

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Operative Medizin
Klinik und Poliklinik für Gynäkologie

Prof. Dr. med. Barbara Schmalfeldt

**Konkordanzraten von intrinsischen Subtypen zwischen Primärtumor und
Lokalrezidiv eines Mammakarzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Carina Straßen
aus Wuppertal

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

11. September 2020

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Isabell Witzel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Prognostische und prädiktive Faktoren	2
1.1.1	TNM-Klassifikation	4
1.1.2	Grading	4
1.1.3	Hormonrezeptorstatus.....	5
1.1.3.1	Östrogenrezeptor	5
1.1.3.2	Progesteronrezeptor	6
1.1.4	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	6
1.1.5	Ki-67-Proliferationsindex	7
1.1.6	Intrinsische Subtypen.....	8
1.1.7	Multigenexpressionsanalysen	10
1.2	Das lokoregionäre Rezidiv	10
1.2.1	Risikofaktoren für das Auftreten eines lokoregionären Rezidivs	11
1.2.2	Inzidenz und Prognose	11
1.2.3	Therapie des lokoregionären Rezidiv.....	12
1.3	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Gewebekollektiv	14
2.2	Tissue Microarray (TMA).....	16
2.2.1	Herstellung des Mamma-Arrays.....	16
2.3	Immunhistochemie (IHC).....	18
2.3.1	Immunhistochemie angewandt am Mamma-TMA.....	18
2.3.2	Auswertung und Interpretation der IHC-Färbungen	26
2.3.2.1	Bewertung des Hormonrezeptorstatus	26
2.3.2.2	Auswertung des Ki-67-PI	26
2.3.2.3	Bewertung des HER2-Status	26
2.4	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	27
2.4.1	FISH angewandt am Mamma-TMA.....	27
2.4.2	Auswertung und Interpretation der HER2-FISH.....	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Patientenkollektiv	32
3.2	Rezeptor- und Subtypendiskordanzen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv	34
3.2.1	Auswertung von Einzelrezeptor- und Subtypendiskordanzen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten	34
3.2.1.1	Östrogenrezeptor	36
3.2.1.2	Progesteronrezeptor	37
3.2.1.3	HER2	38

3.2.1.4	Ki-67	39
3.2.1.5	Intrinsischer Subtyp	40
3.2.2	Auswertung von Einzelrezeptor- und Subtypendiskordanzen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis von TMA-Ergebnissen	43
3.2.2.1	Östrogenrezeptor	45
3.2.2.2	Progesteronrezeptor	46
3.2.2.3	HER2	47
3.2.2.4	Ki-67	48
3.2.2.5	Intrinsischer Subtyp	49
3.3	Vergleich der Ergebnisse von HER2-FISH und HER2-IHC	51
4	Diskussion	52
4.1	Beschreibung der Studienkohorte	53
4.2	Biomarker- und Subtypendiskordanzen zwischen Primarius und Lokalrezidiv eines Mammakarzinoms	54
4.3	Methodenvergleich: HER2-IHC und HER2-FISH	59
4.4	Limitationen	60
5	Zusammenfassung	61
6	Summary	63
7	Abkürzungsverzeichnis	65
8	Abbildungsverzeichnis	67
9	Tabellenverzeichnis	68
10	Literaturverzeichnis	69
11	Danksagung	78
12	Lebenslauf	79
13	Eidesstattliche Erklärung	80

1 Einleitung

Weltweit erkranken jährlich ca. 1.7 Millionen Frauen an einem Mammakarzinom. Etwa eine halbe Millionen Menschen verstirbt jährlich an dessen Folgen. Damit stellt das Mammakarzinom nach dem Bronchialkarzinom insgesamt die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung und die mit Abstand häufigste Tumorerkrankung der Frau weltweit dar [1]. Die Anzahl der invasiven Neuerkrankungen in Deutschland wird pro Jahr auf ca. 70 000 und die der neu diagnostizierten in situ Tumore auf ca. 6 000 geschätzt. Damit besteht allein in Deutschland für Frauen ein Lebenszeitrisko von ca. 13 % an einem Mammakarzinom zu erkranken. Das mittlere Erkrankungsalter liegt dabei im Median bei 64 Jahren. In etwa 1 % der Neuerkrankungen sind Männer betroffen [2].

Infolge verbesserter Früherkennungsmaßnahmen und der Verfügbarkeit effizienter systemischer Therapien konnte in den meisten Industrienationen im Verlauf der letzten Jahre eine sinkende Mortalität von Patientinnen mit einem Mammakarzinom beobachtet werden. Dennoch stellt das Mammakarzinom auch dort weiterhin die zweithäufigste (nach dem Bronchialkarzinom) und in schlechter entwickelten Ländern sogar die häufigste Krebstodesursache der Frau dar [3].

Neben dem initialen Lymphknoten (LK)-Befall und dem Tumorstadium stellt insbesondere das Auftreten eines lokoregionären Rezidivs einen starken unabhängigen Risikofaktor für das Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen dar. Das Ziel eines jeden kurativen Behandlungskonzeptes ist daher die Minimierung des Lokalrezidivrisikos [4, 5].

Im klinischen Alltag wird auf der Basis klinisch-pathologischer Eigenschaften (Grading, Staging, Nodalstatus), molekularer Eigenschaften (ER, PgR, HER2, Ki-67) und unter anderem kommerzieller Signaturen (z. B. Oncotype DX®, MammaPrint®, EndoPredict® oder Prosigna®), die Aggressivität von Tumoren und damit letztlich die Rezidivierungs- bzw. Metastasierungsneigung vorhergesagt. Basierend darauf erfolgt, immer unter Berücksichtigung der jeweiligen Patientenwünsche, die Wahl eines entsprechenden Therapieregimes [6].

Bei allen nicht fortgeschrittenen, d. h. lokoregionär begrenzten Mammakarzinomen steht die vollständige operative Tumorentfernung (d. h. R0-Status = Tumorsektion in sano) im Vordergrund der Therapie [6-8]. Je nach Tumoreigenschaften können (neo)adjuvant Chemotherapeutika, Antikörpertherapien oder eine antihormonelle Therapie eingesetzt werden [6]. Bei dem Nachweis einer Fernmetastasierung (M1) hingegen besteht eine palliative

Therapieintention, mit dem Fokus der Behandlung auf der Systemtherapie. In speziellen Fällen ist auch hier eine operative Therapie sinnvoll (z. B. bei primär metastasierten Mammakarzinomen oder symptomatischen Knochen- oder Hirnmetastasen) [9].

1.1 Prognostische und prädiktive Faktoren

Um der Heterogenität des Mammakarzinoms bei der Therapiewahl gerecht zu werden, erfolgt diese zunehmend personalisiert auf der Basis eines individuell ermittelten Nutzen-Risiko-Profiles. Dazu werden klinisch etablierte *prognostische* und *prädiktive* Faktoren validiert (s. Tabelle 1, S. 3).

Prognostische Faktoren korrelieren mit dem krankheitsfreien oder dem Gesamtüberleben einer Patientin, sofern diese nach der operativen Tumorentfernung keine weitere adjuvante Therapie erhält. Damit geben prognostische Faktoren Aufschluss über den zu erwartenden natürlichen Krankheitsverlauf [10].

Prädiktive Faktoren hingegen geben Hinweise über das potentielle Ansprechen eines Tumors auf eine jeweilige adjuvante systemische Therapie und stellen damit einen therapierelevanten Parameter dar [10, 11].

Ziel ist die Identifikation derjenigen Patientinnen, die tatsächlich von einer adjuvanten Therapie profitieren würden und solcher, bei denen man darauf verzichten kann. Denn insbesondere Chemotherapien besitzen ein breites Nebenwirkungsprofil mit zum Teil lebensbedrohlichen Komplikationen, sodass eine Übertherapie möglichst vermieden werden sollte [12].

Tabelle 1: Übersicht der klinisch etablierten prognostischen und prädiktiven Faktoren [10, 13]

Prognostische Faktoren	Prädiktive Faktoren
pTNM-Status - lokoregionäre Tumorausdehnung - lokoregionärer Lymphknotenbefall - Fernmetastasierung	Endokrine Therapie ➤ Steroidhormonrezeptorstatus: - Östrogenrezeptor (ER) - Progesteronrezeptor (PgR)
Histologisches Grading (G)	Antiöstrogene Therapie ➤ Menopausenstatus
ER/PgR-Status	Anti-HER2-Therapie ➤ HER2-Status
HER2-Status	Adjuvante Chemotherapie ➤ Oncotype DX® (21 gene recurrence score)
Proliferationsmarker Ki-67	Neoadjuvante Chemotherapie
ER/PgR/HER2/Ki-67 als Surrogatmarker für intrinsische Subtypen	Prädiktive Faktoren, die einen signifikanten Vorhersagewert für das Eintreten einer pCR* nach NACT** besitzen: - Junges Alter - cT1-cT2 - N0 - nicht-lobulärer Subtyp - G3 - Negativer ER- und PgR-Status - Positiver HER2-Status - Triple-negative breast cancer (TNBC) - Frühes klinisches Ansprechen
Resektionsrandstatus	
Histologischer Typ (kolloid, muzinös etc.)	
Peritumorale Lymphgefäßinvasion	
Alter	
Multigenexpressionstests - MammaPrint® (70 gene signature) - Oncotype DX® (21 gene recurrence score) - EndoPredict® (11 gene signature) - Prosigna® (PAM50 – 50 gene assay)	

* pathologische Komplettremission; ** neoadjuvanter Chemotherapie

Neben der TNM-Klassifikation sind insbesondere das Grading, der Hormonrezeptor- und HER2-Status von entscheidender Bedeutung für die prognostische Stadiengruppierung [14].

1.1.1 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation stellt eine international einheitliche Systematik zur Beschreibung der anatomischen Ausbreitung maligner Tumore dar. Anhand ihrer erfolgt zudem die Einteilung in die durch die Union for International Cancer Control (UICC) formulierten Tumorstadien. Folgende Kriterien werden in der TNM-Klassifikation berücksichtigt:

[T] – Größe und Ausdehnung des Primärtumors

[N] – Befall regionärer Lymphknoten

[M] – Vorhandensein von Fernmetastasen

Dabei wird mittels der den Buchstaben hintenangestellten Ziffern auf das jeweilige Ausmaß der Tumorausdehnung (T1–4), die Anzahl und Lage betroffener Lymphknoten (N1–3) sowie das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M0/M1) hingewiesen. Des Weiteren wird zwischen einer auf klinischen und pathologischen Untersuchungen basierenden TNM-Klassifikation unterschieden. Der jeweiligen Klassifikation wird dann das entsprechende Präfix „c“ für *clinical* oder „p“ für *pathological* vorangestellt [15].

Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach UICC [15]:

Stadium 0 Tis* N0 M0

Stadium I T1 N0 M0, T0/T1 N1mi** M0

Stadium II T0/T1 N1 M0, T2 N0/N1 M0, T3 N0 M0

Stadium III T0/T1/T2 N2 M0, T3 N1/N2 M0, T4 N0/N1/N2 M0, jedes T N3 M0

Stadium IV jedes T, jedes N, M1

* Tumor in situ

** Mikrometastase

Mit der Bestimmung des Lymphknotenstatus erfasst die TNM-Klassifikation den bisher stärksten prognostischen Faktor für den Krankheitsverlauf bei Mammakarzinompatientinnen. Das krankheitsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben verringern sich dabei mit der Anzahl der betroffenen Lymphknoten, wobei das Auftreten von Lymphknotenmetastasen stark mit der Tumorgröße korreliert [16, 17].

1.1.2 Grading (G)

Alle invasiven Karzinome der Brust werden, basierend auf der histologischen Evaluation von Mitoserate, Kernpleomorphie und Tubulusausbildung (als Ausdruck glandulärer Differenzierung), in drei Differenzierungsgrade (G1–G3) eingeteilt. G1 beschreibt ein Tumorgewebe, das gut differenziert erscheint und sich nur leicht von normalem Brustdrüsengewebe unterscheidet. G3 hingegen beschreibt ein schlecht differenziertes

Gewebe, das stark von der normalen Gewebemorphologie abweicht. Damit gilt, je höher das Grading, desto schlechter die Differenzierung des Tumorgewebes [18]. Zwischen dem Differenzierungsgrad und dem Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen besteht eine signifikante inverse Korrelation. Damit stellt das histologische Grading einen wichtigen prognostischen Faktor dar und bestimmt entscheidend die adjuvante Therapieplanung mit [19].

1.1.3 Hormonrezeptorstatus (HR-Status)

Sowohl der Östrogen- (ER) als auch der Progesteronrezeptor (PgR) zählen zu der Familie der Steroidhormonrezeptoren, womit sie gleichzeitig der Superfamilie der intrazellulären Rezeptoren zugeteilt werden können. Die Steroidrezeptoren liegen im Zytosol der Zelle vor und translozieren nach Ligandenbindung (Östrogen bzw. Progesteron) in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktor fungieren [20]. Die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors gehört schon seit Langem zum Standard der Mammakarzinomdiagnostik. Etwa 70–75 % der invasiven Brusttumore weisen einen positiven Hormonrezeptorstatus auf [21]. Als positiv wird ein Hormonrezeptorstatus dann gewertet, wenn in $\geq 1\%$ der Tumorzellkerne einer oder beide Rezeptoren nachgewiesen werden können [22]. Ihr Nachweis erfolgt immunhistochemisch und hat neben einer eher geringen prognostischen vor allem eine starke prädiktive Bedeutung. Denn das Level der ER- und PgR-Expression steht in einer direkten Korrelation mit dem Ansprechen auf eine (Anti-)Hormontherapie [21].

1.1.3.1 Östrogenrezeptor (ER)

Es werden Östrogenrezeptoren vom Alpha- ($ER\alpha$) und Beta-Typ ($ER\beta$) unterschieden [23]. Im Rahmen der Mammakarzinomtherapie ist insbesondere der Subtyp Alpha¹ von Bedeutung. Er stellt einen durch Östrogene aktivierbaren nukleären Transkriptionsfaktor dar, der das Wachstum und die Differenzierung von Epithelzellen des Brustdrüsengewebes reguliert. Damit induzieren Östrogene bei ER exprimierenden Tumorzellen ein unkontrolliertes Zellwachstum [21]. Ansatzpunkt der endokrinen Therapie ist daher zum einen die Blockade des ER sowie zum anderen die Suppression der Östrogenproduktion. Eine endokrine Therapie ist bei allen Patientinnen mit nachweisbarer ER-Expression indiziert. Die Wahl des zur endokrinen Therapie eingesetzten Medikaments wird durch den Menopausenstatus der Patientin bestimmt. Zur Verfügung stehen Tamoxifen (ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator (SERM)), Aromataseinhibitoren (AI, supprimieren die Produktion von Östrogen), wie z. B.

¹ Der Einfachheit halber wird für den ER-alpha ($ER\alpha$) im Verlauf die Bezeichnung ER benutzt.

Letrozol und als ergänzende Therapieoption die ovarielle Suppression („ovarian function suppression“ (OFS)) mittels GnRH-Analoga (GnRHa) oder bilateraler Ovariectomie [13]. Die adjuvante endokrine Therapie stellt bei HR-positiven Patientinnen eine der effektivsten Therapieoptionen dar. Sowohl Rezidiv- als auch Sterberate werden unabhängig von Patientenalter, Tumorstadium und Vortherapie mit dem Einsatz einer Hormontherapie signifikant gesenkt [24, 25].

1.1.3.2 Progesteronrezeptor (PgR)

Auch der Progesteronrezeptor spielt in der Regulation von Proliferation und Wachstum von Tumorzellen eine entscheidende Rolle. Seine Expression wird ER-abhängig reguliert. Doch trotz dieser Korrelation besteht eine unvollständige Übereinstimmung der Expressionsmuster beider Rezeptortypen, was in der Existenz vier möglicher Phänotyp-Kombinationen resultiert:

- ER+/PgR+
- ER+/PgR–
- ER–/PgR+
- ER–/PgR–

Die vier Phänotyp-Kombinationen gehen hierbei jeweils mit einem signifikant unterschiedlichen Ansprechen auf eine adjuvante Hormontherapie einher. Tumore vom ER+/PgR+-Phänotyp beispielsweise zeigen eine wesentlich geringere Rezidivrate mit entsprechend besserem Outcome als Tumore vom ER+/PgR–-Phänotyp, was bei der Messung nur eines Parameters nicht ersichtlich gewesen wäre. Der alleinige prädiktive Wert der PgR-Bestimmung ist jedoch weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussion [21, 26].

1.1.4 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)

Das humane HER2-Gen (auch HER2/neu oder ERBB2) liegt auf Chromosom 17 und kodiert für das HER2-Protein – einen membranständigen Tyrosin-Kinase-Rezeptor, welcher der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (epidermal growth factor receptor (EGFR)) angehört. HER2 stellt eine normale, von zahlreichen gesunden Epithelzellen exprimierte Komponente dar und reguliert mittels enzymatischer Aktivität seiner intrazellulären Domäne Zellfunktionen wie Proliferation und Apoptose. Damit stellt das HER2-Gen ein klassisches Protoonkogen dar [27].

Studien konnten zeigen, dass es im Rahmen der malignen Tumortransformation bei etwa 15 % aller Brustkrebspatientinnen zu einer, meist auf einer HER2-Genamplifikation basierenden Überexpression von HER2 kommt [21, 28, 29]. Eine HER2-Überexpression wird hierbei mit einer erhöhten Zellproliferation, einer verringerten Apoptose, einem intermediären bis hohen

Grading, einem positiven Lymphknoten- sowie negativen Hormonrezeptorstatus und einer verstärkten Tumorinvasivität assoziiert [27, 30]. Sowohl Abweichungen auf Gen- als auch auf Protein-Ebene werden daher mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf, einer höheren Rezidivrate und einem kürzeren Gesamtüberleben in Verbindung gebracht [28]. Gleichzeitig erlaubt eine HER2-Positivität jedoch den Einsatz einer zielgerichteten HER2-Therapie, z. B. mittels der monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab oder dem Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Trastuzumab-Emastin. Ihr Einsatz führt zu einer statistisch signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens [31-35]. Aufgrund der herausragenden prognostischen sowie prädiktiven Bedeutung des HER2-Status ist seine Bestimmung im Rahmen der Diagnostik und Therapieplanung des Mammakarzinoms obligat [27, 30, 36, 37]. Der Nachweis einer HER2-Positivität erfolgt hierbei mittels immunhistochemischer Verfahren (Nachweis einer Protein-Überexpression) und/oder In-situ-Hybridisierung (ISH, Nachweis einer Genamplifikation) [29].

