

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Prognostische Relevanz des Ploidie-Status beim
Mammakarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jonas Naber aus Eckernförde

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 04.07.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Kindler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Das Mammakarzinom	6
1.2 Durchfluss-Zytometrie	8
1.2.1 Die Durchflusszytometrie beim Mammakarzinom	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Gewebekollektiv	10
2.2 Reagenzien	12
2.3 Materialien	13
2.4 Lösungen	13
2.5 Durchflusszytometrie	13
2.5.1 Zellvereinzellung aus FFPE-Gewebestanzen	13
2.5.2 Zellfärbung	14
2.5.3 FACS-Analyse	14
2.6 Interpretation der FACS-Daten	14
2.7 Statistik	16
3 Ergebnisse	18
3.1 Ploidie-Status der Karzinomproben	18
3.2 Assoziation des Ploidie-Status mit den pathologischen und histologischen Parametern des Mammakarzinoms	18
3.3 Assoziation des Tumorgrads und Tumorstadium mit dem Gesamtüberleben... ..	21
3.4 Assoziation des Ploidie-Status mit dem Gesamtüberleben der Patienten.....	22
4 Diskussion	23
5 Zusammenfassung	27
6 Abstract	28
7 Anhang	29
8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	33
8.1 Tabellenverzeichnis	33
8.2 Abbildungsverzeichnis	33
9 Literaturverzeichnis	34
Danksagung	45
Lebenslauf	46
Eidesstattliche Erklärung	47

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	kleiner
>	größer
≈	ungefähr
≤	kleiner/gleich
≥	größer/gleich
BRE	Bloom-Richardson-Elston
bzw.	beziehungsweise
CD4	CD4-Rezeptor (cluster of differentiation 4)
CD8	CD8-Rezeptor (cluster of differentiation 8)
DCIS	duktales Carcinoma in situ
diff	differenziert
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Dr.	Doktor
ER	Estrogenrezeptoren (Östrogenrezeptoren)
et al.	et alii/aliae (und andere)
FACS	fluorescence activated cell sorting (Fluoreszenz-Durchflusszytometrie)
FISH	Floureszenz-in-situ-Hybridisierung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H/E	Hämatoxylin-Eosin (Färbung)
HCL	Salzsäure
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Inc	Incorporated
Ki67	Antigen KI-67 (Ki - Kiel)
LI	Labelling Index (Kennzeichnungsindex)
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Milli-Mol
Mo	Monate
n	Anzahl

N	Lymphknoten
nm	Nanometer
NST	no special type
p	pathologische Klassifikation
P	p-Wert; probability (Wahrscheinlichkeit; Signifikanzwert)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PD	Privatdozent
pH	potentia hydrogenii (pH-Wert)
PR	Progesteronrezeptor
PT-Link	Gerät: Autostainer Link 48
r	Rezidiv
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RTU	ready to use
T	Tumor
TMA	Tissue-microarray
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USA	United States of America
y	Zustand nach Therapie
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit 2,1 Millionen weltweit neu diagnostizierten Fällen pro Jahr die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau. Jährlich versterben 627.000 Menschen an dieser Erkrankung. Damit macht das Mammakarzinom 15% der karzinombedingten Todesfälle in der weiblichen Bevölkerung weltweit aus [1]. Allerdings hat die Anzahl der kurativ behandelbaren Mammakarzinome in den letzten Jahren stark zugenommen, so dass die Wahrscheinlichkeit an einem Mammakarzinom zu versterben sinkt [2]. Grund dafür sind: Zum einen die Verbesserungen der frühdiagnostischen Verfahren. Dies hat dazu geführt, dass die meisten Karzinome bereits in sehr frühen Stadien gefunden werden und daher sehr gut therapiert werden können. Zum anderen hat es in den letzten Jahren Fortschritte in der Therapie des Karzinoms gegeben, so dass heute Tumoren kurativ therapiert werden können, bei denen dies vor mehreren Jahren noch nicht möglich gewesen wäre [3].

Die häufigste Therapieform beim Mammakarzinom ist die Resektion des Tumors mit Entnahme der Sentinel-Lymphknoten bzw. Axilla-Dissektion. Da die meisten Karzinome heute in sehr frühen Stadien diagnostiziert werden, ist die Resektion des Tumors in den meisten Fällen brusterhaltend möglich [4]. Zusätzlich zur Resektion werden häufig neoadjuvante oder adjuvante Therapien durchgeführt, welche unter anderem basierend auf der histologischen Beurteilung des Primärtumors und der Lymphknoten ausgewählt werden [5]. Die neoadjuvante Therapie soll in der Regel ein präoperatives „Schmelzen“ des Tumors erzielen, um eine brusterhaltende Resektion durchführen zu können. Die adjuvante Therapie hat das Ziel, die Prognose der Patienten zu verbessern und ein erneutes Auftreten der Erkrankung zu verhindern. In beiden Fällen kann eine Radiotherapie oder eine systemische (medikamentöse) Behandlung zur Anwendung kommen. Zu den systemischen Behandlungsformen zählen Chemotherapeutika, Hormontherapien bei Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor-positiven Karzinomen und zielgerichtete monoklonale Antikörper. Eines der bekanntesten Beispiele ist hier sicherlich die Herceptin Behandlung bei HER2-amplifizierten Tumoren zur Blockade des HER2-Rezeptors [6]. Sollte eine kurative Behandlung nicht mehr möglich sein, werden einige dieser Therapieformen außerdem zur palliativen Behandlung der Patienten eingesetzt [7].

Obwohl sich die Prognose des Mammakarzinoms in den letzten Jahren stetig verbessert hat, bleibt zu bedenken, dass mit den meisten kurativen Therapieformen erhebliche Nebenwirkungen einhergehen. Neben der psychischen Belastung durch die Erkrankung und die Gefahr eines vollständigen Verlustes der Brust können vor allem die systemischen Therapien starke Nebenwirkungen hervorrufen. Dazu zählen zum Beispiel Übelkeit, Erbrechen, starke Schmerzen und Haarausfall [8]. Daraus wird deutlich, welche

extreme Belastung die Therapie für die erkrankte Frau bedeuten kann. Umso wichtiger ist es, die Therapie so individuell wie möglich an das zu erwartende biologische Verhalten des Karzinoms anzupassen. Dadurch kann sichergestellt werden, dass die Aggressivität des Karzinoms die Aggressivität der Behandlung rechtfertigt.

Bei der Diagnose eines Mammakarzinoms erfolgt die Einschätzung des klinischen Verlaufs der Erkrankung zunächst anhand von pathologischen Parametern, wie dem Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus und dem Differenzierungsgrad [9]. Der Differenzierungsgrad gibt an, wie stark sich die Morphologie des malignen Gewebes von der Morphologie gesunden Mammagewebes unterscheidet. Die Bestimmung erfolgt mittels der Graduierung nach Bloom-Richardson-Elston (BRE). Berücksichtigt wird zum Beispiel die Anzahl von Mitosen, das Ausmaß von Zellkernatypen sowie der Anteil von drüsig-tubulären und soliden Karzinombereichen [9]. Des Weiteren erfolgt eine Klassifizierung der Karzinome nach ihrem histologischen Typ. Studien haben gezeigt, dass die histologischen Typen der Mammakarzinome bereits einen Hinweis auf die Prognose geben. So ist die Prognose für Patienten mit einem tubulären oder adenoidzystischen Tumor generell günstig [9]. Bei Tumoren von keinem speziellen Typ (NST) hängt die Prognose stark vom Tumorgrad ab. Allerdings ist nicht vollständig auszuschließen, dass ein Grad 1 NST Karzinom im Verlauf der Erkrankung plötzlich diffus metastasiert. Grund dafür ist, dass ein Tumor der histologisch bland aussieht, nicht zwingend auch biologisch bland sein muss. Es ist deswegen denkbar, dass die Untersuchung von molekularen Markern die klassischen Prognose-Parameter auf dem Weg zur „individuellen“ Prognose und damit Therapie unterstützen kann.

Einige molekulare Marker werden bereits in der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms verwendet. Dazu zählen zum Beispiel der Östrogen- und Progesteronrezeptor sowie der Wachstumsrezeptor HER2 [7]. Des Weiteren sind molekulare Multiparametertests kommerziell erhältlich, welche bei der Prognoseeinschätzung für den einzelnen Patienten unterstützen sollen. Diese Testsysteme, wie zum Beispiel Onkotyp DX® [10] und MammaPrint® [11], basieren auf der Analyse der Expression unterschiedlicher Gene auf RNA-Ebene. Das generelle Problem ist dabei, dass mit isolierter RNA gearbeitet wird und damit nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben der Tumor-RNA auch RNA aus den normalen Zellen in die Probe gelangt [12]. Zusätzlich dazu ist die Konzentration der RNA von vielen zellulären Parametern abhängig. So kann es zum Beispiel posttranskriptional zum Abbau von RNA-Molekülen kommen [13]. Darüber hinaus sind diese Mehrparameter-Tests ausgesprochen teuer (über 3000 Euro). Insgesamt wäre es sehr wünschenswert, kostengünstigere, einfacher durchführbare, reproduzierbarere und aussagekräftigere Testsysteme zur Verfügung zu haben. Die Messung des DNA-Gehaltes bzw. des Ploidie-Status mittels Durchflusszytometrie würde viele dieser Kriterien erfüllen.

1.2 Durchfluss-Zytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein automatisiertes Messverfahren zur Analyse von Größe und Inhalt einzelner Zellen. Die zuvor aufbereiteten und vereinzelt Zellen fließen hierzu nacheinander durch eine sogenannte Flusszelle, in der sie mit einem Laser angestrahlt werden. Das dabei entstehende Streulicht wird gemessen und lässt Rückschlüsse über die Beschaffenheit der Zelle zu. Die hohe Durchflussgeschwindigkeit ermöglicht eine Analyse sehr vieler Zellen in kurzer Zeit. Eine weit verbreitete Analysemethode zur spezifischen Messung des Zellinhaltes ist die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, kurz FACS (fluorescence activated cell sorting). Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Substanzen verwendet, welche zum Beispiel mit der DNA oder RNA in der Zelle interkalieren. Über dieses Verfahren kann somit eine Quantifizierung des DNA-Gehaltes der untersuchten Zellen erfolgen. Aufgrund der automatisierten Auswertung handelt es sich bei der Durchflusszytometrie um eine schnelle und kostengünstige Messmethode, die zudem präzise und reproduzierbare Ergebnisse liefert [14].

Die Anwendungsgebiete dieses Verfahrens sind vielfältig und reichen von medizinischer Diagnostik über zytologische Grundlagenforschung bis hin zur Lebensmittelanalytik [15]. So findet es unter anderem in der klinischen Routinediagnostik zur Erstellung von Differentialblutbildern, in der Infektiologie zur Quantifizierung von spezifischen Immunzellen (zum Beispiel CD4 bei HIV-Patienten, CD4/CD8-Quotient) oder in der Immunologie zur Immunophänotypisierung Verwendung [14]. In der Grundlagenforschung ist die Durchflusszytometrie ein etabliertes Verfahren zur einfachen Zellzahlermittlung oder auch zur Bestimmung des Lebendzellanteils einer Gesamtzellpopulation [14].

1.2.1 Die Durchflusszytometrie beim Mammakarzinom

Zahlreiche Studien haben sich bereits mit der Anwendbarkeit der Durchflusszytometrie bzw. der prognostischen Relevanz des DNA-Gehaltes beim Mammakarzinom beschäftigt. Immerhin 88% dieser Studien stammen allerdings aus den Jahren 1980 bis 1999. Nach der Jahrtausendwende sind nur noch wenige Studien zu diesem Thema veröffentlicht worden. Grund dafür könnte sein, dass es mit dem Fortschritt der molekularen Methoden immer mehr möglich wurde, die biologische Relevanz von Veränderungen einzelner Gene zu untersuchen. Die Möglichkeit, andere innovative modernere Forschungsansätze zu verfolgen, dürfte für viele Forscher ein Grund dafür gewesen sein, die an teure Geräte geknüpfte Forschung zur klinischen Relevanz der DNA Zytometrie einzustellen. Dies obwohl nie eine konklusive Studie zur klinischen Relevanz der Ploidie an einem für eine solche Frage nötigen Patientenkollektiv von einigen tausend Patientinnen durchgeführt worden war.

Heute wissen wir, dass der DNA-Gehalt in einer Zelle bzw. die Anzahl an genetischen Veränderungen im Genom der Tumorzelle eine hohe prognostische Bedeutung haben kann. Zwei Studien innerhalb der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf haben zum Beispiel gezeigt, dass die Anzahl der

Deletionen, aber auch das Vorliegen eines nicht diploiden DNA Status beim Prostatakarzinom eine hohe prognostische Relevanz haben [16, 17]. Die bisher publizierten Studien zum Ploidie-Status beim Mammakarzinom sind in Abbildung 4.1 und Tabelle 7.1 dargestellt [18-117]. Beim Mammakarzinom ist trotz zahlreicher Studien bis heute unklar, welchen Einfluss der „reine“ DNA-Gehalt (Ploidie-Status) auf die Tumorprogression und die Prognose des Patienten hat. Die über 100 durchgeführten Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse. So liegt der Anteil an diploiden Tumoren in den Studien zwischen 10,4% [19] und 76,0% [64]. Der Anteil an nicht-diploiden Tumoren bzw. tetraploiden und aneuploiden Karzinomen schwankt dementsprechend zwischen 24,0% [64] und 90% [19]. Der Einfluss des Ploidie-Status auf die Patientenprognose und/oder den Tumorphänotyp wurde in circa der Hälfte aller Studien untersucht. Von diesen Studien konnten 21 einen Zusammenhang zum Tumorphänotyp, wie dem Tumorstadium oder dem Tumorgrad [18, 30, 33, 41, 47, 51, 57, 62, 69, 76, 78, 81, 83-85, 90, 93, 100, 101, 111, 114] und 28 Studien eine Assoziation zur Patientenprognose nachweisen [21, 32, 37, 38, 44, 53, 54, 58, 59, 61, 68, 69, 74, 82-85, 88, 91, 94, 97, 101, 103, 104, 111, 116-118].

Andere Studien fanden allerdings weder eine Assoziation zum Tumorphänotyp (n=20) [20, 23, 24, 37, 39, 49, 61, 63, 64, 67, 75, 77, 86, 87, 94, 97, 103, 112, 113, 117] noch zur Prognose des Patienten (n=31) [20, 21, 28, 35, 36, 41, 44, 51, 53, 55, 63, 66, 68, 75-77, 79, 86, 87, 91, 94, 98, 101, 102, 105, 107, 111-115].

Gründe könnten unter anderem die meist geringe Anzahl der untersuchten Tumoren oder der zu kurze Zeitraum der klinischen Verlaufsbeobachtung sein. Insgesamt ist das prognostische Potential des Ploidie-Status für die Diagnostik des Mammakarzinoms bis heute nicht ganz klar.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Für die Bestimmung des Ploidie-Status wurden 522 Gewebeproben von Patientinnen verwendet, die aufgrund eines Mammakarzinoms in der Zeit von 2007 bis 2008 im Klinikum Osnabrück mit einer Tumorresektion oder Mastektomie behandelt worden sind. Nach der operativen Entfernung wurden die Gewebeproben in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Neben den histologisch-pathologischen Parametern (z.B. BRE Grad, pathologisches Tumorstadium, histologischer Typ) standen außerdem für 292 Patientinnen klinische Verlaufsdaten bezüglich des Gesamtüberlebens zur Verfügung. Der Beobachtungszeitraum betrug im Mittel 68 Monate (Bereich 1 bis 88). Eine detaillierte Darstellung des Patientenkollektivs ist in Tabelle 2.2 zu finden.

