

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

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

bcl-2-Immunhistochemie in der Prognostik von Mammakarzinomen

Dissertation

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

vorgelegt von  
Nicholas Tasch  
2024

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Referent: Prof. Dr. med. S. Biesterfeld

Korreferent: PD Dr. N. Krawczyk

Für meine Familie

## Zusammenfassung

Mit knapp 70.000 Neuerkrankungen im Jahr ist das Mammakarzinom die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau. Zu den routinemäßig erhobenen prädiktiven Größen gehören neben der Tumorausdehnung gemäß TNM-Klassifikation auch die Tumorgraderung, die Hormonrezeptorexpression und der HER2/neu-Status. Die Ergebnisse dieser bereits an den diagnostischen Stanzbiopsien zu erhebenden Untersuchungen findet Eingang in die Planung der operativen und adjuvanten Therapie. Trotz dieser gut erprobten, klinisch validen Parameter gibt es immer noch Mammakarzinome mit günstigen prognostischen Faktoren und einem schlechten Verlauf, wie auch umgekehrt. Dies unterstreicht den Bedarf an zusätzlichen weiteren prognostischen Faktoren.

In der vorliegenden retrospektiven Studie wurde die bcl-2-Immunhistochemie an einem gut charakterisierten Langzeitkollektiv von ca. 93 Fällen von Mammakarzinomen mit einem Beobachtungszeitraum von > 10 Jahren ausgewertet und auf klinische Parameter und die Prognose der Patientinnen bezogen. Das Protein bcl-2 gehört in die Familie der bcl-Proteine, die in die Regulation der Apoptose, des sogenannten „programmierten Zelltodes“, eingebunden sind. Es gilt als Proto-Onkogen, welches bei malignen Tumoren im Rahmen der dabei auftretenden genomischen Veränderungen häufig überexprimiert wird und dann zu einem geringeren Ansprechen der malignen transformierten Zellen auf apoptotische Stimuli führt. Dabei ist bcl-2 Teil eines komplexen Systems aus pro- und anti-apoptotischen Molekülen. Bei der Auswertung wurden die Zahl gefärbter Tumorzellen (bcl-2-PP) und die Färbeintensität (bcl-2-SI) semiquantitativ erfasst und analog zum Remmele-Score der Hormonrezeptoren multiplikativ zum bcl-2-IRS zusammengeführt.

Seit Jahren sind Antikörper gegen bcl-2 entwickelt, die in der Immunhistochemie praktische Anwendung finden. Dabei nutzt man einen bcl-2-Antikörper, der gegen das bcl-2-Protein gerichtet ist, zur visuellen Darstellung einer bcl-2-Überexpression am histologischen Schnitt, diese Darstellung ist mit den üblichen Standardverfahren der Immunhistochemie unter Verwendung gewerblich erhältlicher Antikörper und Reagentien möglich und in den meisten Instituten für Pathologie etabliert.

Bei der Auswertung der Daten ergab sich eine 5 Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 63,4%, bei 10 Jahren von 47,8%. In der univariaten Analyse stellten sich der Lymphknotenstatus pN ( $p=0,0005$ , Wilcoxon-Breslow-Test), die Tumorgroße pT ( $p=0,0048$ ), das morphologische Grading ( $p=0,0064$ ) sowie der Progesteronrezeptorstatus PR ( $p=0,0307$ ) als stärkste prognostische etablierte Größen dar. Bei der bcl-2-Expression zeigte sich ein hoch signifikant ( $p=0,0001$ ) schlechterer Verlauf bei bcl-2-negativen Fällen. Auch die Einzelkomponenten bcl-2-PP ( $p=0,0037$ ) und bcl-2-SI ( $p=0,0045$ ) sowie der analog nach dem Remmele-Score gebildeten immunreaktiven Score bcl-2-IRS ( $p=0,0010$ ) verfügten über eine prognostische Relevanz. Bei der multivariaten Analyse (Cox-Modell) wurden der Lymphknotenstatus pN und die bcl-2 Expression gegenübergestellt. Es ergab sich eine schlechtere Überlebensprognose für Patienten mit bcl-2-negativen Tumoren, die bei positiven Lymphknotenbefund N1 ( $p=0,0011$ ) stärker ausgeprägt war als beim negativen N0 ( $p=0,4573$ , graphischer Trend). Eine statistische Signifikanz bestand somit nur in der N1-Gruppe.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bcl-2 ein für die Prognostik des Mammakarzinoms geeigneter Marker ist, auch wenn sein Haupteinsatzgebiet in der Diagnostik und Typisierung maligner Non-Hodgkin-Lymphome liegt. Auffällig war, dass die bcl-2-Expression mit der der Hormonrezeptoren korreliert war, was Gegenstand weiterer Untersuchungen sein könnte.

## Abstract

With nearly 70.000 new cases per year, breast carcinoma is the most common malignant tumour disease in women. Routinely collected predictive variables include tumour extent according to TNM classification, tumour grading, hormone receptor expression, and HER2/neu status. The results of these examinations, which are already to be collected on the diagnostic punch biopsies, are incorporated into the planning of surgical and adjuvant therapy. Despite these well-tested, clinically valid parameters, there are still breast carcinomas with favourable prognostic factors and poor outcome, as well as vice versa. This emphasises the need for additional further prognostic factors.

In the present retrospective study, bcl-2 immunohistochemistry was evaluated in a well-characterized long-term cohort of approximately 93 cases of breast carcinoma with an observation period of > 10 years and related to clinical parameters and patient prognosis. The protein bcl-2 belongs to the family of bcl proteins involved in the regulation of apoptosis, the so-called "programmed cell death". It is considered a proto-oncogene that is frequently overexpressed in malignant tumours as part of the genomic alterations that occur in the process, and then leads to a reduced response of malignant transformed cells to apoptotic stimuli. In this context, bcl-2 is part of a complex system of pro- and anti-apoptotic molecules. In the evaluation, the number of stained tumour cells (bcl-2-PP) and the staining intensity (bcl-2-SI) were semi-quantitatively recorded and multiplicatively combined to the bcl-2-IRS in analogy to the Remmele score of hormone receptors.

Antibodies against bcl-2 have been developed for years and have practical applications in immunohistochemistry. Here, one uses a bcl-2 antibody directed against the bcl-2 protein to visually display bcl-2 overexpression on the histological section; this visualization is possible with the usual standard immunohistochemistry procedures using commercially available antibodies and reagents and is established in most institutes of pathology.

Analysis of the data revealed a 5-year survival probability of 63,4%, and 47,8% at 10 years. In univariate analysis, lymph node status pN ( $p=0,0005$ , Wilcoxon-Breslow test), tumour size pT ( $p=0,0048$ ), morphologic grading ( $p=0,0064$ ), and progesterone receptor status PR ( $p=0,0307$ ) emerged as the strongest prognostic established variables. For bcl-2 expression, there was a highly significant ( $p=0,0001$ ) worse outcome in bcl-2 negative cases. The individual components bcl-2-PP ( $p=0,0037$ ) and bcl-2-SI ( $p=0,0045$ ) as well as the immunoreactive score bcl-2-IRS ( $p=0,0010$ ), which was formed analogously to the Remmele score, also possessed prognostic relevance. In the multivariate analysis (Cox-model), lymph node status pN and bcl-2 expression were contrasted. There was a poorer survival prognosis for patients with bcl-2 negative tumours, which was more pronounced for positive lymph node findings N1 ( $p=0,0011$ ) than for negative N0 ( $p=0,4573$ , graphical trend). Thus, there was statistical significance only in the N1 group.

In conclusion, bcl-2 is a marker suitable for the prognosis of breast carcinoma, although its main application is in the diagnosis and typing of malignant non-Hodgkin lymphomas. Peculiarly, bcl-2 expression was correlated with that of hormone receptors, which could be the subject of further investigation.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
Bad	bcl-2 associated agonist of cell death protein
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	bcl-2 Interacting Killer
bcl-xs	bcl-x Protein short isoform (pro-apoptotic)
bcl-xl	bcl-x Protein long isoform (anti-apoptotic)
bcl-w	bcl2-like Protein 2
Hrk	Harakiri
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
Bak	Protein im Endoplasmatischen Retikulum
Bax	Mitochondriales Protein
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , Onkoprotein aus der B-Zell-Lymphom Reihe
BET	brusterhaltende Therapie
BMDP	Name des verwendeten Statistikprogramms
BRCA1 / BRCA2	<i>Breast Cancer 1-</i> bzw. <i>-2-Gen</i> , Tumorsuppressorgene
bzw.	beziehungsweise
Chi <sup>2</sup>	Chi-Quadrat[-Test], gängiges statistisches Testverfahren
1D	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
2D	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
DCIS	duktales Carcinoma in situ
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>
ER	Östrogenrezeptor
fmol	Femtomol
G	Gradierung
GnRH-Analoga	Analoga des Neurohormons Gonadotropin-Releasing-Hormon
Gy	Gray
HER2/neu	Menschlicher Epidermaler Wachstumsrezeptor Faktor 2
HPF	<i>High power field</i> , Gesichtsfeld in der Lichtmikroskopie bei 40x Objektivvergrößerung
IMBEI	Institut für Med. Biometrie, Epidemiologie und Informatik
IRS	Immunreaktiver Score
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
KP	<i>Kernpleomorphie</i>
L	Lymphspalteninvasion (TNM-Klassifikation)
1L	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
2L	Unterprogramm des BMDP-Statistikprogramms
M	Fernmetastasierung (TNM-Klassifikation)
mg	Milligramm
MIT	Mitoserate
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter

MRT	Magnetresonanztomographie
NST	<i>no special type</i>
p	Wahrscheinlichkeit
pCR	pathologische Komplettremission
PR	Progesteronrezeptor
pT	postoperative Tumorgröße (TNM-Klassifikation)
pN	postoperativer Lymphknotenstatus (TNM-Klassifikation)
pTNM	postoperatives TNM-Stadium (TNM-Klassifikation)
R	Resektionsrand (TNM-Klassifikation)
RKI	Robert Koch-Institut
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
S3	höchstmögliches Qualitätsmerkmal einer Leitlinie der AWMF (Stufen: S1, S2k, S2e, S3)
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
SOP	<i>Standard operationg procedure</i>
s.u.	siehe unten
T	Primärtumor (TNM-Klassifikation)
Tab.	Tabelle
TD	tubuläre Differenzierung
TNM	Beurteilungssystem für maligne Tumoren nach UICC
TRM	Tumorregister München
UICC	<i>Union international contre le cancer</i>
ÜLW	Überlebenswahrscheinlichkeit
L	Blutgefäßinvasion (TNM-Klassifikation)
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organisation</i>
x	Bezeichnung der Abszisse im Koordinatensystem
x	-fach; z.B. 40-fache Vergrößerung (40x)
y	Bezeichnung der Ordinate im Koordinatensystem
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2	Ätiologie des Mammakarzinoms	2
1.3	Pathologie des invasiven Mammakarzinoms	4
1.4	Klinik, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms	6
1.5	Parameter der Prognose und Prädiktion	14
1.6	bcl-2-Genfamilie	18
1.7	Die bcl-2-Homologie-Domäne	18
1.8	Ziel der Untersuchung und Ethikvotum	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Material	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	TNM-Klassifikation	21
2.2.2	Malignitätsgradierung	24
2.2.3	Bestimmung des Hormonrezeptorstatus	26
2.2.4	Immunhistochemische Darstellung der bcl-2-Expression	27
2.2.5	Statistische Auswertung	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	Allgemeine Daten	30
3.2	Univariate Überlebensanalyse	31
3.2.1	TNM-Klassifikation und ihre Komponenten	31

3.2.2	Gradierung und ihre Komponenten	35
3.2.3	Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus	40
3.2.4	bcl-2-Expression	42
3.3	Multivariate Analyse: Cox-Modell	48
3.4	Korrelationen bcl-2-bezogener Parameter untereinander und mit klinisch-morphologischen Parametern	54
3.4.1	Korrelation zwischen bcl-2-PP und bcl-2-SI	54
3.4.2	Korrelation zwischen bcl-2-Parametern und klinisch-morphologischen Parametern	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	bcl-2 als wichtiger Marker in der Routinediagnostik maligner Non-Hodgkin-Lymphome	57
4.2	bcl-2 als Prognosemarker bei Mammakarzinomen	59
4.3	bcl-2 als Prognosemarker bei anderen häufigen Karzinomen	61
4.4	bcl-2: Perspektivischer Ausblick	66
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom steht mit weltweit nahezu einer Million jährlichen Neuerkrankungen und 71.375 Fällen (2018) allein in Deutschland an erster Stelle der malignen Karzinome (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2018; Tumorregister München, 2021). Die Inzidenz des Mammakarzinoms steigt seit den 1980er Jahren kontinuierlich an und übersteigt die Inzidenz anderer häufig auftretender Karzinome, wie beispielsweise endometriale, bronchiale und kolorektale Karzinome (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2018). Gleichzeitig nimmt die Mortalitätsrate ab, und zum heutigen Zeitpunkt versterben demzufolge weniger Frauen an Brustkrebs, als dies noch vor 10 Jahren der Fall war (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2010). In Deutschland lag die Inzidenz im Jahr 2018 bei 114,6 Fällen pro 100.000 Frauen, die Mortalitätsrate bei 22,3 Fällen (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2018). Im Jahr 2018 starben insgesamt 18.519 an Brustkrebs erkrankte Frauen (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2018; Tumorregister München, 2021). Bei der Erstdiagnose ist nur jede zehnte Frau jünger als 45 Jahre und fast jede dritte jünger als 55 Jahre, so dass Frauen, die 50 bis 70 Jahre alt sind, das größte Erkrankungsrisiko aufweisen (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2018; Tumorregister München, 2021). Das kumulative Risiko für ein weibliches Neugeborenes, in ihrer Lebenszeit bis zum 75. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken, liegt bei 1:8 (12,8%) (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015). Die relative Überlebensrate nach fünf Jahren lag 2018 bei 88 %, nach zehn Jahren bei 83 % (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2018)

Durch den medizinischen Fortschritt ist eine deutliche Verbesserung der Überlebenschancen zu verzeichnen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2021). Ein möglicher Grund hierfür ist, dass aufgrund regelmäßiger Mammographie-Screenings seit dem Jahr 2005 mehr Fälle im Rahmen der Früherkennung identifiziert werden (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2021). Hinzu kommen therapeutische Fortschritte durch Weiterentwicklung systemischer adjuvanter und neoadjuvanter Behandlungsmöglichkeiten. Zusätzlich führen Änderungen in der Anwendung von Hormonersatztherapien im Periklimakterium zu einer Senkung der Inzidenz (Chlebowski et al., 2009; Katalinic et al., 2009).

Obwohl Brustkrebs gemeinhin als eine Krankheit der Frau angesehen wird, können auch Männer an Brustkrebs erkranken. Die Inzidenz liegt mit 760 neu-erkrankten Männern im Jahr 2018 jedoch sehr niedrig (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2018). Die standardisierte Erkrankungsrate liegt laut RKI bei 1,2 Männern von 100.000 und die Sterberate bei 0,3 (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2018). Das Risiko, als Mann an Brustkrebs zu erkranken, ist am höchsten für Männer mit erhöhtem Spiegel weiblicher Geschlechtshormone („Hyperöstrogenismus“), was beispielsweise hormonbehandelte Prostatakarzinom-Patienten und Patienten mit Leberzirrhose betrifft (Schlappack et al., 1985; Sørensen et al., 1998).

## **1.2 Ätiologie des Mammakarzinoms**

Das Mammakarzinom ist eine multifaktorielle Erkrankung mit vielschichtiger Ätiologie. Bestimmte Risikofaktoren konnten bereits identifiziert werden (Haag et al., 2003; McPherson et al., 2000):

- Genetische Disposition: Mutationen der Tumorsuppressorgene Breast Cancer 1 oder Breast Cancer 2 (BRCA1/BRCA2) machen etwa 5-10 % aller Mammakarzinome und etwa ein Viertel aller genetisch bedingten Neuerkrankungen aus , (Campeau et al., 2008). Mutiert ein solches Suppressorgen, fällt das erste Allel dieses Gens für die Tumorsuppressi-

on aus. Mutiert auch das zweite Allel und fällt aus, wird die Tumorsuppression beeinträchtigt und die Tumorentstehung begünstigt.

- Familiäre Prädisposition: Die Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken, erhöht sich um das 1,5–6-Fache, selbst wenn keine Genmutation vorliegt (Brandt et al., 2010). Liegt eine Mutation der BRCA-Gene vor, wird die Trägerin mit einer 50-80%-igen Wahrscheinlichkeit bis zum 70. Lebensjahr an Brustkrebs erkranken (Antoniou et al., 2003). Gibt es einen Verwandten ersten Grades, der im Alter von unter 50 Jahren an Brustkrebs erkrankt ist, ist das Risiko, selbst zu erkranken, 1,2-fach (BRCA1-Mutation) bzw. 1,7-fach (BRCA2-Mutation) erhöht (Metcalf et al., 2010).
- Hormone: Der Einfluss der Geschlechtshormone auf das Brustkrebsrisiko ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch weisen Untersuchungen darauf hin, dass keine Schwangerschaft, eine späte Schwangerschaft, eine frühe Menarche und eine späte Menopause das Risiko möglicherweise erhöhen (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012). Demzufolge könnten längere Phasen, in denen Östrogen dominant ist, also beispielsweise in Zeiten ohne Schwangerschaft oder oraler Einnahme von Östrogen-Präparaten, im Vergleich zu Phasen, in denen Gestagen dominant ist, wie beispielsweise in der Schwangerschaft, die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigern. Stillen senkt vermutlich das Erkrankungsrisiko. Die Hormonzufuhr von außen, also als Kontrazeptivum, lässt das Erkrankungsrisiko nur mäßig ansteigen (1,24-fach) und scheint zehn Jahre nach der letzten Einnahme keine Rolle mehr als Risikofaktor zu spielen (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996). Eine mögliche Substitution weiblicher Geschlechtshormone in der Menopause erhöht das Erkrankungsrisiko, wobei das Ausmaß dieses Faktors von der Dauer und Kombination von Östrogen- und Progesteron-Präparaten abhängig ist (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer et al., 2019). Bei manchen Patientinnen ist das Risiko auch 10 Jahre nach dem Ende der Hormonersatztherapie noch erhöht.

- Lebensstil: Sowohl die Ernährung als auch das Bewegungsverhalten können das Brustkrebsrisiko modifizieren. Adipositas, eine fettreiche Ernährung, Rauchen, Alkoholabusus und Bewegungsmangel gelten als Risikofaktoren. Eine hohe Dichte des Brustdrüsengewebes geht ebenfalls mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit einher.
- Herkunft und Ethnizität: Die Brustkrebsinzidenz ist weltweit besonders hoch bei Frauen, die in Nordamerika oder Nordeuropa leben, während Frauen in Afrika und Asien seltener an Brustkrebs erkranken und versterben (Kelsey, 1979). Der Grund hierfür ist nicht bekannt, aber Migrationsstudien an asiatischen Frauen, die beispielsweise nach Nordamerika auswanderten, zeigten, dass ein Einfluss veränderter Lebensgewohnheiten, wie der Wechsel von einer fettarmen, pflanzenbasierten Diät zu einer fett- und fleischreichen Diät, eine wahrscheinliche Ursache für die höhere Inzidenz in der zweiten und dritten Generation dieser Familien war (Buell, 1973).
- Andere Risikofaktoren, die diskutiert werden, sind Umweltfaktoren (z. B. radioaktive Strahlung, natürliche Östrogene) und ein höherer Sozialstatus.

Anhand der Risikofaktoren wird die multikausale Ätiologie des Mammakarzinoms deutlich, was die Notwendigkeit einer frühen Diagnose und einer individualisierten und multidisziplinären Therapie zur Folge hat.

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

Das maligne Mammakarzinom umfasst heterogene Tumorarten, die anhand definierter Kriterien durch verschiedene Klassifizierungssysteme differenziert werden. Die invasiven Mammakarzinome wurden von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization/WHO) primär als invasiv-duktales und invasiv-lobuläres Entitäten eingeteilt, sowie in einige Sonderformen (Tavassoli & Devilee, 2003). Diese Einteilung findet in der vorliegenden Arbeit Anwendung. Entsprechend der neuen WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2012 werden die invasiv-duktales Karzinome als invasives Adenokarzinom (*no special type* /

NST, duktal) bezeichnet (Lakhani et al., 2012). Die Einteilung der vorliegenden Arbeit stützt sich jedoch auf die ursprüngliche Klassifikation mit der Bezeichnung invasiv-duktales.

Die häufigste Form des Mammakarzinoms ist das invasiv-duktales Mammakarzinom (ca. 60–75 % der Fälle), das invasiv-lobuläre Karzinom (ca. 15–20 % der Fälle) ist das zweithäufigste. Es kommen zudem Mischformen vor, die als dukto-lobulär bezeichnet werden. Seltenerer Formen, die oft eine günstige Prognose haben, werden separat von den häufigsten Formen eingeteilt. Hierzu gehören unter anderem das medulläre (1–7 % der Fälle), tubuläre Karzinom (1–2 % der Fälle), muzinöse Karzinom (1–2 % der Fälle) und papilläre (1–2 % der Fälle) Karzinom (Tumorzentrum München, 2015). Langzeitrezidive kommen bei diesen seltenen Fällen nur mit einer Häufigkeit von etwa 10 % vor (Rosen et al., 1989). Weitere seltene Formen sind das apokrine Mammakarzinom, das lipidreiche Mammakarzinom und das adenoid-zystische Mammakarzinom. Diese Differenzierung beruht auf histologischen Untersuchungen des Tumorzustands. Sind invasiv-lobuläre Karzinome nicht eindeutig abzugrenzen, können immunhistochemische Färbungen zur Klärung beitragen, da beispielsweise das Fehlen einer E-Cadherin-Färbung für den invasiv-lobulären Typ spricht.

Der Ursprung der meisten Mammakarzinome liegt im Übergang der Azini in den Ductus lactiferi, welcher auch als terminale dukto-lobuläre Einheit bezeichnet wird. In vielen Fällen bilden in situ-Karzinome eine Vorstufe. Bestimmte Anomalien oder Hyperplasien des Brustgewebes erhöhen möglicherweise die Invasivität des Karzinoms, werden jedoch nicht als generelle Vorstufen eingeordnet.

Die invasiv-duktales und invasiv-lobulären Mammakarzinome haben entsprechend der Tumorstadien die gleiche Prognose. Die Tumorzustand des invasiv-duktales Karzinoms entspricht jedoch im Wesentlichen dem Palpations- und Mammographie-Befund, während dies bei invasiv-lobulären Karzinomen nicht der Fall ist; diese sind gelegentlich unerwartet viel größer, als es die Befunde nahelegen. Eine solche Fehlinterpretation der Befunde kann dadurch zustande

kommen, dass präoperativ nicht die tatsächliche Tumorgöße bestimmt wird, sondern der Bereich, in dem sich eine Sklerose des Fettgewebes entwickelt, sei es aufgrund des Tumors oder als Begleiterscheinung des Tumors. Invasiv-duktales Karzinome liegen normalerweise innerhalb einer solchen Sklerosierungszone. Im Gegensatz dazu bewegen sich invasiv-lobuläre Karzinome in das angrenzende Fettgewebe, welches im Tastbefund und der Bildgebung unauffällig war. Zudem besteht die Möglichkeit, dass diese Karzinome in das Mantelbindegewebe der Milchgänge eindringen, diese konzentrisch umwachsen, und sich somit fernab der Sklerosierungszone ausbreiten.

## **1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms**

### Klinik

In frühen Stadien verläuft das Mammakarzinom häufig ohne allgemeine Symptome. Ein Gewichtsverlust und eine mögliche Minderung der Leistungsfähigkeit treten erst im fortgeschrittenen Stadium auf (Robert-Koch-Institut, 2020). Die lokalen Symptome beinhalten unter anderem tastbare Knoten, Veränderungen der Haut (beispielsweise als Orangenhaut über dem Tumor) oder der Symmetrie oder Kontur der Brust, Dellen oder Wölbungen im Bereich der Brustwarze, Sekretion oder Blutungen aus der Brustwarze und das Auftreten roter und warmer Stellen aufgrund einer Inflammation. Auch eine tastbare Vergrößerung der axillären oder supraklavikulären Lymphknoten kann ein Symptom des Mammakarzinoms sein.