1.1.5 Ki-67-Proliferationsindex (Ki-67-PI)

Das nukleäre Zellzyklus-Antigen Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, dessen histopathologische Bestimmung einer verbesserten Prognoseabschätzung und adjuvanten Therapieplanung des Mammakarzinoms dient. Ki-67 wird nur in bestimmten Zellzyklus-Phasen proliferierender Zellen exprimiert. Mittels immunhistochemischer Verfahren und dem Einsatz eines monoklonalen Antikörpers kann so die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation bestimmt werden. Typischerweise zeigen gut differenzierte Tumore (G1) eine niedrige ($< 10\%$) und schlecht differenzierte Tumore (G3) eine hohe ($\geq 25\%$) Ki-67-Expression [38]. Hohe Ki-67-Werte werden wiederum mit einer erhöhten Rezidiv- sowie Mortalitätsrate assoziiert [39]. Doch trotz des nachgewiesenen, unabhängigen prognostischen Wertes einer Ki-67-Bestimmung ist sein Einsatz als Prognosefaktor in Fachkreisen umstritten. Kritisiert wird insbesondere, dass die Studien, die eine prognostische Relevanz des Ki-67-Wertes untersuchten, keine einheitlichen Cut-off-Werte für die Differenzierung der verschiedenen Risikogruppen verwendeten. Daneben besteht bezüglich des optimalen Vorgehens bei der Bestimmung und Interpretation des Ki-67-Wertes Uneinigkeit [40]. Dennoch sprechen sich die deutsche Leitliniengruppe [13] und Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) [10], insbesondere im Rahmen der Stratifizierung von Hochrisikopatientinnen in Luminal Tumoren (HR-positive, HER2-negative Mammakarzinome), für die Hinzunahme des Ki-67-PI zu den konventionellen Prognosemarkern aus. Basierend auf den Ergebnissen einer Metaanalyse von Petrelli et al. [39], wird bei einer Ki-67-Positivität von $\geq 25\%$ ein erhöhtes Risiko angenommen. Neben einer prognostischen Bedeutung besitzt die Höhe des Ki-67-Wertes für Patientinnen mit einem Luminal Tumor (HR-positives, HER2-negatives

Mammakarzinom) auch eine prädiktive Aussagekraft. So konnten verschiedene prospektive Studien zeigen, dass Frauen mit einem Mammakarzinom vom Luminal-Subtyp einen größeren Nutzen von einer Chemotherapie haben, wenn der Tumor gleichzeitig eine hohe anstatt eine niedrige Proliferationsaktivität aufweist [41-43]. Demzufolge dient die Bestimmung von Ki-67 nicht nur einer verbesserten Prognoseabschätzung, sondern auch einer verbesserten Nutzen-Risiko-Abwägung im Rahmen der individuellen Therapieplanung.

1.1.6 Intrinsische Subtypen

Schon Anfang des neuen Jahrtausends konnten Perou et al. erstmals auf der Basis von Genexpressionsanalysen bzw. cDNA-Microarrays vier sogenannte intrinsische Subtypen (luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like) des Mammakarzinoms definieren. Die identifizierten Subtypen korrelierten dabei nicht nur mit immunhistochemisch nachweisbaren Phänotypen, sondern wiesen zudem eine signifikante prognostische sowie therapeutische Relevanz auf [44, 45]. Es zeigte sich, dass das Rezidivrisiko neben klinisch-pathologischen Faktoren (wie z. B. Tumorgroße, Nodalstatus, Grading, Patientenalter) maßgeblich von molekularpathologischen Eigenschaften des Primärtumors abhing [46, 47].

Da sich Microarrayanalysen jedoch als schwer in die tägliche Diagnostik integrierbare Methode zur Subtypisierung darstellten, wurden immunhistochemische Algorithmen erarbeitet, die die durch RNA-Expressionsprofile definierten Subtypen nachbilden und damit deren indirekte Bestimmung ermöglichen (s. Tabelle 2) [48, 49].

Tabelle 2: Klinisch-pathologische Definition der intrinsischen Subtypen anhand immunhistochemischer Surrogatmarker [50]

Intrinsischer Subtyp	Klinisch-pathologische Definition	ER	PgR	HER2	Ki-67
Luminal A	Luminal A-like (LA)	+	±	–	niedrig*
Luminal B	Luminal B-like (LB)	+	±	–	hoch*
HER2-enriched	HER2-positiv (non-luminal)	–	–	+	jeder Wert
	HER2-positiv (luminal)	+	±	+	jeder Wert
Basal-like	Triple-negativ (TN)	–	–	–	jeder Wert

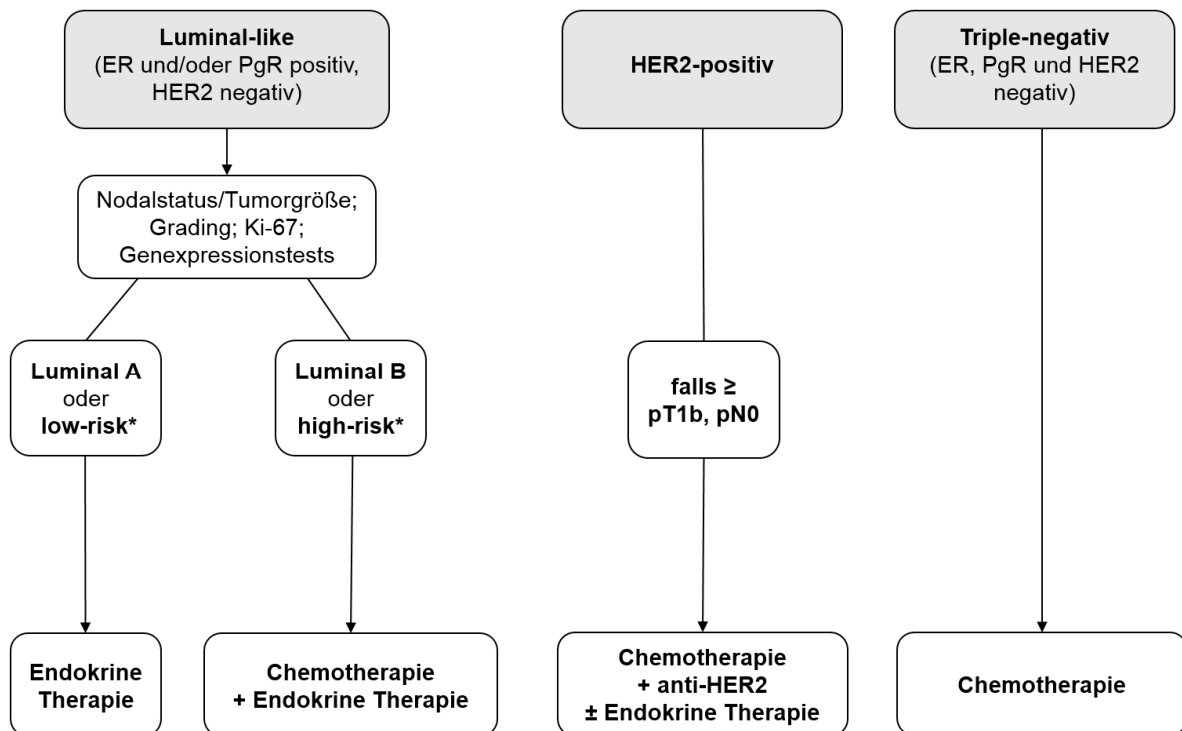
*Derzeit besteht kein internationaler Konsens über einen Cut-off-Wert für Ki-67. Die deutsche Leitliniengruppe orientiert sich an einer Metaanalyse von Petrelli et al. [39] und empfiehlt einen Cut-off-Wert von 25 %.

Somit erfolgt die Subtypisierung im klinischen Alltag meist über die immunhistochemische Bestimmung des Expressionsmusters von ER, PgR, HER2 und dem Proliferationsmarker

Ki-67. Alternativ besteht die Möglichkeit der direkten PAM-50 (Prosigna®) basierten Subtypisierung. Eine kommerzielle Signatur, die anhand des Expressionsmusters von 50 festgelegten Genen einen der vier Subtypen des Mammakarzinoms bestimmt [51, 52]. Nicht immer liefern die beiden zur Subtypisierung eingesetzten Verfahren (Genexpressionsanalysen und IHC) hierbei exakt deckungsgleiche Ergebnisse. So stellen sich z.B. nicht alle triple-negativen als basal-like Tumoren dar und andersherum [53].

Etwa 70 % aller Mammakarzinome stellen sich HR-positiv dar und können somit dem Luminal A- oder Luminal B-Subtyp (mit Ausnahme des HER2-positiven (luminal) Subtyps) zugeordnet werden [50]. HR-positive Tumore besitzen generell eine bessere Prognose als HR-negative Tumore (HER2-positiv, triple-negativ), wobei der Luminal A-Subtyp insgesamt die beste Prognose aufweist. HER2-positive und insbesondere triple-negative Tumore sind im Vergleich durch ein erhöhtes Rezidivrisiko, ein kürzeres krankheitsfreies Intervall sowie Gesamtüberleben gekennzeichnet [47, 54, 55].

Die intrinsische Subtypenbestimmung dient nicht nur einer verbesserten Prognoseabschätzung, sondern auch der Formulierung subtypenabhängiger Therapieprinzipien (s. Abbildung 1).



* die Einteilung in low- und high-risk erfolgt auf der Basis von Genexpressionstests

Abbildung 1: Prinzipien der systemischen (neo)adjuvanten Therapie in Abhängigkeit vom intrinsischen Subtyp (mod. n. [56])

1.1.7 Multigenexpressionsanalysen

In einigen Fällen besteht trotz Berücksichtigung der zuvor beschriebenen klassisch klinischen und histopathologischen Parameter bezüglich der adjuvanten Chemotherapieindikation noch Unsicherheit. Insbesondere bei HR-positiven und HER2-negativen Brustkrebspatientinnen reicht deren alleinige Bewertung für eine sichere Risikostratifizierung und adjuvante Therapieplanung meist nicht aus [57]. In diesen Situationen finden in der Klinik zunehmend kommerzielle Signaturen, wie z. B. Oncotype DX[®], MammaPrint[®], EndoPredict[®] oder Prosigna[®] Verbreitung. Die Genexpressionstests sollen nicht nur die Aggressivität von Tumoren bestimmen, sondern vor allem zu einer genaueren Vorhersage eines Therapieerfolges führen [57, 58]. Ihr Einsatz ermöglicht Ärzten die bessere Abschätzung eines möglichen Chemotherapienutzens und damit eine sicherere Entscheidungsfindung bei der jeweiligen Therapiewahl. Genomische Testergebnisse, die auf ein geringes Rezidivrisiko schließen lassen, ermutigen Ärzte zunehmend dazu, auf eine Chemotherapie zu verzichten und damit ein für die Patientin wesentlich weniger aggressives Therapieregime zu wählen [57]. Cardoso et al. [58] konnten sogar zeigen, dass bei Vorliegen diskordanter Ergebnisse (d. h. die Patientin weist ein hohes klinisches und gleichzeitig niedriges genomisches Rezidivrisiko auf) auf eine Chemotherapie verzichtet werden kann, ohne die Patientin damit einem bedeutend höheren Rezidivrisiko auszusetzen. Der Einsatz der Assays ermöglicht somit die Reduktion der Chemotherapielast insbesondere derjenigen Patientinnen, die nur einen geringen absoluten Nutzen von einer Chemotherapie hätten [57, 59].

1.2 Das lokoregionäre Rezidiv

Das Wiederauftreten einer Tumorerkrankung nach Therapie eines früheren Mammakarzinoms wird als Rezidivkrankung bezeichnet. Hierbei können zwei Manifestationsformen voneinander unterschieden werden. Zum einen das lokalregionär begrenzte Rezidiv und zum anderen die Fernmetastasierung.

Das lokoregionäre Rezidiv fasst wiederum zwei Formen des Rezidivs zusammen:

Das *lokale* Rezidiv ist definiert als das Wiederauftreten der Primärerkrankung in Form eines epithelialen invasiven Tumors oder duktalen Carcinoma in situ (DCIS) in der ipsilateralen Brust (nach brusterhaltender Operation – sog. intramammäres Rezidiv) oder an der ipsilateralen Thoraxwand (nach modifizierter radikaler Mastektomie – sog. Brustwandrezidiv).

Das *regionäre* Rezidiv ist definiert als das Wiederauftreten der Primärerkrankung in ipsilateralen axillären, supra-, infraklavikulären oder intramammären Lymphknoten sowie Lymphknoten entlang der Mammaria-interna-Gefäße [60].

1.2.1 Risikofaktoren für das Auftreten eines lokoregionären Rezidivs

Das Auftreten von lokoregionären Rezidiven nach brusterhaltender Therapie oder Mastektomie hängt vor allem von den bei Erstdiagnose vorliegenden Risikofaktoren ab. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die mit einem lokoregionären Rezidiv assoziierten Faktoren.

Tabelle 3: Lokoregionäres Rezidiv - Risikofaktoren bei Primärdiagnose [10, 13]

-
- **Patienteneigenschaften**
 - junges Alter
 - Übergewicht (Body-Mass-Index)
 - **nicht optimale Ersttherapie**
 - R1-Resektion des Primärtumors
 - unterlassene Strahlentherapie (falls adjuvant indiziert)
 - **fortgeschrittene Tumorerkrankung**
 - pT > 2 cm
 - Anzahl befallener axillärer Lymphknoten
 - **biologische Tumoreigenschaften**
 - Grading G3
 - vaskuläre Invasion (Hämangiosis, Lymphangiosis)
 - ausgedehnte intraduktale Komponente
 - HR-negativ
 - HER2-positiv oder triple-negativ
 - erhöhter Proliferationsmarker (z. B. Ki-67)
 - **inflammatorisches Mammakarzinom**
 - **Multifokalität**
-

HR, Hormonrezeptor

1.2.2 Inzidenz und Prognose

Die Inzidenz lokoregionärer Rezidive variiert je nach Zutreffen der in Tabelle 3 aufgeführten Risikofaktoren stark [61-63]. Ein kürzlich veröffentlichtes Review von Spronk et al. [63] gibt nach einem medianen Follow-Up von 10.5 Jahren, eine mediane kumulative Lokalrezidivrate von 6.2 % (Streuungsbreite (SB): 1.9–11.1 %) an. Die Häufigkeiten und Überlebensraten der verschiedenen lokoregionären Rezidivformen wurden von Haffty et al. [64] untersucht und sind in Tabelle 4 auf Seite 12 dargestellt.

Tabelle 4: Inzidenz und Prognose der verschiedenen lokoregionären Rezidive [10, 64]

Lokalisation	Häufigkeit (%) nach 10 Jahren	5-Jahres-Überleben (%)
Ipsilaterales Rezidiv (nach Brusterhaltung + Radiatio)	5–10	65
Thoraxwandrezidiv (nach Mastektomie)	4	50
Ipsilaterales Axillarezidiv (nach Axilladisektion)	1	55

Prognostisch gelten sowohl für das intramammäre als auch für das Thoraxwandrezidiv einige der primären Prognosefaktoren (s. Tabelle 1, S. 3) weiter. Dabei werden insbesondere ein negativer initialer (im Rahmen der Primärerkrankung) Lymphknoten-Status, eine kleine Tumorgöße des Rezidivs, eine vollständige Entfernung des Rezidivtumors (R0-Resektion) und ein sog. „spätes“ Rezidiv (krankheitsfreies Intervall > 2 Jahre) als positive prognostische Faktoren gewertet [4, 5, 65, 66]. Alle Formen des lokoregionären Rezidivs korrelieren mit einem signifikant höheren Risiko für Fernmetastasen und einer brustkrebsassoziierten Mortalität [4, 5].

1.2.3 Therapie des lokoregionären Rezidiv

Vor der Therapieplanung sollte eine erneute patho-histologische Reevaluation des Rezidivtumors (ER, PgR, HER2, Ki-67) durchgeführt sowie eine Fernmetastasierung mittels Re-Staging ausgeschlossen werden [10, 37]. Liegt ein isoliertes lokoregionäres Rezidiv vor (in 50–70 % der Fälle), d. h. es konnte keine simultane Fernmetastasierung nachgewiesen werden, wird in der Regel ein kurativer Therapieansatz verfolgt [67]. Bei der Therapie der Rezidivkrankung stehen ähnliche Therapieoptionen wie zur Behandlung der Primärerkrankung zur Verfügung. Der Fokus liegt auch hier auf der lokalen Tumorkontrolle durch eine R0-Resektion. Ob eine adjuvante Bestrahlung und Systemtherapie erfolgt, muss individuell entschieden und von der jeweiligen Vortherapie bei Erstdiagnose und des erneut bestimmten HR- bzw. HER2-Status abhängig gemacht werden [10, 37].

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Auftreten eines lokoregionären Rezidivs stellt einen starken unabhängigen Prognosefaktor dar, der mit einem ungünstigen Langzeit-Outcome assoziiert ist [68]. Dennoch besteht bei einer optimalen Rezidivtherapie die Chance auf Heilung. Das Wissen über die genauen Tumoreigenschaften der Rezidivkrankung stellt dabei einen essenziellen Baustein einer optimalen Therapieplanung dar. Lange Zeit galten die bei Primärerkrankung erhobenen Tumoreigenschaften auch als Grundlage für Therapieentscheidungen im Rahmen einer Rezidivkrankung. Heute weiß man, dass es nicht selten im Verlauf der Tumorprogression zu einer Veränderung des Biomarkerprofils und damit gleichzeitig des intrinsischen Subtyps kommt [69, 70]. Die publizierten Angaben über die Häufigkeit einer solchen Rezeptor- bzw. Subtypendiskordanz zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv divergieren hierbei stark und sind aufgrund des häufig retrospektiven Studiencharakters nicht ausreichend verlässlich.