Alle Tumoren wurden in einen Tissue-Microarray-Block (TMA) eingebracht. Zu diesem Zweck wurden repräsentative Tumorareale von einem Pathologen ausgewählt. Mit einem selbst hergestellten Arrayer wurden aus den repräsentativen Tumorregionen durch eine Hohlnadel zylindrische Gewebefragmente entfernt und danach in ein vorgefertigtes, 0,6mm messendes Loch eines leeren Paraffinblocks (einem sogenannten Empfängerblock) eingebracht. Frisch angefertigte 4µm Schnitte des TMA-Blocks wurden verwendet für die immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, HER2 und Ki67. Die verwendeten Antikörper, ihre Verdünnungen, die für Epitopdemaskierung verwendeten Temperaturen, Zeiten und pH-Werte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Visualisierung der Reaktion erfolgte mit dem Envision Kit® der Firma Dako (Glostrup, Dänemark). Die Auswertung von HER2, Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor erfolgte nach etablierten Kriterien [119, 120]. Zur Bestimmung des Ki67-Labeling-Index wurden mindestens 200 Tumorzellen manuell ausgezählt.

Abbildung 2.1: TMA-Paraffinblock mit 522 Tumor-Stanzen



Tabelle 2.1: Antikörper zur immunhistochemischen Analyse

Antikörper	Hersteller	Klon/Katalognummer	Vorbereitung	Verdünnung
HER2	DAKO	rabbit / #SK001	Wasserbad, 95°C, 40min	RTU-Antikörper
ER	DAKO	rabbit monoklonal, Klon: EP1 #IR08461	PT-Link, pH9, 98°C, 15min	RTU-Antikörper
PR	DAKO	mouse monoklonal, Klon: PgR636 #IRO6861	PT-Link, pH9, 98°C, 15min	RTU-Antikörper
Ki67	DAKO	mouse monoklonal, Klon: MIB1 #IR62661-2	PT Link, pH9, 98°C, 15min	RTU-Antikörper

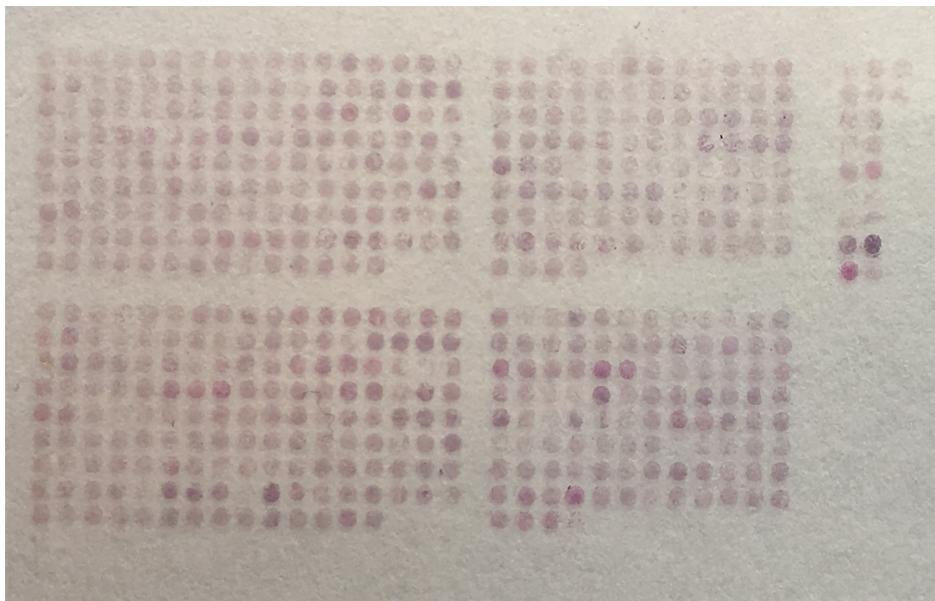
Abbildung 2.4: Auf einen Objektträger aufgetragener, angefärbter TMA-Schnitt

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Patientenkohorte auf dem Gewebemikroarray

	Studienkohorte (n=522)	verstorbene Patienten (n=74)
Verlaufsdaten		
Anzahl (n)	292	74
Median (Mo)	76	41
Mittelwert (Mo)	68	43
Alter		
≤ 49	100 (19,2%)	6 (8,1%)
50 - 70	292 (56,2%)	37 (50,0%)
≥ 71	128 (24,6%)	31 (41,9%)
Histologie		
Basalzell	1 (1,9%)	/
gemischt diff.	5 (1,0%)	/
invasiv-duktral	370 (71,2%)	45 (60,8%)
invasiv-lobulär	75 (14,4%)	16 (21,6%)
medullär	8 (1,5%)	/
muzinös	18 (3,5%)	6 (0,8%)
NST	31 (6,0%)	5 (6,8%)
papillär	2 (0,4%)	/
plattenepi.di	1 (0,2%)	/
tubulär	9 (1,7%)	2 (2,7%)
Grad		
1	78 (15,1%)	9 (12,1%)
2	300 (57,1%)	42 (56,8%)
3	140 (27,0%)	23 (31,1%)
Tumorstadium		
pT1	300 (57,8%)	24 (32,4%)
pT2	166 (32,0%)	34 (45,9%)
pT3	17 (3,3%)	5 (6,7%)
pT4	15 (2,9%)	7 (9,5%)
Nodal-Status		
pN0	342 (67,7%)	37 (52,9%)
pN1	85 (16,8%)	12 (17,1%)
pN2	35 (6,9%)	6 (8,5%)
pN3	30 (5,9%)	13 (18,6%)
Hinweis: Aufgrund von fehlenden Daten ergeben die Zahlen in den einzelnen Kategorien nicht immer 522, Tumoren mit y-, und r-Stadien sind nicht in dieser Tabelle aufgeführt		

2.2 Reagenzien

Tabelle 2.3: verwendete Reagenzien mit Hersteller-Firmen

Reagenzien	Firma mit Standort (Hauptsitz)
RNase A bovine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Propidium iodide solution 1 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natrium Acetat Puffer	VWR, Darmstadt
Tris-HCL Puffer	VWR, Darmstadt
Xylol	J.T. Baker, Center Valley, USA
Ethanol (100%, 96%, 70%)	VWR, Darmstadt
Pepsin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS); auf Eis	Dako Deutschland GmbH, Hamburg / Dako Denmark, Glostrup

2.3 Materialien

Tabelle 2.4: verwendete Materialien mit Hersteller-Firmen

Materialien	Firma mit Standort (Hauptsitz)
Paraffin	Sakura
Gießmaschiene	Shandon, Histocenter 2
Mikrotom	ThermoScientific
Nylon-Säckchen (50µm Netz)	selbst angefertigt
Gewebekassette	Leica Biosystem
Zentrifuge	Heraeus
4,5 ml FACS Tube	BD Falcon

2.4 Lösungen

Tabelle 2.5: verwendete Lösungen

Lösung	Herstellung
Pepsin-Lösung	5mg/ml in 0,07 M HCL Lösung
RNAse	1 mg/ml Stammlösung in 10 mM Natrium Acetat Puffer (pH 5,2) Erhitzen auf 100° Celsius für 15 Minuten Auf Raumtemperatur abkühlen lassen Mittels 1 M Tris-HCL Puffer auf pH 7,4 adjustieren

2.5 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts der Mammakarzinomproben wurde ein standardisiertes und etabliertes Protokoll des Instituts für Pathologie wie folgt verwendet.

2.5.1 Zellvereinzellung aus FFPE-Gewebestanzten

Um sicherzustellen, dass ausreichend Tumorzellen für die Durchflusszytometrie in den Gewebestanzten vorhanden sind, wurde in einem H/E gefärbten Großflächenschnitt der dichteste Tumorbereich ($\approx 70\%$ Tumorzellen) von Pathologen markiert (PD Dr. Eike Burandt und PD Dr. Patrick Lebok). Aus diesem Bereich wurden zwei 0,6 mm durchmessende Gewebestanzten mit einer Hohlnadel entnommen und die Zellen wie folgt vereinzelt:

1. Gewebestanzten in Paraffin einbetten
2. Stanzen mittels Mikrotom schneiden (Dicke: 50µm)
3. Schnitte in Nylongazesäckchen verpacken
4. Nylongazesäckchen in Biopsiekassette verschließen
5. Gewebekassette jeweils 30 Minuten mit folgenden Reagenzien in einem Färbegefäß zur Entparaffinierung inkubieren:
 - Xylol
 - Xylol
 - Ethanol 100%

- Ethanol 96%
 - Ethanol 70%
 - Destilliertes Wasser
 - Destilliertes Wasser
6. Nylon-Säckchen in 5ml Pepsin-Lösung bei 37° Celsius für 30 Minuten inkubieren
 7. Reaktion mit 5ml kaltem PBS stoppen
 8. Proben bei 2.500 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
 9. Überstand bis 450 µl verwerfen und Zellpellet resuspendieren

2.5.2 Zellfärbung

Im Anschluss an die Zellvereinzellung wurden diese zur Vorbereitung der FACS-Analyse mittels Propidium Iodid wie folgt angefärbt.

1. Zelllösung in 4,5 ml FACS-Reagiergefäß überführen
2. Zellen in 500 µl RNAse für 30 Minuten bei 37° Celsius inkubieren
3. Zellen in 100 µl Propidium Iodid Lösung für 5 Minuten bei 4° Celsius unter Lichtausschluss inkubieren

2.5.3 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse wurde mit dem Canto II FACS-Gerät der Firma BD (Franklin Lakes, USA) durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem blauen Laser und mit der Filter-Konfiguration „longpass 556“ und „bandpass 585/42“. Pro FACS-Lauf wurde jeweils eine der unter 2.5.2 angefärbten Zellproben analysiert.

2.6 Interpretation der FACS-Daten

Die Auswertung der FACS-Ergebnisse erfolgte in Anlehnung an die von *Hedley et al.* [121] empfohlene Strategie mittels dem FACS-Diva Programm wie folgt:

1. Ausschluss der Zelldupleten
2. Ausschluss der Propidiumiodid negativen Partikel
3. Erstellen des FACS-Plots: x-Achse = Fläche der Propidiumiodid-Emission; y-Achse = Anzahl der Events
4. Setzen der Messbereiche („Gates“) für jeden klar erkennbaren Peak
5. Arithmetische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden prinzipiell folgende Kriterien festgelegt:

- Diploid: 1 Peak
- Aneuploid: DNA-Index = 1,0-1,8 oder >2,2
- Tetraploid: DNA-Index = 1,8-2,2 von mindestens 20% der insgesamt gemessenen Tumorzellen
- DNA-Index = $\frac{\text{mittlere DNA-Gehalt}_{(\text{Peak}2)}}{\text{mittlerer DNA-Gehalt}_{(\text{Peak}1)}}$

Allerdings wurden alle FACS Ergebnisse visuell am Ausdruck des Histogramms validiert. Nur eindeutig über dem Hintergrund abgrenzbare Peaks wurden von links nach rechts bewertet. Der erste Peak von links wurde als der diploide Peak definiert (siehe Abbildung 2.3). Mögliche, weiter rechts gelegene Peaks wurden anhand der Entfernung vom diploiden Peak sowie der Höhe des Peaks beurteilt. Der zweite Peak wurde dann als „Tetraploid“ gewertet, wenn dieser erstens an der 2-fachen Position der X-Achse des Histogramms (im Vergleich zum diploiden Peak) auftrat und wenn er zweitens eine Höhe aufwies, die mindestens 1/4 der Höhe des ersten (diploiden) Peaks entsprach. Nur im Zweifelsfall wurden die Messwerte des Histogrammes zu Hilfe genommen: Die Position des zweiten Peaks musste dann innerhalb des 1,8 bis 2,2-fachen Wertes des ersten Peaks an der X-Achse liegen und der Peak musste mindestens 20% der insgesamt gemessenen Tumorzellen (Summe der „Events“ in P1 und P2) enthalten (siehe Abbildung 2.4). Alle anderen Peaks jeglicher Höhe, die zusätzlich zum diploiden Peak auftraten und nicht den Kriterien eines tetraploiden Peaks entsprachen, wurden als „aneuploid“ gewertet. Beispiele für Histogramme mit verschiedenen Befunden sind in den Abbildungen 2.3 bis 2.5 dargestellt.

Abbildung 2.7: Beispiel für einen diploiden Tumor. Es ist nur ein Peak messbar.

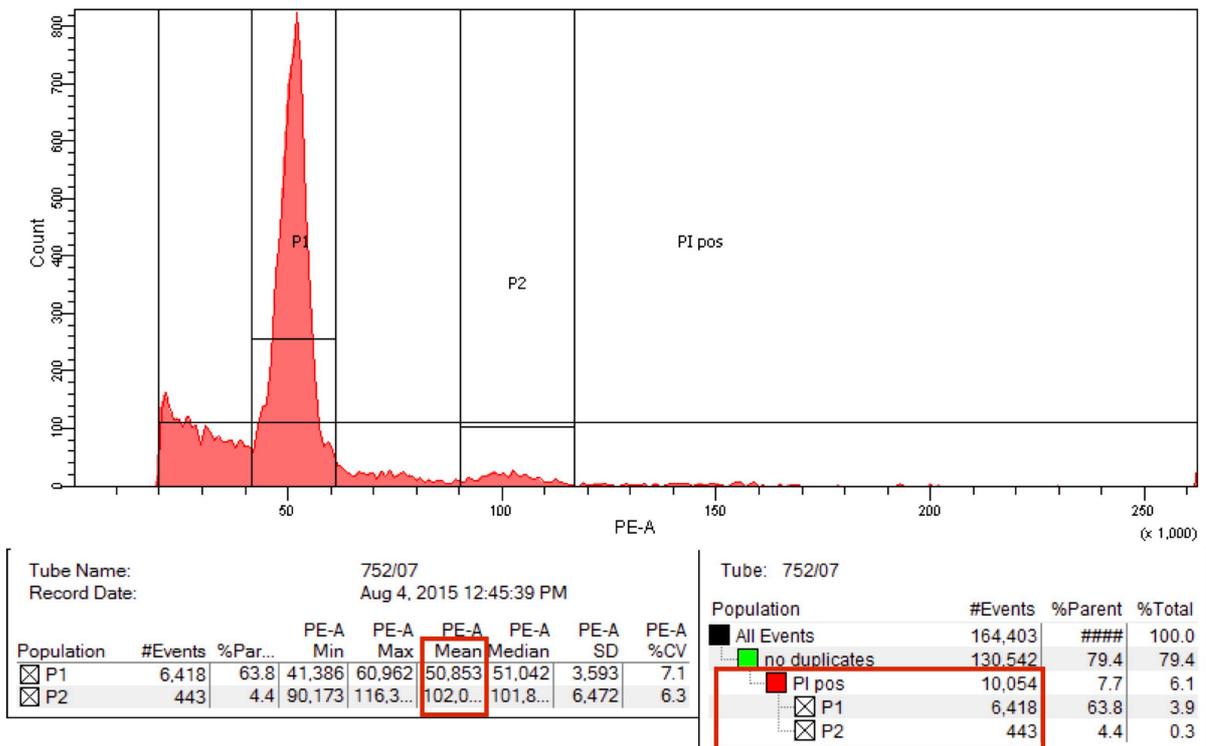


Abbildung 2.4: Ein Beispiel für einen tetraploiden Tumor. DNA-Index: $114,7 / 57,3 = 2,0$. Anteil gemessener Tumorzellen_(Peak2): $(7.683 / 10.000) \times 100 = 76,8\%$