Die Brust wird für die Mammakarzinom-Diagnostik in vier Quadranten eingeteilt. Etwa die Hälfte der primären Manifestationen ist im oberen Quadranten der Brust zur Axilla lokalisiert, seltener in dem äußeren unteren oder inneren oberen Quadranten, und am seltensten im unteren inneren Quadranten. Multifokalität, also das Auftreten mehrerer abgrenzbarer Karzinomherde innerhalb eines Quadranten, ist von der Multizentrität abzugrenzen, bei der mehrere abgrenzbare Karzinomherde in verschiedenen Quadranten lokalisiert sind (Leitlinien-

programm Onkologie der AWMF, 2020).

Metastasen werden entsprechend ihrer Entfernung vom Primärtumor in lokale Metastasen, regionale Metastasen und Fernmetastasen kategorisiert. Infiltriert der Primärtumor das angrenzende Parenchym, breitet sich der Tumor lokal entlang der Milchgänge aus. Von einer regionalen Ausbreitung spricht man dann, wenn der Primärtumor die umliegenden Lymphknoten infiltriert, also die der Axilla oder infra- und supraclaviculäre Lymphknoten. Eine Ausbreitung des Primärtumors ist prinzipiell in alle Körperregionen möglich. Am häufigsten treten Fernmetastasen des Mammakarzinoms in den Knochen, der Leber, der Lunge und im Gehirn auf. Liegen Metastasen vor, können Symptome wie Lymphödemie und für die betroffene Körperregion indikative Symptome auftreten, also Schmerzen im Knochen bei Knochenmetastasen, Husten und Atemnot bei Lungenmetastasen, Ikterus und Leberinsuffizienz bei Lebermetastasen und neurologische Symptome bei einer Metastasierung des Gehirns (Wörmann et al., 2018). Diese Symptome können, müssen aber nicht auftreten, wodurch eine Metastasierung lange unbemerkt bleiben kann.

### Diagnostik

Der erste Schritt in der Diagnostik des Mammakarzinoms ist eine Basisuntersuchung, die aus einer Inspektion und Palpation der Brust und der Lymphknoten besteht. Die Befunde dieser Basisuntersuchung werden bei Verdacht durch bildgebende Verfahren abgesichert. Dies erfolgt in der Regel mit einer Mammographie der Brust durch Röntgen. Bei Frauen unter 40 Jahren erfolgt die Bildgebung üblicherweise durch Sonographie, um die Strahlendosis zu vermeiden (Tumorzentrum München, 2015, S. 37). Eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit einem Kontrastmittel gehört nicht zur Routinediagnostik. Anhand dieses Verfahrens können zwar möglicherweise zusätzliche Läsionen identifiziert und mögliche Interventionen angepasst werden, jedoch ist ein zusätzlicher Nutzen der MRT bezüglich der Verbesserung der Prognose oder der Verhinderung eines Rezidivs bisher nicht belegt (Houssami et al., 2008; Tumorzentrum München, 2015, S. 55).

Die Befunde der bildgebenden Verfahren müssen anschließend histologisch abgeklärt werden, um den Tumor zu charakterisieren. Hierfür wird eine Stanzbiopsie oder eine Vakuumbiopsie entnommen und die Morphologie des Tumorgewebes analysiert (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012, Kapitel 4.2.3.2). Basierend auf der Histologie erfolgt eine Kategorisierung des Tumortyps, die Bewertung eines duktales Carcinoma in situ (DCIS) und ein erstes Tumorigradung (Elston & Ellis, 1991). Immunhistochemische Untersuchungen des Gewebepräparats können Informationen zu der Expression der Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren und des human epidermal growth factor receptor 2 (HER/neu) liefern, welche als Marker für die Tumorart herangezogen werden können.

Entsprechend des Tumorstadiums erfolgen die chirurgische Resektion oder eine neoadjuvante Therapie (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al., 2012). Üblicherweise beinhaltet die Tumorsektion ein anatomisches Segmentresektat, anhand dessen eine erneute Einstufung des Tumortyps, ein erneutes Grading und die Tumorausdehnung nach der TNM-Klassifikation bestimmt werden können (Sobin et al., 2010). Der Resektionsstatus kann, basierend auf den Abständen des Tumors zu der Mamille und dem ventralen, thorakalen und übrigen benachbarten Gewebe abgeleitet werden.

Erfolgt die Resektion nach einer neoadjuvanten Therapie, wird das Regressionsgrading nach Sinn vorgenommen, um das Ansprechen des Tumors auf eine Chemotherapie einordnen zu können (Sinn et al., 1994). In einem solchen Fall werden die immunhistochemischen Färbungen für ER, PR, Ki-67 und HER2/neu an einer Gewebeprobe des Resttumors wiederholt. Bei Verdacht auf ein invasives Karzinom werden mögliche Fernmetastasen anhand von bildgebenden Verfahren der betroffenen Organe (z. B. Skelettszintigraphie, Lebersonographie) dargestellt.

## Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms ist multimodal und beinhaltet entsprechend dem Tumorstadium neben der chirurgischen Resektion adjuvante Therapien wie Chemotherapie, Bestrahlung, Hormontherapie und Antikörpertherapie.

## Neoadjuvante Therapie

Eine neoadjuvante Therapie kann der operativen Resektion vorausgehen. Sie zielt darauf ab, die Operabilität von multizentrischen oder besonders großflächigen Tumoren zu erhöhen und eine Erhaltung der Brust zu ermöglichen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2020). Ein solcher Ansatz fand laut dem Jahresbericht 2020 der Deutschen Krebsgesellschaft in 9416 Fällen statt, was einem Anteil an 57589 Fällen insgesamt von 16,4% entspricht (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. et al., 2017). Die neoadjuvante Therapie kann außerdem bei Patientinnen mit einem prinzipiell primär operablen Karzinom eingesetzt werden, um den Tumor zu verkleinern und die Tumorzellen zu eliminieren, wenn prinzipiell eine Chemotherapie angestrebt wird.

Ein neoadjuvanter Ansatz kann eine individualisierte Therapie unterstützen (Kaufmann et al., 2006). Die Komplettremission (pCR), also das Fehlen eines histologischen Tumorzellnachweises im Brust- und Lymphknotengewebe, wird als Marker für das Ansprechen der neoadjuvanten Therapie herangezogen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2021). Bei Patientinnen mit HER2-positiver/Hormonrezeptor-negativer oder triple-negativer Erkrankung kann im Falle einer Komplettremission von einer eher günstigen Langzeitprognose ausgegangen werden (Minckwitz et al., 2012).

Eine neoadjuvante Chemotherapie beinhaltet mindestens sechs präoperative Zyklen mit einem Anthrazyklin und einem Taxan. Der Therapieeffekt wird nach zwei Zyklen kontrolliert und das Ansprechen des Tumors bewertet. Dies stellt einen Vorteil der neoadjuvanten Therapie dar, da anhand des Ansprechens die Therapie individuell angepasst werden kann. Das Gesamtüberleben von Patienten mit HER2/neu-überexprimierenden Tumoren kann durch zusätzliche präoperative Verabreichung von Trastuzumab und fortgesetzte postoperative Gabe über ein Jahr signifikant erhöht werden (Minckwitz et al., 2012). Für postmenopausale Patientinnen mit rezeptor-positivem und fortgeschrittenem Mammakarzinom kann eine neoadjuvante endokrine Therapie mit Aromatasehemmern initiiert werden (Smith et al., 2005). Das Langzeitüberleben unterscheidet sich nicht zwischen einer adjuvanten und einer neoadjuvanten Therapie.

## Operative Therapie

Die operative Therapie beinhaltet die anatomische Resektion eines oder mehrere Segmente und zielt auf eine Brusterhaltung ab (brusterhaltende Therapie/BET). Solange morphologisch nach der Resektion die erfolgreiche Entfernung des Tumors bestätigt werden kann, erfolgt die Resektion nur einmalig. Die BET mit adjuvanter Bestrahlung liefert bezüglich des Überlebens der radikalen Mastektomie gleichwertige Ergebnisse (Fisher et al., 2001; Veronesi et al., 2002). Eine radikale Mastektomie kommt heutzutage nur noch für Patientinnen mit sehr großen Tumoren in fortgeschrittenen Stadien oder bei multizentrischen Tumoren in Frage (Tumorzentrum München, 2015, S. 122). Auch eine ungünstige Relation zwischen Tumorgröße und Brustvolumen, eine unvollständige Tumorresektion oder Kontraindikationen für anschließende Therapien können eine BET ausschließen und eine radikale Mastektomie bedingen (Houssami et al., 2010).

Bei Resektion des Primärtumors wird die Achselhöhle intraoperativ inspiziert. Der zuvor nuklearmedizinisch markierte Sentinel-Lymphknoten in der Axilla wird hierbei üblicherweise entfernt. Dieser Lymphknoten drainiert das Mammakarzinom und birgt somit die Gefahr einer Infiltration mit Tumorzellen. Die entnommenen Lymphknoten werden anschließend morphologisch untersucht, um den Tumor entsprechend einer standardisierten Klassifikation einzuordnen, den Krankheitsverlauf zu prognostizieren und das Therapieansprechen auf eine systemische Therapie abzuwägen.

Sind sie frei von Tumorzellen, erfolgt keine radikale Dissektion der Axilla, da diese mit Nebenwirkungen wie Dysästhesien, chronischen Schmerzen und Bewegungseinschränkungen einhergeht. Die alleinige Entnahme der Sentinel-Lymphknoten reduziert im Vergleich zu der herkömmlichen axillären Lymphknotendissektion die lokale Morbidität signifikant (Veronesi et al., 2003). Liegen bereits palpable harte Lymphknoten in der Axilla vor, werden die Lymphknoten des axillären Levels I und eventuell auch die des axillären Levels II entfernt.

Die axilläre Lymphknotendissektion bei positivem Befund der Sentinel-

Lymphknoten wird kontrovers diskutiert (Giuliano et al., 2010). Eine BET mit anschließender Bestrahlungstherapie war gegenüber einer Dissektion der Axilla bei Patientinnen im Stadium pT1 bis pT2 und cN0 und ein bis zwei positiven Sentinel-Lymphknoten nicht nachteilig. Dies könnte bedeuten, dass unter bestimmten Rahmenbedingungen von einer solchen Dissektion abgesehen werden kann, auch wenn ein positiver histopathologischer Befund des Lymphknotengewebes vorliegt.

### Strahlentherapie

Die Radiotherapie nach BET ist bei einem invasivem Mammakarzinom indiziert, da hierdurch das Gesamtüberleben verlängert und Rezidive verringert werden können (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005, 2011; Fisher et al., 2002). Die Rezidivrate bezogen auf 15 Jahre verringert sich bei pN0 von 28,3 % auf 10,4 %, bei pN+ von 39,9 % auf 10,9 % und die karzinspezifische Mortalität um 3,3 % bei pN0 und um 8,5 % bei pN+ (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2020). Die Bestrahlung sollte vier bis sechs Wochen postoperativ oder nach adjuvanter Chemotherapie initiiert werden.

Das Zielvolumen der Bestrahlung beinhaltet die gesamte verbliebene Brustdrüse und kann ggfls. auf die angrenzende Thoraxwand ausgedehnt werden (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2021). Eine konventionelle Fraktionierung in einer Dosierung von fünfmal 1,8–2 Gy über fünf bis sechs Wochen, also insgesamt 45–50 Gy, galt lange als Goldstandard. Eine moderate Hyperfraktion (höhere Einzeldosis, weniger Fraktionen) konnte sich jedoch in aktuellen Studien vorteilhaft hinsichtlich der Tumorkontrolle und Spättoxizität zeigen (Haviland et al., 2013; Whelan et al., 2010). Hierdurch wird die Behandlungszeit von fünf bis sechs Wochen auf etwa drei Wochen verkürzt (Zhou et al., 2015). Die breite Anwendbarkeit einer solchen Hyperfraktion wird derzeit erforscht. Für jüngere Frauen und Frauen mit erhöhtem Rezidivrisiko bis zum 50. Lebensjahr könnte die Strahlung eventuell durch einen sogenannten Booster erhöht werden, um die lokale Rezidivrate zu senken (Tumorzentrum München, 2015, S. 133). Verbleibt ein Rest des Tumors in der Axilla oder breitet sich der Tumor in die Lymphknoten ohne Dissektion aus, wird ebenfalls eine Bestrahlung empfohlen

(Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2020). Die Erstlinientherapie nach Bestrahlung der Lymphwege erfolgt konventionell, da für solche Patienten der Nutzen eines Boosters nicht ausreichend nachgewiesen ist.

### Adjuvante Therapie

Eine systemische Chemotherapie verlängert das Überleben ohne Rezidiv und das Gesamtüberleben (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2012). Dieser Effekt ist unabhängig vom Alter und Nodalstatus der Patientinnen. Entsprechend der aktuellen Leitlinie wird eine adjuvante Chemotherapie für Patientinnen mit HER2-positiven und triple-negativen Tumoren (also keine Expression von ER, PR oder HER2) empfohlen. Eine typische adjuvante Chemotherapie mit Anthrazyklin und Taxan dauert 18–24 Wochen (6–8 Zyklen) (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2020).

Eine anti-östrogene endokrine Therapie kann mit zentral (GnRH-Analoga) bzw. peripher (z. B. Tamoxifen) angreifenden Therapeutika bei Patientinnen mit positivem Rezeptorstatus (Östrogen und/oder Progesteron) erfolgen, der bei etwa 65–75 % der Mammakarzinome vorliegt (Miller et al., 2014).

Hat das Primärkarzinom einen Durchmesser von  $\geq 1\text{cm}$  und liegt eine HER2/neu-Überexpression vor, sollte die Chemotherapie durch eine anti-HER2/neu-Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab für ein Jahr ergänzt werden. Trastuzumab wird wöchentlich oder in dreiwöchentlichen Intervallen intravenös oder subkutan verabreicht. Hierbei ist eine Überwachung der Herzfunktion während der Behandlung alle drei Monate und nach der Behandlung für zwei bis 5 Jahre obligat.

### Risikogruppen

Das Rezidivrisiko für Brustkrebspatientinnen lässt sich anhand definierter Kriterien abschätzen. Entsprechend des Nodalstatus erfolgt eine Einteilung in niedriges, mittleres und hohes Risiko eines Rezidivs (Tabelle 1):

**Tab. 1:** Nodalstatus als Parameter zur Einschätzung des Rezidivrisikos (Goldhirsch et al., 2007)

<b>Nodalstatus</b>	<b>Risiko</b>		
	<b>niedrig</b>	<b>mittel</b>	<b>hoch</b>
<b>pN0</b>	Alle der folgenden Merkmale: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumor höchstens 2 cm Durchmesser in der größten Ausbreitung</li> <li>• ER- oder PR-positiv</li> <li>• HER-2/neu- negativ</li> <li>• Grading G1</li> <li>• keine Invasion der Blutgefäße</li> <li>• Alter der Patientin mindestens 35 Jahre</li> </ul>	Mindestens eines der folgenden Merkmale: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumor über 2 cm in der größten Ausbreitung</li> <li>• ER- und PR-negativ</li> <li>• HER-2/neu-positiv</li> <li>• Grading G2 oder G3</li> <li>• Invasion der Blutgefäße</li> <li>• Alter der Patientin über 35 Jahre</li> </ul>	in keinem Fall
<b>pN+ (1 bis 3 Lymphknoten)</b>	---	ER-positiv, PR-positiv und HER-2/neu-negativ	ER- und PR-negativ oder HER-2/neu-positiv
<b>pN+ (4 oder mehr Lymphknoten)</b>	---	---	in jedem Fall

Aufgrund der schlechteren Prognose werden Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko im Anschluss an die Resektion postoperativ systemisch therapiert (Goldhirsch et al., 2007). Bei niedrigem Rezidivrisiko kann möglicherweise auf eine adjuvante Therapie verzichtet werden, dennoch sollte eine endokrine The-

rapie erfolgen (Goldhirsch et al., 2007). Neue molekularbiologische Techniken finden Anwendung bei der Abwägung einer Notwendigkeit der Chemotherapie bei solchen Patientinnen, die trotz Indikation eventuell eine solche Behandlung nicht benötigen.

## 1.5 Parameter der Prognose und Prädiktion

Prognostische Faktoren erlauben eine Einschätzung des Krankheitsverlaufs (rezidiv-freies Überleben und Gesamtüberleben) bei Erstdiagnose, während prädiktive Faktoren eine Einschätzung der Therapieoptionen und dem wahrscheinlichen Therapieansprechen herangezogen werden.

Folgende prognostische Faktoren sind unbestritten von klinischer Relevanz:

- Die TNM-Klassifikation der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) (Sobin et al., 2010). Hierbei werden die Größe des Primärtumors (T), das Vorhandensein von Tumorzellen in den Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) eingeordnet. Ergänzend werden Angaben zu der Invasion der Lymphgänge (L) und der Blutgefäße (V) gemacht und der Resektionsrandstatus (R) festgelegt (Atkinson et al., 1986; Bloom & Richardson, 1957; Carter et al., 1989; Soerjomataram et al., 2008; Veronesi et al., 1993).
- Die histologische Grading nach Bloom und Richardson, modifiziert durch Elston und Ellis (Elston & Ellis, 1991; Lakhani, 2012; Sobin et al., 2010; Tavassoli & Devilee, 2003). Dieser Einteilung liegen zytologische und histologische Parameter zugrunde, die eine Aussage über duktale oder tubuläre Strukturen, eine Pleomorphie der Zellkerne und die Mitoserate der Tumorzellen erlaubt. Diese Einteilung kann bei der Prognose und der Behandlungsplanung unterstützen (Silverstein et al., 1996), ist jedoch nur bedingt reproduzierbar und hängt stark von der Erfahrung des pathologischen Gutachters ab (Champion & Wallace, 1971; Remmele, 1997).
- Die Expression von Hormonrezeptoren. Der Nachweis der Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-Expression erfolgt heute immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern. Der Tumor wird entsprechend

des relativen Anteils angefärbter Zellkerne als Östrogenrezeptor-positiv (ER+) oder Progesteronrezeptor-positiv (PR+) eingestuft, wobei hierfür mindestens 1 % der Zellkerne der Tumorzellen eine Färbung aufweisen müssen. Bei über zwei Drittel der Mammakarzinome kann der Östrogenrezeptor im Tumor als positiv bestimmt und anhand des Remmele-Scores semiquantitativ eingeordnet werden (Remmele & Stegner, 1987). Dies bedeutet eine günstigere Prognose, ein geringes Risiko für ein Rezidiv und auch ein längeres Gesamtüberleben (Roodi et al., 1995) (Lumachi et al., 2013; Miller et al., 2014). Dies beruht darauf, dass bei vorhandenem Östrogenrezeptor eine Hormontherapie initiiert werden kann, die an dem Rezeptor angreift und somit anti-östrogen wirkt (AWMF, 2012). Etwa die Hälfte der Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom sprechen auf eine solche Hormontherapie an, jedoch nur 5 % der Patienten ohne den Rezeptor (Osborne, 1998). Da die Progesteron- und Östrogenrezeptoren häufig einheitlich ausgeprägt sind, spricht eine solche Therapie bei 70-80 % an. Die Ergebnisse divergieren jedoch und das Therapieansprechen auf Tamoxifen kann reduziert sein (Arpino et al., 2005). Der alleinige Nachweis von Progesteronrezeptoren (ER-, PR+) erlaubt keine klare signifikante Aussage, eine alleinige Östrogenrezeptorexpression (ER+, PR-) jedoch schon. Dies basiert darauf, dass die Aktivierung des Östrogenrezeptors die Aktivierung der Progesteronrezeptoren zur Folge hat (Horwitz & McGuire, 1975). Patientinnen mit hormonnegativen Tumoren (ER-, PR-) sprechen signifikant besser auf die primäre Chemotherapie an als Patientinnen mit hormonpositiven Tumoren (Fisher et al., 2001).

- Der HER2/neu-Status. In Deutschland wird dieser standardmäßig immunhistochemisch oder anhand von *in situ*-Hybridisierung (ISH) bei neu diagnostizierten Mammakarzinomen bestimmt. Ein Ansprechen auf monoklonale Antikörper, wie Trastuzumab lässt sich über den HER2/neu-Status herausfinden. Die Stimulation des Tumors über den HER2/neu Rezeptors hemmt den zellinduzierten Untergang, was einen großen Einfluss auf die Tumorprogression einiger Patientinnen haben kann. Bei 20–25 % aller invasiven Mammakarzinome ist der HER2/neu-Rezeptor

überexprimiert, was das Outcome signifikant verschlechtert (Untch et al., 2006). Trastuzumab blockiert den Rezeptor und ist in Kombination mit einer Chemotherapie mit einem verlängerten Gesamtüberleben assoziiert (Marty et al., 2005). Eine adjuvante Behandlung mit Trastuzumab wird nach Resektion auch bei allen Nodal-positiven und bei Nodal-negativen Tumoren mit einem Durchmesser über einem Zentimeter mit HER2/neu-Überexpression empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2020). Derzeit ist nicht bekannt, ob Trastuzumab allein eine ausreichende Wirksamkeit aufweist, weshalb die Therapie in der Regel gleichzeitig mit der adjuvanten Chemotherapie initiiert und ein Jahr lang fortgeführt wird (Petrelli & Barni, 2012). Trastuzumab kann zusätzlich die Chemotherapie bei Patientinnen mit Tumoren von über einem Zentimeter Durchmesser unterstützen, sofern dies nicht kontraindiziert ist.

- Ki-67 - ein Proliferationsmarker, den Zellen während der Zellteilung im Zellkern exprimieren. Dieses Protein ist nur in solchen Zellen vorhanden, die sich in der S-, G<sub>2</sub>- und der M-Phase des Zellzyklus befinden, aber nicht in ruhenden Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase. Bei der immunhistochemischen Bestimmung der Proliferationsrate wird Ki-67 in den Tumorzellen angefärbt und der Anteil Ki-67 gefärbter Zellkerne an der Gesamtintensität der Färbung berechnet. Proliferiert ein Gewebe stark, ist von einem starken Tumorwachstum auszugehen, d. h., ein hoher Ki-67-Wert resultiert in einer schlechteren Prognose. Liegt ein hoher Wert dieses Proliferationsmarkers vor, wird die Therapie entsprechend angepasst und mit Zytostatika unterstützt, um das Tumorwachstum einzudämmen (Tumorzentrum München, 2015, S. 94).

Anhand dieser prognostischen Parameter wurde eine Kategorisierung der Mammakarzinome entwickelt, anhand derer eine entsprechende adjuvante Behandlung geplant werden kann (Tabelle 2) (Goldhirsch et al., 2011). Die Kategorie Luminal A beinhaltet dabei Hormonrezeptor-positive und HER2/neu-negative Tumoren mit einer niedrigen Proliferationsrate und die Kategorie Luminal B umfasst Tumoren mit hoher Proliferation. Problematisch zeigt sich bei dieser Einteilung der Stellenwert des Ki67-Werts, da die mangelnde Standardi-

sierung dieses Parameters und die eingeschränkte Reproduzierbarkeit keine allgemeine Einordnung der Proliferation zulassen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2020). Werte von  $\leq 10\%$  werden als niedrig-proliferierend, Werte über 20–25 % als hoch-proliferierend eingestuft (Coates et al., 2015).

Tab. 2: Adjuvante Therapieentscheidung entsprechend molekularer Subtypen des Mammakarzinoms (Goldhirsch et al., 2011)

Molekularer Subtyp	Marker				Adjuvante Therapie
	ER	PR	HER2	Ki-67	
<b>Luminal A</b>	+	+	-	niedrig	Endokrin
<b>Luminal B</b>	+	+	-	hoch	Chemotherapie und endokrin
	+	+	+	niedrig oder hoch	Chemotherapie, endokrin und Anti-HER2
<b>HER2+ nicht-luminal</b>	-	-	+		Chemotherapie und Anti-HER2
<b>Basalzelltyp Triple negativ</b>	-	-	-		Chemotherapie

Standardmäßig werden im Moment keine molekularbiologischen Analysen („Multigentests“) durchgeführt, weil sie keinen generellen Einfluss auf die Behandlungsoptionen haben und nicht als allgemeingültige prognostische Faktoren zu betrachten sind. Eine molekulare Bewertung kann dann ergänzend herangezogen werden, wenn dies im Einzelfall eine Anpassung der Therapie bedeuten würde, beispielsweise bei Patientinnen mit einer Familienanamnese des Mammakarzinoms.

