSONENI, N., NIZZOLI, R., GUAZZI, A., FLORA, M., BASSANO, C., NEGRI, F., MARTELLA, E., NALDI, N., FRANCIOSI, V. & CASCINU, S. 2003. HER-2/neu amplification by

- fluorescence in situ hybridization in cytologic samples from distant metastatic sites of breast carcinoma. *Cancer*, 99, 310-5.
- BUBLIL, E. M. & YARDEN, Y. 2007. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 124-34.
- BUI, S. M. A. M. M. 2000. Assessment of Her-2/neu Overexpression in Primary Breast Cancers and Their Metastatic Lesions:  
An Immunohistochemical Study. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30, 259-265.
- C YEUNG 1, J. H., M CLEMONS 2 3, S MAZZARELLO 3, B HUTTON 3, F HAGGAR 3, C L ADDISON 3, I KUCHUK 2, X ZHU 2, K GELMON 4, A ARNAOUT 5 6 2016. Estrogen, progesterone, and HER2/neu receptor discordance between primary and metastatic breast tumours-a review. *Cancer Metastasis Rev*
- CHARLES M. PEROU, T. S. R., MICHAEL B. EISEN,, MATT VAN DE RIJN, S. S. J., CHRISTIAN A. REES, JONATHAN R. POLLACK, DOUGLAS T. ROSS, HILDE JOHNSEN,, LARS A. AKSLEN, E. Y. F., ALEXANDER PERGAMENSCHIKOV, CHERYL WILLIAMS, SHIRLEY X. ZHU, PER E. LÜNNING, & ANNE-LISE BÛRRESEN-DALE, P. O. B. D. B. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *NATURE | VOL 406 | 17 AUGUST 2000*
- CHIKAKO SHIMIZU, M., TAKASHI FUKUTOMI, MD, HITOSHII TSUDA, MD, SADAKO AKASHI-TANAKA, MD, TORU WATANABE, MD, TAKESHI NANASAWA, MD, AND KENICHI SUGIHARA, MD 2000. c-erbB-2 Protein Overexpression and p53 Immunoreaction in Primary and Recurrent Breast Cancer Tissues. *Journal of Surgical Oncology*, 73, 17-20.
- CHRISTIAN FOUIGNER, H. B., JENS HENRIK NORUM & THERESE SÛRLIE 14 April 2020. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun* 11, 1787.
- CONSTANZE VOGEL, W. M., BERND MORGENSTERN, SEBASTIAN LUDWIG, JÛRG JANNE VEHRESCHILD, STEFANIE HAMACHER, PETER MALLMANN, VERENA KIRN AND FABINSHY THANGARAJAH Mai 2019. The Role of Previous Therapies and Sites of Metastasis as Influencing Factors on Discordance of ER, PR and HER2 Status Between Primary and Metastasized Breast Cancer. *Anticancer Research*, 39(5), 2647-2659.
- DETMAR, S. K. A. M. 2014. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J Clin Invest*, 124, 922-928.
- DJ SLAMON, G. C., SG WONG, WJ LEVIN, A ULLRICH AND WL MCGUIRE 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *American Association for the Advancement of Science*, cience (print ISSN 0036-8075; online ISSN 1095-9203) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. 2017 © The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. The title Science is a registered trademark of AAAS.
- DUNNWALD, L. K., ROSSING, M.A. & LI, C.I. 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 9.
- EDWARD H. ROMOND, M. D., EDITH A. PEREZ, M.D., JOHN BRYANT, PH.D., VERA J. SUMAN, PH.D., CHARLES E. GEYER, JR., M.D., NANCY E. DAVIDSON, M.D., ELIZABETH TAN-CHIU, M.D., SILVANA MARTINO, D.O., SOONMYUNG PAIK, M.D., PETER A. KAUFMAN, M.D., SANDRA M. SWAIN, M.D., THOMAS M. PISANSKY, M.D., LOUIS FEHRENBACHER, M.D., LEILA A. KUTTEH, M.D., & VICTOR G. VOGEL, M. D., DANIEL W. VISSCHER, M.D., GREG YOTHERS, PH.D., ROBERT B. JENKINS, M.D., PH.D., ANN M. BROWN, SC.D., SHAKER R. DAKHIL, M.D., ELEFTHERIOS P. MAMOUNAS, M.D., M.P.H., WILMA L. LINGLE, PH.D., PAMELA M. KLEIN, M.D., JAMES N. INGLE, M.D., AND NORMAN WOLMARK, M.D. 2005. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *The new england journal of medicine*, 353;16, 1673-84.