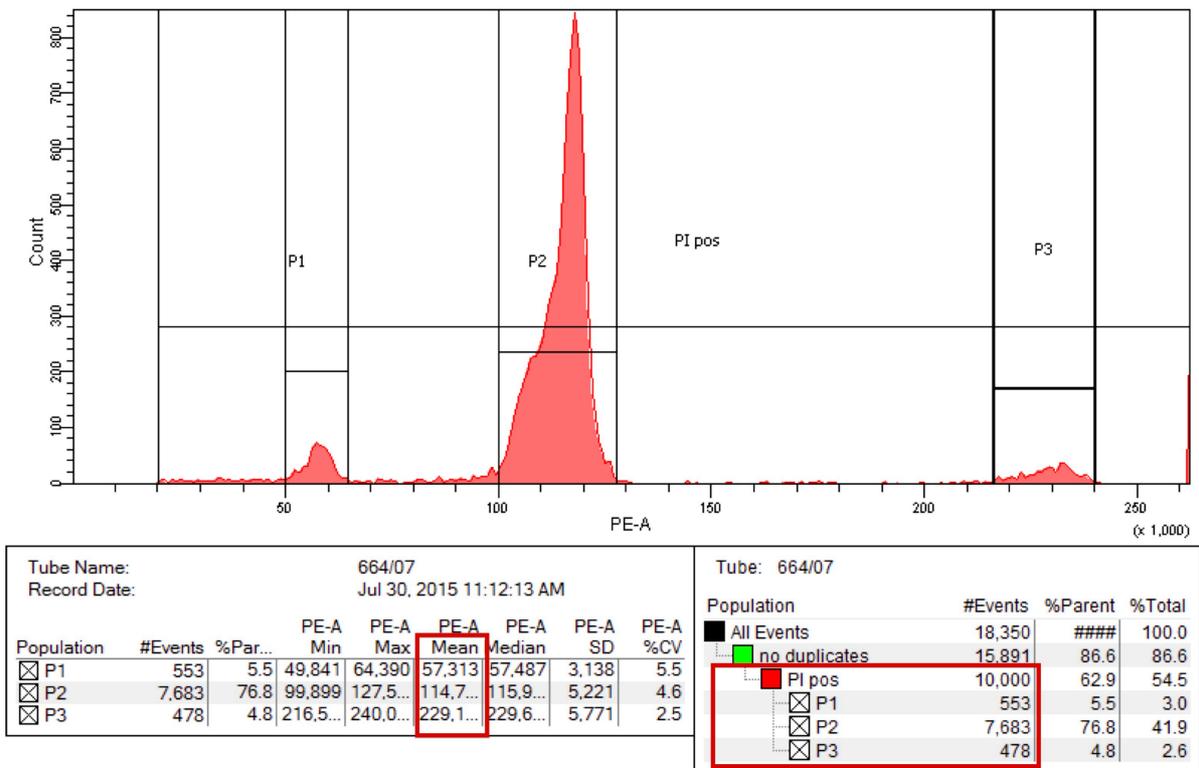
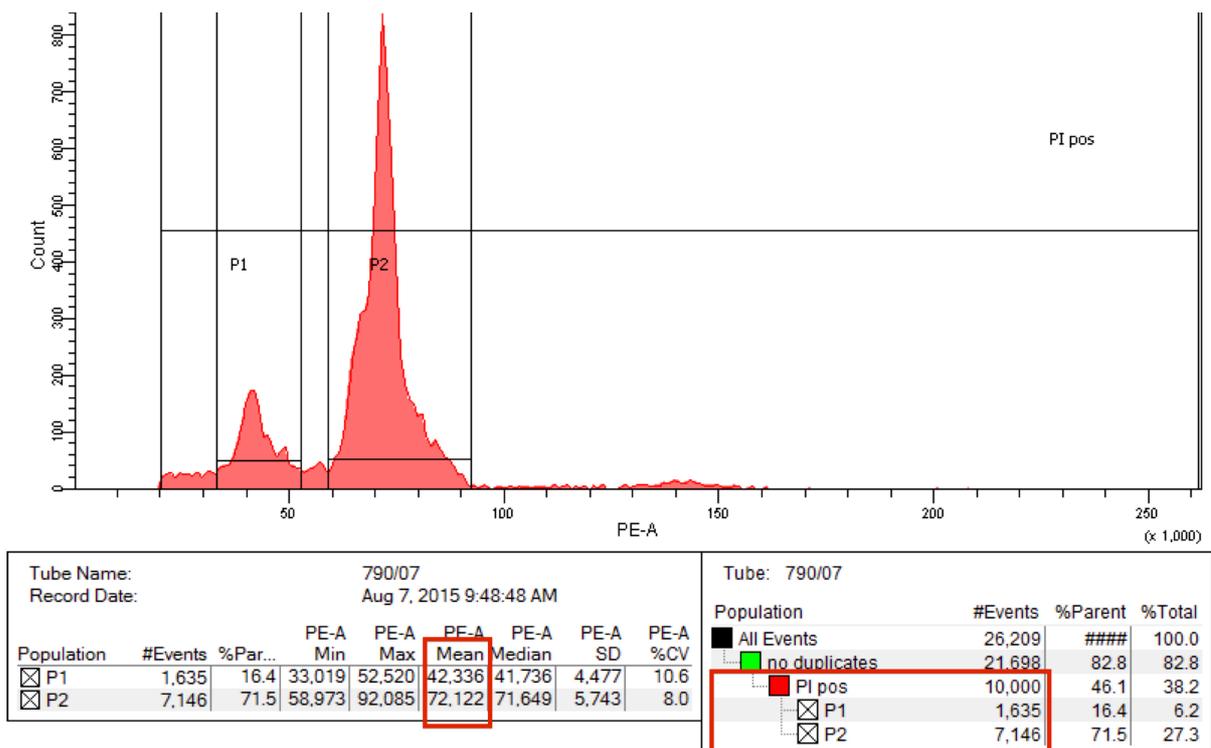


Abbildung 2.5: Ein Beispiel für einen aneuploiden Tumor. DNA-Index: $72,1 / 42,3 = 1,7$



2.7 Statistik

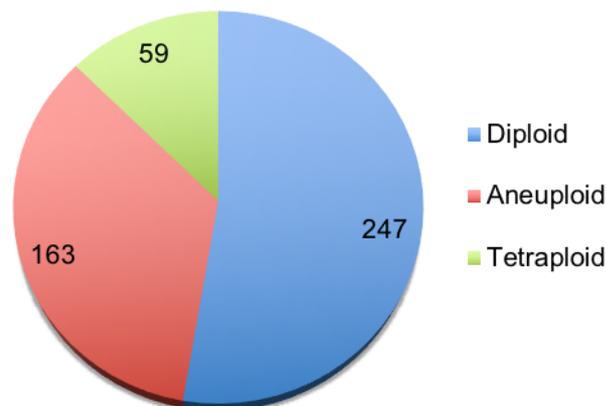
Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit der JMP 13.0.2 Software (SAS Institute Inc., New York, USA). Ein potentieller Zusammenhang zwischen dem Ploidie-Status und den pathologischen Parametern sowie den histologischen Typen des Mammakarzinoms wurde mittels einer Kontingenztabelle und eines Chi-Quadrat-Test untersucht. Der Einfluss des Ploidie-Status auf das Gesamtüberleben wurde nach Kaplan-Meyer bestimmt und zur Ermittlung von statistischen Unterschieden ein Logrank-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ploidie-Status der Karzinomproben

Insgesamt konnte der Ploidie-Status für 469 (89,9%) der 522 Proben mittels Zytometrie bestimmt werden. Für die restlichen 53 (10,2%) Proben konnte aufgrund von fehlenden bzw. unspezifischen Signalen (Peaks) der Ploidie-Status nicht eindeutig festgelegt werden. Diese Proben wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Von den 469 analysierbaren Proben waren 247 (52,7%) diploid, 163 (34,8%) aneuploid und 59 (12,6%) tetraploid.

Abbildung 3.1: Verteilung der Ploidie-Status aller 469 analysierbaren Proben



3.2 Assoziation des Ploidie-Status mit den pathologischen und histologischen Parametern des Mammakarzinoms

Zur Untersuchung einer möglichen Assoziation des Ploidie-Status mit den pathologisch-histologischen Parametern des Mammakarzinoms wurden die Tumoren zunächst nach ihrem Ploidiestatus in diploide, aneuploide und tetraploide Karzinome eingeteilt. In den Tumoren ohne speziellen Typ (NST) war der Anteil an tetraploiden Karzinomen (14,8%) signifikant höher als in den invasiv-lobulären Karzinomen (3,1%, $p=0,0006$). Der Ploidie-Status war signifikant mit dem Tumorgrad ($p=0,0179$) assoziiert. Der Anteil an tetraploiden Tumoren nahm von 9,9% (Grad 1) auf 15,9% (Grad 3) zu. Keine Assoziation konnte zwischen dem Ploidie-Status und dem Tumorstadium ($p=0,0850$) bzw. Lymphknoten-Status ($p=0,1789$) gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. In einer zweiten Untersuchung wurden die Tumoren in diploide und nicht-diploide Karzinome eingeteilt. Den höchsten Anteil an nicht-diploiden Tumoren zeigten die NST Karzinome mit 52,3%. Der Ploidie-Status war signifikant mit dem Tumorgrad ($p=0,0035$) und in dieser Einteilung auch mit dem Tumorstadium ($p=0,0375$) assoziiert. Der Anteil an nicht-diploiden Tumoren nahm zu von 31% (Grad1) auf 55,6% (Grad3) bzw. 42,2% (pT1) auf 57,1% (pT4). Keine Assoziation konnte zwischen dem Ploidie-Status und dem Lymphknoten-Status gefunden werden ($p=0,6362$). Die

Ergebnisse dieser Analyse sind ebenfalls in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Tumoren mit r- und y-Stadien wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Die gleiche Analyse, beschränkt auf die NST Tumoren, ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.1: Ploidie und Tumor-Phänotyp (alle Tumoren)

	Anzahl (n)	Diploid (%)	Tetraploid (%)	Aneuploid (%)	p-Wert	nicht-diploid (%)	p-Wert
Alle Tumoren	469	52.7	12.6	34.8	-	47.3	-
Histologie							
NST	365	47.7	14.8	37.5	0.0006*	52.3	0.0007*
lobulär	64	70.3	3.1	26.6		29.7	
Basalzell Tumor	1	100.0	0	0		0	
gemischt diff	5	60.0	0.0	40.0		40.0	
medullär	8	75.0	0.0	25.0		25.0	
muzinös	14	78.6	7.1	14.3		21.4	
papillär	2	100.0	0.0	0.0		0.0	
tubulär	9	55.6	22.2	22.2		44.4	
Tumorstadium							
pT1	263	57.8	10.6	31.6	0.0850	42.2	0.0375
pT2	155	45.2	13.5	41.3		54.8	
pT3	16	68.8	20.0	23.3		31.3	
pT4	14	42.9	28.6	28.6		57.1	
Nodal-Status							
pN0	303	51.8	11.6	36.6	0.1789	48.2	0.6362
pN1	79	58.2	11.4	30.4		41.8	
pN2	33	51.5	27.3	21.2		48.5	
pN3	28	60.7	7.1	32.1		39.3	
Grad							
1	71	69.0	9.9	21.1	0.0179	31.0	0.0035
2	270	52.2	11.9	35.9		47.8	
3	126	44.4	15.9	39.7		55.6	
HER2							
negative	251	53.8	13.1	33.1	0.1874	46.2	0.0936
positive	36	38.9	22.2	38.9		61.1	
ER							
negative	57	50.9	12.3	36.8	0.7485	49.1	0.9411
positive	210	51.4	15.7	32.9		48.6	
PR							
negative	121	50.4	13.2	36.4	0.4882	49.6	0.5721
positive	173	53.8	16.2	30.1		46.2	
Triple negativ							
ja	34	52.9	8.8	38.2	0.4877	47.1	0.8072
nein	217	50.7	16.1	33.2		49.3	
Ki67-LI Mittelwert	300	5.7±0.6	6.3±1.2	7.5±0.8	0.2131	7.2±0.7	0.1234

* Bezieht sich nur auf NST und lobuläre Karzinome

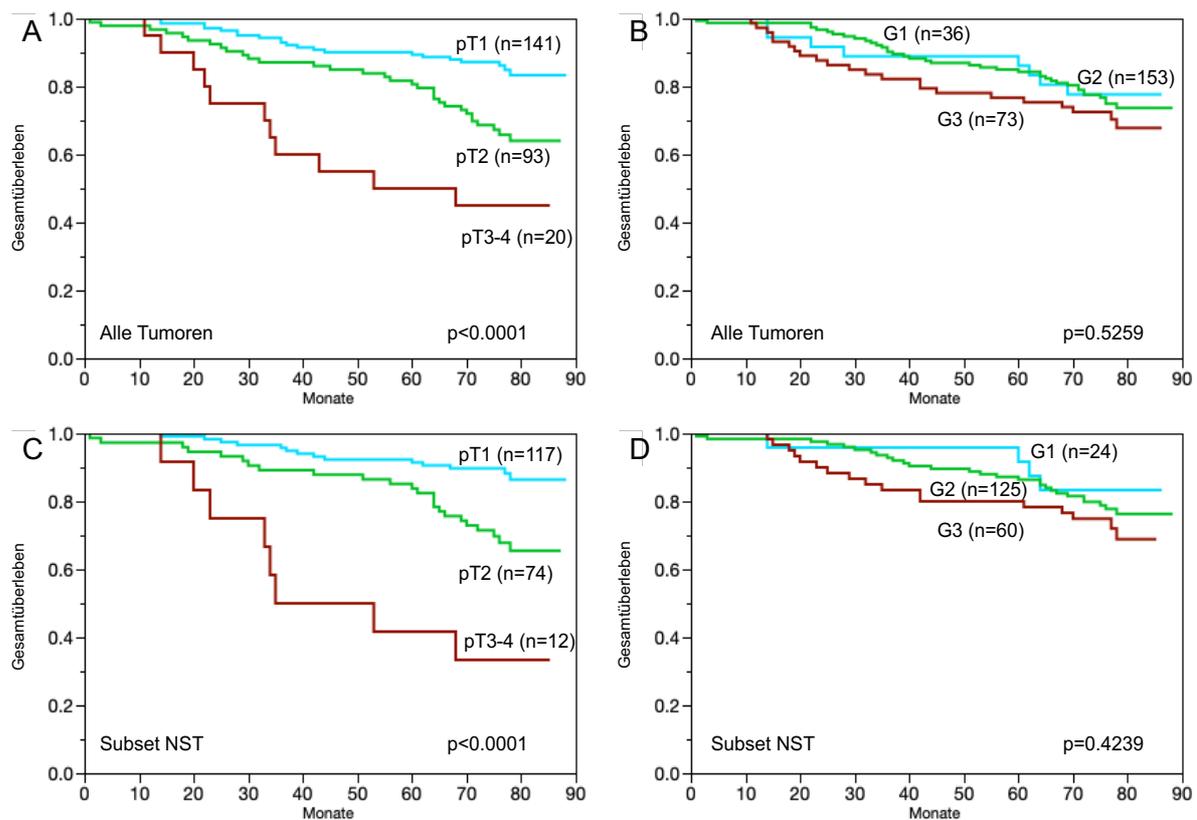
Tabelle 3.2: Ploidie und Tumor-Phänotyp (NST Tumoren)