## 1.6 bcl-2 Genfamilie

Die bcl-2 Genfamilie wurde erstmals in B-Zell-Lymphomen von Säugetieren entdeckt (Tsujimoto et al., 1984). Dabei handelt es sich nicht nur um ein einzelnes Gen, sondern um eine Vielzahl an Genen und deren Expressionsproteinen. Ein Hauptmerkmal zur Unterscheidung liegt in ihrer pro- und anti-apoptotischen Wirkung, wobei angenommen wird, dass eine Balance beziehungsweise Dysbalance der Proteine den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleitet (Korsmeyer et al., 1995).

Zu den pro-apoptotischen Genen zählen Bax, Bak, bcl-X<sub>s</sub>, Bad, Bid, Bik, Hrk und zu den anti-apoptotischen Genen bcl-2, bcl-X<sub>L</sub>, bcl-w, Mcl-1. Die Expressionsproteine der anti-apoptotischen Gene wurden vermehrt auf Membranen der Zellorganellen wie z.B. der Mitochondrien, dem endoplasmatischen Reticulum oder der Zellkernmembran gefunden (Hockenbery et al., 1990; Jong et al., 1994; Krajewski et al., 1993; Zhu et al., 1996). Im Gegensatz dazu wurden pro-apoptotischen Vertreter der bcl-2 Familie, wie Bid und Bad vermehrt im Cytoplasma lokalisiert. Der Grund hierfür wird in der Abstinenz des hydrophoben Carboxy-Terminus als transmembrane Domäne vermutet (Hsu et al., 1997; Puthalakath et al., 1999). Andere hingegen sind nach Aktivierung und Einsetzen der Apoptose in der Mitochondrienmembran integriert, wie z.B. bcl-X<sub>s</sub> und Bax. Um eine Balance zwischen den Expressionsproteinen der bcl-2 Familie zu erreichen, haben die Proteine die Fähigkeit zur Dimerisierung, die nur funktioniert, wenn eine Übereinstimmung in der BH-Domäne vorhanden ist. Somit aktivieren sich die im Cytoplasma befindlichen pro-apoptotischen Proteine, wie Bax, Bad und Bid erst über eine kompetitive Dimerisierung, wenn eine bestimmte Konzentration an anti-apoptotischen Proteinen, wie bcl-2 oder bcl-X<sub>L</sub> aus den Zellmembranen gelöst wurden (Hetz & Glimcher, 2008; Warren et al., 2019).

## 1.7 Die bcl-2-Homologie-Domäne

Innerhalb der bcl-2 Familie besteht eine Homologie in bis zu vier der BH1- bis BH4-Domänen mit alpha-helikaler Struktur (Adams & Cory, 1998; Tsujimoto & Shimizu, 2000). Der Unterschied zwischen den anti- und proapoptotischen Proteinen sind die Abwesenheit einer oder mehrere Domänen wie zum Beispiel innerhalb der proapoptotischen Proteine, bei denen entweder die aminoterminal

gelegene BH4- und die BH1- sowie die BH2-Domäne fehlen kann. Als Ausnahme wäre hier zu nennen, dass die proapoptischen Proteine bcl-Xs und bcl-Rambo als einzige die BH4 Domäne besitzen. Ein wiederkehrendes Merkmal aller proapoptischen Proteine der bcl-2-Familie ist die BH3 Domäne, die als „Todesdomäne“ bezeichnet wird.

Tab. 3: bcl-2 Unterfamilien und Mitglieder (Warren et al., 2019)

<b>Subfamily</b>	<b>Activity</b>	<b>BH Domain Status</b>	<b>Members</b>
Anti-apoptotic	Anti-apoptotic	Presence of BH4 domain	bcl-2 bcl-XL bcl-W bcl-B (bcl2L10) MCL-1L
		Absence of BH4 domain	MCL-1 BFL-1/A1 bcl2L12
Pore-forming executioners	Pro-apoptotic	Multi-domain	BAX BAK BOK
BH3-only	Pro-apoptotic	Activator—binds to pro-apoptotic and anti-apoptotic bcl-2 multiregion proteins	BIM BID Puma Mule
		Sensitizer—displaces activator BH3-only proteins from anti-apoptotic proteins to promote apoptosis	BAD Noxa BIK./BLK BMF HRK/DP5 Beclin-1
	Potential pro-apoptotic	bcl-Rambo (bcl2L13) bcl-G (bcl2L14) MCL-1S MCL-1ES	

## 1.8 Zielsetzung der Studie und Ethikvotum

Bei Mammakarzinomen gibt es auf der einen Seite bereits einige etablierte Prognoseparameter. Auf der anderen Seite sind die Probleme der Tumorprognostik letztendlich nicht gelöst. Es gibt Patientinnen, die mit „guten Tumoraussetzungen“, also z.B. dem Stadium pT1 pN0, relativ schnell Rezidive erleiden und später an der Krankheit versterben, und andere, die mit „schlechten Tumoraussetzungen“, z.B. einem Stadium pT3 pN1, lange rezidivfrei leben.

Dies bedeutet, dass bei aller Gültigkeit der prognostischen Aussagen für Patientengruppen der individuelle Verlauf konkreter Patienten bislang nicht vorhergesagt werden kann, sondern dass Prognostik nach wie vor bedeutet, aus Erfahrungen mit anderen früheren Krankheitsfällen einen prospektiven Verlauf, so gut es geht, abzuschätzen.

Entsprechend ist verständlich, dass es immer wieder Studien gibt, die sich mit der Erprobung und ggfls. der Etablierung neuer prognostischer Faktoren befassen. Dieses ist auch hier der Fall. Das gut charakterisierte Patientengut war zum Anlass genommen worden, eine Reihe von Methoden (z.B. bildanalytische Quantifizierung gegenüber manueller Auszählung oder semiquantitativer Schätzung) und eine Reihe von in der Diskussion stehenden immunhistochemischen Biomarkern klinisch-praktisch zu erproben, darunter auch bcl-2. Die Ergebnisse nur dieser Teilstudie sollen im Folgenden vorgestellt werden; auf andere Teilstudien wird nicht zurückgegriffen, um Probleme mit einer etwaigen wissenschaftliche Zweitverwertung zu vermeiden, insbesondere da sie in weiteren Promotionsarbeiten Eingang finden.

Zu der vorliegenden Studie liegt ein Ethikvotum seitens der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor (Studiennummer 4217 vom 08.04.2013).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

In dieser retrospektiven, zunächst 115 Patientinnen umfassenden Studie wurde an den noch vorhandenen Tumorexzidaten von 93 Patientinnen, die an einem primärem, unilateralem, invasiv-duktalem oder invasiv-lobulärem Karzinom ohne vorige maligne Erkrankung erkrankt waren, eine immunhistochemische bcl-2-Färbung vorgenommen. Die Diagnosestellung erfolgte primär im Institut für Pathologie der RWTH Aachen im Zeitraum zwischen 1988 bis 1990. Alle Patientinnen wurden mit den seinerzeit üblichen Therapiekonzepten einer stadienorientierten, üblicherweise brusterhaltenden chirurgischen Intervention behandelt. Die Ausräumung des axillären Level 1 war noch Standardtherapie. Danach folgte je nach Klassifikation des Tumors eine adjuvante Chemotherapie, additive Radiatio und Antihormontherapie. Eine Kombinationstherapie dieser Ansätze wurde auch schon damals verfolgt und konnte ebenfalls hier erfolgen. Die histologische Aufarbeitung und Klassifizierung der Resektate erfolgte nach den Vorgaben der damals geltenden TNM-Klassifikation und dem modifizierten Grading sowie der Bestimmung des biochemischen und des immunhistochemischen Hormonrezeptorstatus.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 TNM-Klassifikation**

Die Stadieneinteilung der Tumoren nach Größe des Primärtumors und des Lymphknotenstatus (jeweils postoperativ) und eventueller Fernmetastasierung erfolgte nach den TNM-Kriterien der 5. Ausgabe der UICC-Klassifikation (*Union Internationale Contre le Cancer* (UICC), 1997). Als die erhobenen Daten später re-evaluiert wurden, erfolgte die Einteilung in die TNM-Klassifikation der 7. Auflage, die aber keine wesentlichen Änderungen aufwies. Für die Studiauswertung wurde eine vereinfachte Darstellung vorgenommen, damit nicht zu viele kleine Untergruppen entstanden (Tabellen 4 - 7).

Die Tumorgröße pT wurde wie folgt kategorisiert (Tabelle 4):

**Tab. 4:** Vereinfachte Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation für die postoperative Tumorgröße pT; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte wiedergegebene Einteilung angewandt (nach Achterfeld 2019).

<b>pT nach TNM</b>	<b>Definition</b>	<b>Kategorie in der Studie</b>
<b>pT0</b>	kein Tumor nachweisbar	---
<b>pTis</b>	Carcinoma in situ, kein invasiver Tumor	---
<b>pT1</b>	Tumorgröße ≤ 2 cm	<b>pT1</b>
<b>pT1mi</b>	Mikroinvasion bis 0,1cm Größe	---
<b>pT1a</b>	Tumorgröße 0,1 cm - 0,5 cm	---
<b>pT1b</b>	Tumorgröße 0,5 cm - 1 cm	<b>pT1</b>
<b>pT1c</b>	Tumorgröße 1 cm - 2 cm	<b>pT1</b>
<b>pT2</b>	Tumorgröße 2 cm - 5 cm	<b>pT2</b>
<b>pT3</b>	Tumorgröße > 5 cm	<b>pT3</b>
<b>pT4</b>	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut	<b>pT4</b>
<b>pT4a</b>	Ausdehnung auf die Brustwand	---
<b>pT4b</b>	Ödem oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust	<b>pT4</b>
<b>pT4c</b>	Kriterien von pT4a und pT4b zusammen	<b>pT4</b>
<b>pT4d</b>	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom	<b>pT4</b>

Der in der Originalklassifikation recht diversifizierte Lymphknotenstatus wurde ebenfalls vereinfacht angewendet, indem auf eine Subklassifikation des Lymphknotenbefalls verzichtet wurde (Tabelle 5).

Tab 5: Vereinfachte Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation für den postoperativen Lymphknotenstatus pN; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte wiedergegebene Einteilung angewandt (nach Achterfeld 2019).

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

Im Hinblick auf klinisch-bildgebend nachgewiesene Fernmetastasen (M) wird bei Mammakarzinom wie folgt unterteilt (Tabelle 6):

Tab. 6: Unveränderte Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation für bezüglich Fernmetastasen (nach Achterfeld 2019).

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

Aus den drei Einzelkategorien pT, pN und M wird anschließend das zusammenfassende Stadium nach der UICC abgeleitet (Tab. 7), hier in ebenfalls vereinfachter Form angewandt:

**Tab. 7:** Vereinfachte Stadieneinteilung der TNM-Klassifikation für das Gesamtstadium; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte wiedergegebene vereinfachte Einteilung angewandt (nach Achterfeld 2019).

<b>Stadium nach UICC</b>	<b>TNM-Konstellationen</b>	<b>Kategorie in der Studie</b>
<b>0</b>	pT0, pN0, M0 und pTis, pN0, M0	---
<b>I</b>	pT1, pN0, M0	<b>I</b>
<b>Ila</b>	pT1, pN1, M0 und pT2, pN0, M0	<b>II</b>
<b>Ilb</b>	pT2, pN1, M0 und pT3, pN0, M0	<b>II</b>
<b>IIla</b>	pT1-pT3, pN2, M0 und pT3, pN1, M0	<b>III</b>
<b>IIlb</b>	pT4, pN1/pN2, M0	<b>III</b>
<b>IIlc</b>	pN3, M0 (unabhängig von pT)	<b>III</b>
<b>IV</b>	M1 (unabhängig von pT und pN)	<b>IV</b>

### **2.2.2 Malignitätsgradierung**

Die Malignitätsgradierung wurde nach dem 1957 entwickelten System von Bloom und Richardson in der modifizierten Form nach Elston und Ellis (Bloom & Richardson, 1957; Elston & Ellis, 1991) durchgeführt. Dabei werden drei histologische Kriterien semiquantitativ von eins bis drei bewertet, nämlich die histologische Wachstumsform (Tubuläre Differenzierung), die zytologischen Veränderungen (Kernpleomorphie) und zum anderen die Zellteilungsaktivität (Mitoserate). Um die subjektiv eingeschätzten Parameter besser zu klassifizieren, wurden die Bewertungskriterien durch eine Modifikation durch Elston und Ellis präzisiert und damit besser und reproduzierbarer bestimmbar (Tab. 8).

**Tab. 8:** Malignitätsgradierung für Mammakarzinome in der modifizierten Form nach Elston und Ellis (1991). Die Prozentangaben bei der tubulären Differenzierung beziehen sich auf lumenbildende Wachstumsformen des Tumors. Bei der Bestimmung der Mitoserate werden 10 Gesichtsfelder mit 400x-facher Endvergrößerung bei einem Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm (Sehfeldzahl 18) und einer Gesamtfläche von 1,59 mm<sup>2</sup> als Grundlage genommen. Bei Verwendung eines Mikroskops mit einem kleineren oder einem größeren Gesichtsfeldern müssen die Grenzwerte flächenbezogen angepasst werden (Biesterfeld, 1997).

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

Als zusammenfassende Angabe zum Grading als gut (G1), mäßig (G2) oder gering differenziert (G3) werden die Werte der drei Komponenten addiert und wie folgt interpretiert (Tab. 9):

**Tab. 9:** Modifizierte Malignitätsgradierung des Mammakarzinoms (Elston und Ellis 1991)

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

Das Grading war primär nur für invasiv-duktales Karzinome (bzw. Adenokarzinome vom NST-Typ) vorgesehen gewesen, ist aber im internationalen Konsens auch für invasiv-lobuläre Karzinome und für einige der selteneren Sonderformen von Mammakarzinom aus allgemeinen Gründen der Zweckmäßigkeit in Gebrauch.

## 2.2.3 Bestimmung des Hormonrezeptorstatus

### Biochemische Analyse des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus

Tumoranteile aus dem unfixierten, auf einer Kühlkette transportierten Exzidat wurden bei der biochemischen Analyse ihres Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (ER, PR) in der Frauenklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der RWTH Aachen mit Hilfe eines Radioligandenassays (Dextran-Coated Charcoal Assay) untersucht. Die übliche Vorgehensweise war, das Zytosol aus einem Teil des unfixierten Exzidat herauszuschneiden und das daraus gewonnene Zytosol mit einer Konzentration von  $^3\text{H}$ -markiertes 17  $\beta$ -Östradiol für den Östrogenrezeptor bzw. für  $^3\text{H}$ -markiertes ORG 2058 für den Progesteronrezeptor zu inkubieren (Etzrodt et al., 1983). Hierbei zeigte die Differenz der totalen und der unspezifischen Bindungskapazität die sogenannte spezifische Rezeptorbindungskapazität. Um die maximale Bindungskapazität ermitteln zu können, wurde ein Scatchard-Plot bestimmt. Die Grenzwerte von 10 fmol/mg für den Östrogen- und 20 fmol/mg zytosolischem Protein für den Progesteronrezeptor, ab dem das Ergebnis als positiv gewertet wurde, entstammten internationalen Vorgaben vieler vergleichbarer Studien.

### Immunhistochemische Analyse des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und von HER-2/neu

Außerdem wurde an Paraffinschnitten des Tumorgewebes der immunhistochemische ER- und PR-Status nach Standardprotokollen (*standard operation procedures*, SOP) in einem Färbeautomaten („Immunostainer“) bestimmt und nach dem unten in Kapitel 2.2.4 dargestellten Remmele-Score unter Zugrundelegung des Reaktionsausfalls in Positiv- und Negativkontrollen ausgewertet. Ebenso wurde immunhistochemisch der HER-2/neu-Status bestimmt und mit dem international üblichen viergliedrigen DAKO-Score beurteilt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die in eigenen Teilprojekten methodisch und klinisch ausgewertet wurden, sind nicht Gegenstand dieser Arbeit, um dem Problemfeld der unerlaubten wissenschaftlichen Zweitverwertung auszuweichen.

## 2.2.4 Immunhistochemische Darstellung der bcl-2-Expression

### Herstellung der Präparate und immunhistochemische Anwendung

Da die bcl-2-Immunhistochemie nicht Teil der ursprünglichen Diagnostik war, wurden die Originalschnitte der Fälle noch einmal fachärztlich gesichtet, i, zu entscheiden, auf welchem Paraffinblock das am besten geeignete repräsentative Tumorgewebe vorlag.

Von dem jeweiligen Block wurden mit einem Rotationsmikrotom mehrere Schnitte von ca. 3 µm Dicke angefertigt und auf handelsübliche beschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Danach wurde die immunhistochemische Färbung mit bcl-2 in einem immunhistochemischen Färbeautomaten des Institutes nach den Vorgaben der *Standard Operation Procedures* (SOP) standardisiert vorgenommen. Nach einem Antigen Retrieval und ein Blockierung der endogenen Peroxidase wurde als Primärantikörper ein gewerblicher bcl-2-Antikörper (DAKO, M0887, Verdünnung 1:50) verwendet, als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Merck, Verdünnung 1:50). Die Darstellung des Reaktionsproduktes erfolgte nach verschiedenen Spülvorgängen mit Diaminobenzidin (DAB), die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Danach wurden die Präparate mit einem konventionellen Eindeckmedium bedeckt und mit einem Deckglas versiegelt.

Nach Durchführung der Färbung stellte sich eine für bcl-2 positive Zelle durch ein spezifisches braunes Färbesignal im Zytoplasma sowie an der Zellmembran dar.

Als Positivkontrolle wurde pro Schnittpräparat ein Tonsillenfragment mitgefärbt („on slide-Kontrolle“). Ein Tonsillenschnitt wurde pro Charge als Negativkontrolle, bei dem der Primärantikörper weggelassen wurde, verwendet. Tonsillen zeigen in den T-Zellen und den B-Zellen der Mantelzone regelhaft eine bcl-2-Expression, während tonsilläre Lymphfollikel negativ reagieren.

## Auswertung der Präparate

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde semiquantitativ mit Hilfe eines Leitz Orthoplan-Mikroskops (Objektiv: 40 x/0.65, Okular: 10 x GW Periplan 18; Gesichtsfeldfläche 0,159 mm<sup>2</sup>) vorgenommen. Dazu wurden die beiden Kriterien des von Remmele und Stegner eingeführten Immunreaktiven Scores (IRS), der primär für den Östrogenrezeptor entwickelt wurde und oft auch kurz als „Remmele-Score“ bezeichnet wird, geschätzt. Dabei handelt es sich um die Zahl immunreaktiver Tumorzellen und um die mittlere Intensität der Färbung.

Die Kriterien des Immunreaktiven Scores wurden wie folgt ausgewertet (Remmele und Stegner 1987):

### Semiquantitative Bestimmung der Zahl gefärbter Tumorzellen

- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| 0 | Alle Tumorzellen negativ       |
| 1 | < 10 % der Zellen positiv      |
| 2 | 10 % - 50 % der Zellen positiv |
| 3 | 50 % - 80 % der Zellen positiv |
| 4 | > 80 % der Zellen positiv      |

### Semiquantitative Bestimmung der Färbeintensität

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| 0 | alle Zellen negativ   |
| 1 | schwaches Färbesignal |
| 2 | mäßiges Färbesignal   |
| 3 | starkes Färbesignal   |

Zur Bestimmung des IRS werden die beiden Einzelwerte miteinander multipliziert, so dass acht verschiedene IRS-Werte, nämlich 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 12, möglich sind. Da acht Gruppen für eine Statistik über eine begrenzte Zahl von Fällen in der Regel nicht sinnvoll sind, ist es zweckmäßig, mehrere Grup-

pen zusammenzufassen. In der vorliegenden Studie wurden Überlebensvergleiche zum einen mit drei Gruppen (0 / 1-3 / 4-12), zum anderen mit vier Gruppen (0 / 1-2 / 3-4 / 6-12) vorgenommen.

### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem biometrischen Programm BMDP sowohl eigenständig als auch unter Anleitung am Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Im nachfolgenden Abschnitt wurden die Unterprogramme des Bio-Medical Data Package (1D, 1L, 2D, 2L) den Auswertungsschritten hinzugefügt (z.B. "1D").

Für die Auswertung der Exzidate konnten alle Parameter der Statistik, wie Median, Modal-, Mittel-, Minimal- und Maximalwert, sowie Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient, als auch zu allen Perzentilen (1D, 2D) ausgewertet werden.

Die Ermittlung der univariate Überlebensanalysen erfolgte über Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Kaplan & Meier, 1958), deren statistische Signifikanz mit dem Wilcoxon-Breslow-Test kontrolliert wurde (1L). Im Anschluss folgten multivariate Überlebensanalysen mit den Cox-Modellen (Cox, 1972) im forward stepping-Modus (2L).

Hierbei stellte sich eine statistische Signifikanz bei den Cox Modellen für ein  $\alpha$ -Niveau von  $\leq 0,05$  ein und eine mögliche Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 5\%$  ( $\leq 10\%$ ) um nicht die Nullhypothese irrtümlicherweise zu verwerfen.

Da in dieser Studie die Kohorte auf mehrere Zielparameter untersucht wurde und in diesem Sinne eine multiple Testproblematik auftreten könnte, fand die statistische Auswertung explorativ statt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Allgemeine Daten

Die Kohorte umfasste 93 Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von  $59,3 \pm 14,3$  Jahre bei der Diagnosesicherstellung. Dabei betrug das Alter der jüngsten Patientin 32 Jahre und das Alter der ältesten Patientin 95 Jahre.

Gegen Abschluss des Recallintervalls überlebten noch 40 der vormals 93 Patientinnen, wobei die mittlere Beobachtungsdauer  $10,6 \pm 1,0$  Jahre betrug. Die restlichen 50 Patientinnen waren nach  $3,8 \pm 2,6$  Jahren verstorben und drei Patientinnen konnten nach  $6,2 \pm 1,0$  Jahren nicht mehr aktualisiert werden. Hierbei ergab sich für 63,4% der Kohorte eine fünfjährige Überlebensrate, sowie für 47,8 % eine zehnjährige Überlebensrate (Abb. 1). Das durchschnittliche Überleben der Kohorte lag bei 7,5 Jahren und das mediane Überleben 7,8 Jahre.

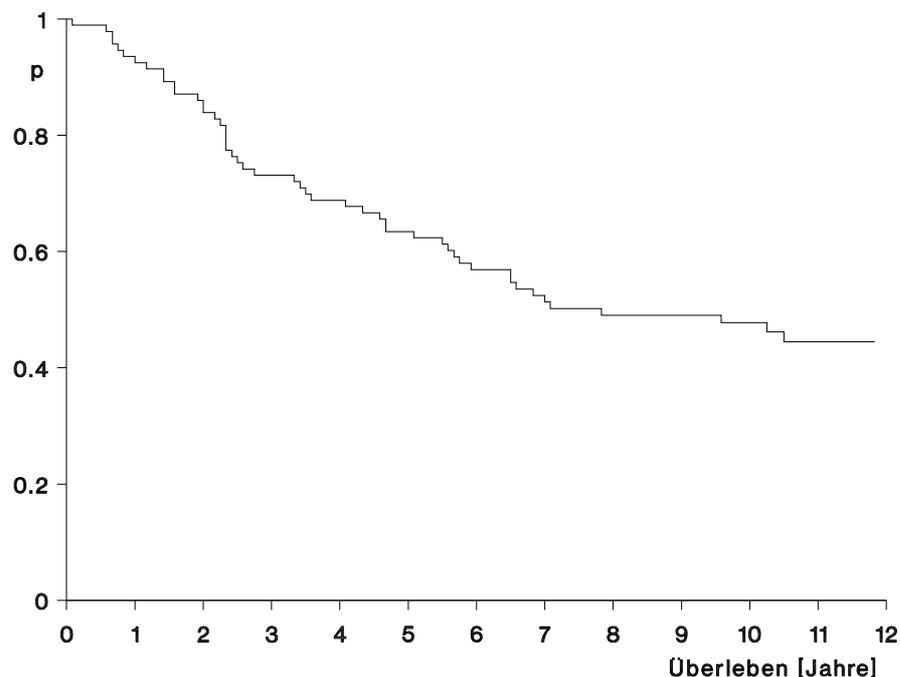


Abb. 1: Gesamtüberleben der 93 Patientinnen

## 3.2 Univariate Überlebensanalyse

### 3.2.1 TNM-Klassifikation und ihre Komponenten

Die nachfolgenden Tabellen 10-13 bzw. die Abbildungen 2-5 spiegeln die Korrelation der TNM-Klassifikation auf das Überleben wider.