- FEHM, T., BECKER, S., DUERR-STOERZER, S., SOTLAR, K., MUELLER, V., WALLWIENER, D., LANE, N., SOLOMAYER, E. & UHR, J. 2007. Determination of HER2 status using both serum HER2

- levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status. *Breast Cancer Res*, 9, R74.
- FILIPPO MONTEMURRO, A. M. D., B MATTEO CLAVAREZZA, C STEFANIA REDANA, A MARIA ELENA JACOMUZZI, D GIORGIO VALABREGA, A SAVERIO DANESE, E GUIDO VIETTI-RAMUS, F ANTONIO DURANDO, G MARCO VENTURINI, C MASSIMO AGLIETTA 2006. Outcome of Patients with HER2-Positive Advanced Breast Cancer
- Progressing During Trastuzumab-Based Therapy. *The Oncologist Breast cancer*, 1:318–324.
- GANCBERG, D., DI LEO, A., CARDOSO, F., ROUAS, G., PEDROCCHI, M., PAESMANS, M., VERHEST, A., BERNARD-MARTY, C., PICCART, M. J. & LARSIMONT, D. 2002. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol*, 13, 1036-43.
- GILLILAND, B. J. P. H. A. D. G. 2005. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *NATURE REVIEWS | CANCER*, 5, 311-322.
- GLORIA A. NIEHANS, T. P. S., DANIEL DYKOSKI, DAVID T. KIANG 1993. Stability of HER-2/neu Expression Over Time and at Multiple Metastatic Sites. *Journal of the National Cancer Institute*, 85, 1230-1235.
- GLUZ O, C. M., KUEMMEL S, ET AL: 2022. Concordance and clinical impact of ER, PR, HER2 expression by local and central immunohistochemistry versus RT-PCR in HR+/HER2- early breast cancer (EBC): Results from the ADAPT trial. *Journal of Clinical Oncology* 40:536-536.
- GOLDHIRSCH, A., INGLE, J. N., GELBER, R. D., COATES, A. S., THURLIMANN, B., SENN, H. J. & PANEL, M. 2009. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*, 20, 1319-29.
- GONG, Y., BOOSER, D. J. & SNEIGE, N. 2005. Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 103, 1763-9.
- GUPTA, G. P. & MASSAGUE, J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127, 679-95.
- GUTIERREZ, M. C., DETRE, S., JOHNSTON, S., MOHSIN, S. K., SHOU, J., ALLRED, D. C., SCHIFF, R., OSBORNE, C. K. & DOWSETT, M. 2005. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol*, 23, 2469-76.
- HAMMOND, M. E., HAYES, D. F., DOWSETT, M., ALLRED, D. C., HAGERTY, K. L., BADVE, S., FITZGIBBONS, P. L., FRANCIS, G., GOLDSTEIN, N. S., HAYES, M., HICKS, D. G., LESTER, S., LOVE, R., MANGU, P. B., MCSHANE, L., MILLER, K., OSBORNE, C. K., PAIK, S., PERLMUTTER, J., RHODES, A., SASANO, H., SCHWARTZ, J. N., SWEEP, F. C., TAUBE, S., TORLAKOVIC, E. E., VALENSTEIN, P., VIALE, G., VISSCHER, D., WHEELER, T., WILLIAMS, R. B., WITTLIFF, J. L. & WOLFF, A. C. 2010. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 2784-95.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARBECK, N., SALEM, M., NITZ, U., GLUZ, O. & LIEDTKE, C. 2010. Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions. *Cancer Treat Rev*, 36, 584-94.
- HORWITZ, K. B. & MCGUIRE, W. L. 1978. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 253, 2223-2228.
- HOUSSAMI, N., MACASKILL, P., BALLEINE, R. L., BILOUS, M. & PEGRAM, M. D. 2011. HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis: tumor biology or test artefact? Insights through meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 129, 659-74.