	Anzahl (n)	Diploid (%)	Tetraploid (%)	Aneuploid (%)	p-Wert	nicht-diploid (%)	p-Wert
Histologie							
NST	365	47.7	14.8	37.5	-	52.3	-
Tumorstadium							
pT1	212	55.2	11.3	33.5	0.0369	44.8	0.0226
pT2	120	38.3	16.7	45.0		61.7	
pT3	7	42.9	28.6	28.6		57.1	
pT4	11	36.4	36.4	27.3		63.6	
Nodal-Status							
pN0	227	46.3	13.7	40.1	0.2545	53.7	0.5404
pN1	70	54.3	12.9	32.9		45.7	
pN2	29	51.7	27.6	20.7		48.3	
pN3	19	57.9	10.5	31.6		42.1	
Grad							
1	45	66.7	8.9	24.4	0.0377	33.3	0.0076
2	214	47.7	14.0	38.3		52.3	
3	105	39.0	19.0	41.9		61.0	
HER2							
negative	200	50.0	15.5	34.5	0.1454	50.0	0.0627
positive	31	32.3	25.8	41.9		67.7	
ER							
negative	43	44.2	16.3	39.5	0.7766	55.8	0.6323
positive	172	48.3	18.0	33.7		51.7	
PR							
negative	121	38.0	13.2	31.4	0.5945	44.6	0.5058
positive	173	40.5	14.5	25.4		39.9	
Triple negativ							
ja	26	50.0	11.5	38.5	0.6718	50.0	0.8125
nein	181	47.5	18.2	34.3		52.5	
Ki67-LI Mittelwert	238	5.9±0.7	6.5±1.3	8.0±0.9	0.194	7.5±0.7	0.1257

3.3 Assoziation des Tumorgrads und Tumorstadium mit dem Gesamtüberleben

Um die Validität der Analyse zu prüfen wurde der Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und dem Tumorgrad bzw. Tumorstadium geprüft. Für die Kaplan-Meier-Analyse wurden alle Tumoren verwendet, deren Ploidie-Status bestimmt werden konnte. Signifikante Unterschiede wurden mittels des Log-Rank-Tests errechnet. Das Tumorstadium zeigte eine signifikante Assoziation zum Gesamtüberleben der Patienten in 254 analysierten Tumoren (siehe Abbildung 3.2 A; $p < 0,0001$). Über 50% der Patienten mit einem Stadium 4 Tumor waren 30 Monate nach der Behandlung verstorben, während weniger als 10% der Patienten mit einem Stadium 1 Tumor im selben Zeitraum verstarben. Keine Assoziation konnte zwischen dem Gesamtüberleben und dem Tumorgrad in 262 analysierten Patienten gefunden werden (Abbildung 3.2 B; $p = 0,5259$). Die Ergebnisse der Analyse des größten homogenen Subsets (NST-Tumoren) ergab ein weitgehend identisches Bild (Abbildung 3.2 C und Abbildung 3.2 D).

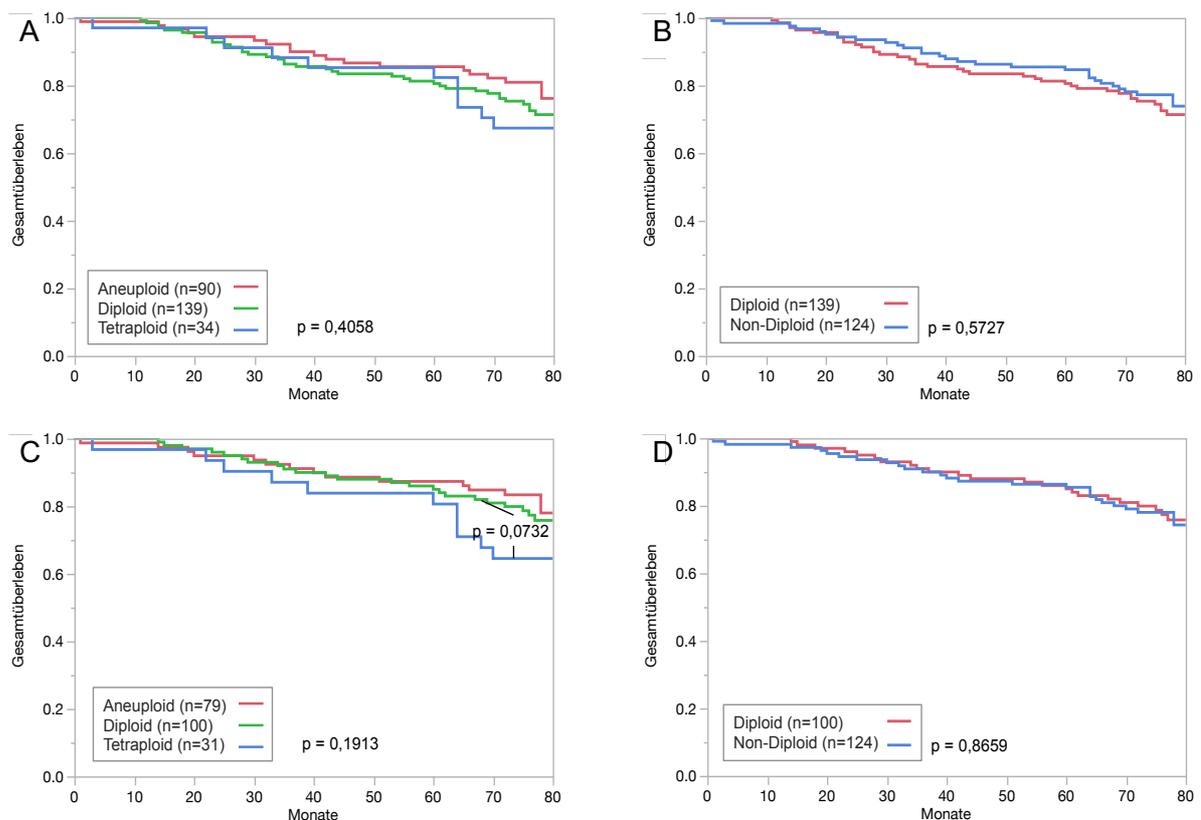
Abbildung 3.4: Prognostische Bedeutung von Tumorstadium und Grad. A und B: Alle Tumoren. C und D: Subset der NST Tumoren.



3.4 Assoziation des Ploidie-Status mit dem Gesamtüberleben der Patienten

Um die prognostische Aussagekraft des Ploidie-Status zu prüfen, wurde eine Kaplan-Meyer-Analyse und ein Log-Rank-Test durchgeführt, in der der Ploidie-Status von 263 Karzinomen in Bezug zum Gesamtüberleben der Patienten gesetzt wurde. Dazu wurden die Tumoren nach ihrem Ploidie-Status diploid, aneuploid und tetraploid (Abbildung 3.3 A) und in diploid und non-diploid (Abbildung 3.3 B) eingeteilt. Beide Einteilungen zeigten bei der Analyse aller Tumoren keinen signifikanten Zusammenhang zum Gesamtüberleben der Patienten (Abbildung 3.3 A: $p=0,4058$; B: $p=0,5727$). In der Untergruppenanalyse der NST-Tumoren zeigten die tetraploiden Karzinome eine tendenziell aber nicht signifikant schlechtere Prognose als die aneuploiden Tumoren ($p=0,0732$). Zwischen den NST-Tumoren mit einem diploiden und non-diploiden Status konnte kein signifikanter Unterschied im Zusammenhang zum Gesamtüberleben ermittelt werden. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

Abbildung 3.7: Prognostische Bedeutung des Ploidie-Status. A und B: Alle Tumoren. C und D: Subset der NST-Tumoren



4 Diskussion

Mammakarzinome werden durch bessere Vorsorgemaßnahmen heute wesentlich früher diagnostiziert als noch vor 20 oder 30 Jahren. Aus diesem Grund können die meisten betroffenen Patientinnen brusterhaltend operiert werden [4]. Doch stellt sich in der Folge die Frage einer adjuvanten Chemotherapie. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das Überleben von Mammakarzinom-Patientinnen durch adjuvante Therapien (zytostatisch, hormonell, Herceptin-Therapie) verlängert werden kann, doch geschieht dies teils auf Kosten substantieller Nebenwirkungen [7]. Die Entscheidung, ob eine adjuvante Therapie notwendig ist, basiert neben dem Lymphknoten-Status und dem pT-Stadium auf dem histologischen Tumorgrad, dessen Bestimmung subjektiven Kriterien unterliegt. Dementsprechend gibt es auch bei der Gradierung von Mammakarzinomen eine Interobserver-Variabilität. Diese wird in Studien sehr unterschiedlich zwischen 10% und 57% angegeben [122-125]. Auch aus diesem Grund hat sich in den letzten Jahren die Anwendung molekularer Zusatzuntersuchungen bei Mammakarzinom-Patientinnen mit fraglicher Indikation zur adjuvanten Therapie weit ausgebreitet. Bei zahlreichen Patientinnen werden RNA-basierte Multiparameter-Tests durchgeführt, wie Onkotyp DX[®] (Genomic Health) [10] oder EndoPredict[®] (Myriad Genetics GmbH) [126]. Diese Tests sind nicht nur teuer, sondern weisen auch aus wissenschaftlicher Sicht substantielle Schwächen auf. Ein Problem ist, dass diese RNA-Panels mit Sicherheit nicht die bestmöglichen Parameter für die Einschätzung der Mammakarzinom-Aggressivität beinhalten. Die diesem Test zugrunde liegenden Untersuchungen wurden vor mehr als 15 Jahren mit heute nicht mehr gebräuchlichen cDNA-Arrays erhoben und die Studien, welche zur Selektion der in die Panels aufgenommenen Gene geführt haben, beinhalteten relativ kleine Patientenkollektive von wenigen 100 Frauen [127]. Es ist offensichtlich, dass heute verfügbare Verfahren, wie Next Generation Sequencing, wenn sie an entsprechend geeigneten Kollektiven angewendet werden, zu besseren Prognose-Panels führen würden. Neben der Gewissheit, dass die existierenden Mammakarzinom-Prognosetests nicht optimal sind, ist es ein weiteres Problem, dass die Methoden auf der Untersuchung von RNA basieren. RNA wird dabei aus einem von einem Pathologen selektionieren Gewebepblock extrahiert. Auch im günstigsten Fall besteht das untersuchte Gewebe allerdings nicht nur aus Tumorzellen, sondern beinhaltet in wechselnder Menge Stromazellen, einschließlich Gefäßen und Entzündungsinfiltraten.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Methode auf ihre prognostische Relevanz beim Mammakarzinom getestet, die heute eigentlich nicht mehr diagnostisch gebraucht wird. Die Flowzytometrie war in den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts die erste Hochdurchsatz-Methode zur Gewebeuntersuchung und erzeugte damals bei den Beteiligten große Euphorie und Hoffnungen durch die Messung des DNA-Gehaltes von Tumorzellen, die Aggressivität von Tumoren einschätzen zu können. Die Überlegung war, dass ein Tumor mit zunehmender Entdifferenzierung und Progression zunehmend eine Störung des Gesamt-DNA-Gehaltes entwickelt, so dass durch die einfache Messung der Ploidie eines Tumors ein wesentlicher Prognoseparameter bestimmt werden könnte. Zu vielen Tumorarten wurden meist nicht sehr große Studien zur

Prognoserelevanz der DNA-Ploidie durchgeführt, wobei die Aussagen dieser Publikationen weitgehend widersprüchlich waren. Einige Publikationen hatten eine Prognoserelevanz der Ploidie beim Kolonkarzinom, Nierenkarzinom, Magenkarzinom und beim Prostatakarzinom gezeigt [17, 128-133]. Wieder andere Studien hatten bei den gleichen Tumorarten aber keine prognostische Relevanz der Ploidie gefunden [134-138]. Aufgrund der widersprüchlichen Daten wurde die Ploidiebestimmung bei keinem Tumor in die routinemäßige Diagnostik integriert und mit der Entwicklung anderer Methoden, wie beispielsweise der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), verschwand an vielen Zentren das wissenschaftliche Interesse an flowzytometrischen Untersuchungen. Die FISH-Methode erlaubt die Visualisierung von Genen und Chromosomen auf Einzelzellniveau und ermöglicht somit eine weit feinere Beurteilung von genomischen Veränderungen einer Tumorzelle, als beispielsweise die Flowzytometrie [139]. Dies auch bei weit geringeren apparativen Kosten.

Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf wurde kürzlich eine der größten Patientenkohorten in der Geschichte der Flowzytometrie untersucht. Aufgrund der stetigen Nachfrage durch Patienten-Selbsthilfe-Organisationen nach DNA-zytometrischen Untersuchungen in der Prostata-Diagnostik untersuchten Lennartz et al. [17] mehr als 3000 Prostatakarzinome und haben – zur eigenen Überraschung – eine hohe prognostische Relevanz der DNA-Befunde ermittelt. Aufgrund dieser ermutigenden Daten machten wir uns die Überlegung, ob möglicherweise auch bei anderen Tumorarten die DNA-Zytometrie als möglicher Prognosefaktor nicht konsequent genug evaluiert worden sein könnte.

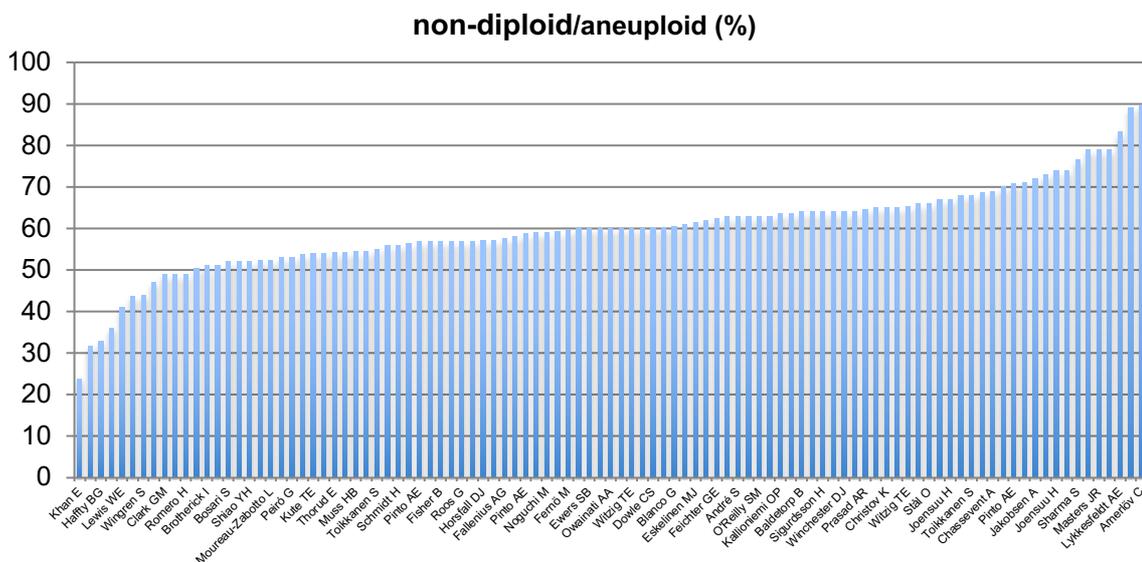
Die Ploidie-Bestimmung hat – zumindest theoretisch – als diagnostische Methode zwei große Vorteile. Der erste Vorteil ist, dass die Methode eine ja/nein Antwort ergibt. Eine nicht Diploide Tumorzellpopulation ist entweder vorhanden oder nicht. Der zweite Vorteil ist, dass die Ploidie-Bestimmung unabhängig ist von einer Beimengung nicht neoplastischer Zellen. Die Flowzytometrie erlaubt die Untersuchung von hunderttausenden Zellen. Bei optimaler technischer Qualität können in einer so großen Zellzahl auch kleine Subpopulationen identifiziert werden.