Tab. 10: Überleben in Beziehung zur Tumorgroße (pT) ( $p = 0,0084$ )

pT	1	2	3	4
Anzahl der Patienten	13	58	14	8
verstorbene Patienten	4	31	9	6
mittl. Überleben (Jahre)	9,2	7,8	5,8	3,9
5-Jahres-ÜLW (%)	84,6	69,0	42,9	25,0
10-Jahres-ÜLW (%)	69,2	48,8	35,7	25,0

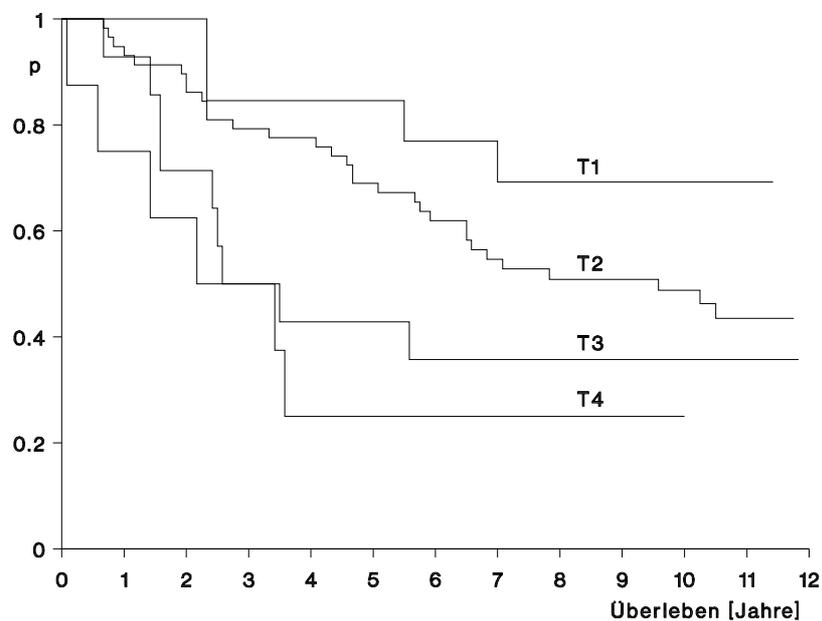
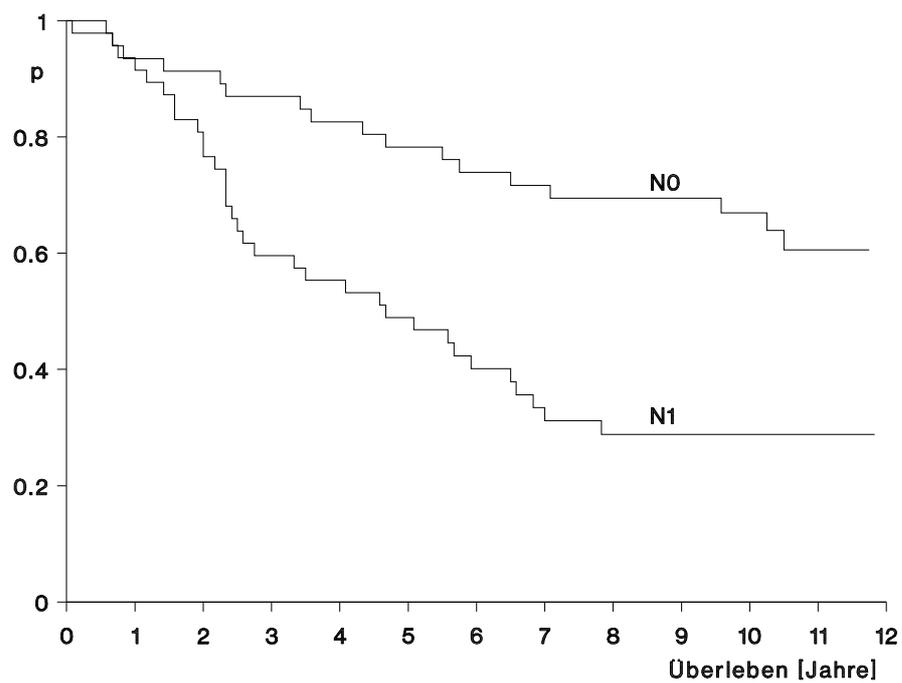


Abb. 2: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Tumorgroße (pT)

**Tab. 11:** Überleben in Beziehung zum Lymphknotenstatus (pN) ( $p = 0,0005$ )

pN	0	1
Anzahl der Patienten	46	47
verstorbene Patienten	17	33
mittl. Überleben (Jahre)	9,1	5,8
5-Jahres-ÜLW (%)	78,3	48,9
10-Jahres-ÜLW (%)	67,0	28,8



**Abb. 3:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für den Lymphknotenstatus (pN)

Tab. 12: Überleben in Beziehung zur Fernmetastasierung (M) ( $p = 0,0030$ )

M	0	1
Anzahl der Patienten	88	4
verstorbene Patienten	46	4
mittl. Überleben (Jahre)	7,7	2,1
5-Jahres-ÜLW (%)	65,9	0,0
10-Jahres-ÜLW (%)	49,3	0,0

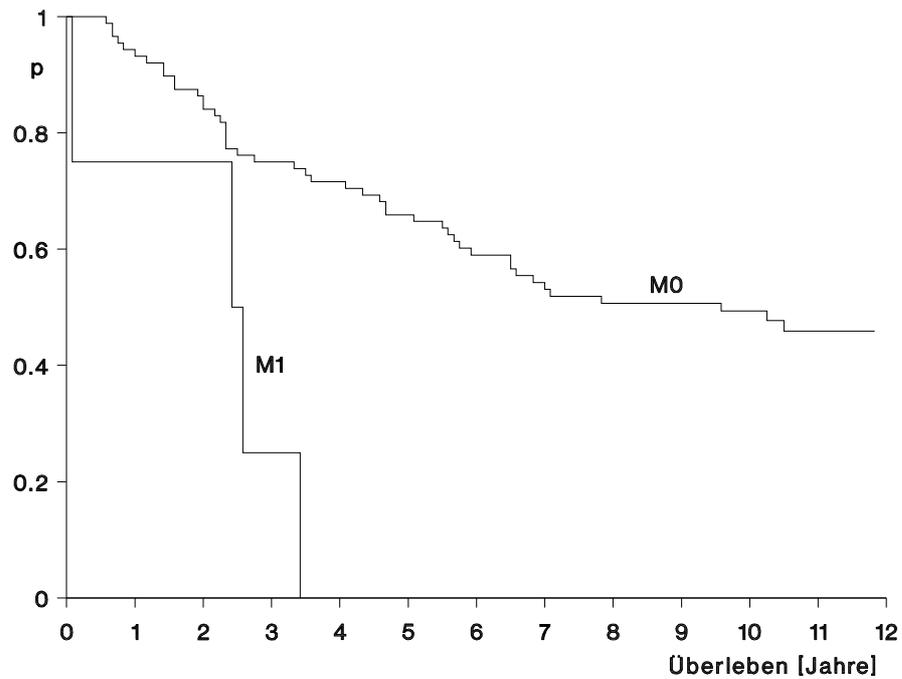
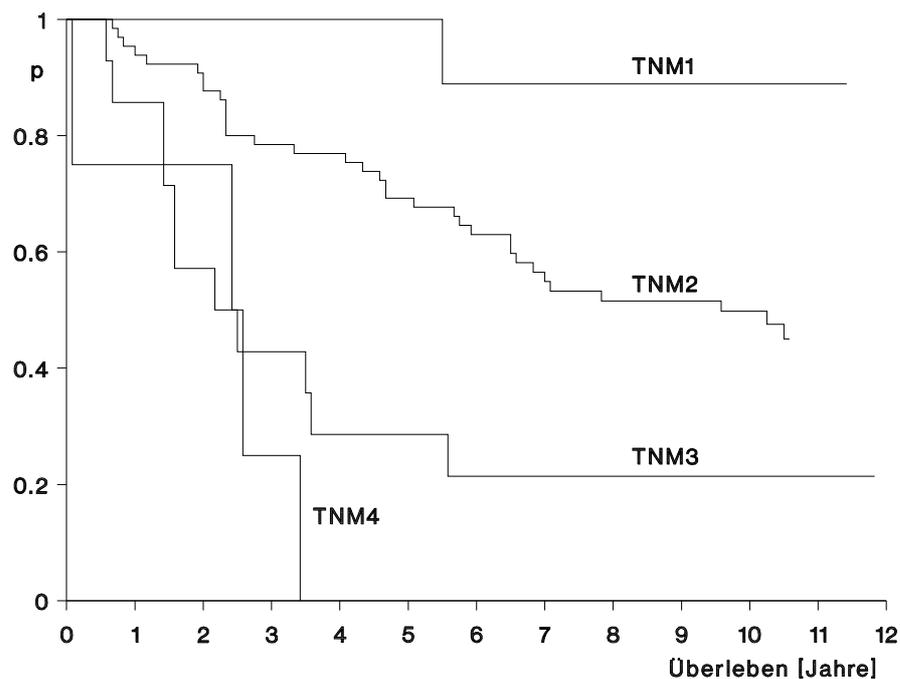


Abb. 4: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Fernmetastasierung (M)

**Tab. 13:** Überleben in Beziehung zum Staging (pTNM) ( $p < 0,0001$ )

pTNM	1	2	3	4
Anzahl der Patienten	9	65	14	4
verstorbene Patienten	1	34	11	4
mittl. Überleben (Jahre)	10,8	7,9	4,3	2,1
5-Jahres-ÜLW (%)	100,0	69,2	28,6	0,0
10-Jahres-ÜLW (%)	88,9	49,8	21,4	0,0



**Abb. 5:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Staging (pTNM)

Die abgebildeten Graphen der einzelnen Parameter der TNM Klassifikation zeigen eine signifikante Trennung der Komponenten. Hervorzuheben sei hier die Separation des Lymphknoten Graphen ( $p = 0,0005$ ), sowie des Fernmetastasie-

rungs Graphen mit ( $p = 0,0030$ ). Dabei stellt der Lymphknotenstatus bei Diagnosestellung die größte Relevanz dar, da sich der Graph bereits nach 1,5 Jahren teilt und somit eine bessere Prognose für das Überleben der Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen aufweist.

Die Zusammenfassung der Einzelkomponenten des TNM Systems zeigen in unserer Kohorte ein noch signifikantere Aufspreizung der Graphen ( $p < 0,0001$ ).

### **3.2.2 Gradierung und ihre Komponenten**

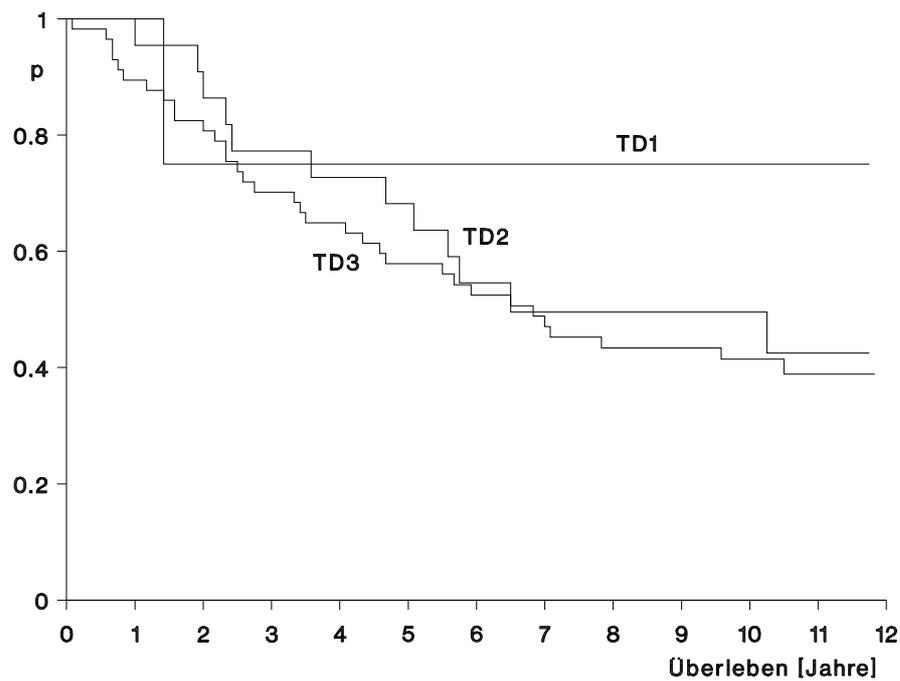
Ein weiterer Prognosefaktor, um die Überlebensrate beim Mammakarzinom neben dem Staging genauer zu ermitteln, ist das Grading. Das Grading umfasst die tubuläre Differenzierung (Tab. 14, Abb. 6), die Kernpleomorphie (Tab. 15, Abb. 7), Mitoseaktivität (Tab. 16, Abb. 8), sowie die Gesamtschau aller Komponenten zusammen (Tab. 17, Abb. 9).

Die Ergebnisse unserer Kohorte zeigen eine Korrelation der Überlebensrate mit der histomorphologischen Gradierung. Dies lässt sich vor allem bei der Mitoseaktivität ( $p = 0,0007$ ) darstellen, ebenso beim Gesamtgrading ( $p = 0,0133$ ), wobei hier eine deutliche Separation der Graphen erst nach 2,5 Jahren eintritt.

Die Einzelkomponenten tubuläre Differenzierung und Kernpleomorphie zeigten in unseren Ergebnissen eine geringere Signifikanz gegenüber der Mitoseaktivität und des Gradings. Hierbei wies die tubuläre Differenzierung mit einer statistischen Signifikanz von  $p = 0,5825$  im Vergleich zur Kernpleomorphie mit  $p = 0,1292$  die schlechtere Aussagekraft auf. Einzig bei der Betrachtung des Graphen der Kernpleomorphie lässt sich ein Überlebensunterschied zwischen den Gruppen KP2 und KP3 darstellen. Dieser schlägt sich allerdings nicht in der statistischen Signifikanz nieder.

**Tab. 14:** Überleben in Beziehung zur tubulären Differenzierung (TD) ( $p = 0,5825$ )

TD	1	2	3
<b>Anzahl der Patienten</b>	4	22	57
<b>verstorbene Patienten</b>	1	12	34
<b>mittl. Überleben (Jahre)</b>	9,2	7,6	7,0
<b>5-Jahres-ÜLW (%)</b>	75,0	68,2	57,9
<b>10-Jahres-ÜLW (%)</b>	75,0	54,6	41,5



**Abb. 6:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur tubulären Differenzierung (TD)

Tabelle 15: Überleben in Beziehung zur Kernpleomorphie (KP) ( $p = 0,1292$ )

KP	1	2	3
Anzahl der Patienten	6	35	47
verstorbene Patienten	2	16	29
mittl. Überleben (Jahre)	9,8	8,0	6,7
5-Jahres-ÜLW (%)	83,3	71,4	55,3
10-Jahres-ÜLW (%)	66,7	53,9	41,6

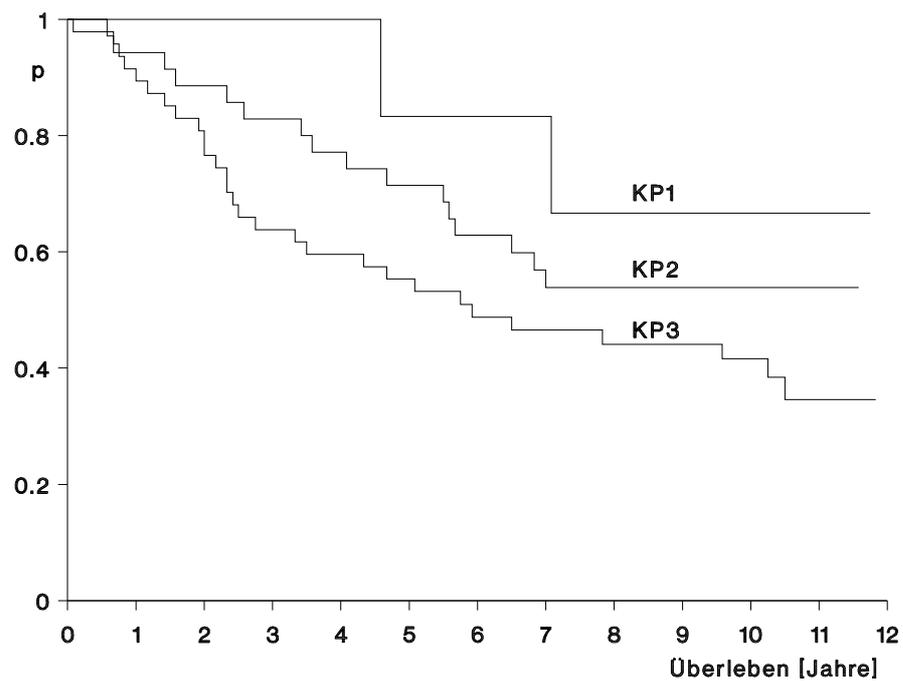


Abb. 7: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Kernpleomorphie (KP)

Tabelle 16: Überleben in Beziehung zur Mitoserate (MIT) ( $p = 0,0007$ )

MIT	1	2	3
Anzahl der Patienten	42	28	17
verstorbene Patienten	14	20	12
mittl.Überleben (Jahre)	9,2	6,3	5,2
5-Jahres-ÜLW (%)	78,6	57,1	35,5
10-Jahres-ÜLW (%)	68,7	27,2	35,3

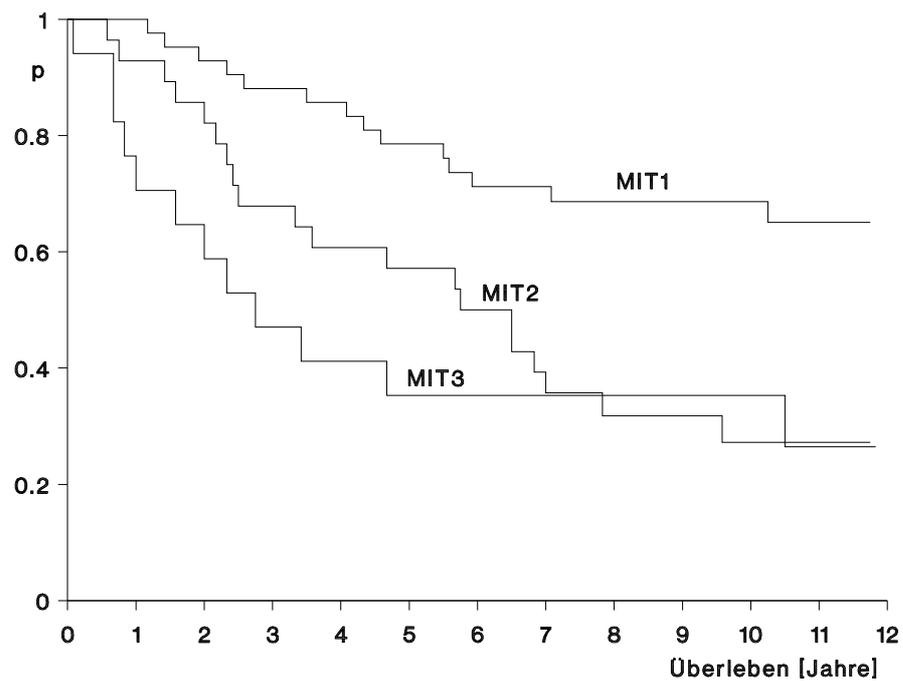
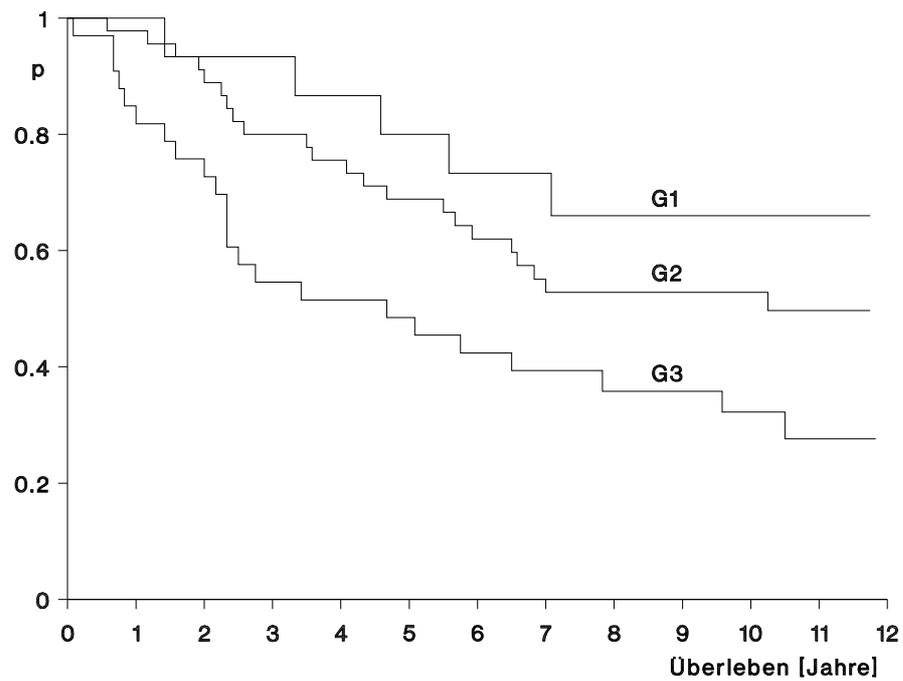


Abb. 8: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Mitoserate

**Tab. 17:** Überleben in der Beziehung zum Grading ( $p = 0,0133$ )

<b>Grad</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Anzahl der Patienten</b>	15	45	33
<b>verstorbene Patienten</b>	5	22	23
<b>mittl. Überleben (Jahre)</b>	9,3	8,0	5,9
<b>5-Jahres-ÜLW (%)</b>	80,0	68,9	48,5
<b>10-Jahres-ÜLW (%)</b>	66,0	52,9	32,2



**Abb. 9:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Grading

### 3.2.3 Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus

Die nachfolgenden Tabellen 18 und 19 bzw. die Abbildungen 10 und 11 geben die Korrelation der beiden Hormonrezeptoren mit dem Überleben wieder.