- HUSEMANN, Y., GEIGL, J. B., SCHUBERT, F., MUSIANI, P., MEYER, M., BURGHART, E., FORNI, G., EILS, R., FEHM, T., RIETHMULLER, G. & KLEIN, C. A. 2008. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*, 13, 58-68.
- I.O.ELLIS, C. W. E. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer.
- I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*1991. 19,403-410.
- IGNATIADIS, M., KALLERGI, G., NTOULIA, M., PERRAKI, M., APOSTOLAKI, S., KAFOUSI, M., CHLOUVERAKIS, G., STATHOPOULOS, E., LIANIDOU, E., GEORGOULIAS, V. & MAVROUDIS, D. 2008. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 2593-600.
- JEFFREY S.ROSS, J. A. F. 1998. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *The Oncologist*, 3, 237-252.
- JENSEN, J. D., KNOOP, A., EWERTZ, M. & LAENKHOLM, A. V. 2012. ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 132, 511-21.
- KARLSSON, E., LINDSTRÖM, L. S., WILKING, U., SKOOG, L., JOHANSSON, U. & BERGH, J. 2010. Discordance in hormone receptor status in breast cancer during tumor progression. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 1009-1009.
- KHOSHNOUD, M. R., LOFDAHL, B., FOHLIN, H., FORNANDER, T., STAL, O., SKOOG, L., BERGH, J. & NORDENSKJOLD, B. 2011. Immunohistochemistry compared to cytosol assays for determination of estrogen receptor and prediction of the long-term effect of adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*, 126, 421-30.
- KLEIN, C. A., BLANKENSTEIN, T. J. F., SCHMIDT-KITTLER, O., PETRONIO, M., POLZER, B., STOECKLEIN, N. H. & RIETHMÜLLER, G. 2002. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *The Lancet*, 360, 683-689.
- LACROIX, H., IGLEHART, J. D., SKINNER, M. A. & KRAUS, M. H. 1989. Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. *Oncogene*, 4, 145-151.
- LIEDTKE, C., BROGLIO, K., MOULDER, S., HSU, L., KAU, S. W., SYMMANS, W. F., ALBARRACIN, C., MERIC-BERNSTAM, F., WOODWARD, W., THERIAULT, R. L., KIESEL, L., HORTOBAGYI, G. N., PUSZTAI, L. & GONZALEZ-ANGULO, A. M. 2009. Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann Oncol*, 20, 1953-8.
- LOWER, E. E., GLASS, E., BLAU, R. & HARMAN, S. 2009. HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 113, 301-6.
- MAGGIE CHON U. CHEANG , M. M., TORSTEN O. NIELSEN , ALEIX PRAT , ALVARO RODRIGUEZ-LESCURE , AMPARO RUIZSTEPHEN K. L. CHIA , LOIS E. SHEPHERD , DAVID VODUC , PHILIP SETH BERNARD , MATTHEW JAMES ELLIS , CHARLES M. PEROU , ANGELO DI LEO , LISA A. CAREY 2012. Quantitative hormone receptors, triple-negative breast cancer (TNBC), and molecular subtypes: A collaborative effort of the BIG-NCI NABCG. *JCO*, 30, 1008-1008.
- MARTINE J. PICCART-GEBHART, M. D., PH.D., MARION PROCTER, M.SCI., BRIAN LEYLAND-JONES, M.D., PH.D., ARON GOLDBIRSCHE, M.D., MICHAEL UNTCH, M.D., IAN SMITH, M.D., LUCA GIANNI, M.D., JOSE BASELGA, M.D., RICHARD BELL, M.D., CHRISTIAN JACKISCH, M.D., DAVID CAMERON, M.D., MITCH DOWSETT, PH.D., CARLOS H. BARRIOS, M.D., GÜNTHER STEGER, M.D., CHIUN-SHEN HUANG, M.D., PH.D., M.P.H., MICHAEL ANDERSSON, M.D., DR.MED.SCI., MOSHE INBAR, M.D., MIKHAIL LICHINITSER, M.D., ISTVÁN LÁNG, M.D., ULRIKE NITZ, M.D., HIROJI IWATA, M.D., CHRISTOPH THOMSEN, M.D., VICTORIA GREATOREX, M.SC., CAROL WARD, M.SC., CAROLYN STRAEHLE, PH.D., ELEANOR MCFADDEN, M.A., M. STELLA DOLCI, AND RICHARD D. GELBER, PH.D., FOR THE HERCEPTIN ADJUVANT (HERA) TRIAL STUDY TEAM, CAROLINE LOHRISCH, M.D., THOMAS

- M. SUTER, M.D., JOSEF RÜSCHOFF, M.D., TAMÁS SÜTO, M.D., PH.D., 2005. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *The new england journal of medicine*, 353.