Die hier vorliegende Studie repräsentiert ein Pilotprojekt, welches mit dem Ziel gestartet wurde, das Patientenkollektiv bei positivem Ergebnis der Studie in der Folge substanziell auszuweiten. Die Untersuchung von 522 Mammakarzinomen führte zu 469 auswertbaren Datensätzen. Diese Zahl ist im Vergleich zur bestehenden Literatur bereits jetzt verhältnismäßig groß. Die von uns identifizierten 100 früheren Studien zur flowzytometrischen Ploidieanalyse beim Mammakarzinom umfassten im Durchschnitt 285 und im Mittel 191 Patienten, wobei eine Untersuchung mit über 100.000 Patienten herausgerechnet ist [106]. Dabei handelt es sich um eine Studie von Wenger CR et al aus dem Jahr 1993, in der 127.220 Gewebeproben aus primären Mammakarzinomen hinsichtlich ihres Ploidie-Status, ihrer S-Phasen-Fraktion und ihres Steroidrezeptor-Status untersucht wurden. Zu über 25.000 Fällen lagen aus einer multizentrischen Datenbank klinische Verlaufsdaten vor, mit einem mittleren Beobachtungszeitraum von 26 Monaten. Die Untersuchung des Ploidie-Status ergab bei 53% einen diploiden und 47% einen

aneuploiden Chromosomensatz. Diese Ergebnisse sind fast identisch mit denen aus unserer Untersuchung. Der Einfluss der Ploidie auf das Rezidiv-freie Überleben bzw. auf das Gesamtüberleben der Patienten wurde nicht untersucht.

Ein wesentlicher Parameter für die Häufigkeit nicht diploider Befunde ist der Schwellenwert zur Definition von Tetraploidie. Hier wird unterschieden zwischen Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Analyse in Teilung befanden und daher einen „Pseudo-tetraploiden“ Chromosomensatz aufweisen und echten tetraploiden Zellen, bei denen der erhöhte Chromosomensatz irreversibel etabliert ist. In der vorliegenden Studie wurde derjenige Schwellenwert verwendet, der in der Literatur am häufigsten für das Mammakarzinom beschrieben wurde (Tabelle 7.2, siehe Anhang) [19-22, 26, 29, 33, 35, 36, 39, 43, 47, 50, 52, 70, 74, 83, 84, 98, 104-107, 111-114]. Der von uns ermittelte Anteil nicht-diploider Tumoren von 47,3 % lag im mittleren Bereich früherer Studien. Die Häufigkeit von nicht-diploiden Befunden in früheren Studien ist in Abbildung 4.1 graphisch dargestellt.

Abbildung 4.1: Anteil non-diploider Tumoren der bisher publizierten Studien zum Ploidie-Status beim Mammakarzinom



Unsere Untersuchung ergab insgesamt allerdings enttäuschende Ergebnisse. Zwar konnte die bekannte höhere Rate nicht-diploider Tumoren bei Tumoren vom nicht-spezialen Typ (NST) im Vergleich zu lobulären Karzinomen bestätigt werden und es fand sich auch eine signifikante Assoziation zwischen nicht-Diploidie und fortgeschrittenem Tumorstadium und ungünstigem Differenzierungsgrad, sowohl bei allen Tumoren, wie auch im Subset von Tumoren vom nicht-spezialen Typ, doch ergaben sich keinerlei Anhaltspunkte auf eine relevante prognostische Bedeutung der Ploidie. Insgesamt passen die vorliegenden Daten gut zur Literatur. Tabelle 7.3 (siehe Anhang) zeigt eine Darstellung sämtlicher 60 Studien, bei denen der Ploidie-Status mit dem Überleben von Mammakarzinom Patientinnen korreliert wurde, zusammen mit Angaben, ob eine signifikante Beziehung beschrieben wurde oder nicht [20, 21, 24, 28, 32, 35-38, 41, 44, 51, 53-55, 58, 59, 61-63, 66, 68, 69, 73-79, 81-88, 91, 94, 97, 98, 101-105, 107, 111-118, 140-143]. Die große Zahl von Studien, welche trotz relativ großer Fallzahl von mehr als

100 Patienten keine signifikante Prognoserelevanz der Ploidie finden konnten, zeigt in Kombination mit unseren Daten, dass die Ploidie-Bestimmung mit Sicherheit nicht als klinisch entscheidender Prognoseparameter dienen kann. Die signifikante Beziehung, die unserem großen Patientenkollektiv zwischen nicht-Diploidie, einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem ungünstigen Differenzierungsgrad gefunden wurde, macht aber deutlich, dass eine nicht-Diploidie insgesamt gehäuft bei aggressiveren Tumoren vorkommt. Dieser Befund macht es erklärbar, dass in einzelnen Studien auch eine signifikante Beziehung zum Überleben gefunden werden konnte.

Da die meisten Studien zur Ploidiebestimmung beim Mammakarzinom vor der Herceptin-Zulassung 1998 erfolgten, gibt es in der Literatur nur verhältnismäßig wenige Daten, welche die flowzytometrische DNA-Bestimmung mit dem HER2-Amplifikationsstatus vergleichen [60, 65, 85, 144-152]. Der Vergleich dieser Parameter ist insofern biologisch interessant, als die Entstehung einer Genamplifikation, wie auch die Entstehung einer nicht-diploiden DNA-Zusammensetzung eine genetische Instabilität von Tumorzellen bedingen. Allerdings fand sich in unserem Patientenkollektiv keine eindeutige Beziehung zwischen dem HER2-Status und der Ploidie. Die HER2-Status-Bestimmung unserer Tumoren erfolgte immunhistochemisch an einem Tissue-Microarray. Konzeptionell beinhaltet diese Art der Untersuchung zwei relevante Nachteile. Nachteil 1 ist die Untersuchung von einem lediglich 0,6mm durchmessenden Gewebefragment, was die Möglichkeit beinhaltet, dass kleine, heterogene Befunde übersehen werden können. Untersuchungen zur Heterogenität der HER2-Amplifikation beim Mammakarzinom haben allerdings ergeben, dass die HER2-Amplifikation in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle ($\geq 95\%$) homogen ist und im gesamten Tumor nachweisbar ist [153]. Dazu passt, dass die HER2-Amplifikation gerade auch in Karzinomvorstufen (DCIS) häufig beschrieben wurde. Der 2. Nachteil ist die Verwendung der Immunhistochemie zum Nachweis der HER2-Amplifikation. Vergleichende Studien, welche Immunhistochemie und die FISH-Methode zur Bestimmung des HER2-Status herangezogen haben, hatten jeweils circa 10% falsch-positive Immunhistochemie-Befunde beschrieben [154]. FISH-Untersuchungen hatten beim Mammakarzinom Häufigkeiten HER2-amplifizierter Fälle um die 15% gezeigt [154]. Das auch in unserer Studie die Zahl der HER2-positiven Fälle lediglich 12,5% beinhaltete, also nicht höher als 15% war, spricht dafür, dass die Zahl der HER2-positiven Fälle in dieser Studie nicht oder nicht wesentlich überschätzt worden waren. Die fehlende Beziehung zwischen HER2-Positivität und „Nicht-Diploidie“ spricht gegen einen engen pathogenetischen Zusammenhang zwischen Aneuploidie und der Entstehung einer Gen-Amplifikation.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie, dass ein abnormaler DNA-Gehalt beim Mammakarzinom häufig vorkommt und dass die Wahrscheinlichkeit einer DNA-nicht-Diploidie vom histologischen Tumortyp abhängt. Anhaltspunkte für eine klinische Relevanz dieser Befunde ergeben sich aber nicht.

5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist der häufigste Tumor bei Frauen. Circa jede zehnte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an dieser Neoplasie. Für die Planung der Therapie ist es von zentraler Bedeutung, die Aggressivität individueller Tumoren richtig einzuschätzen, denn aggressive, mit Nebenwirkungen behaftete, adjuvante Therapien können bei betroffenen Patientinnen zu einer Lebensverlängerung führen. Die flowzytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde früher als möglicher Prognosefaktor beim Mammakarzinom diskutiert. Die meisten Untersuchungen erfolgten an verhältnismäßig kleinen Patientenkollektiven und lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Angesichts ermutigender Daten zur prognostischen Bedeutung der DNA-Ploidie in anderen Tumoren wurden in diesem Projekt 522 Mammakarzinom-Primärtumoren flowzytometrisch untersucht. Von 469 auswertbaren Befunden waren 52,7% diploid, 34,8% aneuploid und 12,6% tetraploid. Für die statistischen Untersuchungen wurden aneuploide und tetraploide als „nicht-diploide“ Fälle zusammengefasst. Die Zahl der nicht-diploiden variierte mit dem histologischen Tumortyp. Nicht-Diploidie war signifikant häufiger in 365 Tumoren vom nicht-spezialen Typ (52,3%) als bei 64 lobulären Karzinomen (29,7%, $p=0,0007$). Die nicht-Diploidie war auch signifikant mit dem Tumorstadium und dem Differenzierungsgrad assoziiert. In allen Tumoren waren 42,2% von 263 pT1, 54,8% von 155 pT2, 31,3% von 16 pT3 und 57,1% von 14 pT4 nicht-diploid ($p=0,0375$) beziehungsweise es waren 31,0% von 71 Grad 1, 47,8% von 270 Grad 2 und 55,6% von 126 Grad 3 Tumoren nicht-diploid ($p=0,0035$). Die gleichen statistischen Beziehungen fanden sich im größten histologischen Subset der Tumoren vom nicht-spezialen Typ. Hier waren 44,8% von 212 pT1, 61,7% von 120 pT2, 57,1% von 7 pT3 und 63,6% von 11 pT4 nicht-diploid ($p=0,0226$) beziehungsweise es waren 33,3% von 45 Grad1, 52,3% von 214 Grad2 und 61,0% von 105 Grad3 Tumoren nicht-diploid ($p=0,0076$). Keine signifikante Beziehung fand sich weder in allen Tumoren noch im Unterkollektiv der Tumoren vom nicht-spezialen Typ mit dem Nodalstatus, dem HER2-Status, der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, der „Triple-Negativität“ und mit dem Ki67-Labeling-Index. Die Untersuchung der prognostischen Relevanz der untersuchten Parameter ergab eine hochgradige prognostische Signifikanz des pT-Status, was die Qualität der klinischen Daten validiert. Für den Ploidie-Status fand sich aber weder in allen Tumoren, noch im Subkollektiv der Tumoren vom nicht-spezialen Typ eine Beziehung zur Prognose. Aus den Daten ist zu schließen, dass der Bestimmung der DNA-Ploidie beim Mammakarzinom keine klinische Relevanz zukommt.

6 Abstract

Breast cancer is the most common tumor in women. About one in ten women suffer from this neoplasm during their lifetime. For the planning of the therapy, it is of central importance to correctly assess the aggressiveness of individual tumors, because aggressive, adjuvant therapies, although with side effects, can lead to a prolongation of life in affected patients. The flow cytometric determination of DNA content was previously discussed as a possible prognostic factor in breast cancer. Most of the studies were done on relatively small groups of patients and gave contradictory results. In view of encouraging data on the prognostic significance of DNA ploidy in other tumors, 522 primary breast cancer tumors were examined flow cytometrically in this project. Of 469 evaluable findings, 52.7% were diploid, 34.8% aneuploid, and 12.6% tetraploid. For the statistical studies, aneuploid and tetraploid have been summarized as "non-diploid" cases. The number of non-diploid varied with the histological tumor type. Non-diploidy was significantly more common in 365 non-specific type tumors (52.3%) than in 64 lobular carcinomas (29.7%, $p = 0.0007$). Non-diploidy was also significantly associated with the degree of differentiation and tumor stage. In all tumors, 42.2% of 263 pT1, 54.8% of 155 pT2, 31.3% of 16 pT3 and 57.1% of 14 pT4 were non-diploid ($p = 0.0375$), respectively 31.0% of 71 grade 1, 47.8% of 270 grade 2 and 55.6% of 126 grade 3 tumors non-diploid ($p = 0.0035$). The same static relationships were found in the largest histological subset of non-specific type tumors. Here, 44.8% of 212 pT1, 61.7% of 120 pT2, 57.1% of 7 pT3 and 63.6% of 11 pT4 were non-diploid ($p = 0.0226$) and 33.3% of 45 grade 1, 52.3% of 214 grade 2 and 61.0% of 105 grade 3 were non-diploid tumors ($p = 0.0076$). No significant relationship was found in either the tumors or the subset of non-specific tumors with nodal status, HER2 status, estrogen and progesterone receptor expression, triple negativity, and Ki67 labeling-index. Examination of the prognostic relevance of the investigated parameters revealed a high degree of prognostic significance of the pT-status, which validated the quality of the clinical data. For the ploidy status, however, there was no relation to the prognosis either in all tumors or in the subgroup of non-specific type tumors. From the data, it can be concluded that the determination of DNA ploidy in breast cancer is of no clinical relevance.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Bisher publizierte Studien zum Ploidie-Status beim Mammakarzinom

Erstautor	Jahr	Anzahl (n)	non-diploid (%)	diploid (%)	Literatur
André S et al.	2007	100	63	37	[18]
Arnerlöv C et al.	2001	48	89,6	10,4	[19]
Arnerlöv C et al.	1992	150	63	37	[20]
Baildam AD et al.	1987	136	62	38	[21]
Baldetorp B et al.	1992	222	64	36	[22]
Beerman H et al.	1991	44	61	11	[23]
Beerman H et al.	1991	62	61	39	[25]
Beerman H et al.	1990	690	73	27	[24]
Bergers E et al.	1996	1295	59,2	40,8	[26]
Bichel P et al.	1982	46	54,3	45,7	[27]
Blanco G et al.	1990	226	60,6	39,4	[28]
Bosari S et al.	1992	147	52	48	[29]
Brotherick I et al.	1995	58	60,3	39,7	[31]
Brotherick I et al.	1995	100	51	49	[30]
Camplejohn RS et al.	1995	802	65	35	[32]
Chassevent A et al.	2001	633	68,9	31,1	[33]
Christov K et al.	1989	210	65	35	[34]
Clark GM et al.	1992	274	49	51	[35]
Clark GM et al.	1993	851	56	44	[36]
Cornelisse CJ et al.	1987	565	71	29	[37]
Coulson PB et al.	1984	74	79	21	[38]
Cufer T et al.	1997	169	49	51	[39]
de la Torre M et al.	1995	41	68	32	[40]
Dowle CS et al.	1987	354	60,2	39,8	[41]
Dressler LG et al.	1992	565	64	36	[42]
Dressler LG et al.	1988	1184	57	43	[43]
Eskelinen MJ et al.	1989	117	61,5	38,5	[44]
Ewers SB et al.	1984	638	66	34	[47]
Ewers SB et al.	1992	506	60	40	[46]
Ewers SB et al.	1992	580	60	40	[46]
Fallenius AG et al.	1988	227	57,7	42,3	[48]
Feichter GE et al.	1988	300	62,4	37,6	[49]
Fernö M et al.	1992	1821	59,6	40,4	[50]
Fisher B et al.	1991	398	57	43	[51]
Frierson HF Jr et al.	1993	118	67	33	[52]
Gnant MF et al.	1992	191	62,8	37,2	[53]
Haffty BG et al.	1992	38	33	67	[54]
Hedley DW et al.	1987	473	65,1	34,9	[55]
Horsfall DJ et al.	1986	145	57,2	42,8	[56]
Jakobsen A et al.	1984	143	72	28	[57]
Joensuu H et al.	1990	222	74	26	[59]
Joensuu H et al.	1992	327	67	33	[58]
Jonsdottir AB et al.	2012	236	53,8	46,2	[60]
Kallioniemi OP et al.	1987	92	60	40	[62]
Kallioniemi OP et al.	1987	297	63,6	36,4	[61]
Keyhani-Rofagha S et al.	1990	165	57	43	[63]
Khan E et al.	2001	218	24	76	[64]
Kim DW et al.	2013	72	31,8	68,2	[65]
Kute TE et al.	1990	197	52	48	[66]
Kute TE et al.	1985	216	54	46	[67]
Kute TE et al.	2004	555	70	30	[68]
Lewis WE et al.	1990	155	41	59	[69]
Luzi P et al.	1995	61	59	41	[70]
Lykkesfeldt AE et al.	1988	167	83,2	16,8	[71]
Masters JR et al.	1987	76	79	21	[72]
Merkel DE et al.	1993	280	58	42	[73]
Moureau-Zabotto L et al.	2005	271	52,4	47,6	[74]