Tab. 18: Überleben in Beziehung zum biochemischen Östrogenrezeptorstatus (ER) ( $p = 0,1023$ )

ER	negativ	positiv
Anzahl der Patienten	24	69
verstorbene Patienten	13	37
Mittl. Überleben (Jahre)	6,4	7,8
5-Jahres-ÜLW (%)	50,0	68,1
10-Jahres-ÜLW (%)	45,8	48,3

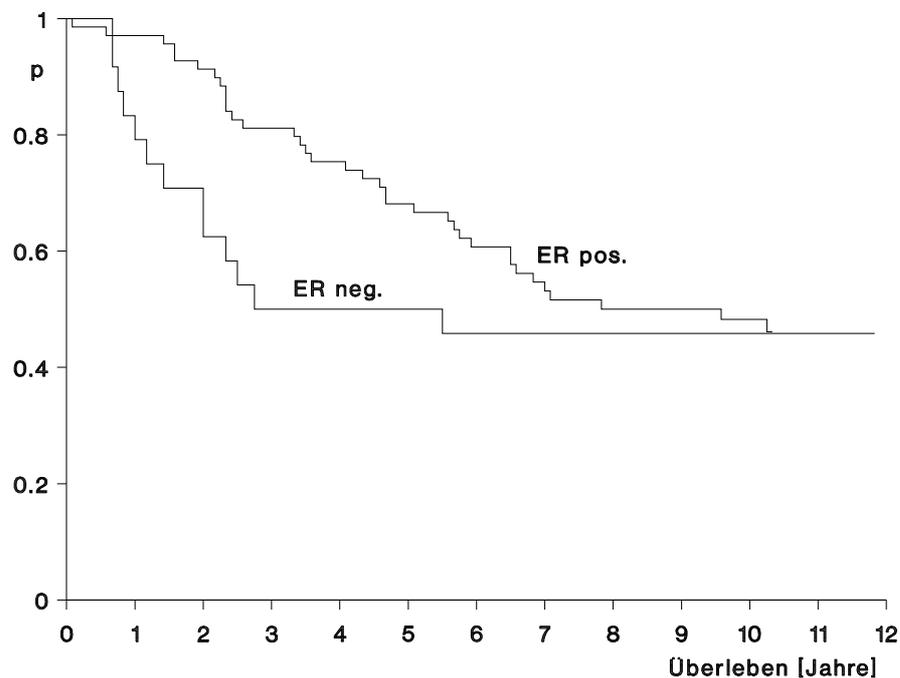


Abb. 10: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Östrogenrezeptor (ER)

Tab. 19: Überleben in Beziehung zum biochemischen Progesteronrezeptorstatus (PR) ( $p = 0,0114$ )

PR	negativ	positiv
Anzahl der Patienten	44	49
verstorbene Patienten	28	22
mittl. Überleben (Jahre)	6,3	8,5
5-Jahres-ÜLW (%)	50,0	75,5
10-Jahres-ÜLW (%)	40,9	53,9

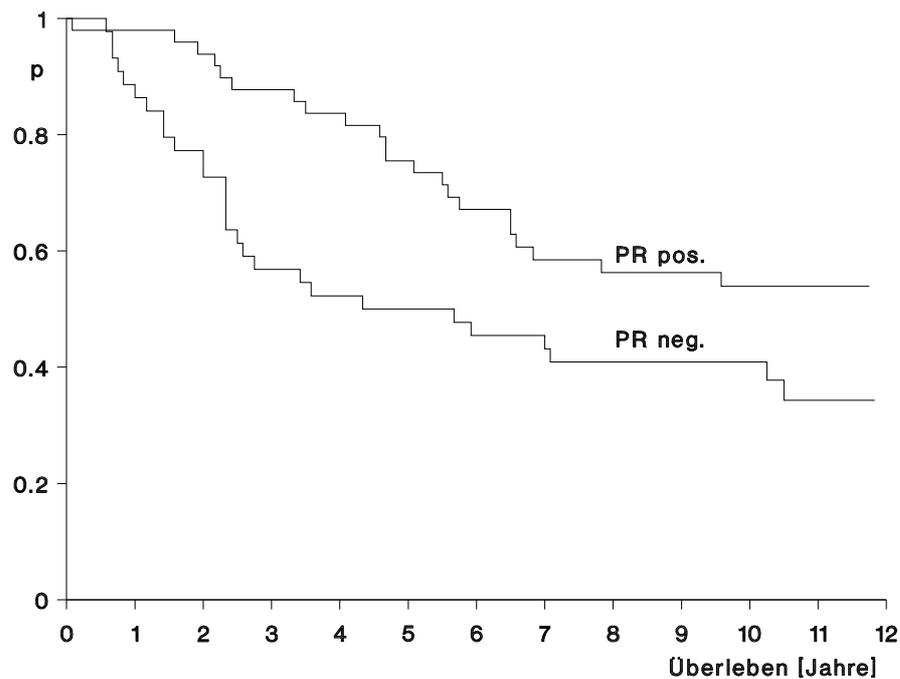


Abb. 11: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Progesteronrezeptor (PR)

Zusammenfassend konnte für die Hormonrezeptoren eine Korrelation mit der Überlebensrate beim Progesteronrezeptor ( $p = 0,0114$ ) über den gesamten Follow-Up-Zeitraum dargelegt werden. Diesen Überlebensvorteil für die positiven Patientinnen wies der Östrogenrezeptor ( $p = 0,1023$ ) nur die ersten sieben Jahre auf, danach erfolgte eine Annäherung der Graphen und damit eine sinkende Aussagekraft.

### **3.2.4 bcl-2-Expression**

Die nachfolgende statische Auswertung der klinischen Relevanz der immunhistochemischen Analyse der bcl-2-Expression wurde bei den 93 Patientinnen auf die Einzelkomponenten (bcl-2-PP, bcl-2-SI) untersucht. Zusätzlich zu den Einzelkomponenten wurde ein Analog zum Remmele-Score, der immunreaktiven Score (bcl-2-IRS) gebildet und ebenfalls begutachtet.

Zunächst wurde untersucht, ob die bcl-2-Expression überhaupt eine prognostische Relevanz hat, ohne dass die Ausprägung von PP oder SI bzw. des IRS beachtet wurden, d.h. eine reine Ja-/Nein-Entscheidung (Tab. 20, Abb. 12). Hierbei zeigte sich ein hoch signifikant ( $p = 0,0001$ ) schlechterer Verlauf bei den bcl-2-negativen Fällen.

Danach wurde die Gruppe der bcl-2-positiven Fälle in jeweils zwei Gruppen aufgespalten, so dass drei Gruppen resultierten. Die Tabellen 21-23 und die Abbildungen 13-15 lassen erkennen, dass die Aufspaltung der positiven Fälle in drei Gruppen für bcl-2-PP, bcl-2-SI und für bcl-2-IRS Überlebensunterschiede ergibt, die sich sowohl graphisch in den entsprechenden Überlebenskurven als auch tabellarisch niederschlagen. Dabei scheint innerhalb der positiven Fälle bcl-2-SI eine stärkere Relevanz zuzukommen als bcl-2-PP. Eine Aufspaltung in vier Gruppen verbessert für den bcl-2-IRS das Ergebnis nicht (Tabelle 24, Abbildung 16).

Tab. 20: Überleben in Beziehung zur bcl-2-Expression in zwei Gruppen (negativ vs. positiv) ( $p = 0,0001$ )

<b>bcl-2</b>	<b>negativ</b>	<b>positiv</b>
<b>Anzahl der Patienten</b>	34	59
<b>verstorbene Patienten</b>	23	27
<b>mittl. Überleben (Jahre)</b>	5,3	8,7
<b>5-Jahres-ÜLW (%)</b>	38,2	78,0
<b>10-Jahres-ÜLW (%)</b>	32,4	56,6

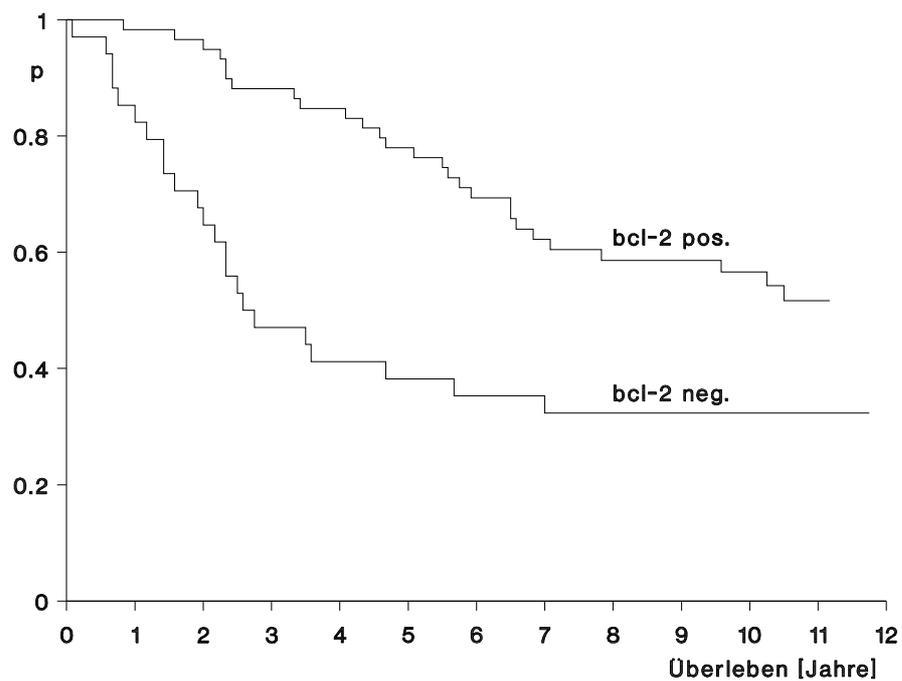


Abb. 12: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur bcl-2-Expression in zwei Gruppen

Tab. 21: Überleben in Beziehung zum Prozentsatz bcl-2-positiver Zellen (bcl-2-PP) ( $p = 0,0005$ ); Grenzwerte: bcl-2-PP = 0 bzw. 2

bcl-2-PP	0	1 - 2	3 - 4
Anzahl der Patienten	34	25	34
verstorbene Patienten	23	13	14
mittl. Überleben (Jahre)	5,3	8,2	9,0
5-Jahres-ÜLW (%)	38,2	72,0	82,4
10-Jahres-ÜLW (%)	32,4	51,3	60,3

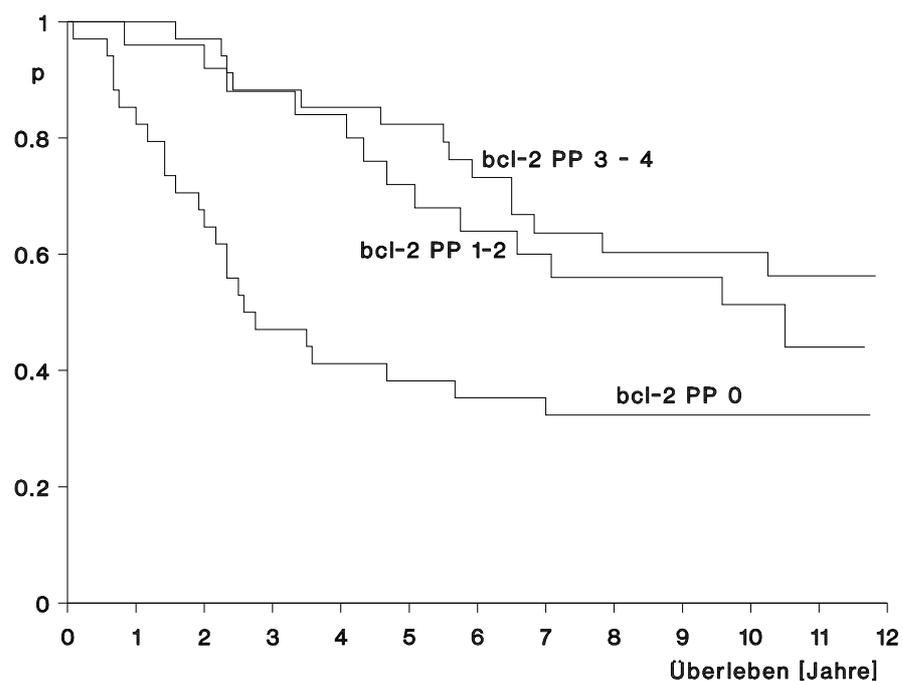
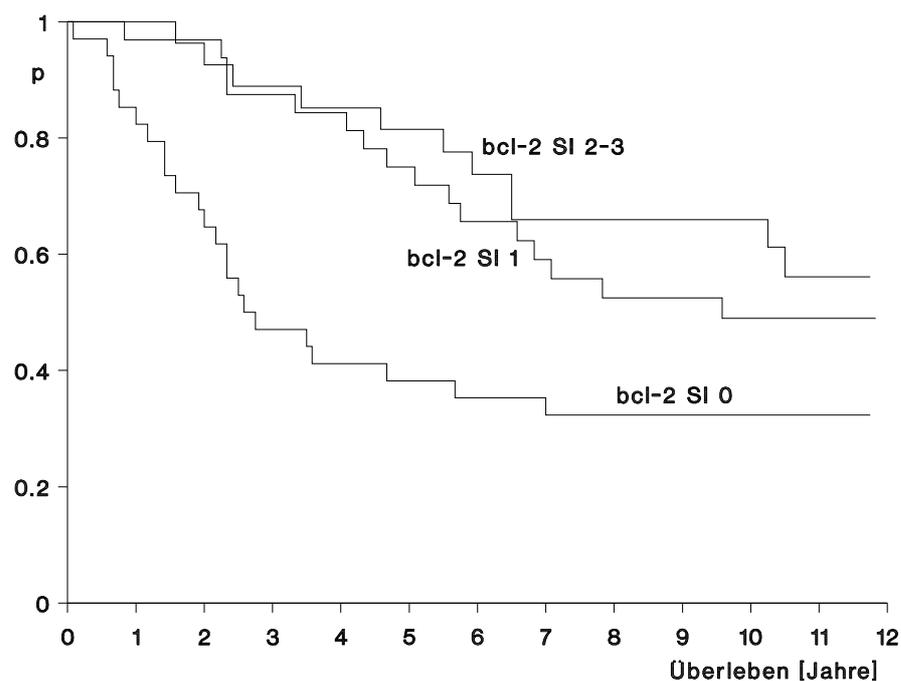


Abb. 13: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum Prozentsatz bcl-2-positiver Zellen (bcl-2-PP) in drei Gruppen

**Tab. 22:** Überleben in Beziehung zur Färbeintensität der bcl-2-Expression (bcl-2-SI) ( $p = 0,0005$ ); Grenzwerte: bcl-2-SI = 0 bzw. 1

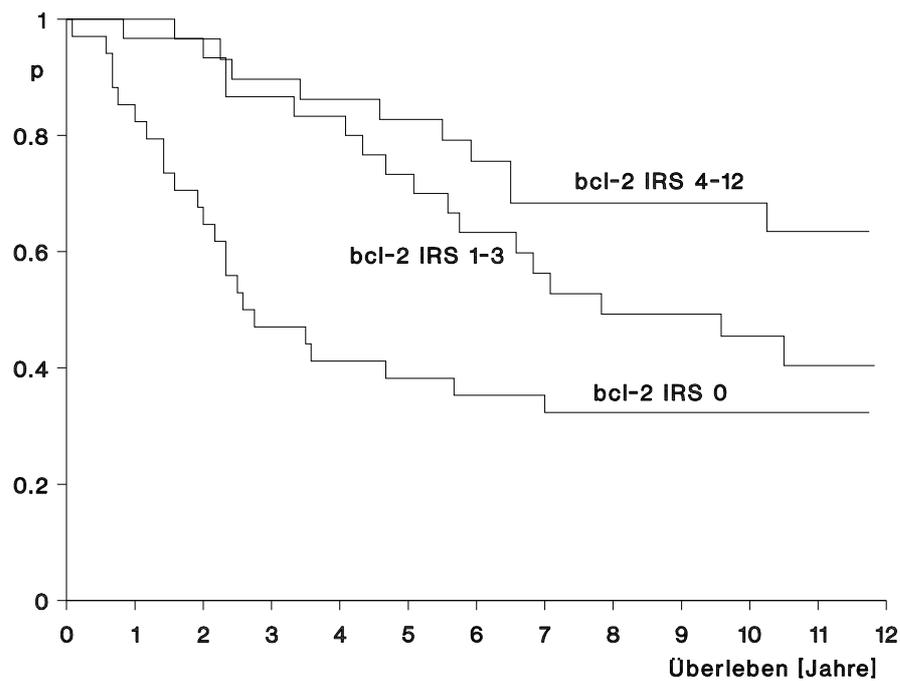
<b>bcl-2-SI</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2 - 3</b>
<b>Anzahl der Patienten</b>	34	32	17
<b>verstorbene Patienten</b>	23	16	11
<b>mittl. Überleben (Jahre)</b>	5,3	8,3	9,1
<b>5-Jahres-ÜLW (%)</b>	38,2	75,0	81,5
<b>10-Jahres-ÜLW (%)</b>	32,4	49,0	66,0



**Abb. 14:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Färbeintensität der bcl-2-Expression (bcl-2-SI) in drei Gruppen

**Tab. 23:** Überleben in Beziehung zum immunreaktiven Score (bcl-2-IRS) ( $p = 0,0004$ ); Grenzwerte: bcl-2-IRS = 0 bzw. 3

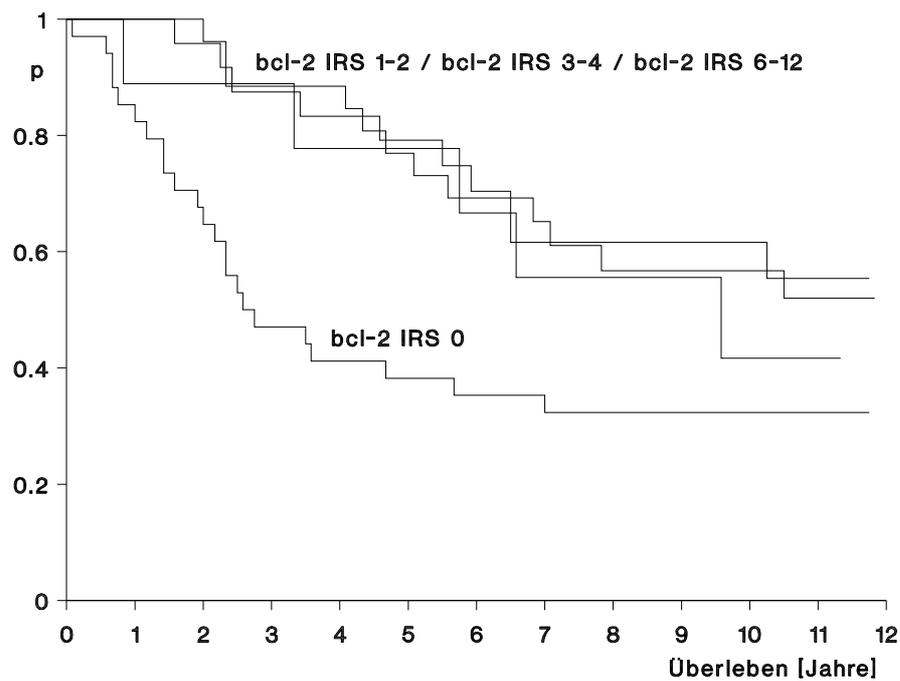
<b>bcl-2-IRS</b>	<b>0</b>	<b>1 - 3</b>	<b>4 - 12</b>
<b>Anzahl der Patienten</b>	34	30	29
<b>verstorbene Patienten</b>	23	17	10
<b>mittl. Überleben (Jahre)</b>	5,3	8,0	9,3
<b>5-Jahres-ÜLW (%)</b>	38,2	73,3	45,5
<b>10-Jahres-ÜLW (%)</b>	32,4	82,8	68,4



**Abb. 15:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum immunreaktiven Score (bcl-2-IRS) in drei Gruppen

**Tab. 24:** Überleben in Beziehung zum immunreaktiven Score (bcl-2-IRS) ( $p = 0,0004$ ); Grenzwerte: bcl-2-IRS = 0 bzw. 3

<b>bcl-2-IRS</b>	<b>0</b>	<b>1 - 2</b>	<b>3 - 4</b>	<b>6 - 12</b>
<b>Anzahl der Patienten</b>	34	9	26	24
<b>verstorbene Patienten</b>	23	5	12	10
<b>mittl. Überleben (Jahre)</b>	5,3	7,9	8,7	8,8
<b>5-Jahres-ÜLW (%)</b>	38,2	77,8	76,9	79,2
<b>10-Jahres-ÜLW (%)</b>	32,4	41,7	56,7	61,6



**Abb. 16:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zum immunreaktiven Score (bcl-2-IRS) in vier Gruppen

### 3.3 Multivariate Analyse: Cox-Modell

Die weitere statistische Auswertung sieht vor, dass die einzelnen Parameter der TNM-Klassifikation, des Grading, des Hormonrezeptorstatus, sowie die immunhistochemische Analyse der bcl-2- Expression auf ihrer statistischen Signifikanz untereinander verglichen werden. Dabei werden die signifikantesten Prognosefaktoren untereinander gelistet, bewertet und Schritt für Schritt in das Cox-Modell aufgenommen bis keine weitere statistische Relevanz der Einzelkomponenten vorhanden ist.

Die einzelnen Schritte des Cox-Modells werden in den Tabellen 25-30 wiedergegeben. Hierbei zeigten die Prognosefaktoren des Lymphknotenstatus ( $p = 0,0014$ ), der bcl-2-bezogenen Größen ( $0,0045 \geq p \geq 0,0005$ ), der Tumorgröße ( $p = 0,0048$ ) als auch des Gradings ( $p = 0,0064$ ) die höchste Relevanz.

Tab.25: Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der klinischen Parameter, des Hormonrezeptorstatus und der vier bcl-2-basierten Parameter;  $n = 93$ . Ausgangssituation vor Schritt 1

Variable	Chi <sup>2</sup> enter	Chi <sup>2</sup> remove	p-Wert
pN	12,08		0,0005
bcl-2-IRS (0/1-3/4-12)	10,79		0,0010
bcl-2 (neg./pos.)	8,58		0,0034
bcl-2-PP	8,41		0,0037
bcl-2-SI	8,05		0,0045
pT	7,94		0,0048
Grad	7,44		0,0064
PR	4,67		0,0307
ER	0,58		0,4451

Der erste Schritt des Cox-Modells sah vor den Lymphknotenstatus als die relevanteste Komponente als erstes aufzunehmen. Danach verfügten mehrere bcl-2-bezogene Variable über eine hohe verbliebene Relevanz ( $0,0106 \geq p \geq$

0,0027); als beste Größe wurde in Schritt 2 sowie der bcl-2-IRS in den Grenzen 0, 1-3 und 4-12 aufgenommen ( $p = 0,0027$ ).

**Tab.26:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der klinischen Parameter, des Hormonrezeptorstatus und der vier bcl-2-basierten Parameter;  $n = 93$ . Schritt 1

Variable	Chi <sup>2</sup> enter	Chi <sup>2</sup> remove	p-Wert
pN		12,08	0,0005
bcl-2-IRS (0/1-3/4-12)	9,00		0,0027
bcl-2-PP	8,26		0,0040
bcl-2 (neg./pos.)	7,77		0,0053
PR	6,71		0,0096
bcl-2-SI	6,53		0,0106
pT	4,30		0,0382
Grad	3,99		0,0458
ER	1,63		0,2018

**Tab. 27:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der klinischen Parameter, des Hormonrezeptorstatus und der vier bcl-2-basierten Parameter;  $n = 93$ . Schritt 2

Variable	Chi <sup>2</sup> enter	Chi <sup>2</sup> remove	p-Wert
pN		10,30	0,0013
bcl-2-IRS (0/1-3/4-12)		9,00	0,0027
Grad	4,67		0,0307
pT	3,53		0,0603
PR	2,60		0,1068
ER	0,36		0,5461
bcl-2-PP	0,25		0,6203
bcl-2-SI	0,21		0,6505
bcl-2 (neg./pos.)	0,08		0,7769

Nach Schritt 2 verfügten die bisher nicht berücksichtigten bcl-2-bezogenen Größen erwartungsgemäß über keinerlei prognostische Relevanz mehr, da sie (s.u.) untereinander deutlich korreliert sind. Als Variable mit größter verbliebe-

ner Restrelevanz ( $p = 0,0307$ ) wurde als weitere Größe die Gradierung in das Cox-Modell in Schritt 3 aufgenommen (Tab. 28). Hiernach erfüllte keiner der restlichen Prognosefaktoren die statistische Signifikanz um in das Cox-Modell aufgenommen zu werden; nach Schritt 3 liegt somit die Endsituation des Cox-Modells vor.

**Tab. 28:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der klinischen Parameter, des Hormonrezeptorstatus und der vier bcl-2-basierten Parameter;  $n = 93$ . Endsituation nach Schritt 3

Variable	Chi <sup>2</sup> enter	Chi <sup>2</sup> remove	p-Wert
<b>bcl-2-IRS (0/1-3/4-12)</b>		9,68	0,0019
<b>pN</b>		5,74	0,0166
<b>Grad</b>		4,67	0,0307
<b>PR</b>	2,30		0,1295
<b>pT</b>	2,06		0,1508
<b>bcl-2 (neg./pos.)</b>	0,28		0,5987
<b>bcl-2-SI</b>	0,15		0,6934
<b>bcl-2-PP</b>	0,14		0,7089
<b>ER</b>	0,08		0,7708

Die Tabelle 29 listet die signifikantesten Prognosefaktoren ( $p = 0,001$  bis  $p = 0,031$ ) des Cox-Modells einzeln mit ihren Chi<sup>2</sup>-Werten und global Chi<sup>2</sup>-Werten von 12,24 bis 25,92 auf.