Ziel der vorliegenden Studie war es, einen Tissue Microarray (TMA) aus Tumorgewebeproben von Mammakarzinompatientinnen vor und nach Rezidivierung zu erstellen. Dieser TMA sollte dann in einem zweiten Schritt auf die subtypendefinierenden molekularen Marker (ER, PgR, HER2, Ki-67) erneut untersucht werden. Unterschiede in der Markerpositivität und im intrinsischen Subtyp vor und nach Rezidivierung sollten als Endpunkt der Studie bestimmt werden. Fälle, in denen kein Gewebematerial für die TMA-Herstellung gesichert werden konnte, wurden auf der Basis retrospektiv erhobener Rezeptorstatus ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Basierend auf einer Patienten-Datenbank (IBM® SPSS® Statistics Version 21) der Klinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) konnten innerhalb der Jahre 1994 bis 2015 337 Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms erfasst werden. In Kooperation mit dem pathologischen Institut des UKE konnten wiederum 135 Rezidivfälle identifiziert werden, in denen die Patientin sowohl bei Primär- als auch Rezidivkrankung im UKE operativ behandelt und entsprechendes Gewebematerial (in Form eines Exzidats oder Abladats) archiviert wurde. Da für diese Arbeit ausschließlich lokoregionäre Erstrezidive mit invasiver und/oder intraduktaler Komponente von Relevanz waren, wurden von den 135 identifizierten Rezidivfällen wiederum 35 ausgeschlossen (s. Abbildung 2, S. 15). Damit wurden insgesamt 100 Rezidivfälle in die Auswertung dieser Arbeit einbezogen. Um die für die TMA-Herstellung geeigneten Tumorböcke zu identifizieren, erfolgte zunächst ein pathologisches Review der entsprechenden Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Gewebeschnitte. Anschließend wurden die für die TMA-Herstellung als geeignet befundenen Tumorböcke aus dem Archiv der Pathologie herausgesucht. Insgesamt konnten so von den ursprünglich 100 identifizierten Tumorkollekten 49 für die TMA-Herstellung genutzt und erneut auf ausgewählte histopathologische Marker (ER, PgR, HER2, Ki-67) untersucht werden. In den 51 Fällen, in denen kein Gewebematerial von Primär- und Rezidivtumor sichergestellt werden konnte, erfolgte der Vergleich der Rezeptorstatus auf der Basis retrospektiv erhobener Daten. Das Flussdiagramm in Abbildung 2 auf Seite 15 gibt einen detaillierten Überblick über den Selektionsvorgang des Patientenkollektivs.

Die für die 100 Patientinnen erhobenen klinisch-pathologischen Daten wurden ebenfalls retrospektiv aus Akten und Datenbanken der Klinik für Gynäkologie und Pathologie sowie dem Klinischen Krebsregister am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf entnommen. Zuletzt wurde im Oktober 2016 ein Follow-Up der Datenbank erstellt. Vor der Nutzung klinischer Daten und Gewebeproben für Studienzwecke wurde ein Votum der Ethikkommission (PV4787) der Ärztekammer Hamburg eingeholt.

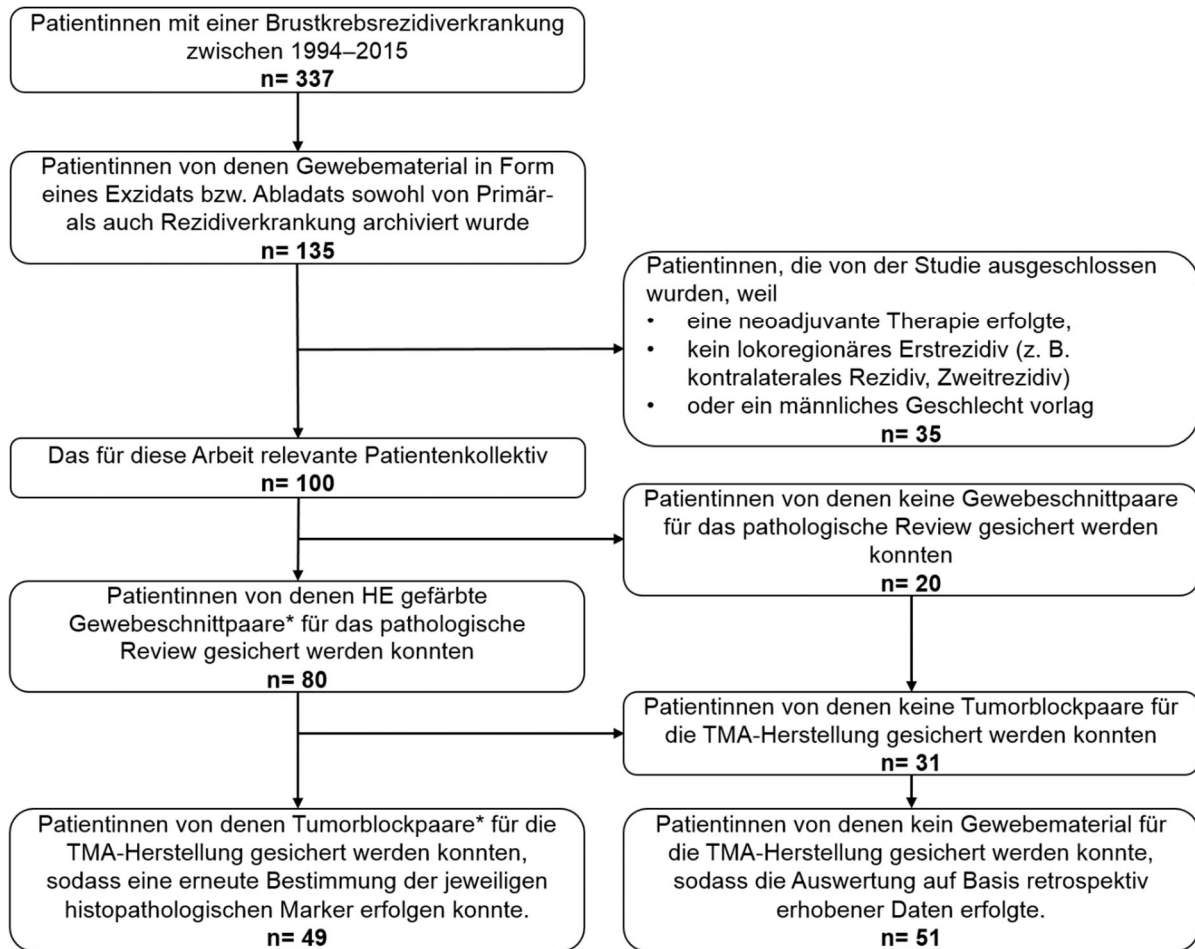


Abbildung 2: Selektion des Patientenkollektivs. *Ein Gewebeschnitt- bzw. Tumorblockpaar liegt vor, wenn sowohl von Primarius als auch korrespondierendem Lokalrezidiv ein Schnitt bzw. Block vorliegt.

2.2 Tissue Microarray (TMA)

Viele Gene bzw. Genprodukte und Signalwege, die Zellproliferation, -teilung und -differenzierung kontrollieren, spielen in der Entwicklung von Karzinomen oder anderen Erkrankungen eine zentrale Rolle [71]. Eine effiziente Identifikation und Validierung solcher potenzieller Kandidatengene erfordert die Analyse großer Fallzahlen [72].

Erst die Einführung der Tissue Microarray-Technik durch Kononen et al. ermöglichte die simultane in situ Analyse von bis zu 1 000 Gewebeproben auf DNA-, Protein- oder RNA-Ebene [73, 74]. Hierbei finden vor allem die Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz- oder RNA-in-situ-Hybridisierung (FISH, RNA-ISH) Anwendung [75]. Durch das Vorfinden exakt gleicher experimenteller Bedingungen für alle Tumorproben und der Möglichkeit der simultanen Auswertung durch eine Person stellt die TMA-Technik nicht nur eine extrem zeit- und kosteneffiziente Methode dar, sondern gewährleistet vor allem ein enorm hohes Maß an Standardisierung und Reproduzierbarkeit [72]. So schaffte die TMA-Technik die Voraussetzung für die Subtypisierung vieler Tumore und etablierte sich als unverzichtbares Werkzeug der translationalen Forschung [71].

2.2.1 Herstellung des Mamma-Arrays

Als Donormaterial für die TMA-Herstellung dienten die 98 (49 Matches) im Archiv der Pathologie gesicherten, formalinfixierten und paraffineingebetteten (FFPE) Tumorgewebeproben sowie fünf Referenzgewebeproben von Brustdrüsennormalgewebe. Vor der eigentlichen Array-Konstruktion erfolgte die Anfertigung eines Stanzschemas, sodass die Gewebestanden im Verlauf den jeweiligen Patientendaten zugeordnet werden konnten (s. Abbildung 3).

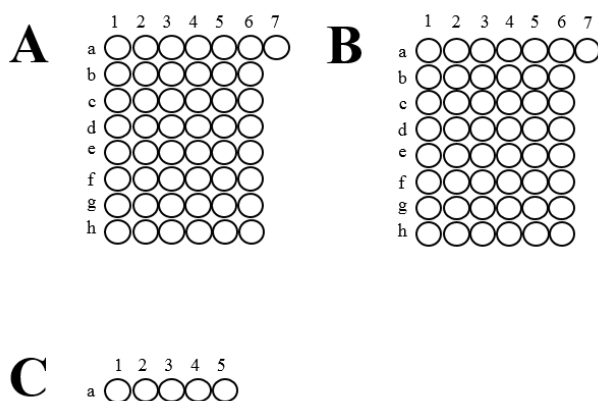


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mamma-Arrays. Abschnitt A umfasst alle 49 Gewebestanden der Primär-, Abschnitt B alle 49 Gewebestanden der Rezidivkrankung. Als Referenz enthält Abschnitt C 5 Gewebestanden von Brustdrüsennormalgewebe.

Die Auswahl des richtigen Entnahmeareals aus dem Spenderblock ist für die Konstruktion eines Array-Blocks von essenzieller Bedeutung. Daher wurde im Rahmen des pathologischen Reviews ein repräsentatives Tumorareal auf dem zum jeweiligen Donorblock korrespondierenden HE-Schnitt markiert.

Die eigentliche TMA-Konstruktion erfolgte dann in drei Schritten (s. Abbildung 4):

1. Zunächst wurden mit Hilfe eines halb-automatisierten Stanzgerätes in einen leeren, sog. Empfängerparaffinblock (Rezipient) Löcher entsprechend des vorgefertigten Array-Schemas gebohrt (in der Abbildung nicht dargestellt).
2. Dann wurde jedem Spenderblock (Donor) in dem zuvor auf dem HE-Schnitt markierten Tumorareal ein Gewebszylinder mit einem Diameter von 0.6 mm entnommen (a).
3. Dieser wurde im Anschluss in den vorbereiteten Empfängerparaffinblock (Rezipient) eingebracht (b).

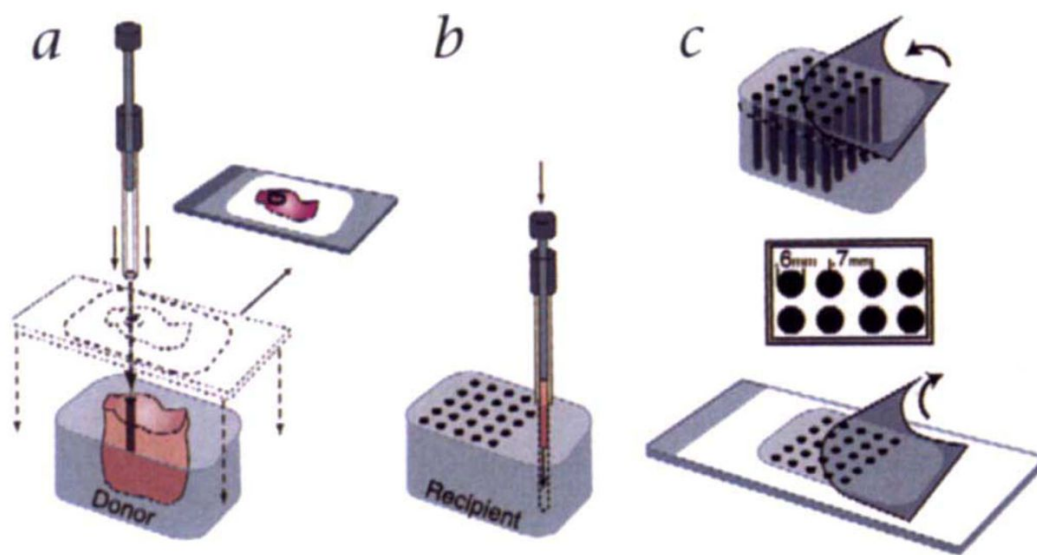


Abbildung 4: TMA-Konstruktion. Quelle: Kononen et al.; Nat.Med., 1998 [71].

Der so entstandene TMA besteht aus einem Block mit insgesamt 98 Tumor- und 5 Normalgewebestanzten.

Für die weitere Aufarbeitung mittels immunhistochemischer Verfahren und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden 4 µm dicke Schnitte des Mamma-Arrays angefertigt und auf einem Objektträger fixiert (s. Abbildung 4, Schritt c). Für jeden der nachzuweisenden Biomarker wurde jeweils ein TMA-Gewebeschnitt angefertigt.

2.3 Immunhistochemie (IHC)

Die erste erfolgreiche Anwendung einer immunhistochemischen Methode geht auf das Jahr 1941 zurück. Damals gelang Coons und Mitarbeitern der Nachweis von Pneumokokkenantigenen in Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer Fluorescein-markierter Antikörper [76]. Inzwischen gehört die IHC zum methodischen Standardrepertoire in der wissenschaftlichen und klinisch-diagnostischen Pathologie. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion und ermöglicht den Nachweis aller (nukleärer, zytoplasmatischer und membranöser) Zellantigene. Besonders bei der Differenzierung von Karzinomen in verschiedene Immunphänotypen kommt der IHC eine zunehmend wichtige Bedeutung zu. Auch die Subtypisierung des Mammakarzinoms basiert auf der Anwendung immunhistochemischer Verfahren und spielt damit im Rahmen der Diagnose- und Prognosestellung sowie insbesondere der Therapieplanung eine entscheidende Rolle.

2.3.1 Immunhistochemie angewandt am Mamma-TMA

Mit dem Ziel der intrinsischen Subtypenbestimmung erfolgte die immunhistochemische Expressionsanalyse folgender Antigene:

- Östrogenrezeptor (ER)
- Progesteronrezeptor (PgR)
- Ki-67
- HER2

Um möglichst hoch standardisierte Bedingungen zu schaffen, wurden die Schnitte des Mamma-Arrays alle an einem Tag und in einem Experiment auf das jeweilige Antigen untersucht. Der Nachweis erfolgte dann durch den Einsatz antigenspezifischer Antikörper (s. Tabelle 5, S. 20).

Vor der eigentlichen immunhistochemischen Färbung müssen die in formalinfixierten und paraffineingebetteten (FFPE) Gewebeschnitte einer Entparaffinierung, Rehydrierung und einem heat induced epitope retrieval (HIER) unterzogen werden. Hierbei kommt es durch Hitzeeinwirkung zur Lösung fixationsbedingter Proteinvernetzungen (Crosslinking) und damit zu einer Demaskierung (Retrieval) von Antigenstrukturen. Das Antigen Retrieval (AR) ermöglicht daher oft erst die spätere Antigenbindung durch einen Antikörper. Bei Peroxidase basierten IHC-Färbungen wird in einem nächsten Schritt die endogene Peroxidase mittels Wasserstoffperoxid (H_2O_2) blockiert. Damit sollen unspezifische bzw. falsch positive Färberesultate vermieden werden. Es folgt die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper (s. Abbildung 5 und 6, S. 19, Schritt 1). Anschließend findet die Immunodetektion (Nachweis einer Primärantikörperbindung) statt. Hierbei werden

Sekundärantikörper (sog. Brückenantikörper oder engl. link antibodies (LINKER); s. Abbildung 5, Schritt 2) eingesetzt. Diese sind gegen das Fc-Fragment des antigenbindenden Primärantikörpers gerichtet und stellen so eine Verbindung zwischen dem Primärantikörper und dem nachfolgenden Reagenz her. Alternativ können direkt Peroxidase- und Antikörpergekoppelte Polymerkonjugate eingesetzt werden (s. Abbildung 6, Schritt 2). Die Notwendigkeit eines LINKER-Einsatzes ist von dem nachzuweisenden Antigen abhängig und dient dazu, das Signal des gebundenen Primärantikörpers um ein Vielfaches (vier- bis fünffach) zu verstärken. Die Visualisierung des gebundenen Antikörpers erfolgt anschließend durch Hinzugabe eines chromogenen Substrats (hier: 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), s. Abbildung 5, Schritt 4 und Abbildung 6, Schritt 3). Dabei wird das zunächst farblose Substrat durch die polymergebundene Peroxidase (hier: horseradish peroxidase (HRP)) in einen braunen Farbkomplex umgewandelt.