Muss HB et al.	1989	101	54,5	45,5	[75]
Noguchi M et al.	1991	121	59	41	[76]
O'Reilly SM et al.	1990	169	63	37	[78]
O'Reilly SM et al.	1990	140	68,6	31,4	[77]
Owainati AA et al.	1987	280	60	40	[79]
Peiró G et al.	1997	118	53	47	[80]
Pinto AE et al.	2006	135	43,7	56,3	[82]
Pinto AE et al.	1999	308	56,5	43,5	[83]
Pinto AE et al.	2015	684	56,9	43,1	[85]
Pinto AE et al.	2013	393	58,8	41,2	[84]
Pinto AE et al.	2003	392	70,9	29,1	[81]
Prasad AR et al.	2001	332	64,6	35,4	[86]
Romero H et al.	1996	174	49	51	[87]
Roos G et al.	1988	72	57	43	[88]
Schmidt H et al.	1999	106	56	44	[89]
Sharma S et al.	1991	98	76,5	23,5	[90]
Shiao YH et al.	1997	98	52	48	[91]
Sigurdsson H et al.	1990	603	64	36	[92]
Stål O et al.	1986	332	54	46	[96]
Stål O et al.	1992	807	60	40	[93]
Stål O et al.	1993	219	79	21	[95]
Stål O et al.	1994	184	66	34	[94]
Stål O et al.	1989	472	63	37	[97]
Stanton PD et al.	1992	281	64	36	[98]
Stuart-Harris R et al.	1985	42	74	26	[99]
Thorud E et al.	1986	59	54,2	45,8	[100]
Toikkanen S et al.	1990	95	55	45	[102]
Toikkanen S et al.	1989	158	68	32	[101]
Tsutsui S et al.	2001	653	50,4	49,6	[103]
Uyterlinde AM et al.	1990	225	63,6	36,4	[104]
van der Linden JC et al.	1989	155	52,3	47,7	[105]
Wenger CR et al.	1993	127220	47	53	[106]
Winchester DJ et al.	1990	198	64	36	[107]
Wingren S et al.	1994	152	57,2	42,8	[108]
Wingren S et al.	1994	209	44	56	[109]
Winter K et al.	1994	100	36	64	[110]
Witzig TE et al.	1994	265	51	49	[112]
Witzig TE et al.	1991	167	65,3	34,7	[111]
Witzig TE et al.	1993	432	60	40	[113]
Wong SW et al.	1999	46	57	43	[114]
Wyss-Desserich MT et al.	1997	57	60	40	[115]
Yuan J et al.	1992	101	54,5	45,5	[117]
Yuan J et al.	1991	170	64	36	[116]

Tabelle 7.2: Tetraploidie-Schwellenwert in der Literatur

Erstautor	Jahr	Anzahl (n)	Tetraploidie-Schwellenwert*	Literatur
Baildam AD et al.	1987	136	10	[21]
Bergers E et al.	1996	1295	10	[26]
Chassevent A et al.	2001	633	10	[33]
Clark GM et al.	1992	274	10	[35]
Moureau-Zabotto L et al.	2005	246	10	[74]
Uyterlinde AM et al.	1990	225	10	[104]
Witzig TE et al.	1994	265	13,4	[112]
Witzig TE et al.	1991	167	13,4	[111]
Witzig TE et al.	1993	432	13,4	[113]
Arnerlöv C et al.	1992	150	15	[20]
Arnerlöv C et al.	2001	48	15	[19]
Cufer T et al.	1997	169	15	[39]
Luzi P et al.	1995	61	15	[70]
Stanton PD et al.	1992	281	15	[98]
van der Linden JC et al.	1989	155	15	[105]
Wong SW et al.	1999	46	15	[114]
Baldetorp B et al.	1992	222	20	[22]
Clark GM et al.	1993	851	20	[36]
Dressler LG et al.	1988	1184	20	[43]
Ewers SB et al.	1984	638	20	[47]
Fernö M et al.	1992	1821	20	[50]
Frierson HF Jr et al.	1993	118	20	[52]
Pinto AE et al.	1999	308	20	[83]
Pinto AE et al.	2013	393	20	[84]
Wenger CR et al.	1993	127220	20	[106]
Winchester DJ et al.	1990	198	20	[107]
Bosari S et al.	1992	147	25	[29]

* Angeben in % der insgesamt gemessenen Tumorzellen

Tabelle 7.3: Korrelation zwischen Ploidie-Status und Überleben von Mammakarzinom-Patientinnen

Erstautor	Jahr	Anzahl (n)	p-Wert	Literatur
Clark GM et al.	1993	851	0,99	[36]
Camplejohn RS et al.	1995	802	0,0011	[32]
Beerman H et al.	1990	690	0,02	[24]
Pinto AE et al.	2015	684	0,018	[85]
Tsutsui S et al.	2001	653	0,0492	[103]
Meyer JS et al.	1994	604	0,079	[143]
Cornelisse CJ et al.	1987	565	0,04	[37]
Kute TE et al.	2004	555	0,02	[68]
Stål O et al.	1989	472	0,0044	[97]
Witzig TE et al.	1993	432	0,31	[113]
Fisher B et al.	1991	398	0,1	[51]
Kute TE et al.	1995	397	0,791	[142]
Pinto AE et al.	2013	393	0,001	[84]
Pinto AE et al.	2003	392	<0,001	[81]
Dowle CS et al.	1987	354	NS	[41]
Clark GM et al.	1989	345	0,11	[140]
Prasad AR et al.	2001	332	0,964	[86]
Pinto AE et al.	1999	308	0,006	[83]
Kallioniemi OP et al.	1987	297	<0,0001	[62]
Joensuu H et al.	1992	284	0,005	[58]
Stanton PD et al.	1992	281	0,28	[98]
Merkel DE et al.	1993	280	0,18	[73]
Owainati AA et al.	1987	280	NS	[79]
Clark GM et al.	1992	274	0,83	[35]
Witzig TE et al.	1994	265	0,13	[112]
Moureau-Zabotto L et al.	2005	246	0,025	[74]
Blanco G et al.	1990	226	NS	[28]
Uyterlinde AM et al.	1990	225	0,023	[104]
Joensuu H et al.	1990	222	0,002	[59]
Eskelinen M et al.	1992	216	NS	[141]
Winchester DJ et al.	1990	198	NS	[107]
Kute TE et al.	1990	197	0,5997	[66]
Gnant MF et al.	1992	191	0,022	[53]
Stål O et al.	1994	184	0,026	[94]
Romero H et al.	1996	174	0,22	[87]
Yuan J et al.	1991	170	<0,01	[116]
O'Reilly SM et al.	1990	169	0,63	[78]
Witzig TE et al.	1991	167	0,01	[111]
Keyhani-Rofagha S et al.	1990	165	0,3	[63]
Toikkanen S et al.	1989	158	0,01	[101]
Lewis WE et al.	1990	155	0,02	[69]
van der Linden JC et al.	1989	155	NS	[105]
Arnerlöv C et al.	1992	150	NS	[20]
O'Reilly SM et al.	1990	140	0,1	[77]
Baildam AD et al.	1987	136	>0,06	[21]
Pinto AE et al.	2006	135	0,007	[82]
Noguchi M et al.	1991	121	0,071	[76]
Eskelinen MJ et al.	1989	117	<0,001	[44]
Muss HB et al.	1989	101	0,925	[75]
Yuan J et al.	1992	101	0,0002	[117]
Toikkanen S et al.	1990	95	0,11	[102]
Kallioniemi OP et al.	1987	92	0,15	[62]
Coulson PB et al.	1984	74	<0,01	[38]
Roos G et al.	1988	72	0,019	[88]
Wyss-Desserich MT et al.	1997	57	NS	[115]
Shiao YH et al.	1997	50	0,687	[91]
Shiao YH et al.	1997	48	0,001	[91]
Wong SW et al.	1999	46	NS	[114]
Haffty BG et al.	1992	38	<0,02	[54]

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Antikörper zur immunhistochemischen Analyse	11
Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Patientenkohorte auf dem Gewebemikroarray...	12
Tabelle 2.3: verwendete Reagenzien mit Hersteller-Firmen	12
Tabelle 2.4: verwendete Materialien mit Hersteller-Firmen	13
Tabelle 2.5: verwendete Lösungen	13
Tabelle 3.1: Ploidie und Tumor-Phänotyp (alle Tumoren)	19
Tabelle 3.2: Ploidie und Tumor-Phänotyp (NST Tumoren).....	20
Tabelle 7.1: Bisher publizierte Studien zum Ploidie-Status beim Mammakarzinom	29
Tabelle 7.2: Tetraploidie-Schwellenwert in der Literatur	31
Tabelle 7.3: Korrelation zwischen Ploidie-Status und Überleben von Mammakarzinom-Patientinnen	32

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: TMA-Paraffinblock mit 522 Tumor-Stanzen.....	10
Abbildung 2.2: Auf einen Objektträger aufgetragener, angefärbter TMA-Schnitt	11
Abbildung 2.3: Beispiel für einen diploiden Tumor. Es ist nur ein Peak messbar.....	15
Abbildung 2.4: Ein Beispiel für einen tetraploiden Tumor. DNA-Index: 114,7 / 57,3 = <u>2,0</u> . Anteil gemessener Tumorzellen _(Peak2) : $(7.683 / 10.000) \times 100 = \underline{76,8\%}$	16
Abbildung 2.5: Ein Beispiel für einen aneuploiden Tumor. DNA-Index: 72,1 / 42,3 = <u>1,7</u>	16
Abbildung 3.1: Verteilung der Ploidie-Status aller 469 analysierbaren Proben	18
Abbildung 3.2: Prognostische Bedeutung von Tumorstadium und Grad. A und B: Alle Tumoren. C und D: Subset der NST Tumoren.....	21
Abbildung 3.3: Prognostische Bedeutung des Ploidie-Status. A und B: Alle Tumoren. C und D: Subset der NST-Tumoren	22
Abbildung 4.1: Anteil non-diploider Tumoren der bisher publizierten Studien zum Ploidie-Status beim Mammakarzinom.....	25

9 Literaturverzeichnis

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018, 68(6):394-424.
- [2] Katalinic A: Sinkende Mortalität bei steigender Inzidenz beim Mammakarzinom. *Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York* 2009.
- [3] Brenner H, Stegmaier C, Ziegler H: Verbesserte Langzeitüberlebensraten von Krebspatienten: Die unterschätzten Fortschritte der Onkologie. *Deutsches Ärzteblatt* 2005, 102(39):2628-2633.
- [4] Lagendijk M, van Maaren MC, Saadatmand S, Strobbe LJA, Poortmans PMP, Koppert LB, Tilanus-Linthorst MMA, Siesling S: Breast conserving therapy and mastectomy revisited: Breast cancer-specific survival and the influence of prognostic factors in 129,692 patients. *Int J Cancer* 2018, 142(1):165-175.
- [5] Untch M, Konecny GE, Paepke S, von Minckwitz G: Current and future role of neoadjuvant therapy for breast cancer. *Breast* 2014, 23(5):526-537.
- [6] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M *et al*: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001, 344(11):783-792.
- [7] Deutsche-Krebsgesellschaft; Geburtshilfe D-GfGu: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *AWMF online* 2018.
- [8] Herdegen T: Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie : 336 Abbildungen; 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014; p. 532.
- [9] Kreienberg RM, Volker; Jonat, Walter; Kühn, Thorsten: Mammakarzinom Interdisziplinär; 4. Auflage; Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2010; p. 100-101; 88; 84-87.
- [10] Genomic Health Deutschland, Köln; Oncotype DX®; verfügbar unter: https://www.genomichealth.com/de-DE/oncotype_iq_produkte/oncotype_dx/oncotype_dx_brustkrebstest; Update vom: 6. Januar 2019
- [11] Agendia N.V. Niederlande, Amsterdam; MammaPrint®; verfügbar unter: <http://www.mammaprint.de/mammaprint/>; Update vom: 6. Januar 2019
- [12] Dabbs DJ, Klein ME, Mohsin SK, Tubbs RR, Shuai Y, Bhargava R: High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study. *J Clin Oncol* 2011, 29(32):4279-4285.
- [13] Nordheim A, Knippers R: Molekulare Genetik; 11., unveränderte Auflage; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018; p. 382-383.
- [14] Sack U: Zelluläre Diagnostik : Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen; Basel u.a.: Karger; 2007; p. 28-70.
- [15] Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden gemäß § 64 LFGB: L 01.01-7:2002-05 Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der Keimzahl in Rohmilch - Durchflusszytometrische Zählung von Mikroorganismen (Routineverfahren). In.: Beuth Verlag; 2002.