- MARUSYK, A. & POLYAK, K. 2010. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1805, 105-17.
- MICHAEL F. PRESS, G. S., LESLIE BERNSTEIN, IVONNE E. VILLALOBOS, MARTINA MIRLACHER, JIANYUAN ZHOU, ROOBA WARDEH, YONG-TIAN LI, ROBERTA GUZMAN, YANLING MA, JANE SULLIVAN-HALLEY, ANGELA SANTIAGO, JINHA M. PARK, ALESSANDRO RIVA AND DENNIS J. SLAMON 2005. Diagnostic Evaluation of HER-2 as a Molecular Target: An Assessment of Accuracy and Reproducibility of Laboratory Testing in Large, Prospective, Randomized Clinical Trials. *Clin Cancer Res* 11, 6598–6607.
- MOSTERT, B., SLEIJFER, S., FOEKENS, J. A. & GRATAMA, J. W. 2009. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 35, 463-74.
- MUHAMMAD AL-HAJJ\*, M. S. W., ADALBERTO BENITO-HERNANDEZ†, SEAN J. MORRISON\*‡§, AND MICHAEL F. CLARKE\*¶¶ 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS*, 100, 3983–3988.
- MUNZONE, E., NOLÉ, F., ZORZINO, L., MEDICI, M., MINCHELLA, I., CASSATELLA, M. C., CASADIO, C., PICOZZI, M., ADAMOLI, L., GOLDBIRSCHE, A. & SANDRI, M. 2008. Acquisition of HER2/neu over-expression on circulating tumor cells (CTCs) in patients (pts) with advanced breast cancer (ABC) during chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 11017-11017.
- MUSGROVE, E. A. & SUTHERLAND, R. L. 2009. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, 9, 631-43.
- NAVIN, N., KRASNITZ, A., RODGERS, L., COOK, K., METH, J., KENDALL, J., RIGGS, M., EBERLING, Y., TROGE, J., GRUBOR, V., LEVY, D., LUNDIN, P., MANER, S., ZETTERBERG, A., HICKS, J. & WIGLER, M. 2010. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Res*, 20, 68-80.
- NEGRINI, S., GORGOULIS, V. G. & HALAZONETIS, T. D. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 220-8.
- NITZ UA, G. O., KUMMEL S, ET AL 2022. Endocrine Therapy Response and 21-Gene Expression Assay for Therapy Guidance in HR+/HER2- Early Breast Cancer. . *J Clin Oncol* 40:2557-2567.
- ODA, K., MATSUOKA, Y., FUNAHASHI, A. & KITANO, H. 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*, 1, 2005 0010.
- ONGARO E1, GERRATANA L1,3, CINAUSERO M1,2, PELIZZARI G1,3, POLETTI E1, GIANGRECO M3,4, ANDREETTA C1, PIZZOLITTO S5, DI LORETO C3,6, MINISINI AM1, MANSUTTI M1, RUSSO S1, FASOLA G1, PUGLISI F3,7. 2018 Apr. Comparison of primary breast cancer and paired metastases: biomarkers discordance influence on outcome and therapy. *Future Oncol.*, 14(9):849-859. doi: 10.2217/fon-2017-0384. Epub 2018 Mar 12.
- OSBORNE, C. K. & SCHIFF, R. 2011. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*, 62, 233-47.
- PANTEL, K. & BRAKENHOFF, R. H. 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4, 448-56.
- PANTEL, K., BRAKENHOFF, R. H. & BRANDT, B. 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 8, 329-40.