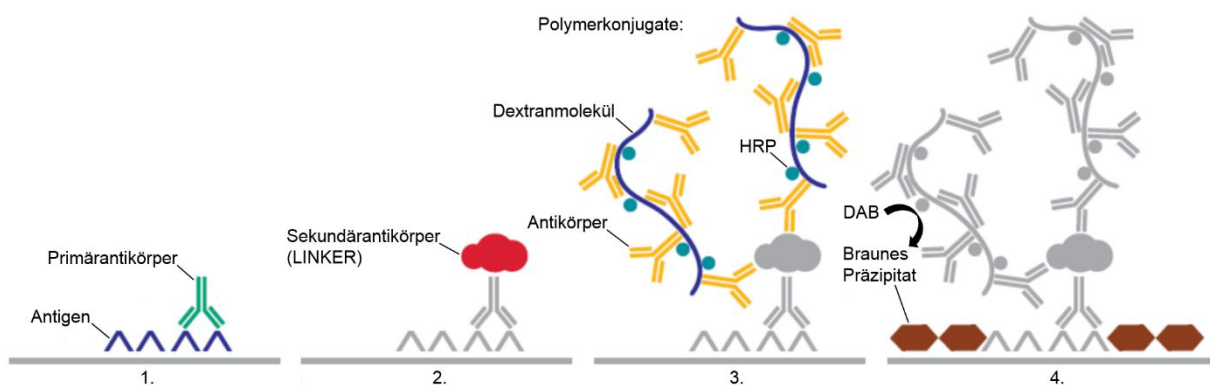


Abbildung 5: IHC mit LINKER-Einsatz. Mod. n. Kanidis; 2011 [77]. 1. Inkubation mit dem Primärantikörper, 2. Inkubation mit dem Sekundärantikörper (LINKER), 3. Inkubation mit dem HRP- und antikörpermarkiertem Polymerkonjugat, 4. Hinzugabe des chromogenen Substrats (DAB)

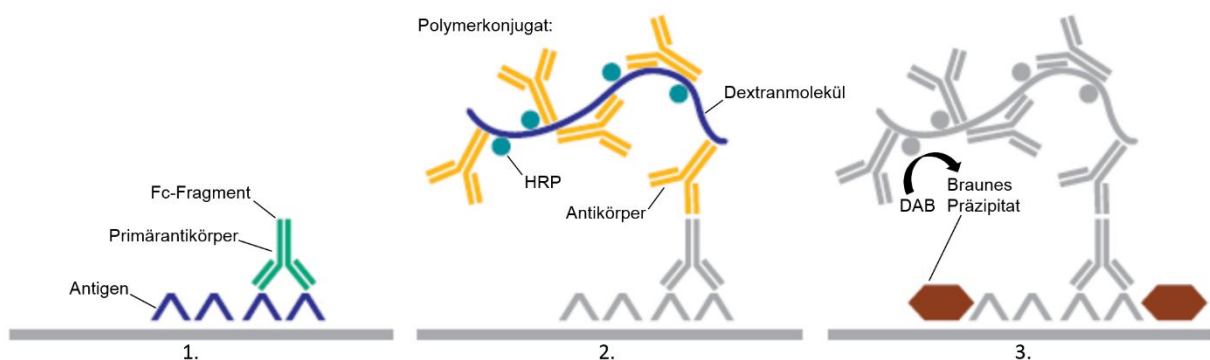


Abbildung 6: IHC ohne LINKER-Einsatz. Mod. n. Kanidis; 2011 [77]. 1. Inkubation mit dem Primärantikörper, 2. Inkubation mit dem HRP- und antikörpermarkiertem Polymerkonjugat, 3. Hinzugabe des chromogenen Substrats (DAB)

Detaillierte, an das jeweilige Antigen angepasste Färbeprotokolle sind nachfolgend dargestellt:

IHC-Färbung von ER, PgR und Ki-67

Die IHC-Färbung der Antigene ER, PgR und Ki-67 erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll. Lediglich im Rahmen des PgR-Nachweises wurde zur Signalverstärkung ein Sekundärantikörper (LINKER) eingesetzt. Sowohl die Vorbehandlung als auch die anschließende IHC-Färbung der Gewebeschnitte erfolgte vollautomatisiert mittels PT Link (pre-treatment system) und dem Autostainer Link 48 der Firma Dako. Tabelle 5 und 6 stellen alle verwendeten Antikörper und Reagenzien dar.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper ER α /PgR/Ki-67-IHC

Antigen	Primärantikörper	Klon	Sekundärantikörper
ERα	FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α (Ready-to-Use)	Clone EP1 (Dako IR084)	—
PgR	FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor (Ready-to-Use)	Clone PgR636 (Dako IR068)	EnVision™ FLEX + Mouse (LINKER) (Code-Nr. K8021)
Ki-67	FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67 Antigen (Ready-to-Use)	Clone MiBi1 (Dako IR626)	—

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien und Kits ER/PgR/Ki-67-IHC

Reagenzien/Kits	Firma
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)	Dako, Gastrup, Dänemark
EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)	Dako, Gastrup, Dänemark
EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	Dako, Gastrup, Dänemark
Dako FLEX Ready-to-Use (RTU) Primary Antibodies	Dako, Gastrup, Dänemark
EnVision™ FLEX + Mouse (LINKER)	Dako, Gastrup, Dänemark
EnVision™ FLEX/HRP Detection Reagent	Dako, Gastrup, Dänemark
EnVision™ FLEX DAB + Chromogen	Dako, Gastrup, Dänemark
EnVision™ FLEX Substrate Buffer	Dako, Gastrup, Dänemark
EnVision™ FLEX Hematoxylin	Dako, Gastrup, Dänemark
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR, Darmstadt
Ethanol 70 % (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 80 % (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 90 % (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 96 % (vergällt)	VWR, Darmstadt

Reagenzvorbereitung

- EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (TRS), High pH (50x)
Verdünnung: 1:50: 1 L: 20 mL TRS + 980 mL destilliertes Wasser
- EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)
Verdünnung: 1:20: 1 L: 50 mL Wash Buffer + 950 mL destilliertes Wasser
- EnVision™ FLEX Substrate Working Solution
1 mL EnVision™ FLEX Substrate Buffer + 1 Tropfen EnVision™ FLEX DAB + Chromogen
- Ethanolserie: drei Gefäße mit einer 70 % – 80 % – 90 % – 96 % Ethanollösung vorbereiten

Protokoll

1. Vorbehandlung (vollautomatisiert)

Entparaffinierung, Rehydrierung und hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) der Objektträger nach dem 3-in-1-Verfahren im PT Link (Dako):

- Nach Herstellung der Arbeitslösung durch Verdünnung der konzentrierten EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x), PT Link Tanks mit Arbeitslösung füllen und auf 85 °C erwärmen
- Sobald die Arbeitslösung in den PT Link Tanks eine Temperatur von 85 °C erreicht hat, werden die auf Objektträger aufgebrachten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte in die Arbeitslösung eingebracht
- Arbeitslösung weiter auf 95 °C erhitzen
- Sobald die Arbeitslösung in den PT Link Tanks eine Temperatur von 95 °C erreicht hat, Objektträger für weitere 15 Minuten inkubieren
- Dann die Autostainer-Gestelle mit den Objektträgern aus den PT Link Tanks nehmen, in verdünnte EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) Lösung stellen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) abkühlen lassen

Anschließend Autostainer-Gestelle mit den Objektträgern in den Autostainer Link 48 (Dako) einsetzen und mit der Behandlung bei RT fortsetzen.

2. Peroxidase Block

- Objektträger mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) spülen
- Objektträger 5 Minuten in 200 µL EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (H₂O₂) inkubieren
- Objektträger mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) spülen

3. Antikörperinkubation

- Objektträger 20 Minuten in 200 µL des jeweiligen Ready-to-Use (RTU) Primärantikörpers (s. Tabelle 5, S. 20) inkubieren
- Objektträger mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) spülen
- Folgende zwei Schritte nur bei IHC-Nachweis von PgR:
 - Objektträger 15 Minuten in 200 µL EnVision™ FLEX+Mouse (LINKER) inkubieren
 - Objektträger mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) spülen
- Objektträger 20 Minuten in 200 µL EnVision™ FLEX/HRP Detection Reagent (Labelled Polymer) inkubieren
- Objektträger mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) spülen
- Spülung mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) wiederholen

4. Visualisierung

Hinzugabe des Chromogens (Substrat):

- Objektträger 10 Minuten in 400 µL EnVision™ FLEX Substrate Working Solution inkubieren
- Objektträger mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) spülen

5. Gegenfärbung

Blaufärbung der Zellkerne:

- Objektträger 5 Minuten in 200 µL EnVision™ FLEX Hematoxylin inkubieren
- Objektträger 5 Minuten mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) spülen
- Objektträger mit destilliertem Wasser spülen
- Objektträger unter fließendem Leitungswasser spülen

6. Fixation

- Objektträger mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 % – 80 % – 90 % – 96 %) dehydrieren
- Schnittpräparate werden automatisch mit Folie eingedeckt

IHC-Färbung von HER2:

Für den IHC-Nachweis einer Überexpression des HER2-Proteins wurde der HercepTest™ eingesetzt. Nach einer manuellen Vorbehandlung (Entparaffinierung, Rehydrierung und Antigen Retrieval (AR)) des formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitts erfolgte die IHC-Färbung ebenfalls vollautomatisiert mit dem Autostainer Link 48 der Firma Dako.

Tabelle 7: Verwendeter Antikörper HER2-IHC

Antigen	Primärantikörper
HER2	Rabbit Anti-Human HER2 Protein (Dako SK001)

Tabelle 8: Verwendete Reagenzien und Kits HER2-IHC

Reagenzien/Kits	Firma
Dako Kit-HercepTest™ for Automates Link Platforms	Dako, Gastrup, Dänemark
HercepTest™ Epitope Retrieval Solution (10x)	Dako, Gastrup, Dänemark
Dako Wash Buffer (10x)	Dako, Gastrup, Dänemark
HercepTest™ Peroxidase-Blocking Reagent	Dako, Gastrup, Dänemark
HercepTest™ Rabbit Anti-Human HER2 Protein	Dako, Gastrup, Dänemark
HercepTest™ Visualization Reagent	Dako, Gastrup, Dänemark
HercepTest™ DAB Substrate Buffer	Dako, Gastrup, Dänemark
HercepTest™ DAB Chromogen	Dako, Gastrup, Dänemark
EnVision™ FLEX Hematoxylin	Dako, Gastrup, Dänemark
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR, Darmstadt
Ethanol 70 % (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 80 % (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 90 % (vergällt)	VWR, Darmstadt

Reagenzvorbereitung:

- HercepTest™ Epitope Retrieval Solution (10x)
Verdünnung: 1:10: 1L: 100 mL HercepTest™ Epitope Retrieval Solution + 900 mL destilliertes Wasser
- Dako Wash Buffer (10x)
Verdünnung: 1:10: 1L: 100 mL Dako Wash Buffer + 900 mL destilliertes Wasser

- Substrat-Chromogenlösung (DAB)
Mischung: 25 µL HercepTest™ DAB Chromogen + 1 mL HercepTest™ DAB Substrate Buffer
- Ethanolserie: drei Gefäße mit einer 70 % – 80 % – 90 % – 96 % Ethanollösung vorbereiten

Protokoll

1. Vorbehandlung (manuell)

1.1 Entparaffinierung und Rehydrierung (erfolgt bei RT)

- Objektträger in ein Xylolbad stellen und 5 Minuten inkubieren. Den Vorgang dreimal in einem frischen Bad wiederholen.
- Objektträger für 1 Minute in 100 % Ethanol eintauchen. Den Vorgang einmal in einem frischen Bad wiederholen.
- Objektträger für 1 Minute in 96 % Ethanol eintauchen. Den Vorgang einmal in einem frischen Bad wiederholen.
- Objektträger für 1 Minute in 80 % Ethanol eintauchen. Den Vorgang einmal in einem frischen Bad wiederholen.
- Objektträger für mindestens 30 s mit destilliertem Wasser spülen.

1.2 Antigen Retrieval (AR)

- Coplin-Schalen (Färbeschalen) mit der verdünnten HercepTest™ Epitope Retrieval Solution (10x) füllen und in ein Wasserbad stellen.
- Wasserbad auf 95 °C erwärmen.
- Entparaffinierte Gewebeschnitte in die vorgewärmte HercepTest™ Epitope Retrieval Solution (10x) eintauchen.
- Objektträger 40 Minuten bei 95 °C inkubieren.
- Coplin-Schalen aus dem Wasserbad nehmen und Objektträger 20 Minuten in HercepTest™ Epitope Retrieval Solution (10x) bei RT abkühlen lassen.
- HercepTest™ Epitope Retrieval Solution (10x) abgießen und Objektträger mit Dako Wash Buffer (10x) spülen.

Anschließend Autostainer-Gestelle mit den Objektträgern in den Autostainer Link 48 (Dako) einsetzen und mit der Behandlung bei RT fortsetzen.

2. Peroxidase Block

- Objektträger 5 Minuten mit Dako Wash Buffer (10x) spülen
- Objektträger 5 Minuten in 200 µL HercepTest™ Peroxidase-Blocking Reagent (H₂O₂) inkubieren
- Objektträger 5 Minuten mit Dako Wash Buffer (10x) spülen

3. Antikörperinkubation

- Objektträger 30 Minuten in 200 µL HercepTest™ Rabbit Anti-Human HER2 Protein inkubieren
- Objektträger 5 Minuten mit Dako Wash Buffer (10x) spülen
- Objektträger 30 Minuten in 200 µL HercepTest™ Visualization Reagent (Labelled Polymer) inkubieren
- Objektträger zweimal für jeweils 5 Minuten mit Dako Wash Buffer (10x) spülen

4. Visualisierung

Hinzugabe des Chromogens (Substrat):

- Objektträger 10 Minuten in 200 µL Substrat-Chromogenlösung (DAB) inkubieren
- Objektträger mit destilliertem Wasser spülen
- Objektträger mit Dako Wash Buffer (10x) spülen

5. Gegenfärbung

Blaufärbung der Zellkerne:

- Objektträger 8 Minuten in 200 µL EnVision™ FLEX Hematoxylin inkubieren
- Objektträger mit Dako Wash Buffer (10x) spülen
- Objektträger mit destilliertem Wasser spülen
- Objektträger unter fließendem Leitungswasser spülen

6. Fixation

- Objektträger mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % – 80 % – 90 % – 96 %) dehydrieren
- Schnittpräparate werden automatisch mit Folie eingedeckt

2.3.2 Auswertung und Interpretation der IHC-Färbungen

Die Auswertung der IHC-Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops und basierte auf entsprechenden antigenspezifischen etablierten Scoring Systemen.

2.3.2.1 Bewertung des Hormonrezeptorstatus (HR-Status)

Die Quantifizierung der nukleären Expressionsstärke von ER und PgR erfolgte nach Remmele und Stegner. Hierbei wurde jeweils der Prozentsatz positiver Tumorzellkerne (Werte von 0 bis 4) und die durchschnittliche Färbeintensität (Werte von 0 bis 3) bestimmt. Durch die Multiplikation der beiden Faktoren wurde anschließend der sogenannte Immunreaktive Score (IRS) gebildet. Dieser konnte dementsprechend einen Wert zwischen 0 und 12 annehmen. Ein $IRS \leq 2$ wurde als ER- bzw. PgR-negativ und ein $IRS > 2$ als ER- bzw. PgR-positiv bewertet.

2.3.2.2 Auswertung des Ki-67-PI

Die Beurteilung des Ki-67-PI erfolgte durch semiquantitatives Schätzen des Prozentsatzes Ki-67-positiver Tumorzellen bezogen auf die Gesamtzahl der Tumorzellen. Die Färbeintensität wurde in der Beurteilung nicht berücksichtigt.

2.3.2.3 Bewertung des HER2-Status

Die Bewertung des HER2-Status auf Basis der IHC-Färbung erfolgte zum einen durch die Beurteilung der Färbeintensität (schwach – stark) und zum anderen durch die Beurteilung des Färbemusters (inkomplett – zirkulär) der Zellmembran. Unter Berücksichtigung beider Parameter wurde dann ein Score zwischen 0 bis 3+ ermittelt. Ein Score von 0 und 1+ wurde als negativ, ein Score von 2+ als schwach positiv (unsicher) und ein Score von 3+ als stark positiv gewertet. Um bei Vorliegen eines IHC-Scores von 2+ trotzdem eine sichere Aussage bezüglich des HER2-Status treffen zu können, wurde der HER2-Status ebenfalls mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) analysiert. Bei gleichzeitigem Vorliegen eines positiven FISH-Ergebnisses wurde der HER2-Status als positiv und bei gleichzeitigem Vorliegen eines negativen FISH-Ergebnisses als negativ beurteilt.

2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH ermöglicht den selektiven Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen bzw. Gene in den Zellkernen des zu untersuchenden Gewebes. Insbesondere in der Tumorzytogenetik nimmt die FISH eine herausragende Bedeutung ein. Hier dient sie der Detektion von chromosomalen Veränderungen, wie z. B. Deletionen (Gen-Verluste), Amplifikationen (Gen-Vermehrung) oder Translokationen (Gen-Brüche und Gen-Fusionen), die gehäuft mit dem Auftreten bestimmter Tumorerkrankungen assoziiert sind. Die Technik der FISH basiert auf der Paarung bzw. Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden (Nukleinsäuresonden) mit der jeweiligen Ziel-DNA. Ihre Anwendung an formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten erfordert eine vorherige Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung. Erst dann kann nach Denaturierung der Ziel-DNA eine erfolgreiche Hybridisierung der DNA-Sonden gewährleistet werden. An die Hybridisierung schließt sich ein stringenter Waschprozess an, um nicht bzw. unspezifisch gebundene FISH-Sonden zu entfernen. Abschließend werden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), einem blau fluoreszierendem DNA-Farbstoff, gegengefärbt. So können die andersfarbig fluoreszierenden Sonden bei der Auswertung gut gegen den Zellkern abgegrenzt werden. Abbildung 7 veranschaulicht grob die auf die Vorbehandlung folgenden Schritte der FISH.

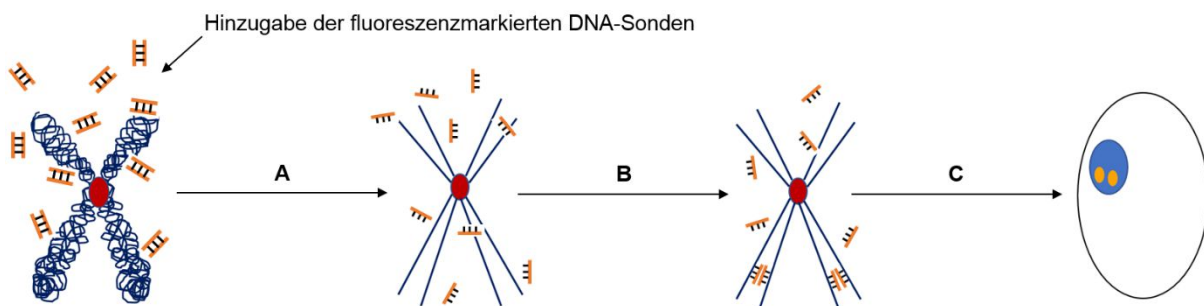


Abbildung 7: Ablauf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Mod. n. Berger J; 2011 [78]. **A:** Denaturierung der Ziel-DNA und der DNA-Sonden, **B:** Hybridisierung der DNA-Sonden mit der Ziel-DNA, **C:** Waschung, Gegenfärbung des Zellkerns und Detektion im Fluoreszenzmikroskop.