**Tab. 29:** Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung der klinischen Parameter, des Hormonrezeptorstatus und der bcl-2-basierten Parameter. Übersicht über die Entwicklung der statistischen Kenngrößen von Schritt zu Schritt

Schritt	Improvement Chi <sup>2</sup>	p-Wert	Global Chi <sup>2</sup>	p-Wert
<b>1 (pN)</b>	12,08	0,001	12,24	< 0,001
<b>2 (bcl-2-IRS (0/1-3/4-12))</b>	9,00	0,003	20,91	< 0,001
<b>3 (Grad)</b>	4,67	0,031	25,92	< 0,001

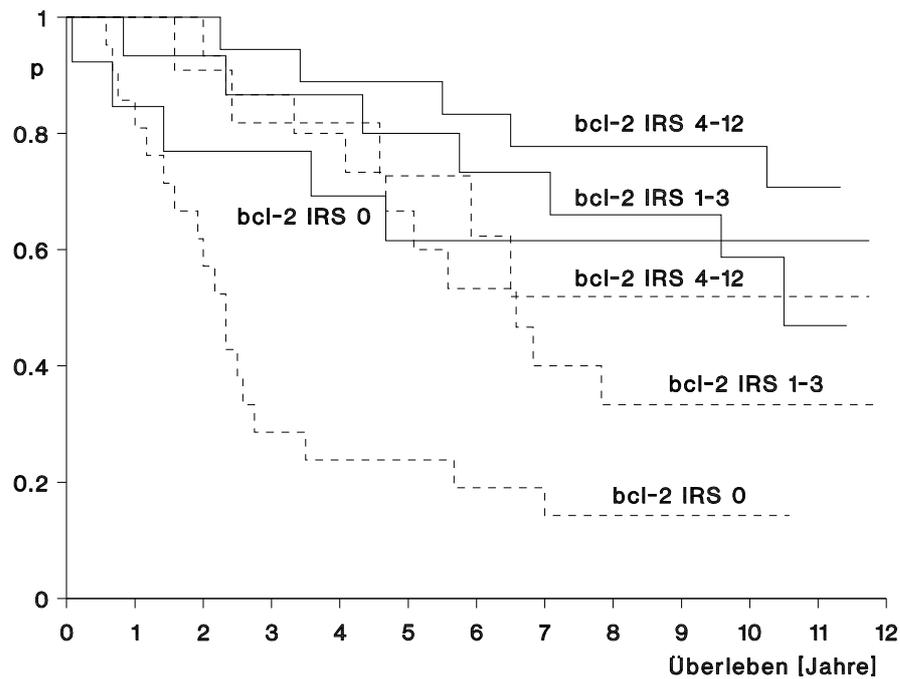
Zur Validierung des Cox-Modells am konkreten Datensatz wurden Lymphknotenstatus und bcl-2-Expression gegenübergestellt. Da sowohl der Lymphknotenstatus (pN) als auch der Remmele-Score (bcl-2-IRS) mehrere Kategorien aufweist, konnte eine Aufteilung in sechs Kombinationsmöglichkeiten pN0/bcl-2-IRS 0, pN0/bcl-2-IRS 1-3, pN0/bcl-2-IRS 4-12, pN1/bcl-2-IRS 0, pN1/bcl-2-IRS 1-3, pN1/bcl-2-IRS 4-12 erfolgen und diese in einer Kaplan-Meier-Kurve graphisch dargestellt werden (Tabelle 30, Abbildung 17).

**Tab. 30:** Überleben in Beziehung zum Lymphknotenstatus unter Berücksichtigung des bcl-2-IRS in drei Gruppen (0, 1-3, 4-12) (global:  $p < 0,0001$ ; pN0:  $p = 0,4573$ , pN1:  $p = 0,0011$ )

<b>pN bcl-2-IRS</b>	<b>0 0</b>	<b>0 1-3</b>	<b>0 4-12</b>	<b>1 0</b>	<b>1 1-3</b>	<b>1 4-12</b>
<b>Anzahl der Patienten</b>	13	15	18	21	15	11
<b>verstorbene Patienten</b>	5	7	5	18	10	5
<b>mittl. Überleben (Jahre)</b>	8,0	8,7	9,7	3,5	7,5	8,2
<b>5-Jahres-ÜLW (%)</b>	61,5	80,0	88,9	23,8	66,7	72,7
<b>10-Jahres-ÜLW (%)</b>	61,5	58,7	77,8	14,3	33,3	52,0

In Abbildung 17 erkennt man einen Trend für eine geminderte Überlebensrate bei Patientinnen mit Tumoren, die eine negative bcl-2 Expression aufweisen. Wobei der positive Lymphknotenstatus (N1,  $p = 0,0011$ ) diesen Trend stärker veranschaulicht als bei den negativen Lymphknotenstatusbefunden (N0,  $p = 0,4573$ ). Deshalb ist das Ergebnis nur in den Gruppen der positive Lymphknotenstatusbefunde statistisch signifikant ( $p = 0,0002$ ).

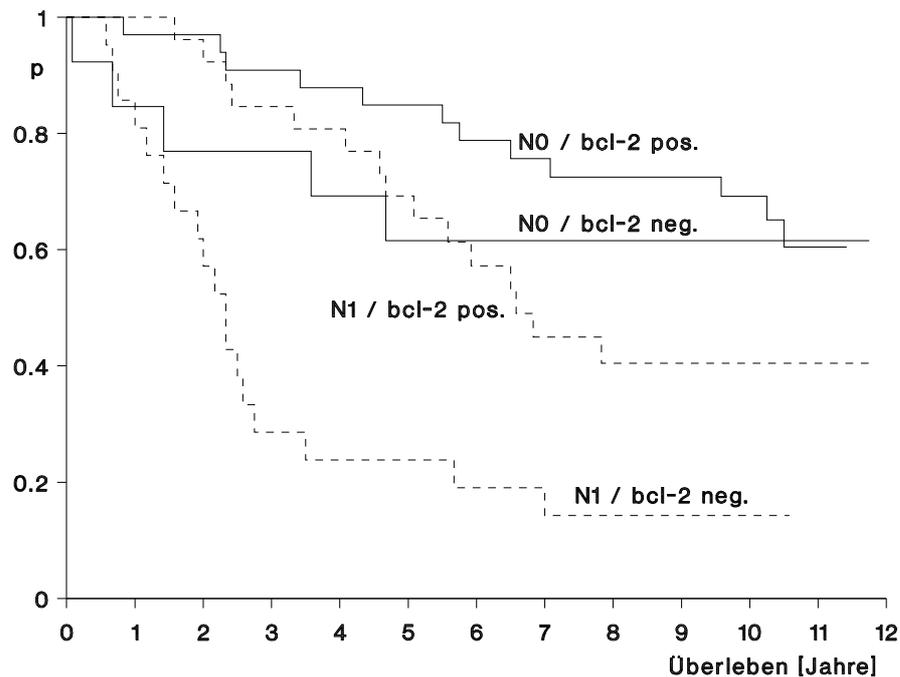
Ein weitgehend gleichartiges Bild ergibt sich auch, wenn zur Vereinfachung pN und bcl-2 (neg./pos.) in vier statt sechs Gruppen gegenübergestellt werden; hier lassen sich vier Gruppen (pN0/bcl-2 neg., pN0/bcl-2 pos., pN1/bcl-2 neg., pN1/bcl-2 pos.) statistisch hoch signifikant unterscheiden (Tabelle 31, Abbildung 18). Dass der Effekt in der N1-Gruppe stärker und signifikant ausfällt, ist auch bei dieser Darstellung unverändert der Fall (global:  $p < 0,0001$ ; pN0:  $p = 0,3897$ ; pN1:  $p = 0,0002$ ).



**Abb. 17:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur kombinierten Darstellung des Lymphknotenstatus und des bcl-2-IRS. pN0: durchgezogen, pN1: gestrichelt.

**Tab. 31:** Überleben in Beziehung zum Lymphknotenstatus unter Berücksichtigung der bcl-2-Expression (neg./pos.) (global:  $p < 0,0001$ ; pN0:  $p = 0,3897$ , pN1:  $p = 0,0002$ )

pN bcl-2	0 neg.	0 pos.	1 neg.	1 pos.
<b>Anzahl der Patienten</b>	13	33	21	26
<b>verstorbene Patienten</b>	5	12	18	15
<b>mittl. Überleben (Jahre)</b>	8,0	9,3	3,5	7,6
<b>5-Jahres-ÜLW (%)</b>	61,5	84,9	23,8	69,2
<b>10-Jahres-ÜLW (%)</b>	61,5	69,2	14,3	40,5



**Abb. 18:** Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur kombinierten Darstellung des Lymphknotenstatus und der bcl-2-Expression (neg./pos.)

Zusammenfassend lässt sich somit am konkreten Datensatz die Modellannahme einer ergänzenden prognostischen Signifikanz von Lymphknotenstatus und bcl-2-Expression verifizieren.

Die Aufnahme des Gratings mit seinen drei Ausprägungen (G1, G2, G3) würde bei der Erstellung der Gruppen, wie zuvor mit dem Lymphknotenstatus in seinen Ausprägungen (pN1, pN2) und dem immunreaktive Score des bcl-2 in seinen Ausprägungen (bcl-2-IRS 0, bcl-2-IRS 1-3, bcl-2-IRS 4-12) zu einer 18teiligen Gruppierung führen, die keine statisch sinnvolle Auswertung mehr zuließe. Erfahrungsgemäß ergeben sich aber durch die Hinzunahme einer dritten Größe keine wesentlichen Veränderungen mehr.

### 3.4 Korrelationen bcl-2-bezogener Parameter untereinander und mit klinisch-morphologischen Parametern

Schließlich sollen die bcl-2-bezogenen Größen untereinander, als auch zu den anderen prognostischen Faktoren auf ihre Korrelation hin ausgewertet werden.

#### 3.4.1 Korrelation zwischen bcl-2-PP und bcl-2-SI

Um einen Zusammenhang zwischen bcl-2-PP und bcl-2-SI zu untersuchen, wurden verschiedene Dimensionen in Mehr-Felder-Tafeln beider Parameter untersucht. Bei der Auswertung nach dem Person Chi<sup>2</sup>-Test wurde stets eine statistische Signifikanz nachgewiesen. Dies veranschaulicht die Tabelle 32 für bcl-2-PP und deren Ausprägungen 1 und 2, sowie 3 und 4 bzw. für bcl-2-SI und deren Ausprägungen 2 und 3, die somit in einer Gruppe zusammenfassbar sind ( $p < 0,0001$ ).

Da sich das Analog zum Remmele-Score (bcl-2-IRS) aus den Variablen bzw. Parametern bcl-2-PP und bcl-2-SI ableitet, wurde keine Korrelationen zwischen dem bcl-2-IRS und seinen Grundgrößen vorgenommen.

Tab. 32: Beziehung zwischen dem Prozentsatz positiver Zellen (bcl-2-PP) und der Färbeintensität (bcl-2-SI);  $p < 0,0001$

<b>bcl-2-SI bcl-2-PP</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2 und 3</b>	<b>total</b>
<b>0</b>	34	0	0	34
<b>1 und 2</b>	0	16	9	25
<b>3 und 4</b>	0	16	18	34
<b>Total</b>	34	32	27	93

### 3.4.2 Korrelation zwischen bcl-2-Parametern und klinisch-morphologischen Parametern

Die vorangegangenen statistischen Auswertungen zeigten eine enge Korrelation zwischen den Parametern bcl-2-PP und bcl-2-SI, sodass eine weitere Untersuchung nur noch demonstrativ für die Korrelationen zwischen bcl-2-PP mit den klinisch-morphologischen Parametern dargestellt wurde. Die Ergebnisse für bcl-2-SI zeigten ein annähernd analoges Ergebnis.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen bcl-2-PP und dem TNM-Stadium (Tabelle 33,  $p = 0,0839$ ) bzw. pT ( $p = 0,0710$ ), pN ( $p = 0,2243$ ) oder M ( $p = 0,4580$ ) lag nicht vor, ebenso verhielt es sich mit dem Grading (Tabelle 34,  $p = 0,3341$ ).

Tab.33: Beziehung zwischen bcl-2-PP und dem TNM-Stadium ( $p = 0,0839$ )

pTNM bcl-2-PP	1	2	3	4	total
0	3	19	9	2	33
1 und 2	1	23	1	0	25
3 und 4	5	23	4	2	34
total	9	65	14	4	92

Tab. 34: Beziehung zwischen bcl-2-PP und dem Grading ( $p = 0,3341$ )

Grading bcl-2-PP	1	2	3	total
0	4	17	13	34
1 und 2	4	9	12	25
3 und 4	7	19	8	34
total	15	45	33	93

Mit dem Östrogenrezeptorstatus bestand keine erkennbare Korrelation (Tabelle 35,  $p = 0,0832$ ), mit dem Progesteronrezeptorstatus war die bcl-2-Expression signifikant in dem Sinne korreliert (Tab. 36,  $p = 0,0005$ ), dass eine bcl-2-Positivität häufiger mit einer PR-Positivität verbunden war.

Tab. 35: Beziehung zwischen bcl-2-PP und dem ER-Status ( $p = 0,0832$ )

<b>ER-Status bcl-2-PP</b>	<b>negativ</b>	<b>positiv</b>	<b>total</b>
<b>0</b>	13	21	34
<b>1 und 2</b>	6	19	25
<b>3 und 4</b>	5	29	34
<b>total</b>	24	69	93

Tab. 36: Beziehung zwischen bcl-2-PP und dem PR-Status ( $p = 0,0005$ )

<b>PR-Status bcl-2-PP</b>	<b>negativ</b>	<b>positiv</b>	<b>total</b>
<b>0</b>	24	10	34
<b>1 und 2</b>	12	13	25
<b>3 und 4</b>	8	26	34
<b>total</b>	44	49	93

## 4 Diskussion

Die Immunhistochemie ist ein wichtiger tragender Pfeiler in der Diagnostik und Prognostik maligner Tumoren geworden. Auch wenn ihr heute die Molekularpathologie zur Seite steht und in manchen Bereichen eine höhere Bedeutung gewonnen hat, ändert das nichts an ihrem hohen Stellenwert. Denn während die Immunhistochemie in situ angewandt wird, also zu im Gewebe zuordbaren Färbesignalen umgesetzt wird, sind molekularpathologische PCR-basierte Verfahren im Grunde Laboranwendungen, die nicht morphologisch sind. Die molekularpathologischen Verfahren wiederum, die ebenfalls auf das Gewebe rückführen wie die verschiedenen Methoden der in situ-Hybridisierung (FISH, SISH, CISH), sind teuer und letztendlich sehr aufwendig. Insofern ist anzunehmen, dass auch in Zukunft der Immunhistochemie eine wesentliche Rolle in der Beantwortung onkologischer Fragen im Fach Pathologie zukommen wird, und sei es nur als ein wichtiger Filter im Vorfeld weiterführender Untersuchungsmethoden.

Die Zahl der Antikörper, die in medizinischen Fragestellungen eingesetzt werden, nimmt immer weiter zu. Dennoch sind auch Marker vorhanden, die seit vielen Jahren in der Diagnostik und Prognostik verschiedener onkologischer Fragestellungen konstant Verwendung finden. Hierzu gehört auch das bcl-2, das Gegenstand der hier vorgestellten Studie ist.

### 4.1 bcl-2 als wichtiger Marker in der Routinediagnostik maligner Non-Hodgkin-Lymphome

Der im Grunde einzig wichtige Einsatzbereich von bcl-2 in der Routinediagnostik liegt in der Diagnostik maligner Non-Hodgkin-Lymphome.

Hier wird es zum einen als wichtiger Marker zu Klärung der Frage eingesetzt, ob ein auffälliger follikulärer Umbau eines Lymphknotens neoplastischer Natur im Sinne eines follikulären B-Zell-Lymphoms oder reaktiver Natur ist, also in

den Formenkreis der (B-Zell-) folliculären Hyperplasien fällt. Stellen sich folliculäre Strukturen als bcl-2 positiv heraus, so ist dieses Ergebnis ein durchaus harter Marker für Malignität. Bei bcl-2-Negativität spricht der Ausfall der Färbung in erster Linie für eine reaktive Genese, wobei aber selten auch folliculäre Lymphome bcl-2-negativ sein können (Kaur, 2020), insbesondere diejenigen mit Vorherrschen von Blasten (Grad 3) (Nasr et al., 2019). Plakativ ausgedrückt, spiegelt die Präsenz von bcl-2 in folliculären Strukturen die Immortalisierung der Zellen wider, was wiederum die Annahme eines neoplastischen Charakters unterstützt. Allerdings darf man sich bcl-2 in diesem Zusammenhang nicht als alleinig Malignität beweisenden Marker vorstellen, sondern nur als einen wesentlichen Mosaikstein, der zur Diagnostik folliculärer B-Zell-Lymphome beiträgt. Andere wesentliche Marker, die üblicherweise von dieser Lymphomart exprimiert werden, sind neben klassischen allgemeinen B-Zell-Markern insbesondere CD10 und bcl-6 (Kaur, 2020; Nasr et al., 2019).

Eine zweite Anwendung liegt in der Teilhabe von bcl-2 in der Subtypisierung auch anderer maligner Non-Hodgkin-Lymphome (Nasr et al., 2019; Olteanu et al., 2012). Hierzu werden je nach morphologischem Ersteindruck verschiedene Markerkombinationen eingesetzt, die helfen sollen, die wichtigsten Lymphome wie das diffus-großzellige Lymphom, das folliculäre Lymphom, das Mantelzell-Lymphom, das Marginalzonen- bzw. MALT-Lymphom und die CLL voneinander abzugrenzen. Andere Marker, die hier eine Rolle spielen, sind neben CD3, CD20, CD79a und Pax-5 als den klassischen T- und B-Zellmarkern auch bcl-6, CD5, CD10, CD23, Cyclin D1 oder Ki-67, ferner bei bestimmten Fragestellungen MUM-1, Lambda und Kappa. Dabei gibt es keinen allgemein anerkannten diagnostischen Algorithmus, sondern eher hausinterne bzw. auf den Erfahrungen der einzelnen Befunder basierende Vorgehensweisen. Auf diese soll hier nicht näher eingegangen werden, sondern nur darauf verwiesen werden, dass die Lymphomdiagnostik insgesamt komplex und oft schwierig ist, viel Erfahrung und Spezialwissen benötigt und nicht wenige Fälle erst referenzpathologisch nach Weiterversand an ein spezialisiertes Zentrum, z.B. das Lymphknotenregister in Würzburg, verbindlich typisiert werden können.

Ohne den Kapiteln 4.2 und 4.3 vorgreifen zu wollen, die sich mit der bcl-2-gestützten Tumorprognostik (allerdings an Karzinomen) befassen, soll hier kurz erwähnt werden, dass eine aktuelle Publikation einen prognostischen Wert für bcl-2 bei einer ganz anderen Lymphomgruppe, nämlich den Hodgkin-Lymphomen, beschreibt (Travaglino et al., 2021): In einer Meta-Analyse über die Jahre 2000-2020, die 18 geeignete Studien umfasste, wurde ermittelt, dass eine Überexpression von bcl-2 in Hodgkin-Zellen bzw. Sternberg-Reed-Zellen mit einem kürzeren Progressions-freien Überleben (Hazard Ratio (HR): 2,202) signifikant korreliert war ( $p < 00001$ ). Obwohl der HR-Wert für das allgemeine Überleben ebenfalls deutlich erhöht war (HR: 1,565), war dieses Ergebnis nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Ähnliches gilt auch für die seltene Gruppe der primären kutanen diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome, für die aktuell eine Meta-Analyse aus der gleichen Arbeitsgruppe über acht Studien mit 148 Patienten vorliegt (Russo et al., 2022). Hier ergab sich ebenfalls für bcl-2-positive Fälle ein deutlich schlechteres Überleben gegenüber den negativen (HR: 4.615,  $p = 0,001$ ).

## **4.2 bcl-2 als Prognosemarker bei Mammakarzinomen**

Die Möglichkeiten, die bcl-2 für die Prognostik von Mammakarzinomen bietet, wurde mit Stand 2008 in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst (Callagy et al., 2008). Diese umfasst die Ergebnisse von 18 Studien mit in verschiedenen Teilaspekten 5821 Patientinnen mit einem durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von 92 Monaten. Eine kurze Darstellung der Daten wird dadurch ein wenig erschwert, dass die Autoren heterogene Studien vorfanden und diese nach verschiedenen biometrischen Verfahren auswerten mussten. Dabei wurden die Daten der einzelnen Studien so verarbeitet, dass nur zwischen negativ (keine bcl-2-Expression) und positiv (bcl-2-Expression jeglicher Art) unterschieden wurde. So entstanden zwölf Schätzer für den HR, die aber letztendlich doch zu relativ homogenen Ergebnissen führten. Für das allgemeine Überleben (bis zu 3910 Fälle) ergaben sich HR-Werte von 1,37-1,64 (95%-Konfidenz-

intervalle: 1,19-2,0;  $p < 0,001$ ), für das rezidivfreie Überleben (bis zu 2285 Fälle) von 1,58-1,66 (1,25-2,22;  $p < 0,001$ ), so dass eine bcl-2-Expression in Mammakarzinomen ein stark positiver Prognostikator angesehen wurde. Ferner wurde angegeben, dass die bcl-2-Expression im Mittel aller Studien sich in der multivariaten Analyse als unabhängig von der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus und dem Grading erwiesen habe, so dass einer bcl-2-Expression bei Mammakarzinomen auch eine multivariate Bedeutung zukäme.

Unsere eigenen Ergebnisse an einer seinerzeit bereits in Bearbeitung befindlichen Langzeitstudie an Mammakarzinomen mit multiplen immunhistochemischen Biomarkern belegt erneut die prognostische Relevanz der bcl-2-Immunhistochemie, wobei sich diese in der Tat nicht nur auf univariat erstellte Überlebenskurven bezieht, sondern auch auf die multivariate Cox-Analyse. Dass hier der Lymphknotenstatus, die bcl-2-Expression und das Grading aufgenommen werden, belegt die Unabhängigkeit dieser Parameter voneinander - es ist ja gerade das Prinzip bzw. die „Aufgabe“ des Cox-Modells, Parameter herauszuarbeiten, die sich ergänzende und eben nicht zueinander redundante Informationen bereitstellen. Wesentlich ist dabei, dass sich anders in reinen Modellen die Resultate des Cox-Modells im Rahmen einer Validierung auch in sich unterscheidenden Überlebenskurven abbilden und statistisch bestätigen ließen. Dabei muss natürlich der Stellenwert eines Prognoseparameters, der hinzukommen soll, im Kontext mit denjenigen gesehen werden, die bereits etabliert sind. Für bcl-2 gilt dabei in Bezug auf unsere Gesamtstudie, dass nicht nur Korrelationen zu Größen wie T, N, TNM oder Grading berücksichtigt werden müssen, sondern auch zu den immunhistochemisch bestimmten Expressionen des Östrogen- und des Progesteronrezeptors (ER, PR), von Ki-67 und von Her-2/neu. Entsprechende Werte gibt es aus anderen Einzelprojekten, die hier zur Vermeidung einer wissenschaftlichen Zweitverwertung aber nicht näher besprochen werden können. Kurz gesagt bestand insbesondere eine hohe Korrelation zwischen der bcl-2-Expression und der immunhistochemischen ER- und PR-Expression.

Während sich der Review und unsere eigenen Untersuchungen auf Mammakarzinome „im allgemeinen“ bezogen, wurde seitdem auch versucht, für bestimmte Untergruppen gezielt Ergebnisse zu generieren und daraus in einem zweiten Schritt ggfls. therapeutische Optionen zu entwickeln. In mehreren Arbeiten wurde dabei herausgearbeitet, dass bcl-2 in den prognostisch schlechten Triple-negativen Mammakarzinomen signifikant seltener exprimiert wird als beispielsweise in Fällen der Gruppe Luminal A (de Ruijter et al., 2011; Escórcio-Dourado et al., 2017; Hwang et al., 2021; Kallel-Bayoudh et al., 2011; Tawfik et al., 2012).

Außerdem gibt es Evidenz dafür (Bacinski et al., 2020), dass innerhalb der Gruppe der Triple-negativen Mammakarzinome Patientinnen bei Gabe einer Anthrazyklin-haltigen Chemotherapie (ob mit oder ohne gleichzeitige Taxan-Gabe) bei niedriger bcl-2-Expression im Überleben besser abschneiden als bei hoher bcl-2-Expression (Bouchalova et al., 2015; Choi et al., 2014), anders also als Patientinnen mit Mammakarzinomen „im Ganzen“. Deswegen wurde eine bcl-2-Expression bei Triple-negativen Fällen als wesentlicher negativer prognostischer Faktor benannt (Ozretic et al., 2018). Innerhalb der Gruppe von Fällen mit bcl-2-negativen und Triple-negativen Mammakarzinomen war andererseits eine Anthrazyklin-haltige Chemotherapie mit besseren Überlebensdaten verknüpft als eine CMF-basierte Chemotherapie; noch schlechter schnitten Patientinnen ganz ohne chemotherapeutische Behandlung ab (Abdel-Fatah et al., 2013).