- [16] Barow P: Prognostische Relevanz der Anzahl chromosomaler Deletionen beim Prostatakarzinom. Hamburg: Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg; 2017.
- [17] Lennartz M, Minner S, Brasch S, Wittmann H, Paterna L, Angermeier K, Ozturk E, Shihada R, Ruge M, Kluth M *et al*: The Combination of DNA Ploidy Status and PTEN/6q15 Deletions Provides Strong and Independent Prognostic Information in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2016, 22(11):2802-2811.
- [18] Andre S, Pinto AE, Laranjeira C, Quaresma M, Soares J: Male and female breast cancer--differences in DNA ploidy, p21 and p53 expression reinforce the possibility of distinct pathways of oncogenesis. *Pathobiology* 2007, 74(6):323-327.
- [19] Arnerlov C, Emdin SO, Cajander S, Bengtsson NO, Tavelin B, Roos G: Intratumoral variations in DNA ploidy and s-phase fraction in human breast cancer. *Anal Cell Pathol* 2001, 23(1):21-28.
- [20] Arnerlov C, Emdin SO, Lundgren B, Roos G, Soderstrom J, Bjersing L, Norberg C, Angquist KA: Mammographic growth rate, DNA ploidy, and S-phase fraction analysis in breast carcinoma. A prognostic evaluation in a screened population. *Cancer* 1992, 70(7):1935-1942.
- [21] Baidam AD, Zaloudik J, Howell A, Barnes DM, Turnbull L, Swindell R, Moore M, Sellwood RA: DNA analysis by flow cytometry, response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1987, 55(5):553-559.
- [22] Baldetorp B, Ferno M, Fallenius A, Fallenius-Vecchi G, Idvall I, Olsson H, Sigurdsson H, Akerman M, Killander D: Image cytometric DNA analysis in human breast cancer analysis may add prognostic information in diploid cases with low S-phase fraction by flow cytometry. *Cytometry* 1992, 13(6):577-585.
- [23] Beerman H, Bonsing BA, van de Vijver MJ, Hermans J, Kluin PM, Caspers RJ, van de Velde CJ, Cornelisse CJ: DNA ploidy of primary breast cancer and local recurrence after breast-conserving therapy. *Br J Cancer* 1991, 64(1):139-143.
- [24] Beerman H, Kluin PM, Hermans J, van de Velde CJ, Cornelisse CJ: Prognostic significance of DNA-ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 1990, 45(1):34-39.
- [25] Beerman H, Smit VT, Kluin PM, Bonsing BA, Hermans J, Cornelisse CJ: Flow cytometric analysis of DNA stemline heterogeneity in primary and metastatic breast cancer. *Cytometry* 1991, 12(2):147-154.
- [26] Bergers E, Montironi R, van Diest PJ, Prete E, Baak JP: Interlaboratory reproducibility of semiautomated cell cycle analysis of flow cytometry DNA-histograms obtained from fresh material of 1,295 breast cancer cases. *Hum Pathol* 1996, 27(6):553-560.
- [27] Bichel P, Poulsen HS, Andersen J: Estrogen receptor content and ploidy of human mammary carcinoma. *Cancer* 1982, 50(9):1771-1774.
- [28] Blanco G, Holli K, Heikkinen M, Kallioniemi OP, Taskinen P: Prognostic factors in recurrent breast cancer: relationships to site of recurrence, disease-free interval, female sex steroid receptors, ploidy and histological malignancy grading. *Br J Cancer* 1990, 62(1):142-146.
- [29] Bosari S, Lee AK, Tahan SR, Figoni MA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML: DNA flow cytometric analysis and prognosis of axillary lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer* 1992, 70(7):1943-1950.
- [30] Brotherick I, Shenton BK, Cowan WK, Angus B, Horne CH, Higgs MJ, Lennard TW: The relationship between flow-cytometric and immunohistochemically

- detected c-erbB-2 expression, grade and DNA ploidy in breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1995, 41(3):137-145.
- [31] Brothrick I, Shenton BK, Cowan WK, Angus B, Horne CH, Higgs MJ, Lennard TW: p53 expression measured by flow cytometry. A comparison of three monoclonal antibodies and the relationship with grade and DNA ploidy in breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1995, 41(3):146-150.
- [32] Camplejohn RS, Ash CM, Gillett CE, Raikundalia B, Barnes DM, Gregory WM, Richards MA, Millis RR: The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single centre. *Br J Cancer* 1995, 71(1):140-145.
- [33] Chassevent A, Jourdan ML, Romain S, Descotes F, Colonna M, Martin PM, Bolla M, Spyrtos F: S-phase fraction and DNA ploidy in 633 T1T2 breast cancers: a standardized flow cytometric study. *Clin Cancer Res* 2001, 7(4):909-917.
- [34] Christov K, Milev A, Todorov V: DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumors. *Cancer* 1989, 64(3):673-679.
- [35] Clark GM, Mathieu MC, Owens MA, Dressler LG, Eudey L, Tormey DC, Osborne CK, Gilchrist KW, Mansour EG, Abeloff MD *et al*: Prognostic significance of S-phase fraction in good-risk, node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1992, 10(3):428-432.
- [36] Clark GM, Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Vendely P, Pandian MR, Harrington D, McGuire WL: How to integrate steroid hormone receptor, flow cytometric, and other prognostic information in regard to primary breast cancer. *Cancer* 1993, 71(6 Suppl):2157-2162.
- [37] Cornelisse CJ, van de Velde CJ, Caspers RJ, Moolenaar AJ, Hermans J: DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry* 1987, 8(2):225-234.
- [38] Coulson PB, Thornthwaite JT, Woolley TW, Sugarbaker EV, Seckinger D: Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content, and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res* 1984, 44(9):4187-4196.
- [39] Cufer T, Lamovec J, Bracko M, Lindtner J, Us-Krasovec M: Prognostic value of DNA ploidy in breast cancer stage I-II. *Neoplasma* 1997, 44(2):127-132.
- [40] de la Torre M, Nygren P, Larsson R, Lindgren A, Tsuruo T, Bergh J: Expression of the 85-kd membrane protein in primary human breast cancer: relationship to hormone receptor levels, DNA ploidy, and tumor grade. *Hum Pathol* 1995, 26(2):180-185.
- [41] Dowle CS, Owainati A, Robins A, Burns K, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW: Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br J Surg* 1987, 74(2):133-136.
- [42] Dressler LG, Eudey L, Gray R, Tormey DC, McGuire WL, Gilchrist KW, Clark GM, Osborne CK, Mansour EG, Abeloff MD: Prognostic potential of DNA flow cytometry measurements in node-negative breast cancer patients: preliminary analysis of an intergroup study (INT 0076). *J Natl Cancer Inst Monogr* 1992(11):167-172.
- [43] Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WL: DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 1988, 61(3):420-427.
- [44] Eskelinen MJ, Pajarinen P, Collan Y, Pesonen E, Alhava E, Kettunen K, Nordling S: Relationship between DNA ploidy and survival in patients with primary breast cancer. *Br J Surg* 1989, 76(8):830-834.

- [45] Ewers SB, Attewell R, Baldetorp B, Borg A, Ferno M, Langstrom E, Ryden S, Killander D: Flow cytometry DNA analysis and prediction of loco-regional recurrences after mastectomy in breast cancer. *Acta Oncol* 1992, 31(7):733-740.
- [46] Ewers SB, Attewell R, Baldetorp B, Borg A, Langstrom E, Killander D: Prognostic potential of flow cytometric S-phase and ploidy prospectively determined in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1992, 20(2):93-108.
- [47] Ewers SB, Langstrom E, Baldetorp B, Killander D: Flow-cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry* 1984, 5(4):408-419.
- [48] Fallenius AG, Franzen SA, Auer GU: Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. A retrospective study of 227 consecutive cases. *Cancer* 1988, 62(3):521-530.
- [49] Feichter GE, Mueller A, Kaufmann M, Haag D, Born IA, Abel U, Klinga K, Kubli F, Goertler K: Correlation of DNA flow cytometric results and other prognostic factors in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1988, 41(6):823-828.
- [50] Ferno M, Baldetorp B, Borg A, Olsson H, Sigurdsson H, Killander D: Flow cytometric DNA index and S-phase fraction in breast cancer in relation to other prognostic variables and to clinical outcome. *Acta Oncol* 1992, 31(2):157-165.
- [51] Fisher B, Gunduz N, Costantino J, Fisher ER, Redmond C, Mamounas EP, Siderits R: DNA flow cytometric analysis of primary operable breast cancer. Relation of ploidy and S-phase fraction to outcome of patients in NSABP B-04. *Cancer* 1991, 68(7):1465-1475.
- [52] Frierson HF, Jr.: Grade and flow cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas. *Hum Pathol* 1993, 24(1):24-29.
- [53] Gnant MF, Blijham G, Reiner A, Reiner G, Reynders M, Schutte B, van Asche C, Steger G, Jakesz R: DNA ploidy and other results of DNA flow cytometry as prognostic factors in operable breast cancer: 10 year results of a randomised study. *Eur J Cancer* 1992, 28(2-3):711-716.
- [54] Haffty BG, Toth M, Flynn S, Fischer D, Carter D: Prognostic value of DNA flow cytometry in the locally recurrent, conservatively treated breast cancer patient. *J Clin Oncol* 1992, 10(12):1839-1847.
- [55] Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 1987, 47(17):4729-4735.
- [56] Horsfall DJ, Tilley WD, Orell SR, Marshall VR, Cant EL: Relationship between ploidy and steroid hormone receptors in primary invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1986, 53(1):23-28.
- [57] Jakobsen A, Poulsen HS, Madsen EL, Petersen SE, Hansen HS: Ploidy level of human breast carcinoma. Relation to histopathologic features and hormone receptor content. *Acta Radiol Oncol* 1984, 23(2-3):103-107.
- [58] Joensuu H, Alanen K, Falkmer UG, Klemi P, Nordling S, Remvikos Y, Toikkanen S: Effect of DNA ploidy classification on prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* 1992, 52(5):701-706.
- [59] Joensuu H, Toikkanen S, Klemi PJ: DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer* 1990, 66(2):331-340.
- [60] Jonsdottir AB, Stefansson OA, Bjornsson J, Jonasson JG, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE: Tetraploidy in BRCA2 breast tumours. *Eur J Cancer* 2012, 48(3):305-310.

- [61] Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Mattila J, Lauslahti K, Koivula T: Tumour DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 1987, 56(5):637-642.
- [62] Kallioniemi OP, Hietanen T, Mattila J, Lehtinen M, Lauslahti K, Koivula T: Aneuploid DNA content and high S-phase fraction of tumour cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987, 23(3):277-282.
- [63] Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV, Farrar WB, Sickie-Santanello B, DeCenzo J, Young D: Is DNA ploidy an independent prognostic indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma? *Cancer* 1990, 65(7):1577-1582.
- [64] Khan E, Mapara Z, Khan S, Arshad N, Siddiqui T, Pervez S: DNA ploidy analyses in 218 consecutive Pakistani breast cancer patients: does it add anything? *Pathol Oncol Res* 2001, 7(2):125-128.
- [65] Kim DW, Kim CG: Effects of DNA ploidy and S-phase fraction on fluorine-18 FDG uptake of primary breast cancer lesions. *Clin Breast Cancer* 2013, 13(3):196-201.
- [66] Kute TE, Muss HB, Cooper MR, Case LD, Buss D, Stanley V, Gregory B, Galleshaw J, Booher K: The use of flow cytometry for the prognosis of stage II adjuvant treated breast cancer patients. *Cancer* 1990, 66(8):1810-1816.
- [67] Kute TE, Muss HB, Hopkins M, Marshall R, Case D, Kammire L: Relationship of flow cytometry results to clinical and steroid receptor status in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1985, 6(2):113-121.
- [68] Kute TE, Russell GB, Zbieranski N, Long R, Johnston S, Williams H, Stackhouse C, Wilkins L, Evans I, Berry P *et al*: Prognostic markers in node-negative breast cancer: a prospective study. *Cytometry B Clin Cytom* 2004, 59(1):24-31.
- [69] Lewis WE: Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in node-negative breast cancer patients. *Cancer* 1990, 65(10):2315-2320.
- [70] Luzi P, Bruni A, Mangiavacchi P, Cevenini G, Marini D, Tosi P: Ploidy pattern and cell cycle in breast cancer as detected by image analysis and flow cytometry. *Cytometry* 1994, 18(2):79-87.
- [71] Lykkesfeldt AE, Balslev I, Christensen IJ, Larsen JK, Molgaard H, Rasmussen BB, Thorpe S, Rose C: DNA ploidy and S-phase fraction in primary breast carcinomas in relation to prognostic factors and survival for premenopausal patients at high risk for recurrent disease. *Acta Oncol* 1988, 27(6A):749-756.
- [72] Masters JR, Camplejohn RS, Millis RR, Rubens RD: Histological grade, elastosis, DNA ploidy and the response to chemotherapy of breast cancer. *Br J Cancer* 1987, 55(4):455-457.
- [73] Merkel DE, Winchester DJ, Goldschmidt RA, August CZ, Wruck DM, Rademaker AW: DNA flow cytometry and pathologic grading as prognostic guides in axillary lymph node-negative breast cancer. *Cancer* 1993, 72(6):1926-1932.
- [74] Moureau-Zabotto L, Bouchet C, Cesari D, Uzan S, Lefranc JP, Antoine M, Genestie C, Deniaud-Alexandre E, Bernaudin JF, Touboul E *et al*: Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast carcinoma: analysis of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005, 91(1):61-71.
- [75] Muss HB, Kute TE, Case LD, Smith LR, Booher C, Long R, Kammire L, Gregory B, Brockschmidt JK: The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer* 1989, 64(9):1894-1900.

- [76] Noguchi M, Taniya T, Ohta N, Koyasaki N, Miyazaki I, Mizukami Y: Lymph node metastases versus DNA ploidy as prognostic factors for invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 1991, 19(1):23-31.
- [77] O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Allen D, Rubens RD, Richards MA: DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1990, 61(5):671-674.
- [78] O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Rubens RD, Richards MA: Node-negative breast cancer: prognostic subgroups defined by tumor size and flow cytometry. *J Clin Oncol* 1990, 8(12):2040-2046.
- [79] Owainati AA, Robins RA, Hinton C, Ellis IO, Dowle CS, Ferry B, Elston CW, Blamey RW, Baldwin RW: Tumour aneuploidy, prognostic parameters and survival in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1987, 55(4):449-454.
- [80] Peiro G, Lerma E, Climent MA, Segui MA, Alonso MC, Prat J: Prognostic value of S-phase fraction in lymph-node-negative breast cancer by image and flow cytometric analysis. *Mod Pathol* 1997, 10(3):216-222.
- [81] Pinto AE, Andre S, Mendonca E, Silva G, Soares J: Overall survival in advanced breast cancer: relevance of progesterone receptor expression and DNA ploidy in fine-needle aspirates of 392 patients. *Int J Biol Markers* 2003, 18(1):7-12.
- [82] Pinto AE, Andre S, Pereira T, Silva G, Soares J: DNA flow cytometry but not telomerase activity as predictor of disease-free survival in pT1-2/N0/G2 breast cancer. *Pathobiology* 2006, 73(2):63-70.
- [83] Pinto AE, Andre S, Soares J: Short-term significance of DNA ploidy and cell proliferation in breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic markers in a series of 308 patients. *J Clin Pathol* 1999, 52(8):604-611.
- [84] Pinto AE, Pereira T, Santos M, Branco M, Dias A, Silva GL, Ferreira MC, Andre S: DNA ploidy is an independent predictor of survival in breast invasive ductal carcinoma: a long-term multivariate analysis of 393 patients. *Ann Surg Oncol* 2013, 20(5):1530-1537.
- [85] Pinto AE, Pereira T, Silva GL, Andre S: Aneuploidy identifies subsets of patients with poor clinical outcome in grade 1 and grade 2 breast cancer. *Breast* 2015, 24(4):449-455.
- [86] Prasad AR, Divine G, Zarbo RJ: Two-color, cytokeratin-labeled dna flow cytometric analysis of 332 breast cancers: lack of prognostic value with 12-year follow-up. *Arch Pathol Lab Med* 2001, 125(3):364-374.
- [87] Romero H, Schneider J, Burgos J, Bilbao J, Rodriguez-Escudero FJ: S-phase fraction identifies high-risk subgroups among DNA-diploid breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 1996, 38(3):265-275.
- [88] Roos G, Arnerlov C, Emdin S: Retrospective DNa analysis of T3/T4 breast carcinoma using cytophotometry and flow cytometry. A comparative study with prognostic evaluation. *Anal Quant Cytol Histol* 1988, 10(3):189-194.
- [89] Schmidt H, Wei JP, Yeh KA: Predictive value of flow cytometry for metastatic potential in breast cancer. *Am Surg* 1999, 65(5):434-438.
- [90] Sharma S, Mishra MC, Kapur BM, Verma K, Nath I: The prognostic significance of ploidy analysis in operable breast cancer. *Cancer* 1991, 68(12):2612-2616.
- [91] Shiao YH, Chen VW, Lehmann HP, Wu XC, Correa P: Patterns of DNA ploidy and S-phase fraction associated with breast cancer survival in blacks and whites. *Clin Cancer Res* 1997, 3(4):587-592.