- PUSZTAI, L., VIALE, G., KELLY, C. M. & HUDIS, C. A. 2010. Estrogen and HER-2 receptor discordance between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist*, 15, 1164-8.
- QUINTANA, E., SHACKLETON, M., SABEL, M. S., FULLEN, D. R., JOHNSON, T. M. & MORRISON, S. J. 2008. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 456, 593-8.
- REGITNIG, P., SCHIPPINGER, W., LINDBAUER, M., SAMONIGG, H. & LAX, S. F. 2004. Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J Pathol*, 203, 918-26.

- RICHTER S, Z. A. 2011. Meta-Analyse zum diskordanten HER-2-Status bei Vergleich von Primärtumor und Metastasen bei Brustkrebs. *SABCS*, , PD05-05.
- ROSS, J. S., SLODKOWSKA, E. A., SYMMANS, W. F., PUSZTAI, L., RAVDIN, P. M. & HORTOBAGYI, G. N. 2009. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*, 14, 320-68.
- RULIANG XU, M. D., MARY ANN PERLE, PH.D., GIORGIO INGHIRAMI, M.D., WAI CHAN, B.S., YARA DELGADO, M.D., HELEN FEINER, M.D. 2002. Amplification of Her-2/neu Gene in Her-2/neu–Overexpressing and –Nonexpressing Breast Carcinomas and Their Synchronous Benign, Premalignant, and Metastatic Lesions Detected by FISH In Archival Material. *Mod Pathol* 15(2), 116-124.
- RYDEN, L., LANDBERG, G., STAL, O., NORDENSKJOLD, B., FERNO, M. & BENDAHL, P. O. 2008. HER2 status in hormone receptor positive premenopausal primary breast cancer adds prognostic, but not tamoxifen treatment predictive, information. *Breast Cancer Res Treat*, 109, 351-7.
- S. M. EDGERTON, M., D. MOORE, II, PHD, D. MERKEL, MD, AND ANN D. THOR, MD 2003. erbB-2 (HER-2) and Breast Cancer Progression. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 11 (3), 214-221.
- S. R. D. JOHNSTON, G. S.-J., I. E. SMITH, J. SALTER, J. NEWBY, M. COPPEN, S. R. EBBS, AND M. DOWSETT 1995. Changes in Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and pS2 Expression in Tamoxifen-resistant Human Breast Cancer. *CANCER RESEARCH* 55, 3331-3338, August 1, 1995.
- SABRINA ROSSI 1 , M. B., ANTONIA STRIPPOLI 2 , VINCENZO DADDUZZIO 2 , ELEONORA CERCHIARO 2 , ROSALBA BARILE 2 , ETTORE D'ARGENTO 2 , ALESSANDRA CASSANO 2 , GIOVANNI SCHINZARI 2 , CARLO BARONE 2 2015 Oct. Hormone Receptor Status and HER2 Expression in Primary Breast Cancer Compared With Synchronous Axillary Metastases or Recurrent Metastatic Disease. *Clin Breast Cancer*, 15(5):307-12.
- SANTINELLI, A., PISA, E., STRAMAZZOTTI, D. & FABRIS, G. 2008. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer*, 122, 999-1004.
- SHAH, S. P., MORIN, R. D., KHATTRA, J., PRENTICE, L., PUGH, T., BURLEIGH, A., DELANEY, A., GELMON, K., GULIANY, R., SENZ, J., STEIDL, C., HOLT, R. A., JONES, S., SUN, M., LEUNG, G., MOORE, R., SEVERSON, T., TAYLOR, G. A., TESCHENDORFF, A. E., TSE, K., TURASHVILI, G., VARHOL, R., WARREN, R. L., WATSON, P., ZHAO, Y., CALDAS, C., HUNTSMAN, D., HIRST, M., MARRA, M. A. & APARICIO, S. 2009. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature*, 461, 809-13.