### **4.3 bcl-2 als Prognosemarker bei anderen häufigen Karzinomen**

Natürlich ist bcl-2 nicht nur in der Prognostik von Mammakarzinomen erprobt worden, sondern auch bei anderen malignen Tumorerkrankungen. Im Folgenden soll der aktuelle Stand von Anwendungen von bcl-2 bei den neben dem Mammakarzinom (Neuerkrankungsrate 2018: 70620) in Deutschland vier häufigsten Tumorentitäten kurz skizziert werden. Den Zahlen des Robert-Koch-Institutes folgend sind dieses Prostatakarzinome (65200), kolorektale Karzino-

me (60630), Lungenkarzinome (57220) und die Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches einschließlich des Ösophagus (25170) (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2018).

### Prostatakarzinom

Beim Prostatakarzinom liegt eine Review-artige Publikation zu Biomarkern vor, die allerdings recht allgemein gehalten ist und nur wenige Arbeiten zu bcl-2 aufgenommen hat (L. Zhao et al., 2014). Bezogen auf zwei Arbeiten wird in ihr ein Überlebensvorteil bzgl. des krankheitsfreien Intervalls für bcl-2-Negativität gesehen (HR: 3,86 [95%-Konfidenzintervall: 2,14-6,96]). Die eine der beiden Studien umfasste dabei 77 Patienten, die kurativ strahlentherapeutisch behandelt worden waren und deren allerdings nur 12 Patienten (15,6%) mit bcl-2-Expression im Tumorgewebe schlechter abschnitten (Pollack et al., 2003). Eine andere Arbeit an 201 ebenfalls strahlentherapeutisch behandelten Fällen bestätigt dieses Ergebnis; auch hier erlitten die 143 Patienten mit bcl-2-positiven Tumoren (71,1%) häufiger Tumorrezidive (Vergis et al., 2010). Interessanterweise war der Verlauf innerhalb der bcl-2-positiven Gruppe wiederum besser bei höherer Strahlendosis (74 Gy gegenüber 64 Gy); für die bcl-2-negativen Fälle bestand dieser Effekt hingegen nicht. Diese klinischen Ergebnisse passen gut in den Kontext auch von experimentellen Arbeiten am Prostatakarzinom über einen Zusammenhang zwischen bcl-2-Expression und Strahlenresistenz, für die bcl-2 als einer der anerkannten Treiber gilt (King et al., 2022).

Ähnliche Resultate ergaben sich in einer größeren Studie für inzidentell aufgefundene Prostatakarzinome (Concato et al., 2009), die alters- und stadiengerecht variabel operativ, strahlentherapeutisch oder hormonell therapiert bzw. beobachtet wurden (*Watchful Waiting*): Für 1007 Fälle stellten sich für bcl-2-Positivität in den Tumorstanzen signifikant geringere Überlebensdaten dar (HR: 1,61 [1,01-2,57]). Verlassen worden ist offenbar das Konzept, anhand der bcl-2-Expression im Tumorgewebe nach Prostatektomien auf die Wahrscheinlichkeit eines biochemischen Rezidivs rückzuschließen, nachdem sich hier widersprüchliche Ergebnisse gezeigt hatten (Nariculam et al., 2009).

## Kolorektales Karzinom

Für das kolorektale Karzinom liegt eine größere Meta-Analyse vor, in die 40 Arbeiten mit 7658 Patienten aufgenommen werden konnten (Huang et al., 2017). Zusammenfassend zeigten die Arbeiten einen deutlichen Überlebensvorteil für Patienten, deren Tumoren eine hohe bcl-2-Expression aufwiesen; der HR-Wert lag bei 0,69 (0,55-0,87) für das allgemeine Überleben und für das krankheitsfreie bzw. rezidivfreie Überleben bei 0,65 (0,50-0,85). Eine vorangegangene Therapie hatte offenbar keinen Einfluss auf die Bedeutung einer erhöhten bcl2-Expression; sie war sowohl prognostisch günstig bei vorbehandelten Patienten (n = 2056, HR: 0,77 [0,55-0,95]), als auch bei nicht vorbehandelten Patienten (n = 2615, HR: 0,70 [0,50-0,96]). Insgesamt gelten die klinischen Ergebnisse aber wohl nur für europäische bzw. amerikanische Patienten (n = 6143, HR: 0,69 [0,55-0,86]). Bei asiatischen Patienten hingegen traten recht uneinheitliche Ergebnisse auf (n = 777, HR: 1,02 [0,49-2,13]); der gepoolte HR von 1,02 zeigt in dieser Patientengruppe keinen ableitbaren prognostischen Effekt, das hohe 95%-Konfidenzintervall belegt die Heterogenität der Studienergebnisse.

Methodisch interessant war, dass sich die Resultate von großen Studien ( $\geq 100$  Patienten) von denen kleiner Studien ( $< 100$  Patienten) nur um 0,01 Punkte (!) im HR unterschieden, was unterstreicht, dass auch kleinere Studien durchaus einen Sinn haben, sofern sie sauber konzipiert und ausgewertet werden. Auch der Wert auf der *Newcastle-Ottawa quality assessment scale* (NOS), mit dem die Studiengüte eingeschätzt wurde, hatte keinen Einfluss auf den gepoolten HR-Wert beim Vergleich zweier Gruppen. Bei einem NOS von  $\geq 7$  im Vergleich zu  $< 7$  unterschied sich der HR ebenfalls nur minimal, nämlich um 0,03.

## Lungenkarzinom

Bei Lungenkarzinomen waren insgesamt 50 Arbeiten für eine Berücksichtigung in einer Meta-Analyse (J. Zhang et al., 2015) geeignet. Sie umfassten Untersuchungen an 6863 Patienten. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten nicht einheitlich waren, ließ sich zum einen

ein allgemein positiver Effekt einer bcl-2-Expression auf das Überleben zeigen (HR: 0,79 [95%-Konfidenzintervall 0,72-0,87]). Zum anderen unterteilten die Autoren die Studien in verschiedene Subgruppen und versuchten, gepoolte Aussagen für bestimmte Gruppen herauszuarbeiten: Bezogen auf die Tumorausdehnung war der Effekt von bcl-2 insbesondere stark, wenn auch die Tumorstadien I-III berücksichtigt waren (n = 4390, HR: 0,77 [0,67-0,89]), wohingegen allein im Stadium I kein sicherer Einfluss nachzuweisen war (n = 1432, HR: 0,93 [0,80-1,07]). Studien von Fällen, die nur Adenokarzinome (n = 511) enthielten, zeigten keinen prognostischen Effekt (HR: 0,92 [0,56-1,51]), wohingegen bei kleinzelligen Karzinomen (n = 397, HR: 0,54 [0,32-0,90]) ein klarer positiver Effekt einer stärkeren bcl-2-Expression auf das Überleben erkennbar war. Rein aus Plattenepithelkarzinomen bestehende Patientenkollektive waren offenbar bis dahin noch nicht untersucht. Eine neuere Arbeit speziell an 72 Fällen von Plattenepithelkarzinomen (Feng et al., 2018) zeigte auch für diese Tumorentität deutliche Überlebensunterschiede zugunsten der Patienten mit hoher bcl-2-Expression, die sich auch im multivariaten Cox-Modell als relevant herausstellten. Ein anderer Review aus dem Jahr zuvor (X.-D. Zhao et al., 2014) über 8522 Fälle zeigte ebenfalls Überlebensvorteile bei hoher bcl-2-Expression, dabei aber nicht nur für das allgemeine Überleben (HR 0,76 [0,68-0,85]), sondern auch für das rezidivfreie Überleben (HR: 0,85 [0,75-0,95]). Allerdings müssen derartige Erkenntnisse auch im Zusammenhang mit adjuvanten Therapien gesehen werden. So wurde beispielsweise in einer späteren Arbeit dargestellt, dass eine hohe bcl-2-Expression mit geringerem Response gegenüber einer Cisplatin-basierten Chemotherapie assoziiert sein kann (Lin et al., 2016) ähnlich also wie die oben skizzierten Effekte einer bcl-2-Expression beim Prostatakarzinom auf die Strahlentherapie.

### Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches und des Ösophagus

Bei den hier behandelten Tumoren handelt es sich in aller Regel, abgesehen von den Karzinomen des ösophago-gastralen Überganges, um Plattenepithelkarzinome. Daher sollen im Folgenden auch nur Tumoren dieser Entität berücksichtigt werden.

Eine Arbeit aus dem Jahr 2015 fasste 14 Studien von 1150 Patienten zusammen, die an Gewebe von Larynxkarzinomen erarbeitet worden waren (Gioacchini et al., 2015). Die Ergebnisse erwiesen sich als so heterogen, dass die Autoren auf die Bestimmung zusammenfassender statistischer Angaben verzichteten: Manche Arbeiten hatten einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer bcl-2-Expression und Überlebensparametern gezeigt, andere nicht. Die Autoren des Reviews führten dieses auf unterschiedlich zusammengesetzte Patientenkollektive, verschiedene Grenzwerte in der Zuordnung der Expression von bcl-2 als „niedrig“ oder „hoch“ und unterschiedliche therapeutische Ansätze zurück. Was allerdings erneut zutage trat, war ein in mehreren Arbeiten zu erkennender Trend, dass eine hohe bcl-2-Expression auch hier mit einem verminderen Ansprechen auf eine Strahlentherapie einherging. Entsprechend wurden in diesen Arbeiten bereits Vorschläge gemacht, durch eine therapeutische Inhibition von bcl-2 ein besseres Ansprechen auf eine Strahlentherapie oder Chemotherapie zu erhalten (dos Santos & Carvalho, 2011; Lo Russo & Lo Muzio, 2009; Louw & Claassen, 2008). Hierauf wird in Kapitel 4.4 noch eingegangen.

Für orale Karzinome ist die Datenlage bzgl. prognostischer Aussagen dünn. Hier liegen vorwiegend Arbeiten vor, die sich mit dem immunhistochemischen Nachzeichnen der Tumorprogression befassen, aber keine prognostischen Aussagen ableiten lassen (Pavithra et al., 2017). Ein prognostischer univariater Effekt von bcl-2 wurde in einer Arbeit an 110 Mundhöhlenkarzinomen gesehen, in der ein Quotient aus der bcl-2- und der Bax-Expression gebildet wurde; die nur grenzwertige statistische Signifikanz ( $p=0,0466$ ) weist hier aber auf einen nur schwachen Einfluss (M. Zhang et al., 2009).

Dass in Ösophaguskarzinomen die bcl-2-Expression keine Rolle spielt, weder für die Prognose, noch für ein eventuelles Ansprechen auf zielgerichtete adjuvante Therapeutika, wurde schon vor einigen Jahren, u.a. früh auch in Arbeiten aus dem hiesigen Institut für Pathologie, dargestellt und verschiedentlich bestätigt (Boone et al., 2009; Koide et al., 1997; Sarbia et al., 1996; Stockeld et al., 2009; Takikita et al., 2009), wobei insbesondere auch die in manchen Studien nur seltene bcl-2-Expression im Tumor einen Einsatz als Biomarker nicht aussichtsreich erschienen ließ. Proben vor und nach Brachytherapie zeigten keine Unterschiede in der bcl-2-Expression (Sur et al., 2003).

#### **4.4 bcl-2: Perspektivischer Ausblick**

Die Immunhistochemie als eine einfach anzuwendende und jeder Pathologie stets zur Verfügung stehende adjuvante Methode wird auch in Zukunft ein wichtiges Standbein in der morphologischen Diagnostik und Prognostik bleiben, auch wenn manche Marker aus dem Portfolio verschwinden, weil sie überholt oder ihre Bestimmung durch andere Methoden ersetzt ist, und andere hinzukommen. Sieht man sich vor z.B. 15 Jahren typische diagnostische Abläufe an, so ist die Dynamik in der Entwicklung auch der Immunhistochemie evident. Zumindest in vielen Fällen würde man heute sicher anders vorgehen als seinerzeit und andere Markerpanel in möglicherweise auch anderer Reihenfolge einsetzen.

Bei Mammakarzinomen ist aber letztendlich unverändert geblieben, dass die Bestimmung der vier prädiktiven Marker ER, PR, Ki-67 und Her-2/neu Standard ist und diese genau die morphologischen Zusatzgrößen sind, die den Klinikern bei der Vorstellung der Fälle in Konferenzen der Brustzentren den Weg zur therapeutischen Entscheidung weisen. Die Bestimmungen dieser vier Marker erfolgt an den Stanzbiopsien bei jedem neu auftretenden Mammakarzinom, ferner bei Resektaten nach neoadjuvanter Chemotherapie, außerdem in den meisten Fällen auch an synchron oder metachron aufgetretenen Fernmetastasen. Eine Ausnahme stellen synchron nachgewiesene axilläre Lymphknotenmetastasen dar, bei denen üblicherweise keine Immunhistochemie angewandt wird. Ki-67 allein wird ferner neu bestimmt, wenn zwischen der stanzbiopsischen Tumorsicherung und der Resektion des Tumors eine Therapie mit dem Aromatasehemmer Letrozol durchgeführt worden ist, von der man sich eine Senkung der Proliferationsrate verspricht.

Alle Marker, die außerhalb dieser Rationale zum Einsatz kommen sollen, müssen ergänzende Informationen zu den vier etablierten Markern bieten - dies gilt auch für bcl-2. Legt man die in Kapitel 4.2 dargestellten Ergebnisse aus der Literatur und unsere eigenen Daten zugrunde, so ist die prognostische Relevanz

des Markers allgemein anerkannt. Patientinnen mit bcl-2-positiven Mammakarzinomen habe eine deutlich bessere Prognose, zumindest wenn sie wie die große Mehrzahl der Patientinnen einen ER- und PR-positiven Tumor aufweisen. Anders sieht es bei ER- und PR-negativen Tumoren aus, insbesondere bei Triple-negativer Konstellation. Dieser Kontrast weist bereits auf eine wesentliche Limitation der Relevanz von bcl-2 für Routineanwendungen hin, nämlich auf eine hohe Korrelation der Markerexpression mit derjenigen von ER (Kawiak & KostECKa, 2022). Dieser Nachteil kann allerdings gelegentlich auch ein diagnostisch nutzbarer Vorteil sein. Es gibt Fälle, in denen die ER-Immunhistochemie aus nicht erklärbaren Gründen auch bei Wiederholung versagt, erkennbar daran, dass nicht nur das Tumorgewebe keine immunhistochemischen Kernsignale zeigt (was prinzipiell bei ER-Negativität biologisch bedingt sein könnte), sondern auch das benachbart gelegene Epithel von normalen Milchgängen oder Azini nicht. Dann wäre möglich, bcl-2, das ebenfalls in normalem Epithel der Mamma exprimiert wird, als Surrogatmarker einzusetzen und mit der gebotenen Vorsicht eine Positivität als Ersatzaussage für den ER-Status zu nutzen.

Als weiterer Aspekt tritt nun in den letzten Jahren die Frage hinzu, ob man eine bcl-2-Expression auch zur Therapieplanung nutzen kann. Die in Kapitel 4.3 dargestellten Ergebnisse an anderen Karzinomen legen nahe, dass die Effekte einer bcl-2-Expression organspezifisch sind. Mammakarzinome, Lungenkarzinome und kolorektale Karzinome sind bei hoher bzw. überhaupt vorhandener bcl-2-Expression prognostisch günstig, während bei Prostatakarzinomen und Kopf-Hals-Karzinomen der Effekt gegenläufig ist. Dieses wird bei den letzteren beiden Entitäten u.a. als Folge einer geringeren Ansprechbarkeit auf adjuvante Therapien interpretiert, zurückgehend auf die Rolle, die bcl-2 bzw. weitere anti-apoptische Proteine der bcl-2-Familie in der mitochondrialen Apoptose von Zellen spielt. Hieraus wiederum leitet sich die Überlegung ab, über eine medikamentöse Hemmung dieser Proteine das Ansprechen auf adjuvante Therapien zu verbessern. Die Substanzen, die als Medikamente zu Anwendung kommen sollen, sind sogenannte BH3-Mimetika, die bislang aber bei Mammakarzinomen ganz überwiegend in Zell-Linien und in Mausmodellen erprobt worden sind. Der aktuelle Stand ist in einer Übersichtsarbeit detailliert dargestellt worden (Kawiak

und Kostecka, 2022); dort werden 15 unterschiedliche experimentelle Ansätze genannt, von denen neun auch bcl-2 als Target nennen. Bei zwei der 15 Arbeiten handelt es sich bereits um klinische Studien mit dem gegen bcl-2 eingesetzten BH3-Mimetikum ABT-199 (Venetoclax), jeweils durchgeführt bei Patientinnen mit ER-positiven metastasierten Mammakarzinomen. Bei der einen von ihnen handelte es sich um eine Phase Ib-Studie (Lok et al., 2019), bei der anderen um eine Phase II-Studie (Lindeman et al., 2021), deren Ergebnisse aber in einer Übersichtarbeit aus Deutschland, an der Onkologen diverser Frauenkliniken beteiligt waren, als nicht hinreichend für einen therapeutischen Einsatz angesehen wurden (Lüftner et al., 2022). Eine weitere Phase Ib-Studie wurde 2022 angekündigt (Muttiah et al., 2022). Nach aktuellem Stand ist Venetoclax als Medikament innerhalb der EU nur für die Behandlung der CLL und der AML zugelassen (European Medicine Agency 2021). Eine andere Substanz, das BH3-Mimetikum ABT-263 (Navitoclax), befindet sich derzeit in der Erprobung in klinischen Studien zu Lungenkarzinomen und zur primären Myelofibrose, ist aber zu regulären Therapie noch nicht zugelassen. Aktuellere Daten ließen sich nicht ermitteln; die Abstrakte des jährlich abgehaltenen *San Antonio Breast Cancer Symposium 2022*, das vom 6.-10.12.2022 stattfand, liegen noch nicht öffentlich vor (Stand: 9.1.2023).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass auf dem Sektor der zielgerichteten Therapien, die ja nur einen der neueren Ansätze zur Verbesserung von Therapien in der Onkologie und damit auch der senologischen Onkologie repräsentieren, einiges in Bewegung ist, ohne dass zum Stand Januar 2023 bereits ein therapeutischer Durchbruch zu vermelden gewesen wäre. Welche der verschiedenen Entwicklungen sich durchsetzen werden, wird man dann später anhand prospektiver randomisierter klinischer Studien klären müssen.

## 5 Literaturverzeichnis

Abdel-Fatah, T. M. A., Perry, C., Dickinson, P., Ball, G., Moseley, P., Madhusudan, S., Ellis, I. O., & Chan, S. Y. T. (2013). Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 24(11), 2801–2807.

Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*, 281(5381), 1322–1326.

Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., & Borg, Å. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117–1130.

Arpino, G., Weiss, H., Lee, A. V., Schiff, R., De Placido, S., Osborne, C. K., & Elledge, R. M. (2005). Estrogen receptor–positive, progesterone receptor–negative breast cancer: Association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(17), 1254–1261.

Atkinson, E. N., Brown, B. W., & Montague, E. D. (1986). Tumor Volume, Nodal Status, and Metastasis in Breast Cancer in Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 76(2), 171–178.

Bacinschi, X. E., Zgura, A., Safta, I., & Anghel, R. (2020). Biomolecular Factors Represented by Bcl-2, p53, and Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predict Response for Adjuvant Anthracycline Chemotherapy in Patients with Early Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Management and Research*, 12, 11965–11971.

Biesterfeld, S. (1997). Methodische Aspekte bei der standardisierten Beurteilung der mitotischen Aktivität von Tumorgewebe. *Der Pathologe*, 18(6), 439–444.

Bloom, H. J. G., & Richardson, W. W. (1957). Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. *British Journal of Cancer*, 11(3), 359–377.

Boone, J., van Hillegersberg, R., Offerhaus, G. J. A., van Diest, P. J., Borel Rinkes, I. H. M., & Ten Kate, F. J. W. (2009). Targets for molecular therapy in esophageal squamous cell carcinoma: An immunohistochemical analysis. *Diseases of the Esophagus: Official Journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*, 22(6), 496–504.

- Bouchalova, K., Svoboda, M., Kharraishvili, G., Vrbkova, J., Bouchal, J., Trojanec, R., Koudelakova, V., Radova, L., Cwierka, K., Hajduch, M., & Kolar, Z. (2015). BCL2 is an independent predictor of outcome in basal-like triple-negative breast cancers treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(6), 4243–4252.
- Brandt, A., Lorenzo Bermejo, J., Sundquist, J., & Hemminki, K. (2010). Breast cancer risk in women who fulfill high-risk criteria: At what age should surveillance start? *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(1), 133–141.
- Buell, P. (1973). Changing Incidence of Breast Cancer in Japanese-American Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1479–1483.
- Callagy, G. M., Webber, M. J., Pharoah, P. D. P., & Caldas, C. (2008). Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer*, 8,
- Campeau, P. M., Foulkes, W. D., & Tischkowitz, M. D. (2008). Hereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues. *Human Genetics*, 124(1), 31–42.
- Carter, C. L., Allen, C., & Henson, D. E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 63(1), 181–187.
- Champion, H. R., & Wallace, I. W. J. (1971). Breast Cancer Grading. *British Journal of Cancer*, 25(3), 441–448.
- Chlebowski, R. T., Kuller, L. H., Prentice, R. L., Stefanick, M. L., Manson, J. E., Gass, M., Aragaki, A. K., Ockene, J. K., Lane, D. S., & Sarto, G. E. (2009). Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine*, 360(6), 573–587.
- Choi, J. E., Kang, S. H., Lee, S. J., & Bae, Y. K. (2014). Prognostic significance of Bcl-2 expression in non-basal triple-negative breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(12), 12255–12263.
- Coates, A. S., Winer, E. P., Goldhirsch, A., Gelber, R. D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.-J., André, F., Baselga, J., Bergh, J., Bonnefoi, H., Burstein, H., Cardoso, F., Castiglione-Gertsch, M., Coates, A. S., Colleoni, M., Curigliano, G., Davidson, N. E., Xu, B. (2015). Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of Oncology*, 26(8), 1533–1546.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1996). Breast

cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *The Lancet*, 347(9017), 1713–1727.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology*, 13(11), 1141–1151.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, Goldbohm, R. A., & van den Brandt, P. (2019). Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet (London, England)*, 394(10204), 1159–1168.

Concato, J., Jain, D., Uchio, E., Risch, H., Li, W. W., & Wells, C. K. (2009). Molecular markers and death from prostate cancer. *Annals of Internal Medicine*, 150(9), 595–603.

Cox, D., 1972. Regression models and life-tables JR Statist Soc B 34: 187–220.

de Ruijter, T. C., Veeck, J., de Hoon, J. P. J., van Engeland, M., & Tjan-Heijnen, V. C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(2), 183–192.

Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Gesellschaft für Senologie e.V., & Zertifizierungskommission Brustkrebszentren. (2020). *Jahresbericht der zertifizierten Brustkrebszentren*. Deutsche Krebsgesellschaft (DKG). Version e-A1-de; Stand 20.07.2020. Online unter [https://www.onkozert.de/wordpress/wp-content/uploads/2020/07/qualitaetsindikatoren\\_brustkrebs\\_2020-A1\\_200720.pdf?v=76614339](https://www.onkozert.de/wordpress/wp-content/uploads/2020/07/qualitaetsindikatoren_brustkrebs_2020-A1_200720.pdf?v=76614339), abgerufen am 1.2.2023

dos Santos, L. V., & Carvalho, A. L. (2011). Bcl-2 targeted-therapy for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 6(1), 45–57.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *The Lancet*, 366(9503), 2087–2106.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *The Lancet*, 378(9804), 1707–1716.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2012). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet*, 379(9814), 432–444.

Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, *19*(5), 403–410.