2.4.1 FISH angewandt am Mamma-TMA

Für den Nachweis einer HER2-Genamplifikation wurde das kommerziell erhältliche PathVysion HER2-DNA-Sonden-Kit II (PathVysion II) der Firma Abbott eingesetzt. Das Kit ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis des auf Chromosom 17 liegenden humanen HER2 (ERBB2) -Gens und das als Referenz dienenden Zentromers von Chromosom 17 (CEP17). Im Rahmen der HER2-FISH-Auswertung kann so zwischen einer tatsächlichen HER2-Genamplifikation und einer auf einer Chromosom 17 Polysomie (s. Abbildung 8, S. 31)

begründeten HER2-Signalvermehrung (gilt nicht als Amplifikation) unterschieden werden. Alle verwendeten Sonden sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Sonden HER2-FISH

Sondenziel	Zytogenetische Lokalisation	Sondenname	Fluoreszenzfarbstoff
Zentromer 17	17p11.1–q11.1	Vysis CEP17 SpectrumGreen	grün
HER2 (ERBB2)	17q11.2–12	Vysis LSI HER-2/neu SpectrumOrange	orange

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien und Kits HER2-FISH

Reagenzien/Kits	Firma
Dako Histology FISH Accessory Kit	Dako, Gastrup, Dänemark
Pre-Treatment Solution (20x)	Dako, Gastrup, Dänemark
Pepsin (ready-to-use)	Dako, Gastrup, Dänemark
Stringent Wash Buffer (20x), saline-sodium citrate buffer	Dako, Gastrup, Dänemark
Fluorescence Mounting Medium (DAPI – ready-to-use)	Dako, Gastrup, Dänemark
Wash Buffer (20x), Tris/HCl buffer	Dako, Gastrup, Dänemark
PathVysion HER2-DNA-Sonden-Kit II	Abbott, Illinois, USA
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR, Darmstadt
Ethanol 70 % (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 80 % (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 96 % (vergällt)	VWR, Darmstadt
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, USA

Reagenzvorbereitung

- Pre-Treatment Solution (20x)
Verdünnung: 1:20, 1 L: 50 mL Pre-Treatment Solution + 950 mL destilliertes Wasser
- Stringent Wash Buffer (20x)
Verdünnung: 1:20, 1 L: 50 mL Stringent Wash Buffer + 950 mL destilliertes Wasser
- Wash Buffer (20x)
Verdünnung: 1:20, 1 L: 50 mL Wash Buffer + 950 mL destilliertes Wasser
- Ethanolserie: drei Gefäße mit einer 70 % – 80 % – 96% Ethanollösung vorbereiten

Die Durchführung der FISH erfolgte in Anlehnung an die dem Dako Histology FISH Accessory Kit beigefügten Anleitung, wobei einzelne Abänderungen vorgenommen wurden. Die einzelnen Färbeschritte sind im Folgenden detailliert aufgeführt.

Protokoll Tag 1

1. Vorbehandlung

1.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

- TMA-Schnitt dreimal für 5 Minuten in Xylol stellen
- TMA-Schnitt zweimal für 5 Minuten in Ethanol 96 % stellen
- TMA-Schnitt 3 Minuten mit Tris/HCl-Waschpuffer bei Raumtemperatur (RT) spülen

1.2 Proteinandau

- Küvette mit Pretreatment-Lösung füllen und in einem Wasserbad auf 95 °C erwärmen
- TMA-Schnitt in die vorgeheizte Pretreatment-Lösung einbringen und für 10 Minuten inkubieren
- Küvette aus dem Wasserbad entfernen und TMA-Schnitt 15 Minuten in Pretreatment-Lösung bei RT abkühlen lassen
- TMA-Schnitt zweimal für 3 Minuten mit Tris/HCl-Waschpuffer bei RT spülen
5 – 8 Tropfen Pepsin direkt auf den TMA-Schnitt geben und 3 – 5 Minuten im Hybrit bei 37 °C inkubieren
- TMA-Schnitt zweimal für 3 Minuten mit Tris/HCl-Waschpuffer bei RT spülen

1.3 Dehydrierung

- TMA-Schnitts mittels aufsteigende Ethanolreihe entwässern: jeweils 2 Minuten in 70 % – 80 % – 96 % Ethanol stellen
- TMA-Schnitt für 10 Minuten lufttrocknen lassen

2. DNA-Denaturierung und FISH-Sonden Hybridisierung

- Etwa 8 µL der Sondenlösung (PathVysion HER2-DNA-Sonden-Kit II) direkt auf den TMA-Schnitt auftragen, ein Deckplättchen (18 x 18 mm) auflegen und mit Fixogum abdichten
- DNA-Denaturierung: TMA-Schnitt 5 Minuten bei 72 °C im Hybrit
- Hybridisierung der FISH-Sonden: über Nacht bei 37 °C

Protokoll Tag 2

3. stringenter Waschprozess

- Zwei Küvetten mit SSC (saline sodium citrate) -Waschpuffer füllen: 1. Küvette bei RT, 2. Küvette im Wasserbad auf 65 °C erwärmen
- Fixogum von den Deckplättchen entfernen
- TMA-Schnitt mit Deckplättchen bei RT in 1. Küvette stellen, bis sich das Deckplättchen löst
- TMA-Schnitt für 5 Minuten bei 65 °C in 2. Küvette stellen
- TMA-Schnitt für zweimal 3 Minuten bei RT in Tris/HCl-Puffer spülen
- TMA-Schnitt durch eine aufsteigende Ethanolreihe entwässern: jeweils zwei Minuten in 70 % – 80 % – 96 % Ethanol stellen
- TMA-Schnitt für 10 Minuten lufttrocknen lassen

4. Gegenfärbung

- 10 µL 4',6-Diamidine-2-phenylindole (DAPI) auf den TMA-Schnitt auftragen
- Deckplättchen (24 x 32 mm) auflegen

2.4.2 Auswertung und Interpretation der HER2-FISH

Für die Auswertung der HER2-FISH wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss vom Typ Imager.A1 verwendet. Um die unterschiedlich fluoreszierenden Signale von HER2-Sonde (SpectrumOrange), CEP17-Sonde (SpectrumGreen) und DAPI-Gegenfärbung (blau fluoreszierende Zellkerne) zu detektieren, wurden entsprechende Fluoreszenzfilter eingesetzt. Die Signalauswertung erfolgte anschließend bei einer 640fachen Vergrößerung. Hierbei wurden nur Zellen mit optimalen nukleären Signalen evaluiert. Zellen, die infolge einer unzureichenden Hybridisierung nur ein schwaches oder kein HER2-Signal in den Tumorzellkernen aufwiesen, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte anschließend durch Schätzung der durchschnittlichen HER2- und Zentromer 17-Signalzahl. In Fällen, in denen kein eindeutiger Amplifikationsstatus erhoben werden konnte, wurde die HER2- und Zentromer 17-Signalzahl für 20 Tumorzellen ausgezählt und anschließend eine HER2/CEP17-Ratio gebildet, indem die Gesamtzahl aller HER2-Signale durch die Gesamtzahl aller CEP17-Signale geteilt wurde. Um ein falsch-negatives Ergebnis durch einen Zugewinn der perizentromeren Region des Chromosom 17 auszuschließen, wurde zudem die mittlere HER2-Signalzahl pro Zelle bestimmt. Eine Ratio von ≥ 2.0 wurde dann als HER2-positiv, eine Ratio < 2.0 mit einer mittleren HER2-Signalzahl pro Zelle ≥ 6 ebenfalls als HER2-positiv und mit einer mittleren HER2-Signalzahl pro Zelle < 4 als

HER2-negativ bewertet. Bei Vorliegen einer Ratio < 2 und einer mittleren HER2-Signalzahl pro Zelle zwischen 4 und 6 wurden weitere 20 Zellen beurteilt. Abbildung 8 zeigt Beispiele für ein negatives und positives FISH-Ergebnis sowie für eine HER2-Signalvermehrung infolge einer Chromosom 17 Polysomie.

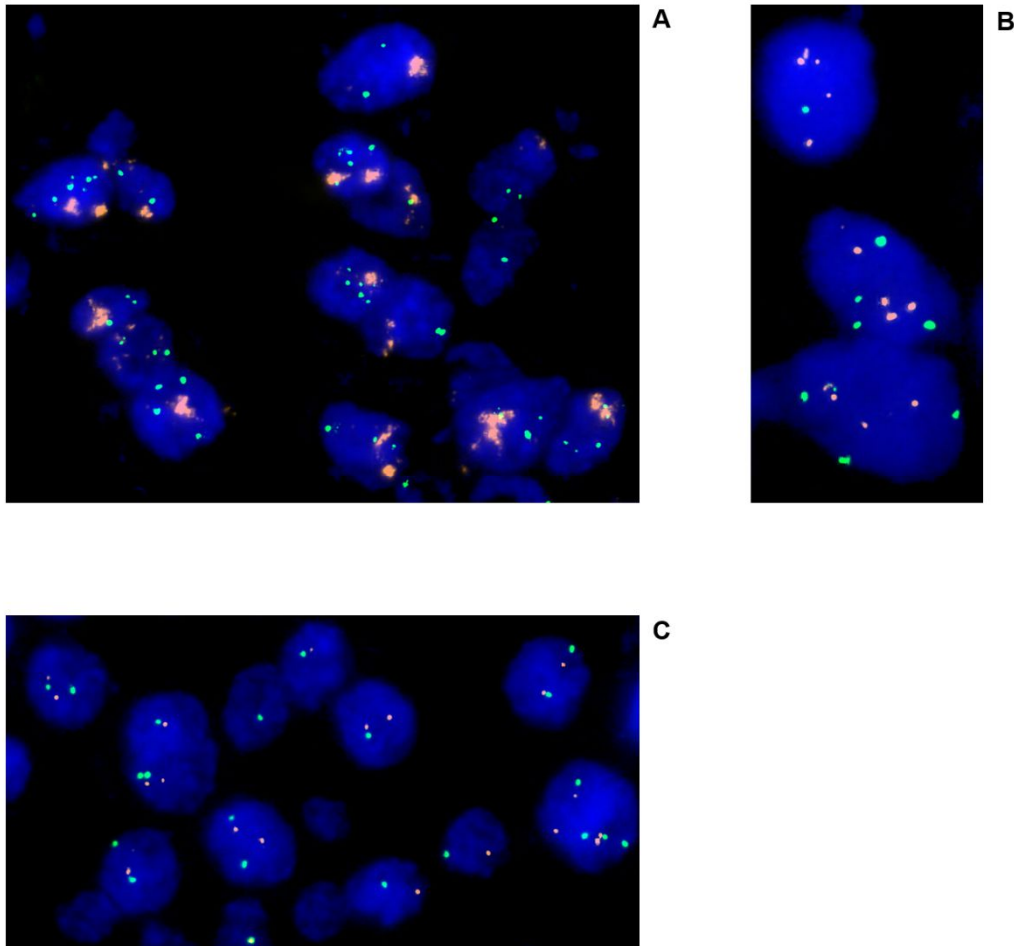


Abbildung 8: Auswertung der HER2-FISH bzw. der Sondensignale mittels Fluoreszenzmikroskopie. **A:** HER2-Amplifikation (HER2-positiv); **B:** HER2-Signalvermehrung (orange) infolge einer Chromosom 17 (grün) Polysomie; **C:** Regelrechtes (HER2-negatives) FISH-Ergebnis mit zwei orangenen (HER2) und zwei grünen (Zentromer 17) Signalen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die klinisch-pathologischen Charakteristika des ausgewählten Patientenkollektivs (n= 100) bei Erst- und Rezidivdiagnose sind Tabelle 11 auf Seite 33 zu entnehmen.

Das mediane Alter bei Erstdiagnose (ED) lag bei 55 Jahren (Streuungsbreite (SB): 29–87 Jahren), wobei 33 Patientinnen jünger und 67 Patientinnen älter als 50 Jahre waren. Eine Patientin wies simultan zum Zeitpunkt der ED eine Fernmetastase (Leber, n= 1) auf. In 83.8 % der Primärtumore zeigte sich eine mittlere bis schlechte Differenzierung (G2–G3). Histologisch dominierte ein invasiv-duktales Tumorwachstum (61.0 %). Die Therapie des Primärtumors erfolgte in 82.0 % der Fälle brusterhaltend und in 18.0 % der Fälle durch eine vollständige Entfernung des Brustdrüsengewebes (Mastektomie/Ablatio).

Das mediane Alter bei Rezidivdiagnose lag bei 64 Jahren, wobei die jüngste Patientin 38 und die älteste Patientin 89 Jahre alt war. Das mediane Zeitintervall zwischen Erst- und Rezidivdiagnose lag im Gesamtkollektiv bei 63 Monaten (SB: 2–232 Monate). Insgesamt entwickelten 80 Patientinnen ein intramammäres, 15 Patientinnen ein Thoraxwand- und 5 Patientinnen ein Axillarezidiv. In 9 der 100 Rezidivfälle konnte zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose gleichzeitig eine Fernmetastasierung diagnostiziert werden (Knochen, n= 4; Leber, n= 3; Lunge, n= 2). Auch bei Rezidiverkrankung dominierte eine mittlere (G2) bis schlechte (G3) Tumordifferenzierung (91.6 %) sowie ein invasiv-duktales Tumorwachstum (57.9 %). Die Therapie des lokoregionären Rezidivs erfolgte in 49.0 % der Fälle durch ein ablatives, in 31.0 % der Fälle durch ein erneutes brusterhaltendes Verfahren und in 15.0 % bzw. 5.0 % der Fälle durch eine Thoraxwand- bzw. Axillaexzision.

Tabelle 11: Klinisch-pathologische Charakteristika des ausgewählten Patientenkollektivs (n= 100) bei Erst- und Rezidivdiagnose

Parameter	Primarius n*(%)**	Rezidiv n*(%)**
Ort des Rezidivs		
Intramammär		80 (80.0)
Thoraxwand		15 (15.0)
Axilla		5 (5.0)
Alter		
Median	55	64
Streuungsbreite (SB)	29–87	38–89
< 50	33 (33.0)	23 (23.0)
≥ 50	67 (67.0)	77 (77.0)
Menopausenstatus		
Prämenopausal	32 (37.6)	
Postmenopausal	53 (62.4)	
Unbekannt	15	
UICC Stadien		
Stadium 0 (Tis*N0)	11 (11.1)	12 (12.5)
Stadium 1 (T1N0)	42 (42.4)	50 (52.1)
Stadium 2 (T1N1) (T2N0/1) (T3N0)	35 (35.4)	19 (19.8)
Stadium 3 (T1/2N2) (T3N1/2) (T4N0-2) oder jedes T N3	10 (10.1)	6 (6.3)
Stadium 4 (M1)	1 (1.0)	9 (9.4)
Unbekannt	1	4
Histologischer Grad		
G1	16 (16.2)	7 (8.4)
G2	42 (42.4)	42 (50.6)
G3	41 (41.4)	34 (41.0)
Unbekannt	1	17
Histologischer Typ		
Invasiv-duktral	61 (61.0)	55 (57.9)
Invasiv-lobulär	17 (17.0)	12 (12.6)
DCIS/CLIS*	11 (11.0)	12 (12.6)
Sonstiges	11 (11.0)	16 (16.8)
Unbekannt	0	5
OP-Art		
Brusterhaltende Therapie (BET)	82 (82.0)	31 (31.0)
Mastektomie/Ablatio	18 (18.0)	49 (49.0)
Exzision Thoraxwand	0	15 (15.0)
Exzision Axilla	0	5 (5.0)
Unbekannt	0	0

Anmerkung: * n= Anzahl, entspricht nicht immer dem vollständigen Patientenkollektiv, da in Einzelfällen keine Daten vorlagen. ** Die Prozentangabe bezieht sich jeweils auf die Anzahl der auswertbaren Fälle. Tis, Tumor in situ; DCIS, Duktales Carcinoma in situ; CLIS, Carcinoma lobulare in situ.

3.2 Rezeptor- und Subtypendiskordanzen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv

Die Auswertung der einzelnen Diskordanzraten für den ER, PgR, HER2, Ki-67 und den daraus gebildeten intrinsischen Subtypen erfolgte für die beschriebene Patientenpopulation (n= 100) innerhalb zweier Kollektive. Für das eine Kollektiv (n= 51) basierte die Auswertung hierbei auf retrospektiv erhobenen Daten und für das andere Kollektiv (n=49) auf den mittels TMA-Herstellung erneut bestimmten Rezeptorstatus. Für den Vergleich der intrinsischen Subtypen wurden die Tumore anhand der Surrogatparameter ER, PgR, HER2 und Ki-67 in folgende vier Subtypen eingeteilt:

- **Luminal A** (LA; Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ und Ki-67 < 25 %)
- **Luminal B** (LB; Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ und Ki-67 ≥ 25 %)
- **HER2-positiv** (Hormonrezeptor-positiv/-negativ, HER2-positiv)
- **Triple-negativ** (TN; Hormonrezeptor-negativ, HER2-negativ)

Infolge einer zum Teil inkompletten Dokumentation bzw. Auswertbarkeit der Biomarker konnte nicht in jedem Fall der Rezeptorstatus bzw. intrinsische Subtyp bestimmt werden. Die Diskordanzraten für die einzelnen Biomarker und den intrinsischen Subtyp werden im Folgenden für beide Kollektive separat dargestellt.