- SHANU MODI, W. J., TOSHINARI YAMASHITA, JOOHYUK SOHN, MARIA VIDAL, ERIKO TOKUNAGA, JUNJI TSURUTANI, NAOTO T. UENO, YEE SOO CHAE, KEUN SEOK LEE, NAOKI NIIKURA, YEON HEE PARK, XIAOJIA WANG, BINGHE XU, DHIRAJ GAMBHIRE, LOTUS YUNG, GEROLD MEINHARDT, YIBIN WANG, NADIA HARBECK, DAVID A. CAMERON; MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER, NEW YORK, NY; INSTITUT DU CANCER DE MONTPELLIER (ICM) VAL D'AURELLE, MONTPELLIER UNIVERSITY, MONTPELLIER, FRANCE; KANAGAWA CANCER CENTER, YOKOHAMA, JAPAN; YONSEI CANCER CENTER, SEOUL, SOUTH KOREA; HOSPITAL CLINIC, BARCELONA, SPAIN; NATIONAL HOSPITAL ORGANIZATION KYUSHU CANCER CENTER, FUKUOKA, JAPAN; ADVANCED CANCER TRANSLATIONAL RESEARCH INSTITUTE, SHOWA UNIVERSITY, TOKYO, JAPAN; THE UNIVERSITY OF TEXAS MD ANDERSON CANCER CENTER, HOUSTON, TX; KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY CHILGOK HOSPITAL, DAEGU, SOUTH KOREA; RESEARCH INSTITUTE AND HOSPITAL, NATIONAL CANCER CENTER, GOYANG, SOUTH KOREA; TOKAI UNIVERSITY, TOKYO, JAPAN; SAMSUNG MEDICAL CENTER, SEOUL, SOUTH KOREA; ZHEJIANG CANCER HOSPITAL AND INSTITUTE OF CANCER AND BASIC MEDICINE, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES, HANGZHOU, CHINA; CANCER HOSPITAL CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES MEDICAL COLLEGE, BEIJING, CHINA; DAIICHI SANKYO, INC., BASKING RIDGE, NJ;

- COM- PREHENSIVE CANCER CENTER, LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITY (LMU) HOSPITAL, MUNICH, GERMANY; EDIN- BURGH CANCER RESEARCH CENTRE, UNIVERSITY OF EDINBURGH AND NHS LOTHIAN, EDINBURGH, UNITED KINGDOM 2022. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) versus treatment of physician's choice (TPC) in patients (pts) with HER2-low unresectable and/or metastatic breast cancer (mBC): Results of DESTINY-Breast04, a randomized, phase 3 study. *Jahrestagung der American Academy of Clinical Oncology 2022*.
- SHOU, J., MASSARWEH, S., OSBORNE, C. K., WAKELING, A. E., ALI, S., WEISS, H. & SCHIFF, R. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 96, 926-35.
- SIMON, R., NOCITO, A., HUBSCHER, T., BUCHER, C., TORHORST, J., SCHRAML, P., BUBENDORF, L., MIHATSCH, M. M., MOCH, H., WILBER, K., SCHOTZAU, A., KONONEN, J. & SAUTER, G. 2001. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93, 1141-6.
- SLIWKOWSKI, Y. Y. A. M. X. 2001. UNTANGLING THE ErbB SIGNALLING NETWORK. *NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY*
- VOLUME 2 | FEBRUARY 2001 | 127-137.*
- SMITH I, R. J., KILBURN L, ET AL 2020. Long-term outcome and prognostic value of Ki67 after perioperative endocrine therapy in postmenopausal women with hormone-sensitive early breast cancer (POETIC): an open-label, multicentre, parallel-group, randomised, phase 3 trial. . *The Lancet. Oncology* 21:1443-1454.
- SORLIE, T., TIBSHIRANI, R., PARKER, J., HASTIE, T., MARRON, J. S., NOBEL, A., DENG, S., JOHNSEN, H., PESICH, R., GEISLER, S., DEMETER, J., PEROU, C. M., LONNING, P. E., BROWN, P. O., BORRESEN-DALE, A. L. & BOTSTEIN, D. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8418-23.
- TAPIA, C., SAVIC, S., WAGNER, U., SCHONEGG, R., NOVOTNY, H., GRILLI, B., HERZOG, M., BARASCUD, A. D., ZLOBEC, I., CATHOMAS, G., TERRACCIANO, L., FEICHTER, G. & BUBENDORF, L. 2007. HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res*, 9, R31.