Escórcio-Dourado, C. S., Martins, L. M., Simplício-Revoredo, C. M., Sampaio, F. A., Tavares, C. B., da Silva-Sampaio, J. P., Borges, U. S., Alves-Ribeiro, F. A., Lopes-Costa, P. V., Lima-Dourado, J. C., & da Silva, B. B. (2017). Bcl-2 antigen expression in luminal A and triple-negative breast cancer. *Medical Oncology Northwood, London, England*, *34*(9), 161.

Etzrodt, A., Jung, H., Schweissfurth, C., Tolxdorff, T., & Lamberti, G. (1983). Die Beziehung der Steroid-Hormon-Rezeptoren zum axillären Lymphknotenbefall beim Mammakarzinom. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, *43*(12), 726–731.

Feng, C., Wu, J., Yang, F., Qiu, M., Hu, S., Guo, S., Wu, J., Ying, X., & Wang, J. (2018). Expression of Bcl-2 is a favorable prognostic biomarker in lung squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, *15*(5), 6925–6930.

Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., Jeong, J.-H., & Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, *347*(16), 1233–1241.

Fisher, B., Dignam, J., Tan-Chiu, E., Anderson, S., Fisher, E. R., Wittliff, J. L., & Wolmark, N. (2001). Prognosis and Treatment of Patients With Breast Tumors of One Centimeter or Less and Negative Axillary Lymph Nodes. *Journal of the National Cancer Institute*, *93*(2), 112–120.

Gioacchini, F. M., Alicandri-Ciufelli, M., Rubini, C., Magliulo, G., & Re, M. (2015). Prognostic value of Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the larynx: A systematic review. *The International Journal of Biological Markers*, *30*(2), e155-160.

Giuliano, A. E., McCall, L., Beitsch, P., Whitworth, P. W., Blumencranz, P., Leitch, A. M., Saha, S., Hunt, K. K., Morrow, M., & Ballman, K. (2010). Locoregional Recurrence After Sentinel Lymph Node Dissection With or Without Axillary Dissection in Patients With Sentinel Lymph Node Metastases: The American College of Surgeons Oncology Group Z0011 Randomized Trial. *Transactions of the Meeting of the American Surgical Association*, *128*, 12–21.

Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., Senn, H.-J., & Panel members. (2011). Strategies for subtypes—Dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*, *22*, 1736-1747

Goldhirsch, A., Wood, W. C., Gelber, R. D., Coates, A. S., Thurlimann, B., Senn, H.-J., & Panel Members. (2007). Progress and promise: Highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Annals of Oncology*, *18*(7), 1133–1144.

Haag, P., Hanhart, N., & Müller, M. (2003). *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. Medizinische Verlags- und Informationsdienste.

Haviland, J. S., Owen, J. R., Dewar, J. A., Agrawal, R. K., Barrett, J., Barrett-Lee, P. J., Dobbs, H. J., Hopwood, P., Lawton, P. A., Magee, B. J., Mills, J., Simmons, S., Sydenham, M. A., Venables, K., Bliss, J. M., & Yarnold, J. R. (2013). The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. *The Lancet Oncology*, *14*(11), 1086–1094.

Hetz, C., & Glimcher, L. (2008). The daily job of night killers: Alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends in Cell Biology*, *18*(1), 38–44.

Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., & Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, *348*(6299), Art. 6299.

Horwitz, K. B., & McGuire, W. L. (1975). Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids*, *25*(4), 497–505.

Houssami, N., Ciatto, S., Macaskill, P., Lord, S. J., Warren, R. M., Dixon, J. M., & Irwig, L. (2008). Accuracy and Surgical Impact of Magnetic Resonance Imaging in Breast Cancer Staging: Systematic Review and Meta-Analysis in Detection of Multifocal and Multicentric Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(19), 3248–3258.

Houssami, N., Macaskill, P., Marinovich, M. L., Dixon, J. M., Irwig, L., Brennan, M. E., & Solin, L. J. (2010). Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *European Journal of Cancer*, *46*(18), 3219–3232.

Hsu, Y.-T., Wolter, K. G., & Youle, R. J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(8), 3668–3672.

Huang, Q., Li, S., Cheng, P., Deng, M., He, X., Wang, Z., Yang, C.-H., Zhao, X.-Y., & Huang, J. (2017). High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: Result of a meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, *23*(27), 5018–5033.

Hwang, K.-T., Kim, Y. A., Kim, J., Oh, H. J., Park, J. H., Choi, I. S., Park, J. H., Oh, S., Chu, A., Lee, J. Y., & Hwang, K. R. (2021). Prognostic influences of BCL1 and BCL2 expression on disease-free survival in breast cancer. *Scientific*

*Reports*, 11(1), 11942.

Jong, D. de, Prins, F. A., Mason, D. Y., Reed, J. C., Ommen, G. B. van, & Kluin, P. M. (1994). Subcellular Localization of the bcl-2 Protein in Malignant and Normal Lymphoid Cells. *Cancer Research*, 54(1), 256–260.

Kallel-Bayouhd, I., Hassen, H. B., Khabir, A., Boujelbene, N., Daoud, J., Frikha, M., Sallemi-Boudawara, T., Aifa, S., & Rebaï, A. (2011). Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 28 Suppl 1, S55-61.

Kaplan, E.L., Meier, P., 1958. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53, 457–481.

Katalinic, A., Lemmer, A., Zawinell, A., Rawal, R., & Waldmann, A. (2009). Trends in Hormone Therapy and Breast Cancer Incidence -Results from the German Network of Cancer Registries. *Pathobiology*, 76(2), 90–97.

Kaufmann, M., Hortobagyi, G. N., Goldhirsch, A., Scholl, S., Makris, A., Valagussa, P., Blohmer, J.-U., Eiermann, W., Jackesz, R., Jonat, W., Lebeau, A., Loibl, S., Miller, W., Seeber, S., Semiglazov, V., Smith, R., Souchon, R., Stearns, V., Untch, M., & Minckwitz, G. von. (2006). Recommendations From an International Expert Panel on the Use of Neoadjuvant (Primary) Systemic Treatment of Operable Breast Cancer: An Update. *Journal of Clinical Oncology*, 24(12), 1940–1949.

Kaur, P. (2020). Follicular Lymphoma: Definition, Epidemiology, Pathobiology – Lymphomagenesis, Morphology, Variants, Immunophenotype, Prognostic Factors, Transformation. In P. Kaur (Hrsg.), *Follicular Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma: Pathobiology, Diagnosis and Treatment* (S. 1–47). Springer International Publishing.

Kawiak, A., & Kostecka, A. (2022). Regulation of Bcl-2 Family Proteins in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Their Implications in Endocrine Therapy. *Cancers*, 14(2), 279.

Kelsey, J. L. (1979). A review of the epidemiology of human breast cancer. *Epidemiologic reviews*, 1, 74–109.

King, L., Bernaitis, N., Christie, D., Chess-Williams, R., Sellers, D., McDermott, C., Dare, W., & Anoopkumar-Dukie, S. (2022). Drivers of Radioresistance in Prostate Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 11(19), 5637.

Koide, N., Koike, S., Adachi, W., Amano, J., Usuda, N., & Nagata, T. (1997). Immunohistochemical expression of bcl-2 protein in squamous cell carcinoma and basaloid carcinoma of the esophagus. *Surgery Today*, 27(8), 685–691.

Korsmeyer, S. J., Yin, X.-M., Oltvai, Z. N., Veis-Novack, D. J., & Linette, G. P. (1995). Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2

gene family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1271(1), 63–66.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., & Reed, J. C. (1993). Investigation of the Subcellular Distribution of the bcl-2 Oncoprotein: Residence in the Nuclear Envelope, Endoplasmic Reticulum, and Outer Mitochondrial Membranes. *Cancer Research*, 53(19), 4701–4714.

Lakhani, S. R. (2012). *WHO classification of tumours of the breast*. International Agency for Research on Cancer.

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

Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF. (2021). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.4, Juni 2021, AWMF-Registernummer: 032-045OL*.

Online unter

[https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom\\_4\\_0/Version\\_4.4/LL\\_Mammakarzinom\\_Langversion\\_4.4.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.4.pdf), abgerufen am 1.2.2023

Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V., & Deutsche Krebshilfe e.V. (Hrsg.). (2012). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms: Langversion 3.0, Aktualisierung 2012, AWMF-Registernummer: 032-045OL*. Zuckschwerdt.

Lin, T.-C., Tsai, L.-H., Chou, M.-C., Chen, C.-Y., & Lee, H. (2016). Association of cytoplasmic p27 expression with an unfavorable response to cisplatin-based chemotherapy and poor outcomes in non-small cell lung cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(3), 4017–4023.

Lindeman, G. J., Bowen, R., Jerzak, K. J., Song, X., Decker, T., Boyle, F. M., McCune, S. L., Armstrong, A., Shannon, C. M., Bertelli, G., Fernando, T. M., Desai, R., Gupta, K., Hsu, J. Y., Flechais, A., & Bardia, A. (2021). Results from VERONICA: A randomized, phase II study of second-/third-line venetoclax (VEN) + fulvestrant (F) versus F alone in estrogen receptor (ER)-positive, HER2-negative, locally advanced, or metastatic breast cancer (LA/MBC). *Journal of Clinical Oncology*, 39(15\_suppl), 1004–1004.

Lo Russo, L., & Lo Muzio, L. (2009). Combination chemotherapy for head and neck cancer: The addition of Bcl-2 inhibitors. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, 10(12), 1325–1333.

Lok, S. W., Whittle, J. R., Vaillant, F., Teh, C. E., Lo, L. L., Policheni, A. N., Bergin, A. R. T., Desai, J., Ftouni, S., Gandolfo, L. C., Liew, D., Liu, H. K., Mann, G. B., Moodie, K., Murugasu, A., Pal, B., Roberts, A. W., Rosenthal, M. A., Shack-

leton, K., ... Lindeman, G. J. (2019). A Phase Ib Dose-Escalation and Expansion Study of the BCL2 Inhibitor Venetoclax Combined with Tamoxifen in ER and BCL2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancer Discovery*, 9(3), 354–369.

Louw, L., & Claassen, J. (2008). Rationale for adjuvant fatty acid therapy to prevent radiotherapy failure and tumor recurrence during early laryngeal squamous cell carcinoma. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 78(1), 21–26.

Lüftner, D., Schütz, F., Stickeler, E., Fasching, P. A., Janni, W., Kolberg-Liedtke, C., Kolberg, H.-C., Thomssen, C., Müller, V., Fehm, T. N., Belleville, E., Bader, S., Untch, M., Welslau, M., Thill, M., Tesch, H., Ditsch, N., Lux, M. P., Wöckel, A., ... Hartkopf, A. D. (2022). Update Breast Cancer 2021 Part 5—Advanced Breast Cancer. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, 82(2), 215–225.

Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U., & MM Basso, S. (2013). Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Current medicinal chemistry*, 20(5), 596–604.

Marty, M., Cognetti, F., Maraninchi, D., Snyder, R., Mauriac, L., Tubiana-Hulin, M., Chan, S., Grimes, D., Antón, A., & Lluch, A. (2005). Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: The M77001 study group. *Journal of Clinical Oncology*, 23(19), 4265–4274.

McPherson, K., Steel, C. M., & Dixon, J. M. (2000). Breast cancer—Epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ: British Medical Journal*, 321(7261), 624–628.

Metcalf, K., Lubinski, J., Lynch, H. T., Ghadirian, P., Foulkes, W. D., Kim-Sing, C., Neuhausen, S., Tung, N., Rosen, B., & Gronwald, J. (2010). Family history of cancer and cancer risks in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(24), 1874–1878.

Miller, E., Lee, H. J., Lulla, A., Hernandez, L., Gokare, P., & Lim, B. (2014). Current treatment of early breast cancer: Adjuvant and neoadjuvant therapy. *F1000Research*, 3, 198

Minckwitz, G. von, Untch, M., Blohmer, J.-U., Costa, S. D., Eidtmann, H., Fasching, P. A., Gerber, B., Eiermann, W., Hilfrich, J., Huober, J., Jackisch, C., Kaufmann, M., Konecny, G. E., Denkert, C., Nekljudova, V., Mehta, K., & Loibl, S. (2012). Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 30(15), 1796–1804.

Muttiah, C., Whittle, J. R., Oakman, C., & Lindeman, G. J. (2022). PALVEN: Phase Ib trial of palbociclib, letrozole and venetoclax in estrogen receptor- and BCL2-positive advanced breast cancer. *Future Oncology (London, England)*,

18(15), 1805–1816.

Nariculam, J., Freeman, A., Bott, S., Munson, P., Cable, N., Brookman-Amissah, N., Williamson, M., Kirby, R. S., Masters, J., & Feneley, M. (2009). Utility of tissue microarrays for profiling prognostic biomarkers in clinically localized prostate cancer: The expression of BCL-2, E-cadherin, Ki-67 and p53 as predictors of biochemical failure after radical prostatectomy with nested control for clinical and pathological risk factors. *Asian Journal of Andrology*, 11(1), 109–118.

Nasr, M. R., Perry, A. M., & Skrabek, P. (2019). *Lymph Node Pathology for Clinicians*. Springer International Publishing.

Olteanu, H., MD, A. H., & MD, S. H. K. (2012). *Lymph Nodes*. Demos Medical Publishing.

Osborne, C. K. (1998). Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 339(22), 1609–1618.

Ozretic, P., Alvir, I., Sarcevic, B., Vujaskovic, Z., Rendic-Miocevic, Z., Roguljic, A., & Beketic-Oreskovic, L. (2018). Apoptosis regulator Bcl-2 is an independent prognostic marker for worse overall survival in triple-negative breast cancer patients. *The International Journal of Biological Markers*, 33(1), 109–115.

Pavithra, V., Kumari, K., Haragannavar, V. C., Rao, R. S., Nambiar, S., Augustine, D., & Sowmya, S. V. (2017). Possible Role of Bcl-2 Expression in Metastatic and Non Metastatic Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(9), ZC51–ZC54.

Petrelli, F., & Barni, S. (2012). Meta-analysis of concomitant compared to sequential adjuvant trastuzumab in breast cancer: The sooner the better. *Medical Oncology*, 29(2), 503–510.

Pollack, A., Cowen, D., Troncso, P., Zagars, G. K., von Eschenbach, A. C., Meistrich, M. L., & McDonnell, T. (2003). Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma: Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x. *Cancer*, 97(7), 1630–1638.

Puthalakath, H., Huang, D. C. S., O'Reilly, L. A., King, S. M., & Strasser, A. (1999). The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Molecular Cell*, 3(3), 287–296.

Remmele, W. (Hrsg.). (1997). *Pathologie 4: Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe* (Bd. 4). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenre-

zeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe*, 8(3), 138–140.

Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2021). *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. Online unter [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/krebs\\_in\\_deutschland\\_2021.pdf;jsessionid=C7A366B26C5AEA8734C453219E825776.internet051?\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf;jsessionid=C7A366B26C5AEA8734C453219E825776.internet051?_blob=publicationFile), abgerufen am 1.2.2023

Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). (2010). *Krebs in Deutschland 2005/2006* (7. Aufl.). Online unter [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/vergangene\\_ausgaben/downloads/krebs\\_in\\_deutschland\\_7.pdf?\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/vergangene_ausgaben/downloads/krebs_in_deutschland_7.pdf?_blob=publicationFile), abgerufen am 1.2.2023

Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012* (10. Aufl.). Online unter [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2015/krebs\\_in\\_deutschland\\_2015.pdf?\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?_blob=publicationFile), abgerufen am 1.2.2023

Robert-Koch-Institut. (2020). *Gesundheitliche Lage der Frauen in Deutschland 2020*. Online unter [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/Gesundheitliche\\_Lage\\_der\\_Frauen\\_2020.pdf?\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/Gesundheitliche_Lage_der_Frauen_2020.pdf?_blob=publicationFile), abgerufen am 1.2.2023

Roodi, N., Bailey, L. R., Kao, W.-Y., Verrier, C. S., Yee, C. J., Dupont, W. D., & Parl, F. F. (1995). Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(6), 446–451.

Rosen, P. P., Groshen, S., Saigo, P. E., Kinne, D. W., & Hellman, S. (1989). Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: A study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *Journal of Clinical Oncology*, 7(9), 1239–1251.

Russo, D., Travaglino, A., Varricchio, S., Pace, M., Cretella, P., Baldo, A., Severino, A., Picardi, M., & Mascolo, M. (2022). Prognostic value of Bcl2 and Bcl6 in primary cutaneous large B-cell lymphoma: A systematic review and meta-analysis. *Pathology, Research and Practice*, 232, 153812.

Sarbia, M., Bittinger, F., Porschen, R., Verreet, P., Dutkowski, P., Willers, R., &

- Gabbert, H. E. (1996). Bcl-2 expression and prognosis in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *International Journal of Cancer*, 69(4), 324–328.
- Schlappack, O. K., Braun, O., & Maier, U. (1985). Report of two cases of male breast cancer after prolonged estrogen treatment for prostatic carcinoma. *Cancer detection and prevention*, 9(3–4), 319–322.
- Silverstein, M. J., Lagios, M. D., Craig, P. H., Waisman, J. R., Lewinsky, B. S., Colburn, W. J., & Poller, D. N. (1996). A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 77(11), 2267–2274.
- Sinn, H., Schmid, H., Junkermann, H., Huober, J., Leppien, G., Kaufmann, M., Bastert, G., & Otto, H. (1994). Histologische Regression des Mammakarzinoms nach primärer (neoadjuvanter) Chemotherapie. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 54(10), 552–558.
- Smith, I. E., Dowsett, M., Ebbs, S. R., Dixon, J. M., Skene, A., Blohmer, J.-U., Ashley, S. E., Francis, S., Boeddinghaus, I., & Walsh, G. (2005). Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: The Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *Journal of clinical oncology*, 23(22), 5108–5116.
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2010). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons (9. Auflage).
- Soerjomataram, I., Louwman, M. W. J., Ribot, J. G., Roukema, J. A., & Coebergh, J. W. W. (2008). An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 107(3), 309–330.
- Sørensen, H. T., Friis, S., Olsen, J. H., Thulstrup, A. M., Mellekjær, L., Linet, M., Trichopoulos, D., Vilstrup, H., & Olsen, J. (1998). Risk of breast cancer in men with liver cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*, 93(2), 231–233.
- Stockeld, D., Falkmer, U., Falkmer, S., Backman, L., Granström, L., & Fagerberg, J. (2009). Response to chemoradiotherapy in squamous cell carcinoma of the esophagus: Evaluation of some prognostic factors. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 2, 41–47.
- Sur, M., Sur, R. K., Cooper, K., & Bizos, D. (2003). Preliminary report on the effect of brachytherapy on expression of p53, bc1-2 and apoptosis in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *South African Journal of Surgery. Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Chirurgie*, 41(1), 14–20.
- Takikita, M., Hu, N., Shou, J.-Z., Wang, Q.-H., Giffen, C., Taylor, P. R., & Hewitt, S. M. (2009). Biomarkers of apoptosis and survival in esophageal

squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 9, 310.

Tavassoli, F. A., & Devilee, P. (2003). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press.

Tawfik, K., Kimler, B. F., Davis, M. K., Fan, F., & Tawfik, O. (2012). Prognostic significance of Bcl-2 in invasive mammary carcinomas: A comparative clinicopathologic study between „triple-negative“ and non-„triple-negative“ tumors. *Human Pathology*, 43(1), 23–30.

Travaglino, A., Russo, D., Varricchio, S., Picardi, M., & Mascolo, M. (2021). Prognostic value of Bcl2 and p53 in Hodgkin lymphoma: A systematic review and meta-analysis. *Pathology, Research and Practice*, 219, 153370.

Tsujimoto, & Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Letters*, 466(1), 6–10.

Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226(4678), 1097–1099.

Tumorregister München. (2021). *Mammakarzinom Frauen. Inzidenz und Mortalitaet*. Online unter [https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC50f\\_G-ICD-10-C50-Mammakarzinom-Frauen-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf](https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC50f_G-ICD-10-C50-Mammakarzinom-Frauen-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf), abgerufen am 1.2.2023

Tumorzentrum München (Hrsg.). (2015). *Manual Mammakarzinome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (15. Aufl.). W. Zuckerschwerdt Verlag München.

Union Internationale Contre le Cancer (UICC). (1997). *TNM-Klassifikation maligner Tumoren* (C. Wittekind & G. Wagner, Hrsg.; 5. Aufl.). Springer-Verlag.

Untch, M., Jackisch, C., Thomssen, C., Nitz, U., von Minckwitz, G., & Kaufmann, M. (2006). MEDIZIN-Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. *Deutsches Ärzteblatt-Ärztliche Mitteilungen-Ausgabe A*, 103(50), 3406–3410.

Vergis, R., Corbishley, C. M., Thomas, K., Horwich, A., Huddart, R., Khoo, V., Eeles, R., Sydes, M. R., Cooper, C. S., Dearnaley, D., & Parker, C. (2010). Expression of Bcl-2, p53, and MDM2 in localized prostate cancer with respect to the outcome of radical radiotherapy dose escalation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 78(1), 35–41.

Veronesi, U., Cascinelli, N., Mariani, L., Greco, M., Saccozzi, R., Luini, A., Aguilar, M., & Marubini, E. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 347(16), 1227–1232.

Veronesi, U., Galimberti, V., Zurrada, S., Merson, M., Greco, M., & Luini, A. (1993). Prognostic significance of number and level of axillary node metastases in breast cancer. *The Breast*, 2(4), 224–228.

Veronesi, U., Paganelli, G., Viale, G., Luini, A., Zurrada, S., Galimberti, V., Intra, M., Veronesi, P., Robertson, C., Maisonneuve, P., & others. (2003). A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 349(6), 546–553.

Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death & Disease*, 10(3), Art. 3.

Whelan, T. J., Pignol, J.-P., Levine, M. N., Julian, J. A., MacKenzie, R., Parpia, S., Shelley, W., Grimard, L., Bowen, J., Lukka, H., Perera, F., Fyles, A., Schneider, K., Gulavita, S., & Freeman, C. (2010). Long-Term Results of Hypofractionated Radiation Therapy for Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine; Boston*, 362(6), 513–520.

Wörmann, B., Aebi, S., Greil, R., Balic, M., Overkamp, F., Rick, O., Samonigg, H., Possinger, K., Decker, T., Fehm, T., Harbeck, N., Krug, B., Wenz, F., & Lüftner, D. (2018). *Mammakarzinom der Frau* (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Hrsg.). Online unter <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.html>, abgerufen am 1.2.2023

Zhang, J., Wang, S., Wang, L., Wang, R., Chen, S., Pan, B., Sun, Y., & Chen, H. (2015). Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: A meta-analysis and systemic review. *OncoTargets and Therapy*, 8, 3361–3369.

Zhang, M., Zhang, P., Zhang, C., Sun, J., Wang, L., Li, J., Tian, Z., & Chen, W. (2009). Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 38(3), 307–313.

Zhao, L., Yu, N., Guo, T., Hou, Y., Zeng, Z., Yang, X., Hu, P., Tang, X., Wang, J., & Liu, M. (2014). Tissue biomarkers for prognosis of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 23(6), 1047–1054.

Zhao, X.-D., He, Y.-Y., Gao, J., Zhao, C., Zhang, L.-L., Tian, J.-Y., & Chen, H.-L. (2014). High expression of Bcl-2 protein predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer: Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15(20), 8861–8869.

Zhou, Z.-R., Mei, X., Chen, X.-X., Yang, Z.-Z., Hou, J., Zhang, L., Yu, X.-L., & Guo, X.-M. (2015). Systematic review and meta-analysis comparing hypofractionated with conventional fraction radiotherapy in treatment of early breast

cancer. *Surgical Oncology*, 24(3), 200–211.

Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G. W., Penn, L. Z., Leber, B., & Andrews, D. W. (1996). Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *The EMBO Journal*, 15(16), 4130–4141.

## **Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung und Vorbereitung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Einen besonderen Dank kommt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld zu, der mir nicht nur dieses interessante Thema überließ, sondern auch stets Verständnis für Fragestellungen jeglicher Art zeigte. Diese Leidenschaft zu unterstützen und zu ermutigen, trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenso danke ich meiner Familie, die mich in der gesamten Zeit meines Studiums und Promotion so herzlich unterstützte. Ihr wart bei allen Höhen und Tiefen dabei.

Den liebevollsten Dank möchte ich meiner Frau Christin zukommen lassen. Auf ihre Unterstützung und Rückhalt konnte ich immer vertrauen. Mit Ihr erscheinen nicht nur die weitesten Wege machbar, sondern sie ist die Einzige, mit der ich diese Wege gehen will.