3.2.1 Auswertung von Einzelrezeptor- und Subtypendiskordanzen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten

Tabelle 12 auf Seite 35 gibt einen Überblick über die aus Datenbanken der Gynäkologie und Pathologie erhobenen Rezeptorstatus und den daraus gebildeten Tumorsubtypen. Für die Primärtumore konnte in 92.2 % (47/51) der ER-, in 90.2 % (46/51) der PgR-, in 70.6 % (36/51) der HER2- und in 43.1 % (22/51) der Ki-67-Status ermittelt werden. Für die Rezidivtumore konnte jeweils in 90.2 % (46/51) der ER- sowie PgR-, in 70.6 % (36/51) der HER2- und in 54.9 % (28/51) der Ki-67-Status erhoben werden. Basierend auf den einzelnen Rezeptorstatus gelang in 58.8 % (30/51) der Primär- und 56.9 % (29/51) der Rezidivtumore eine Subtypenbestimmung.

Ein Vergleich des jeweiligen Rezeptorstatus zwischen Primarius und Rezidiv konnte für den ER in 82.4 % (42/51), den PgR in 80.4 % (41/51), den HER2 in 52.9 % (27/51) und den Ki-67-PI in 31.4 % (16/51) der 51 Gewebepaare erfolgen. Für den intrinsischen Subtyp lagen in 41.2 % (21/51) der 51 Fälle vergleichbare Daten vor. Die Darstellung der jeweiligen Kon- bzw. Diskordanzraten erfolgt im Anschluss für jeden Biomarker bzw. den intrinsischen Subtyp separat.

Tabelle 12: Retrospektiv erhobene Biomarkerstatus und intrinsische Subtypen bei Erst- und Rezidivdiagnose (n= 51)

	Primarius	Rezidiv
Parameter	n* (%)**	n* (%)**
ER		
Bekannt	47 (100)	46 (100)
Positiv	34 (72.3)	34 (73.9)
Negativ	13 (27.7)	12 (26.1)
Unbekannt	4	5
PgR		
Bekannt	46 (100)	46 (100)
Positiv	31 (67.4)	28 (60.9)
Negativ	15 (32.6)	18 (39.1)
Unbekannt	5	5
HER2		
Bekannt	36 (100)	36 (100)
Positiv	17 (47.2)	11 (30.6)
Negativ	19 (52.8)	25 (69.4)
Unbekannt	15	15
Ki-67		
Bekannt	22 (100)	28 (100)
< 25 % (niedrig proliferierend)	12 (54.5)	18 (64.3)
≥ 25 % (hoch proliferierend)	10 (45.5)	10 (35.7)
Unbekannt	29	23
Intrinsischer Subtyp		
Bekannt	30 (100)	29 (100)
Luminal A	7 (23.3)	12 (41.4)
Luminal B	2 (6.7)	3 (10.3)
HER2-positiv (HR+/HR-)	17 (56.7)	11 (37.9)
Triple-negativ	4 (13.3)	3 (10.3)
Unbekannt	21	22

Anmerkung: * n= Anzahl, entspricht nicht immer dem vollständigen Patientenkollektiv, da in Einzelfällen keine Daten vorlagen. ** Die Prozentangabe bezieht sich jeweils auf die Anzahl der auswertbaren Fälle; ER, Östrogenrezeptor; PgR, Progesteronrezeptor; HR, Hormonrezeptor.

3.2.1.1 Östrogenrezeptor (ER)

In 82.4 % (42/51) der insgesamt 51 Fälle konnte der ER-Status sowohl für den Primär- als auch den korrespondierenden Rezidivtumor erfasst werden. Hierbei wiesen die Primärtumore in 73.8 % (31/42) der Fälle einen ER-positiven und in 26.2 % (11/42) der Fälle einen ER-negativen Status auf. Die Rezidivtumore zeigten wiederum in 71.4 % (30/42) der Fälle einen ER-positiven und in 28.6 % (12/42) der Fälle einen ER-negativen Status. Von den initial ER-positiven Primärtumoren (n= 31) zeigten 87.1 % (27/31) auch bei Rezidivverkrankung einen ER-positiven Rezeptorstatus (positiv konkordant). In 12.9 % (4/31) konnte ein Wechsel zu einem ER-negativen Rezidivtumor verzeichnet werden (positiv zu negativ). Von den initial ER-negativen Primärtumoren (n= 11) zeigten 72.7 % (8/11) der Rezidivtumore ebenfalls einen ER-negativen Rezeptorstatus (negativ konkordant). In 27.3 % (3/11) erfolgte ein Wechsel zu einem ER-positiven Rezidivtumor (negativ zu positiv). Insgesamt lagen somit für die 42 vergleichbaren Fälle in 16.6 % (7/42) diskordante und in 83.4 % (35/42) konkordante ER-Status zwischen Primarius und Lokalrezidiv vor.

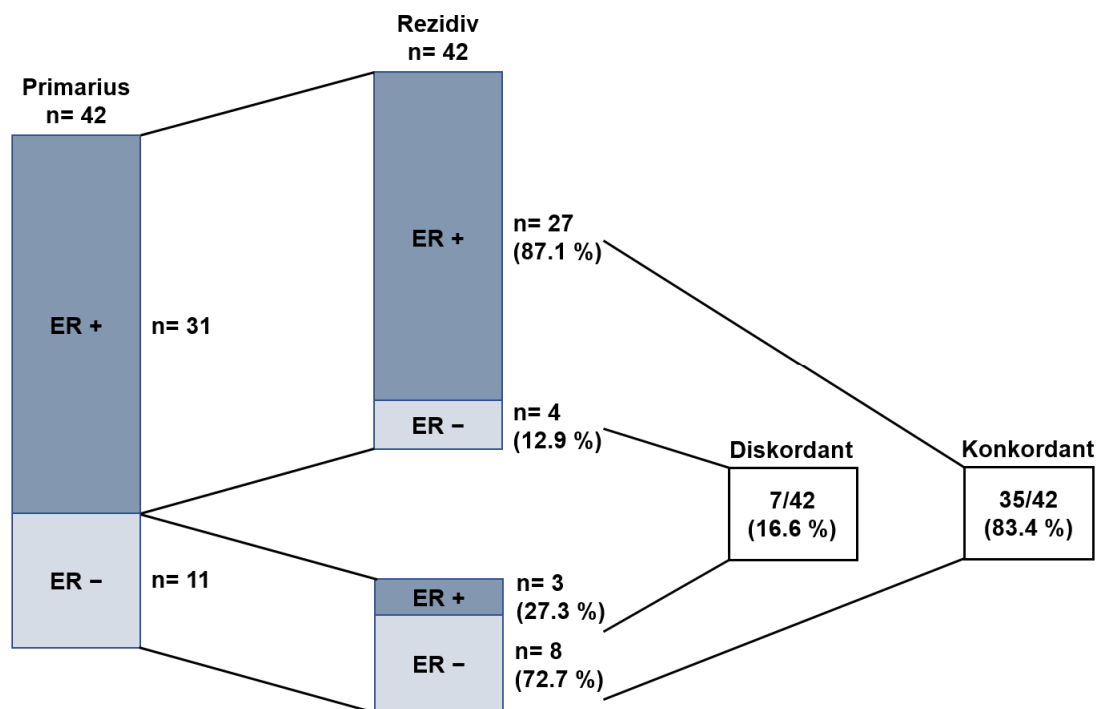


Abbildung 9: Kon- bzw. Diskordanzraten des ER-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten. ER, Östrogenrezeptor.

3.2.1.2 Progesteronrezeptor (PgR)

Vergleichbare Daten für den PgR lagen in 80.4 % (41/51) der insgesamt 51 Fälle vor. Hiervon wiesen 68.3 % (28/41) der Primärtumore einen positiven und 31.7 % (13/41) einen negativen PgR-Status auf. Bei Rezidiverkrankung wiederum zeigten 58.6 % (24/41) der Tumore einen PgR-positiven und 41.4 % (17/41) einen PgR-negativen Status. Von den initial PgR-positiven Primärtumoren (n= 28) wiesen 71.4 % (20/28) auch bei Rezidiverkrankung einen PgR-positiven Rezeptorstatus auf (positiv konkordant). In 28.6 % (8/28) der Fälle konnte hingegen ein Wechsel zu einem PgR-negativen Rezidivtumor verzeichnet werden (positiv zu negativ). Von den initial PgR-negativen Primärtumoren (n= 13) blieben 69.2 % (9/13) auch bei Rezidiverkrankung PgR-negativ (negativ konkordant). In 30.8 % (4/13) der Fälle konnte ein Wechsel zu einem PgR-positiven Rezidivtumor beobachtet werden (negativ zu positiv). Insgesamt lagen somit in 29.3 % (12/41) der vergleichbaren Fälle (n= 41) diskordante und in 70.7 % (29/41) konkordante PgR-Status zwischen Primarius und Lokalrezidiv vor.

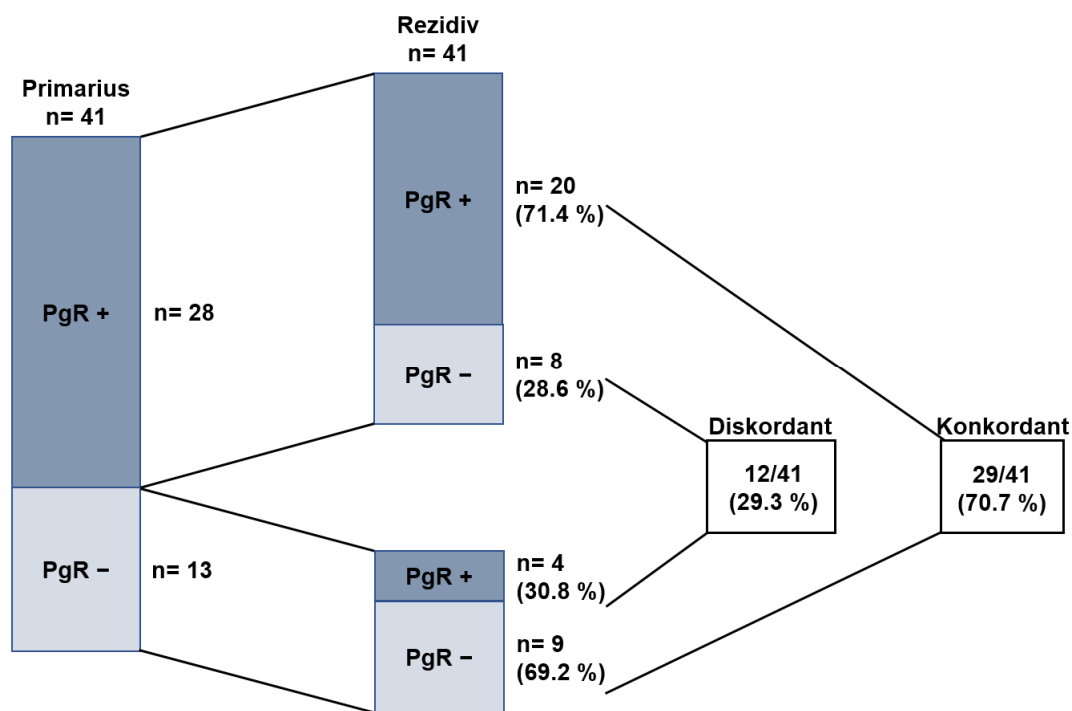


Abbildung 10: Kon- bzw- Diskordanzraten des PgR-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten. PgR, Progesteronrezeptor.

3.2.1.3 HER2

Für den HER2-Status lagen in 52.9 % (27/51) der 51 Fälle vergleichbare Daten vor. 48.1 % (13/27) der Primärtumore wiesen dabei einen HER2-positiven und 51.9 % (14/27) einen HER2-negativen Status auf. Die Rezidivtumore zeigten wiederum in 37.0 % (10/27) der Fälle einen positiven und in 63.0 % (17/27) einen negativen HER2-Status. Von den initial HER2-positiven Primärtumoren (n= 13) wiesen 61.5 % (8/13) auch bei Rezidivverkrankung einen HER2-positiven Rezeptorstatus auf (positiv konkordant). In 38.5 % (5/13) der Fälle zeigte sich hingegen ein Wechsel zu einem HER2-negativen Rezidivtumor (positiv zu negativ). Von den initial HER2-negativen Primärtumoren (n= 14) zeigten 85.7 % (12/14) auch bei Rezidivverkrankung einen HER2-negativen Rezeptorstatus (negativ konkordant). In 14.3 % (2/14) der Fälle konnte ein Wechsel zu einem HER2-positiven Rezidivtumor verzeichnet werden (negativ zu positiv). Insgesamt lagen somit in 25.9 % (7/27) der vergleichbaren Fälle diskordante und in 74.1 % (20/27) konkordante HER2-Status vor.

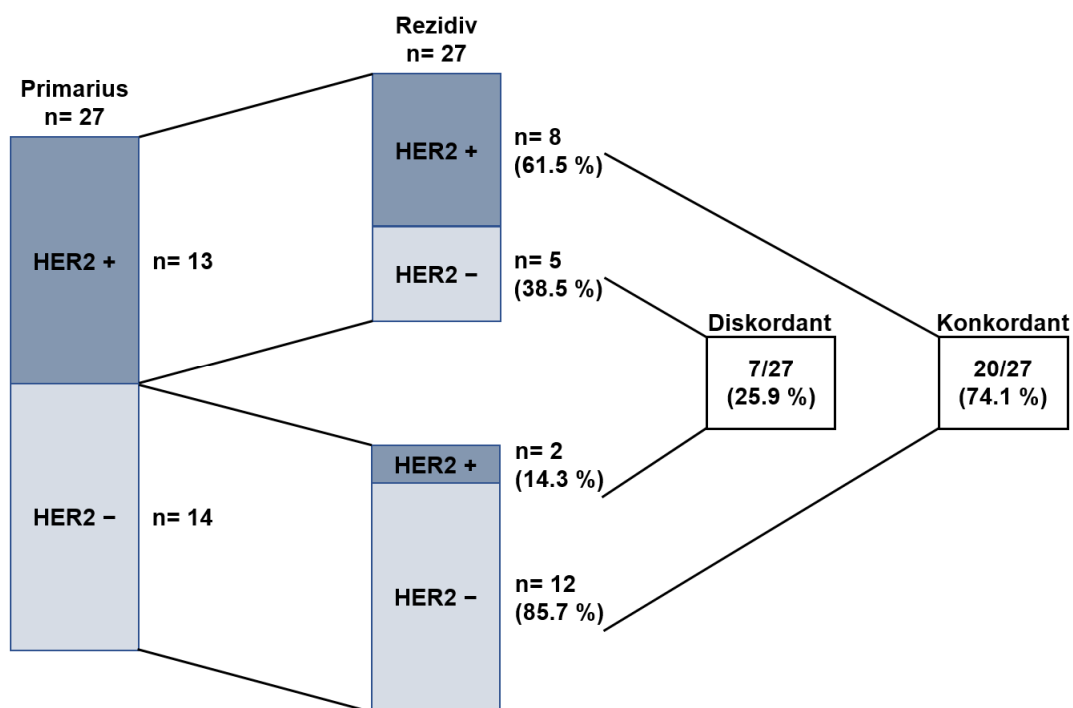


Abbildung 11: Kon- bzw. Diskordanzraten des HER2-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten.

3.2.1.4 Ki-67

Für den Ki-67-Status lagen in 31.4 % (16/51) der 51 Fälle vergleichbare Daten vor. Sowohl bei Primär-, als auch bei Rezidivkrankung wiesen 43.7 % (7/16) der Tumore einen hohen (high, Ki-67-PI ≥ 25.0 %) und 56.3 % (9/16) einen niedrigen (low, Ki-67-PI < 25.0 %) Ki-67-PI auf. Von den initial hoch proliferierenden Primärtumoren (n= 7) wiesen 57.1 % (4/7) auch bei Rezidivkrankung einen hohen Proliferationsindex auf (positiv konkordant). In 42.9 % (3/7) der Fälle hingegen wechselte ein hoch proliferierender Primär- zu einem niedrig proliferierenden Rezidivtumor (positiv zu negativ). Von den initial niedrig proliferierenden Primärtumoren (n=9) zeigten 66.7 % (6/9) auch bei Rezidivkrankung einen niedrig proliferierenden Tumor (negativ konkordant). In 33.3 % (3/9) konnte ein Wechsel zu einem hochproliferierenden Rezidivtumor beobachtet werden (negativ zu positiv). Insgesamt lagen somit in 37.5 % (6/16) der vergleichbaren Fälle diskordante und in 62.5 % (10/16) konkordante Ki-67-Status vor.

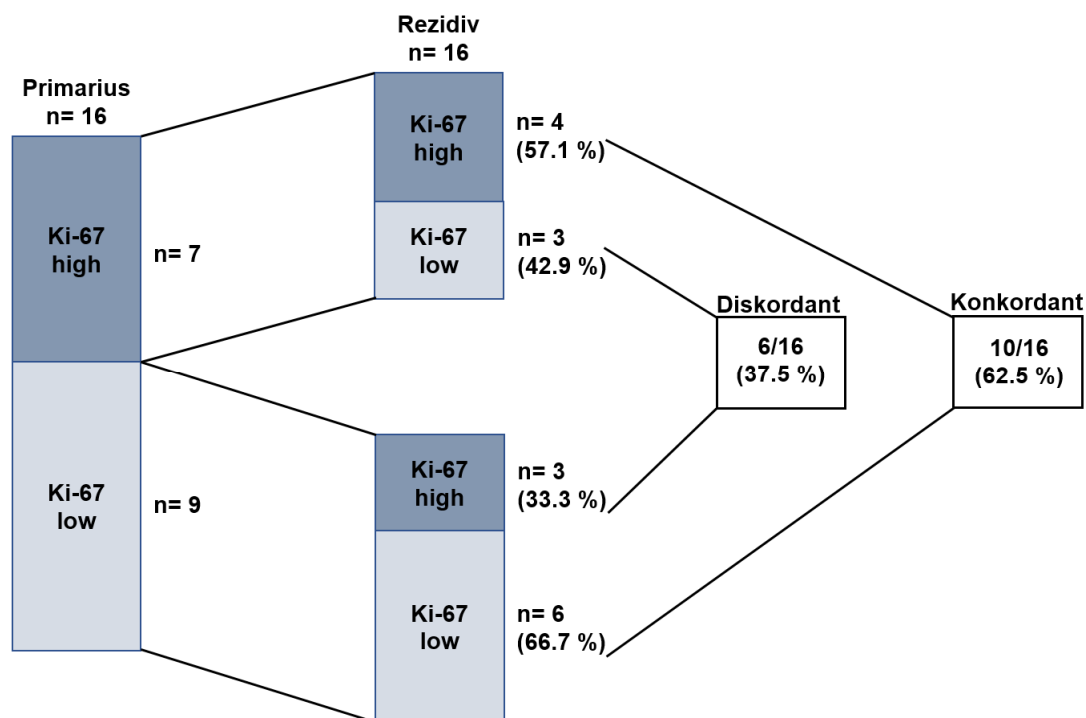


Abbildung 12: Kon- bzw. Diskordanzraten des Ki-67-PI zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten.