- TORRES, L., RIBEIRO, F. R., PANDIS, N., ANDERSEN, J. A., HEIM, S. & TEIXEIRA, M. R. 2007. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat*, 102, 143-55.
- TUULA KUUKASJÄRVI, J. K., HEIKKI HELIN, KAIJA HOLLI, AND JORMA ISOLA 1996. Loss of Estrogen Receptor in Recurrent Breast Cancer Is Associated With Poor Response to Endocrine Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 14, No 9 (September), 1996: pp 2584-2589.
- TUULA KUUKASJÄRVI, R. K., MINNA TANNER, MARKETTA KÄHKÖNEN, ALEJANDRO SCHÄFFER, NINA NUPPONEN, SARI PENNANEN, ANNE KALLIONIEMI, OLLIPEKKA KALLIONIEMI, AND JORMA ISOLA 1997. Genetic Heterogeneity and Clonal Evolution Underlying Development of Asynchronous Metastasis in Human Breast Cancer'. *CANCER RESEARCH*, 57, 1597-1604.
- VISVADER, J. E. & LINDEMAN, G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 8, 755-68.
- W. FRASER SYMMANS, M., CHB, JIGUAN LIU, MD, DANIELM. KNOWLES, MD, GIORGIO INGHIRAMI, MD 1994. Breast Cancer Heterogeneity:
- Evaluation of Clonality in Primary and Metastatic Lesions. *Department of Pathology, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, New York, NY. Accepted for publication*
- WEIGELT, B., PETERSE, J. L. & VAN 'T VEER, L. J. 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, 5, 591-602.
- WEIGELT, B. & REIS-FILHO, J. S. 2009. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*, 6, 718-30.

- WILLEMIJNE A. M. E. SCHRIJVER, K. P. M. S., CARLA H VAN GILS, ELSKEN VAN DER WALL, CATHY B MOELANS, PAUL J VAN DIEST 05 January 2018. Receptor Conversion in Distant Breast Cancer Metastases: A Systematic Review and Meta-analysis *Journal of the National Cancer Institute*, 110, 568-580.
- WOLFF, A. C., HAMMOND, M. E., SCHWARTZ, J. N., HAGERTY, K. L., ALLRED, D. C., COTE, R. J., DOWSETT, M., FITZGIBBONS, P. L., HANNA, W. M., LANGER, A., MCSHANE, L. M., PAIK, S., PEGRAM, M. D., PEREZ, E. A., PRESS, M. F., RHODES, A., STURGEON, C., TAUBE, S. E., TUBBS, R., VANCE, G. H., VAN DE VIJVER, M., WHEELER, T. M., HAYES, D. F., AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL, O. & COLLEGE OF AMERICAN, P. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*, 25, 118-45.
- WU, J. M., FACKLER, M. J., HALUSHKA, M. K., MOLAVI, D. W., TAYLOR, M. E., TEO, W. W., GRIFFIN, C., FETTING, J., DAVIDSON, N. E., DE MARZO, A. M., HICKS, J. L., CHITALE, D., LADANYI, M., SUKUMAR, S. & ARGANI, P. 2008. Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res*, 14, 1938-46.
- XIAO, C., GONG, Y., HAN, E. Y., GONZALEZ-ANGULO, A. M. & SNEIGE, N. 2011. Stability of HER2-positive status in breast carcinoma: a comparison between primary and paired metastatic tumors with regard to the possible impact of intervening trastuzumab treatment. *Ann Oncol*, 22, 1547-1553.
- YU, F., YAO, H., ZHU, P., ZHANG, X., PAN, Q., GONG, C., HUANG, Y., HU, X., SU, F., LIEBERMAN, J. & SONG, E. 2007. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 131, 1109-23.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ruckhäberle, Frau Prof. Dr. med. Nitz und Herrn PD Dr. med. Oleg Gluz für die Betreuung und Motivation, Frau Prof. Dr. med. Kolberg-Liedtke und Herrn Dr. med. Stefan Paepke für die Anregungen und kritische Durchsicht.

Ganz besonders danke ich meinem Ehemann, Eckart Neuhaus, und meinen Kindern, Jana Katharina und Kai Jonathan, für stete Unterstützung und Geduld während der gesamten Zeit, die ich für dieser Arbeit benötigt habe.