- [92] Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, Dalberg M, Ferno M, Killander D, Olsson H, Ranstam J: Flow cytometry in primary breast cancer: improving the prognostic value of the fraction of cells in the S-phase by optimal categorisation of cut-off levels. *Br J Cancer* 1990, 62(5):786-790.
- [93] Stal O, Brisfors A, Carstensen J, Ferraud L, Hatschek T, Nordenskjold B: Relationships of DNA ploidy, S-phase fraction and hormone receptor status to tumor stage in breast cancers detected by population screening. The South-East Sweden Breast Cancer Group. *Int J Cancer* 1992, 51(1):28-33.
- [94] Stal O, Carstensen JM, Wingren S, Rutqvist LE, Skoog L, Klintenberg C, Nordenskjold B: Relationship of DNA ploidy and S-phase fraction to survival after first recurrence of breast cancer. *Acta Oncol* 1994, 33(4):423-429.
- [95] Stal O, Dufmats M, Hatschek T, Carstensen J, Klintenberg C, Rutqvist LE, Skoog L, Sullivan S, Wingren S, Nordenskjold B: S-phase fraction is a prognostic factor in stage I breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1993, 11(9):1717-1722.
- [96] Stal O, Klintenberg C, Franzen G, Risberg B, Arvidsson S, Bjelkenkrantz K, Skoog L, Nordenskjold B: A comparison of static cytofluorometry and flow cytometry for the estimation of ploidy and DNA replication in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1986, 7(1):15-22.
- [97] Stal O, Wingren S, Carstensen J, Rutqvist LE, Skoog L, Klintenberg C, Nordenskjold B: Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in relation to estrogen receptor content and clinicopathological variables in primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989, 25(2):301-309.
- [98] Stanton PD, Cooke TG, Oakes SJ, Winstanley J, Holt S, George WD, Murray GD: Lack of prognostic significance of DNA ploidy and S phase fraction in breast cancer. *Br J Cancer* 1992, 66(5):925-929.
- [99] Stuart-Harris R, Hedley DW, Taylor IW, Levene AL, Smith IE: Tumour ploidy, response and survival in patients receiving endocrine therapy for advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1985, 51(4):573-576.
- [100] Thorud E, Fossa SD, Vaage S, Kaalhus O, Knudsen OS, Borner O, Shoaib MC: Primary breast cancer. Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. *Cancer* 1986, 57(4):808-811.
- [101] Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P: The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer--a study with long-term follow-up. *Br J Cancer* 1989, 60(5):693-700.
- [102] Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P: Nuclear DNA content as a prognostic factor in T1-2N0 breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1990, 93(4):471-479.
- [103] Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S: Prognostic value of DNA ploidy in 653 Japanese women with node-negative breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2001, 6(4):177-182.
- [104] Uytterlinde AM, Baak JP, Schipper NW, Peterse H, Matze E, Meijer CJ: Further evaluation of the prognostic value of morphometric and flow cytometric parameters in breast-cancer patients with long follow-up. *Int J Cancer* 1990, 45(1):1-7.
- [105] van der Linden JC, Lindeman J, Baak JP, Meijer CJ, Herman CJ: The Multivariate Prognostic Index and nuclear DNA content are independent prognostic factors in primary breast cancer patients. *Cytometry* 1989, 10(1):56-61.
- [106] Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Vendely P, Pandian MR, Harrington D, Clark GM, McGuire WL: DNA ploidy, S-phase, and steroid

- receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993, 28(1):9-20.
- [107] Winchester DJ, Duda RB, August CZ, Goldschmidt RA, Wruck DM, Rademaker AW, Winchester DP, Merkel DE: The importance of DNA flow cytometry in node-negative breast cancer. *Arch Surg* 1990, 125(7):886-889.
- [108] Wingren S, Stal O, Nordenskjold B: Flow cytometric analysis of S-phase fraction in breast carcinomas using gating on cells containing cytokeratin. South East Sweden Breast Cancer Group. *Br J Cancer* 1994, 69(3):546-549.
- [109] Wingren S, Stal O, Sullivan S, Brisfors A, Nordenskjold B: S-phase fraction after gating on epithelial cells predicts recurrence in node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 1994, 59(1):7-10.
- [110] Winter K, Eidtmann H, Jonat W: [Flow cytometry detected S-phase fraction and ploidy as prognostic parameters in primary, node-negative breast cancer]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1994, 54(5):291-294.
- [111] Witzig TE, Gonchoroff NJ, Therneau T, Gilbertson DT, Wold LE, Grant C, Grande J, Katzmann JA, Ahmann DL, Ingle JN: DNA content flow cytometry as a prognostic factor for node-positive breast cancer. The role of multiparameter ploidy analysis and specimen sonication. *Cancer* 1991, 68(8):1781-1788.
- [112] Witzig TE, Ingle JN, Cha SS, Schaid DJ, Tabery RL, Wold LE, Grant C, Gonchoroff NJ, Katzmann JA: DNA ploidy and the percentage of cells in S-phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer* 1994, 74(6):1752-1761.
- [113] Witzig TE, Ingle JN, Schaid DJ, Wold LE, Barlow JF, Gonchoroff NJ, Gerstner JB, Krook JE, Grant CS, Katzmann JA: DNA ploidy and percent S-phase as prognostic factors in node-positive breast cancer: results from patients enrolled in two prospective randomized trials. *J Clin Oncol* 1993, 11(2):351-359.
- [114] Wong SW, Rangan AM, Bilous AM, Boyages J, Gebiski V, Benson EM: The value of S-phase and DNA ploidy analysis as prognostic markers for node-negative breast cancer in the Australian setting. *Pathology* 1999, 31(2):90-94.
- [115] Wyss-Desserich MT, Caduff-Joos R, Wyss P, Rageth C, Wight E, Unger C, Walt H, Haller U: Premenopausal node-negative breast cancer: may adjuvant chemotherapy be indicated by the analysis of nuclear DNA dynamics? *Breast Cancer Res Treat* 1997, 42(3):253-263.
- [116] Yuan J, Hennessy C, Corbett IP, Dykin R, Givan AL, Shenton BK, Henry JA, Wright C, Lennard TW: Node negative breast cancer: the prognostic value of DNA ploidy for long-term survival. *Br J Surg* 1991, 78(7):844-848.
- [117] Yuan J, Hennessy C, Givan AL, Corbett IP, Henry JA, Sherbet GV, Lennard TW: Predicting outcome for patients with node negative breast cancer: a comparative study of the value of flow cytometry and cell image analysis for determination of DNA ploidy. *Br J Cancer* 1992, 65(3):461-465.
- [118] Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Mattila J, Lauslahti K, Lehtinen M, Koivula T: Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. A proposed classification of DNA histograms in breast cancer. *Cancer* 1988, 62(10):2183-2190.
- [119] Agilent Dako Denmark A/S Glostrup; HercepTest; verfügbar unter: <https://www.agilent.com/en/product/pharmdx/herceptest-kits/herceptest-76911>; Update vom: 6. Januar 2019

- [120] Remmele W: Neuropathologie, Sinnesorgane, Muskulatur, angeborene Stoffwechselkrankheiten : mit 49 Tabellen; Berlin u.a.: Springer; 1984; p. 259.
- [121] Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983, 31(11):1333-1335.
- [122] Obermann EC, Eppenberger-Castori S, Tapia C: [Assessment of proliferation: core biopsy or resection specimen? Discrepancies in breast cancer with low and high proliferation]. *Pathologe* 2012, 33(3):245-250.
- [123] Schnitt SJ, Connolly JL, Tavassoli FA, Fechner RE, Kempson RL, Gelman R, Page DL: Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria. *Am J Surg Pathol* 1992, 16(12):1133-1143.
- [124] Verkooijen HM, Peterse JL, Schipper ME, Buskens E, Hendriks JH, Pijnappel RM, Peeters PH, Borel Rinkes IH, Mali WP, Holland R *et al*: Interobserver variability between general and expert pathologists during the histopathological assessment of large-core needle and open biopsies of non-palpable breast lesions. *Eur J Cancer* 2003, 39(15):2187-2191.
- [125] Yamaguchi T, Mukai H, Akiyama F, Arihiro K, Masuda S, Kurosumi M, Kodama Y, Horii R, Tsuda H: Inter-observer agreement among pathologists in grading the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer* 2018, 25(1):118-125.
- [126] EndoPredict®; verfügbar unter: <https://endopredict.eu/de/was-ist-endopredict/#12molecule>; Update vom: 28. Januar 2019
- [127] Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T *et al*: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004, 351(27):2817-2826.
- [128] Di Silverio F, D'Eramo G, Buscarini M, Sciarra A, Casale P, Di Nicola S, Loreto A, Seccareccia F, De Vita R: DNA ploidy, Gleason score, pathological stage and serum PSA levels as predictors of disease-free survival in C-D1 prostatic cancer patients submitted to radical retropubic prostatectomy. *Eur Urol* 1996, 30(3):316-321.
- [129] Attallah AM, Elhak NG, Nasif WA, Tabll A, Ezzat F: Detection of p53 protein overexpression and DNA ploidy analysis in colon cancer. *Hepatogastroenterology* 1997, 44(18):1595-1601.
- [130] Choi WT, Wen KW, Rabinovitch PS, Huang D, Mattis AN, Gill RM: DNA content analysis of colorectal serrated lesions detects an aneuploid subset of inflammatory bowel disease-associated serrated epithelial change and traditional serrated adenomas. *Histopathology* 2018, 73(3):464-472.
- [131] Yasa MH, Bektas A, Yukselen V, Akbulut H, Camci C, Ormeci N: DNA analysis and DNA ploidy in gastric cancer and gastric precancerous lesions. *Int J Clin Pract* 2005, 59(9):1029-1033.
- [132] Santoro E, Carboni M, Catarci M, Carlini M, Carboni F, Zupi G, Vecchione A, D'Agnano I, Giannarelli D, Santoro R *et al*: DNA ploidy, proliferative index and EGF-R status in 130 cases of resected gastric cancer--a multivariate analysis. *Hepatogastroenterology* 1997, 44(15):826-837.
- [133] Grignon DJ, Ayala AG, el-Naggar A, Wishnow KI, Ro JY, Swanson DA, McLemore D, Giacco GG, Guinee VF: Renal cell carcinoma. A clinicopathologic and DNA flow cytometric analysis of 103 cases. *Cancer* 1989, 64(10):2133-2140.

- [134] Deans GT, Williamson K, Heatley M, Hamilton P, Arthurs K, Crockard A, Patterson CC, Rowlands BJ, Parks G, Spence RA: The role of flow cytometry in carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1993, 177(4):377-382.
- [135] Bahn DK, Silverman P, Lee F, Sr., Badalament R, Bahn ED, Rewcastle JC: In treating localized prostate cancer the efficacy of cryoablation is independent of DNA ploidy type. *Technol Cancer Res Treat* 2004, 3(3):253-257.
- [136] Syrios J, Kechagias G, Agrogiannis G, Xynos ID, Kavantzias N, Lazaris AC, Amptoulach S, Mourati A, Sougioultzis S, Patsouris ES *et al*: DNA ploidy: a prognostic factor of response to chemotherapy and survival in metastatic gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2013, 33(3):1209-1214.
- [137] Shalev M, Gdor Y, Leventis A, Radnay J, Shapiro H, Bernheim J, Nissenkorn I: The prognostic value of DNA ploidy in small renal cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 2001, 197(1):7-12.
- [138] Currin SM, Lee SE, Walther PJ: Flow cytometric assessment of deoxyribonucleic acid content in renal adenocarcinoma: does ploidy status enhance prognostic stratification over stage alone? *J Urol* 1990, 143(3):458-463.
- [139] Levsky JM, Singer RH: Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* 2003, 116(Pt 14):2833-2838.
- [140] Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL: Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989, 320(10):627-633.
- [141] Eskelinen M, Lipponen P, Papinaho S, Aaltomaa S, Kosma VM, Klemi P, Syrjanen K: DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer. *Int J Cancer* 1992, 51(4):555-561.
- [142] Kute TE, Quadri Y, Muss H, Zbieranski N, Cirrincione C, Berry DA, Barcos M, Thor AP, Liu E, Koerner F *et al*: Flow cytometry in node-positive breast cancer: cancer and leukemia group B protocol 8869. *Cytometry* 1995, 22(4):297-306.
- [143] Meyer JS, Province MA: S-phase fraction and nuclear size in long term prognosis of patients with breast cancer. *Cancer* 1994, 74(8):2287-2299.
- [144] Xu L, Jia S, Li H, Yu Y, Liu G, Wu Y, Liu X, Liu C, Zhou Y, Zhang Z *et al*: Characterization of circulating tumor cells in newly diagnosed breast cancer. *Oncol Lett* 2018, 15(2):2522-2528.
- [145] Bezic J, Samija Projic I, Projic P, Meljanac Salopek K, Zivkovic PM, Bozic J, Tomic S: Pathobiology of HER 2 positive small invasive (T1a,b) breast cancer: "A wolf in sheep's clothing". *Pathol Res Pract* 2017, 213(12):1510-1514.
- [146] Malorni L, Shetty PB, De Angelis C, Hilsenbeck S, Rimawi MF, Elledge R, Osborne CK, De Placido S, Arpino G: Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2012, 136(3):795-804.
- [147] Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, Oga A, Nagashima Y, Sasaki K: Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes* 2012, 5:376.
- [148] Fernandez Val JF, Losada J, Arregui Murua MA, Sarria R: Cell proliferation, nuclear ploidy, and EGFr and HER2/neu tyrosine kinase oncoproteins in infiltrating ductal breast carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002, 138(1):69-72.

- [149] Kim YR, Choi JR, Song KS, Chong WH, Lee HD: Evaluation of HER2/neu status by real-time quantitative PCR in breast cancer. *Yonsei Med J* 2002, 43(3):335-340.
- [150] Peredo R, Sastre G, Serrano J, Hunter Mellado R: Her-2/neu oncogene expression in Puerto Rican females with breast cancer. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001, 47(6):1025-1032.
- [151] Stomper PC, Budnick RM, Stewart CC: Use of specimen mammography-guided FNA (fine-needle aspirates) for flow cytometric multiple marker analysis and immunophenotyping in breast cancer. *Cytometry* 2000, 42(3):165-173.
- [152] Albanell J, Bellmunt J, Molina R, Garcia M, Caragol I, Bermejo B, Ribas A, Carulla J, Gallego OS, Espanol T *et al*: Node-negative breast cancers with p53(-)/HER2-neu(-) status may identify women with very good prognosis. *Anticancer Res* 1996, 16(2):1027-1032.
- [153] Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, Bubendorf L, Mihatsch MM, Moch H, Wilber K *et al*: Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93(15):1141-1146.
- [154] Layfield LJ, Frazier S, Esebua M, Schmidt RL: Interobserver reproducibility for HER2/neu immunohistochemistry: A comparison of reproducibility for the HercepTest and the 4B5 antibody clone. *Pathol Res Pract* 2016, 212(3):190-195.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die Überlassung dieses Themas und für die Möglichkeit die Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Darüber hinaus möchte ich ihm meinen besonderen Dank aussprechen für die wirklich gute und intensive Betreuung und die Zeit, die er sich für mich und meine Arbeit genommen hat.

Herrn PD Dr. Ronald Simon möchte ich speziell danken für die fachliche Unterstützung und Betreuung meiner Dissertation, sowie für die vielen Treffen und für sein offenes Ohr bei Fragen aller Art.

Mein außerordentlicher Dank geht an Dr. Martina Kluth, die mir mit großem Einsatz bei vielen schwierigen Fragestellungen zur Seite stand und mir von Beginn an praktische Hilfe und Ratschläge zu dieser Arbeit gegeben hat.

Christina Möller-Koop danke ich vor allem für die gute Betreuung und Unterstützung während meiner Zeit im Labor und im Archiv.

Zuletzt danke ich meiner Familie und vor allem meiner Frau Kim für ihren Zuspruch und für ihre stetige und uneigennützig Unterstützung, die mir die Arbeit an dieser Dissertation erst möglich gemacht haben.

Danke!

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Eidesstattliche Erklärung

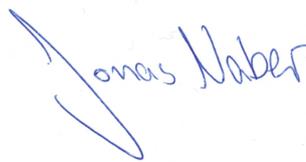
Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, 04.07.2019

Ort, Datum



Unterschrift