3.2.1.5 Intrinsischer Subtyp

In 41.2 % (21/51) der 51 Fälle konnte basierend auf den erhobenen Einzelrezeptorstatus ein intrinsischer Subtyp sowohl für den Primär- als auch den korrespondierenden Rezidivtumor gebildet werden. Die Primärtumore wiesen zu 28.6 % (6/21) einen Luminal A, zu 9.5 % (2/21) einen Luminal B, zu 57.1 % (12/21) einen HER2-positiven und zu 4.8 % (1/21) einen triple-negativen Subtyp auf. Die Rezidivtumore hingegen wiesen zu 28.6 % (6/21) einen Luminal A, zu 9.5 % (2/21) einen Luminal B, zu 47.6 % (10/21) einen HER2-positiven und zu 14.3 % (3/21) einen triple-negativen Subtyp auf. Primärtumore vom Luminal A-Subtyp (n=6) wiesen in 66.6 % (4/6) auch bei Rezidivverkrankung einen Luminal A-Subtyp auf. In jeweils 16.7 % (1/6) erfolgte ein Wechsel zu einem Rezidivtumor vom Luminal B- bzw. HER2-positiven Subtyp. Primärtumore vom Luminal B-Subtyp (n=2) zeigten in 50.0 % (1/2) der Fälle auch bei Rezidivverkrankung einen Luminal B-Subtyp. In den anderen 50.0 % (1/2) erfolgte ein Wechsel zu einem HER2-positiven Subtyp. Primärtumore vom HER2-positiven Subtyp (n=12) zeigten in 66.6 % (8/12) auch bei Rezidivverkrankung einen HER2-positiven Subtyp. In jeweils 16.7 % (2/12) der Fälle wechselte ein HER2-positiver Primärtumor zu einem Luminal A- bzw. triple-negativen Subtyp. Im direkten Subtypenvergleich zeigten demnach 33.3 % (7/21) der 21 Tumopaare diskordante und 66.7 % (14/21) konkordante Ergebnisse.

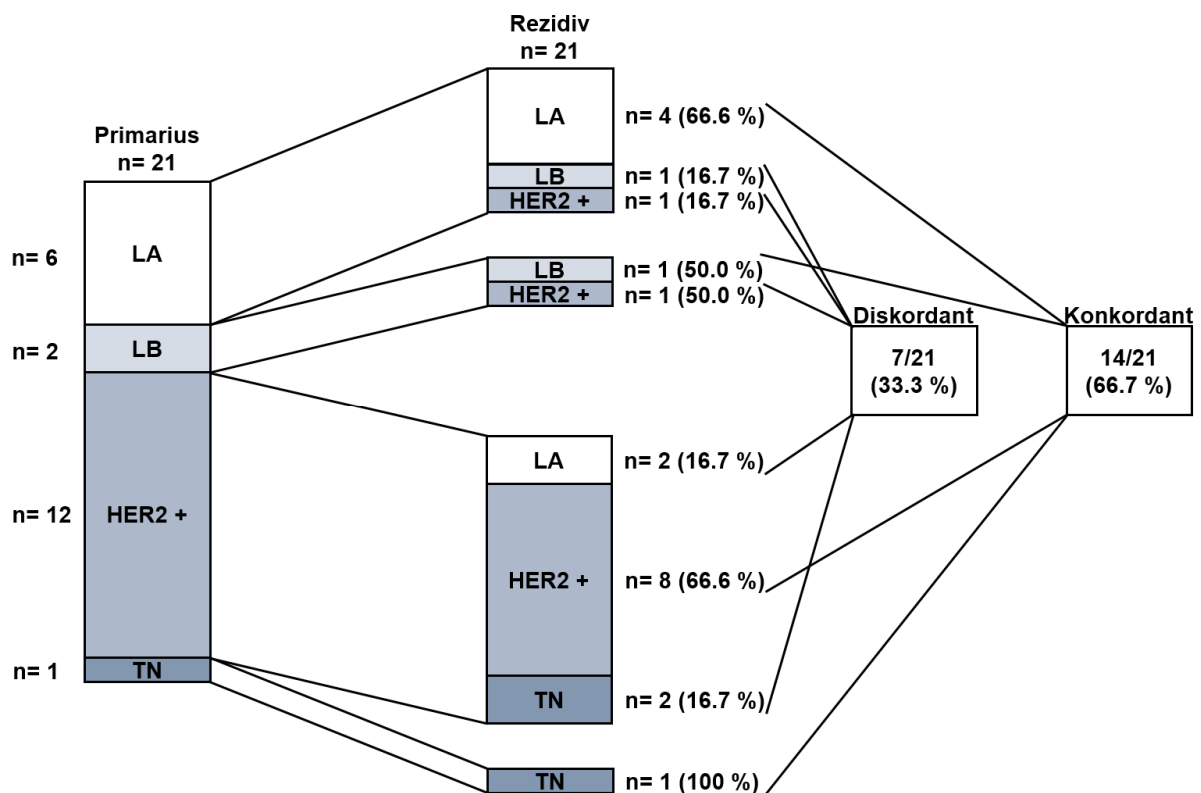


Abbildung 13: Kon- bzw. Diskordanzraten von intrinsischen Subtypen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten. LA, Luminal A; LB, Luminal B; HER2 +, HER2-positiv; TN, triple-negativ.

Tabelle 13: Zusammenfassung der auf Basis von retrospektiven Daten ermittelten Kon- bzw. Diskordanzraten von ER, PgR, HER2, Ki-67 und intrinsischen Subtypen zwischen Primarius und Lokalrezidiv (n= 51)

Biomarker/intrinsischer Subtyp		n* (%)**
ER	Vergleichbar	42 (100)
	Konkordant	35 (83.4)
	Positiv > Positiv	27 (64.3)
	Negativ > Negativ	8 (19.1)
	Diskordant	7 (16.6)
	Positiv > Negativ	4 (9.5)
	Negativ > Positiv	3 (7.1)
	Unbekannt	9
PgR	Vergleichbar	41 (100)
	Konkordant	29 (70.7)
	Positiv > Positiv	20 (48.8)
	Negativ > Negativ	9 (21.9)
	Diskordant	12 (29.3)
	Positiv > Negativ	8 (19.5)
	Negativ > Positiv	4 (9.8)
	Unbekannt	10
HER2	Vergleichbar	27 (100)
	Konkordant	20 (74.1)
	Positiv > Positiv	8 (29.6)
	Negativ > Negativ	12 (44.5)
	Diskordant	7 (25.9)
	Positiv > Negativ	5 (18.5)
	Negativ > Positiv	2 (7.4)
	Unbekannt	24
Ki-67	Vergleichbar	16 (100)
	Konkordant	10 (62.5)
	high > high	4 (25.0)
	low > low	6 (37.5)
	Diskordant	6 (37.5)
	high > low	3 (18.7)
	low > high	3 (18.7)
	Unbekannt	35
Intrinsischer Subtyp	Vergleichbar	21 (100)
	Konkordant	14 (66.7)
	LA → LA	4 (19.0)
	LB → LB	1 (4.8)
	HER2+ → HER2+	8 (38.1)
	TN → TN	1 (4.8)
	Diskordant	7 (33.3)
	LA → LB	1 (4.8)
	LA → HER2+	1 (4.8)
	LB → HER2+	1 (4.8)
	HER2+ → LA	2 (9.5)
	HER2+ → TN	2 (9.5)
	Unbekannt	30

Anmerkung: * n= Anzahl, entspricht nicht immer dem vollständigen Patientenkollektiv, da in Einzelfällen keine Daten vorlagen. ** Die Prozentangabe bezieht sich jeweils auf die Anzahl der auswertbaren Fälle; ER, Östrogenrezeptor; PgR, Progesteronrezeptor; LA, Luminal A; LB, Luminal B; HER2 +, HER2-positiv; TN, triple-negativ.

Tabelle 13 auf Seite 41 fasst die ermittelten Diskordanzraten zusammen. Vergleichbare Daten lagen für den ER-, PgR-, HER2- und Ki-67-Status in jeweils 82.4 % (42/51), 80.4 % (41/51), 52.9 % (27/51) und 31.4 % (16/51) der 51 Gewebepaare vor. Für den ER zeigten sich hierbei in 16.6 % (7/42), den PgR in 29.3 % (12/41), den HER2 in 25.9 % (7/27) und den Ki-67-PI in 37.5 % (6/16) diskordante Rezeptorstatus. Ein Vergleich des intrinsischen Subtyps konnte in 41.2 % (21/51) der 51 Tumorkaare erfolgen. Hier zeigte sich in 33.3 % (7/21) der vergleichbaren Fälle ein Wechsel im intrinsischen Subtyp.

3.2.2 Auswertung von Einzelrezeptor- und Subtypendiskordanzen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis von TMA-Ergebnissen

Eine Übersicht über die Auswertbarkeit der einzelnen Immunfärbungen ist in Tabelle 14 gegeben. Insgesamt wurden fünf TMA-Gewebeschnitte hergestellt. Je TMA-Gewebeschnitt wurden jeweils 49 Primärtumor-, 49 Rezidivtumor- und fünf Normalgewebesots untersucht (s. Abbildung 3, S. 16). In der folgenden Darstellung der Ergebnisse blieb das Normalgewebe (fünf Gewebesots je TMA-Gewebeschnitt) unberücksichtigt. Insgesamt wurden so 490 Tumorgewebesots (98 je TMA-Gewebeschnitt) untersucht. In 26.7 % (n= 131) der 490 Gewebesots konnte kein Ergebnis erzielt werden, weil entweder einzelne Gewebesots fehlten, zu wenige oder keine Tumorzellen im Gewebespot vorlagen oder im Rahmen der FISH-Analyse kein Sondersignal erfasst werden konnte. Folglich wurden insgesamt 73.3 % (n= 359) der initial 490 Gewebesots in die Auswertung miteinbezogen.

Tabelle 14: Auswertbarkeit der fünf TMA-Gewebeschnitte (n= 49)

Parameter	Primarius n* (%)**	Rezidiv n* (%)**
ER-IHC		
Auswertbar	39 (100)	33 (100)
Positiv	27 (69.2)	14 (42.4)
Negativ	12 (30.8)	19 (57.6)
Nicht auswertbar	10	16
Kein Gewebe	2	1
Keine Tumorzellen	8	15
PgR-IHC		
Auswertbar	39 (100)	33 (100)
Positiv	22 (56.4)	13 (39.4)
Negativ	17 (43.6)	20 (60.6)
Nicht auswertbar	10	16
Kein Gewebe	2	1
Keine Tumorzellen	8	15
Ki-67-IHC		
Auswertbar	40 (100)	31 (100)
< 25 % (niedrig proliferierend)	38 (95.0)	29 (93.5)
≥ 25 % (hoch proliferierend)	2 (5.0)	2 (6.5)
Nicht auswertbar	9	18
Kein Gewebe	1	2
Keine Tumorzellen	8	16
HER2-IHC		
Auswertbar	42 (100)	31 (100)
Negativ (0, 1+)	35 (83.3)	25 (80.6)
Unsicher (2+)	1 (2.4)	2 (6.5)
Positiv (3+)	6 (14.3)	4 (12.9)

Ergebnisse

Nicht auswertbar	7	18
Kein Gewebe	2	2
Keine Tumorzellen	5	16
HER2-FISH		
Auswertbar	39 (100)	32 (100)
Negativ	31 (79.5)	27 (84.4)
Positiv	8 (20.5)	5 (15.6)
Nicht auswertbar	10	17
Kein Gewebe	5	9
Keine Tumorzellen	4	4
Kein Signal	1	4
Intrinsischer Subtyp		
Auswertbar	37 (100)	31 (100)
Luminal A	23 (62.2)	13 (41.9)
Luminal B	1 (2.7)	0
HER2-positiv (HR+/HR-)	7 (18.9)	5 (16.1)
Triple-negativ	6 (16.2)	13 (41.9)
Nicht auswertbar	12	18

Anmerkung: * n= Anzahl, entspricht nicht immer dem vollständigen Patientenkollektiv, da in Einzelfällen keine Daten auswertbar waren. ** Die Prozentangabe bezieht sich jeweils auf die Anzahl der auswertbaren Fälle; ER, Östrogenrezeptor; PgR, Progesteronrezeptor; IHC, Immunhistochemie; FISH, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; HR, Hormonrezeptor.

3.2.2.1 Östrogenrezeptor (ER)

Für 51.0 % (25/49) der 49 Gewebepaare konnte der ER-Status sowohl für den Primär- als auch den korrespondierenden Rezidivtumor bestimmt werden. Hierbei wiesen die Primärtumore in 68.0 % (17/25) der Fälle einen positiven und in 32.0 % (8/25) der Fälle einen negativen ER-Status auf. Die Rezidivtumore zeigten hingegen in 48.0 % (12/25) der Fälle einen ER-positiven und in 52.0 % (13/25) der Fälle einen ER-negativen Status. Von den initial ER-positiven Primärtumoren (n= 17) zeigten 64.7 % (11/17) auch bei Rezidiverkrankung einen ER-positiven Status (positiv konkordant). In 35.3 % (6/17) erfolgte ein Wechsel zu einem ER-negativen Status (positiv zu negativ). Von den initial ER-negativen Primärtumoren (n= 8) wiesen 87.5 % (7/8) auch bei Rezidiverkrankung einen ER-negativen Status auf. In 12.5 % (1/8) wechselte ein ER-negativer Primärtumor zu einem ER-positiven Rezidivtumor. Insgesamt lagen demnach in 28.0 % (7/25) diskordante und in 72.0 % (18/25) konkordante ER-Status zwischen Primarius und Lokalrezidiv vor.

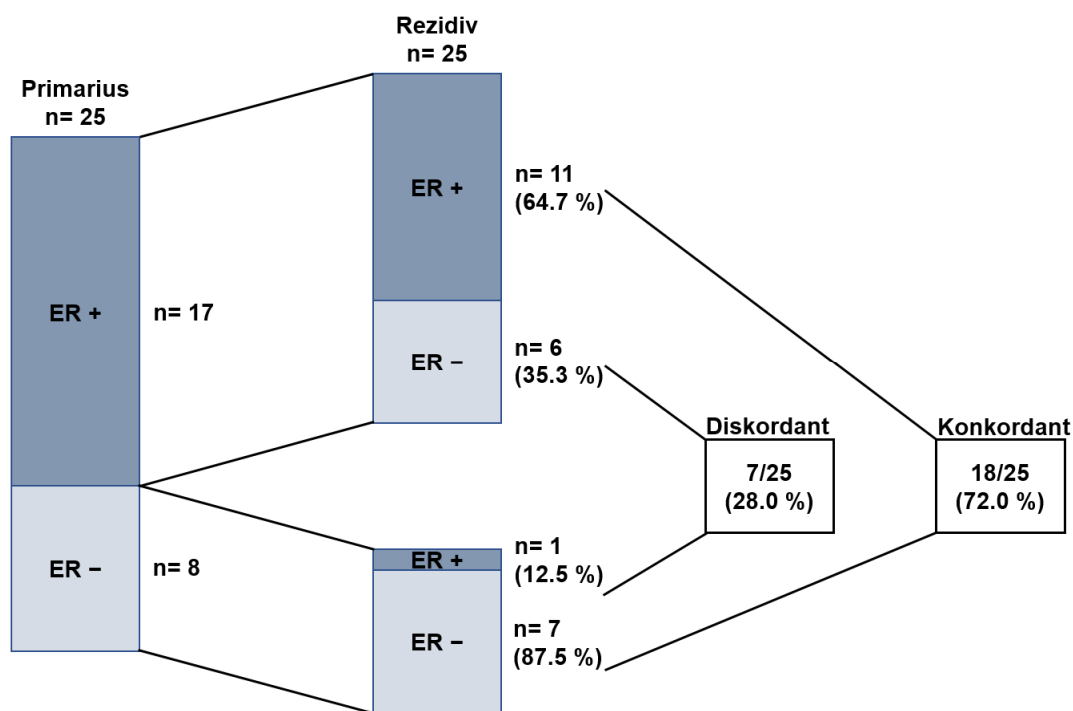


Abbildung 14: Kon- bzw. Diskordanzraten des ER-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse. ER, Östrogenrezeptor.

3.2.2.2 Progesteronrezeptor (PgR)

Vergleichbare Daten für den PgR lagen in 51.0 % (25/49) der 49 Gewebepaare vor. Hiervon wiesen 64.0 % (16/25) der Primärtumore einen positiven und 36.0 % (9/25) einen negativen PgR-Status auf. Im Vergleich zeigten 48.0 % (12/25) der Rezidivtumore einen PgR-positiven und 52.0 % (13/25) einen PgR-negativen Status. Von den initial PgR-positiven Primärtumoren (n= 16) wiesen 62.5 % (10/16) auch bei Rezidiverkrankung einen PgR-positiven Status auf (positiv konkordant). In 37.5 % (6/16) erfolgte ein Wechsel zu einem PgR-negativen Status (positiv zu negativ). Von den initial PgR-negativen Primärtumoren (n= 9) wiesen 77.8 % (7/9) auch bei Rezidiverkrankung einen PgR-negativen Status auf. In 22.2 % (2/9) der Fälle konnte ein Wechsel zu einem PgR-positiven Status beobachtet werden (negativ zu positiv). Insgesamt zeigten somit 32.0 % (8/25) der vergleichbaren Fälle diskordante und 68.0 % (17/25) konkordante Rezeptorstatus zwischen Primarius und Lokalrezidiv.

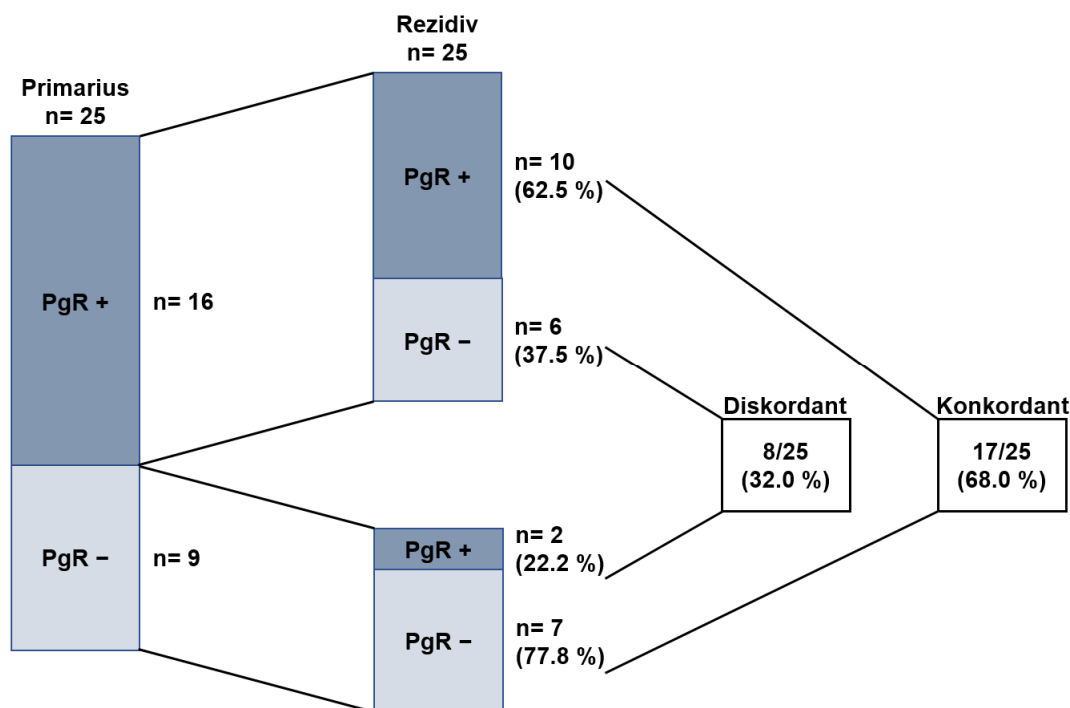


Abbildung 15: Kon- bzw. Diskordanzraten des PgR-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse. PgR, Progesteronrezeptor.

3.2.2.3 HER2

Für den HER2-Status lagen in 57.1 % (28/49) der Fälle vergleichbare Daten vor. 14.3 % (4/28) der Primärtumore wiesen einen HER2-positiven und 85.7 % (24/28) einen HER2-negativen Status auf. Gleichmaßen verhielt sich die Verteilung bei den Rezidivtumoren. Von den initial HER2-positiven Primärtumoren (n= 4) wiesen 75.0 % (3/4) auch bei Rezidivverkrankung einen HER2-positiven Status auf (positiv konkordant). In 25.0 % (1/4) der Fälle erfolgte ein Wechsel zu einem HER2-negativen Rezidivtumor (positiv zu negativ). Von den initial HER2-negativen Primärtumoren (n= 24) zeigten 95.8 % (23/24) auch bei Rezidivverkrankung einen negativen Rezeptorstatus (negativ konkordant). In 4.2 % (1/24) der Fälle konnte ein Wechsel zu einem HER2-positiven Status beobachtet werden (negativ zu positiv). Insgesamt lagen somit in 7.2 % (2/28) der vergleichbaren Fälle diskordante und in 92.8 % (26/28) konkordante Rezeptorstatus zwischen Primarius und Lokalrezidiv vor.

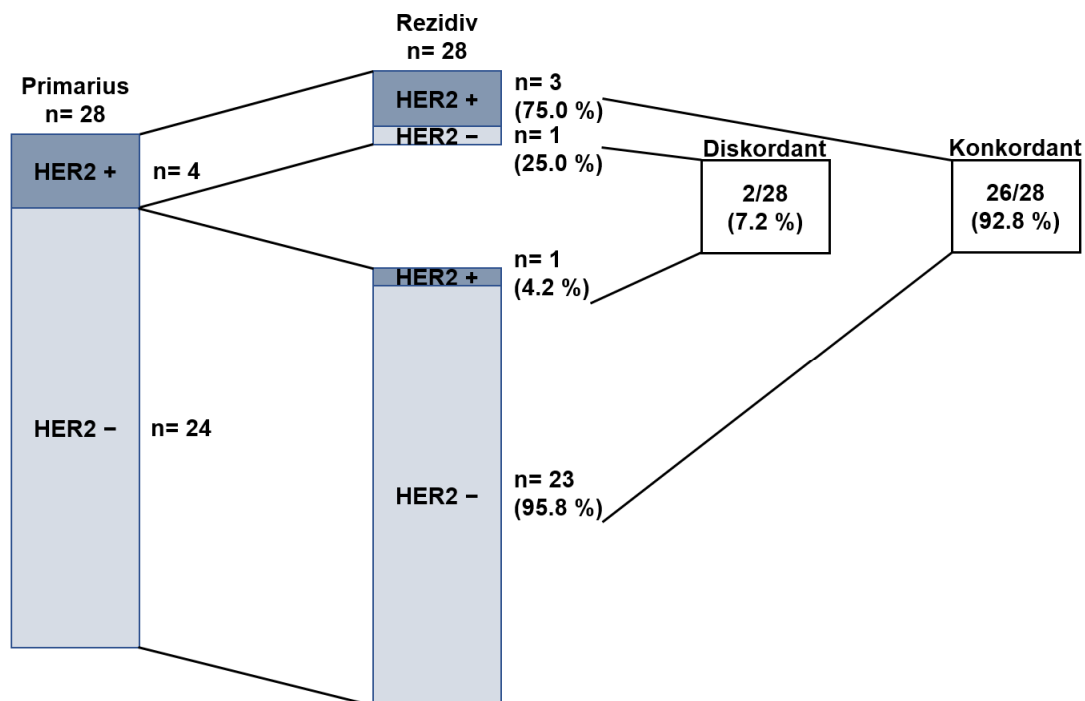


Abbildung 16: Kon- bzw. Diskordanzraten des HER2-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse.

3.2.2.4 Ki-67

Ein Vergleich des Ki-67-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv konnte in 49.0 % (24/49) der Fälle erfolgen. 8.3 % (2/24) der Patientinnen wiesen bei Primärerkrankung einen hoch ($\text{Ki-67-PI} \geq 25.0 \%$) und 91.7 % (22/24) einen niedrig proliferierenden ($\text{Ki-67-PI} < 25.0 \%$) Tumor auf. Im Rahmen der Rezidiv Erkrankung zeigte sich eine identische Verteilung. Insgesamt lagen zu 100 % (24/24) konkordante Ki-67-Status zwischen Primarius und Lokalrezidiv vor.

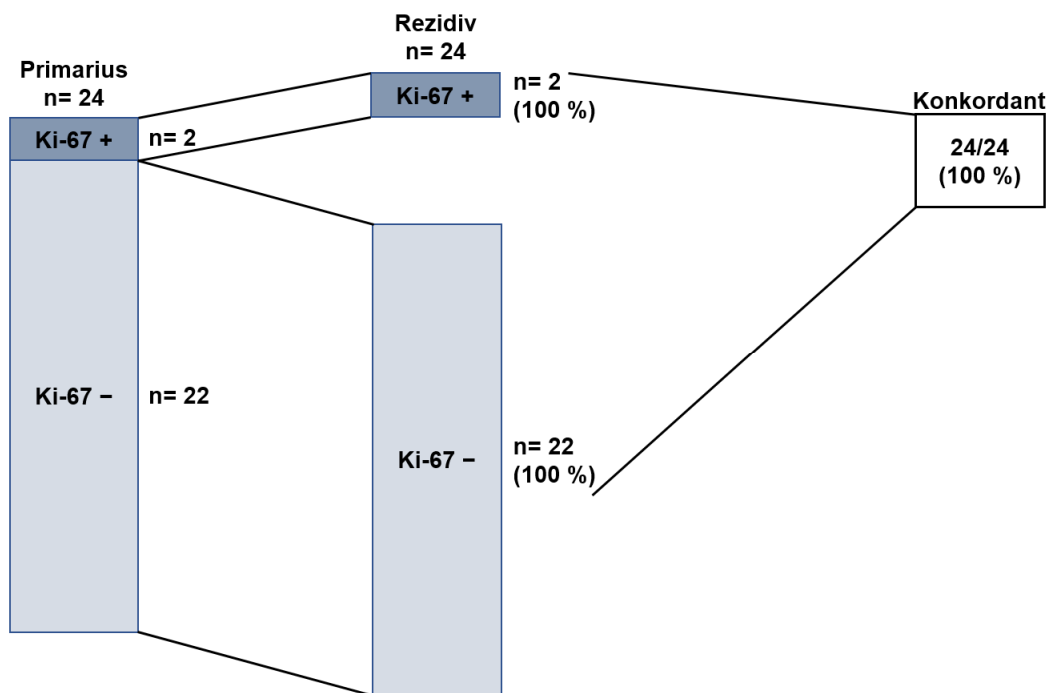


Abbildung 17: Kon- bzw. Diskordanzraten des Ki-67-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse.

3.2.2.5 Intrinsischer Subtyp

In 42.9 % (21/49) der 49 Gewebepaare konnte basierend auf den erneut bestimmten Rezeptorstatus ein intrinsischer Subtyp sowohl für den Primär- als auch den korrespondierenden Rezidivtumor gebildet werden. Die Primärtumore wiesen zu 61.9 % (13/21) einen Luminal A-, zu 14.3 % (3/21) einen HER2-positiven und zu 23.8 % (5/21) einen triple-negativen Subtyp auf. Die Rezidivtumore zeigten in 47.6 % (10/21) der Fälle einen Luminal A-, in 19.1 % (4/21) einen HER2-positiven und in 33.3 % (7/21) einen triple-negativen Subtyp. Von den Primärtumoren mit einem Luminal A-Subtyp (n= 13) zeigten 76.9 % (10/13) auch bei Rezidivverkrankung einen Luminal A-Subtyp. In 15.2 % (2/13) wechselte ein Primärtumor vom Luminal A-Subtyp zu einem triple-negativen und in 7.7 % (1/13) zu einem HER2-positiven Subtyp. Primärtumore vom HER2-positiven und triple-negativen Subtyp zeigten bei Rezidivverkrankung zu 100 % konkordante intrinsische Subtypen. Folglich konnten insgesamt in 14.3 % (3/21) der vergleichbaren Fälle diskordante und in 85.7 % (18/21) konkordante intrinsische Subtypen zwischen Primarius und Lokalrezidiv verzeichnet werden.

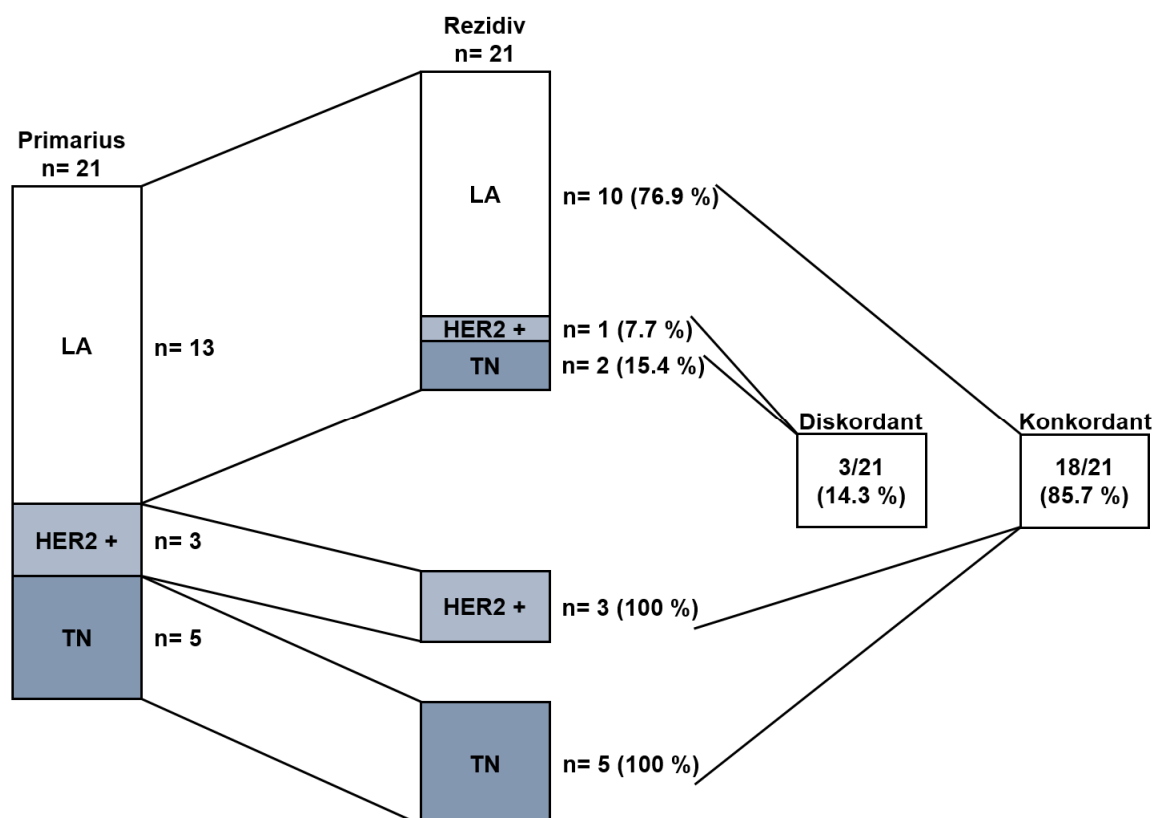


Abbildung 18: Kon- bzw. Diskordanzraten von intrinsischen Subtypen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse. LA, Luminal A; HER2+, HER2-positiv; TN, triple-negativ.

Tabelle 15: Zusammenfassung der auf TMA-Basis ermittelten Kon- bzw. Diskordanzraten von ER, PgR, HER2, Ki-67 und intrinsischen Subtypen zwischen Primarius und Lokalrezidiv (n= 49)

Parameter	n* (%)**
ER	
Vergleichbar	25 (100)
Konkordant	18 (72.0)
Positiv > Positiv	11 (44.0)
Negativ > Negativ	7 (28.0)
Diskordant	7 (28.0)
Positiv > Negativ	6 (24.0)
Negativ > Positiv	1 (4.0)
Nicht auswertbar	24
PgR	
Vergleichbar	25 (100)
Konkordant	17 (68.0)
Positiv > Positiv	10 (40.0)
Negativ > Negativ	7 (28.0)
Diskordant	8 (32.0)
Positiv > Negativ	6 (24.0)
Negativ > Positiv	2 (8.0)
Nicht auswertbar	24
HER2	
Vergleichbar	28 (100)
Konkordant	26 (92.8)
Positiv > Positiv	3 (10.7)
Negativ > Negativ	23 (82.1)
Diskordant	2 (7.2)
Positiv > Negativ	1 (3.6)
Negativ > Positiv	1 (3.6)
Nicht auswertbar	21
Ki-67	
Vergleichbar	24 (100)
Konkordant	24 (100)
high > high	2 (8.3)
low > low	22 (91.7)
Diskordant	0
Nicht auswertbar	25
Intrinsischer Subtyp	
Vergleichbar	21 (100)
Konkordant	18 (85.7)
LA → LA	10 (47.6)
HER2+ → HER2+	3 (14.3)
TN → TN	5 (23.8)
Diskordant	3 (14.3)
LA → HER2+	1 (4.8)
LA → TN	2 (9.5)
Nicht auswertbar	28

Anmerkung: * n= Anzahl, entspricht nicht immer dem vollständigen Patientenkollektiv, da in Einzelfällen keine Daten auswertbar waren. ** Die Prozentangabe bezieht sich jeweils auf die Anzahl der auswertbaren Fälle; ER, Östrogenrezeptor; PgR, Progesteronrezeptor; LA, Luminal A; HER2+, HER2-positiv; TN, triple-negativ.

Tabelle 15 auf Seite 50 fasst die basierend auf den TMA-Ergebnissen ermittelten Diskordanzraten zusammen. Vergleichbare Daten lagen für den ER und PgR jeweils in 51.0 % (25/49), für den HER2 in 57.1 % (28/49) und für den Ki-67-PI in 48.9 % (24/49) der 49 Gewebepaare vor. Diskordante Ergebnisse konnten für den ER in 28.0 % (7/25), den PgR in 32.0 % (8/25) und den HER2 in 7.2 % (2/28) der vergleichbaren Fälle nachgewiesen werden. Für den Ki-67-Status lagen ausschließlich konkordante Ergebnisse vor. Ein Vergleich des intrinsischen Subtyps zwischen Primarius und Lokalrezidiv konnte in 42.9 % (21/49) der Fälle durchgeführt werden. Ein Subtypenswitch zeigte sich in 14.3 % (3/21) der Fälle.

3.3 Vergleich der Ergebnisse von HER2-FISH und HER2-IHC

Die Bestimmung des HER2-Status erfolgte für die 49 Primär- und 49 Rezidivtumore sowohl mittels IHC als auch FISH. Für 73.5 % (36/49) der Primär- und 59.2 % (29/49) der Rezidivtumore konnte mittels beider Verfahren ein Ergebnis für den HER2-Status erzielt werden. Folglich konnte für insgesamt 65 Tumore ein Vergleich der mittels IHC und FISH erzielten HER2-Ergebnisse erfolgen. In 94.0 % (61/65) der Fälle zeigten beide Testverfahren ein übereinstimmendes HER2-Ergebnis. Diskordante Testergebnisse lagen demnach in 6.0 % (4/65) der vergleichbaren Fälle vor. Von den vier diskordanten Fällen, zeigten hierbei drei ein unsicheres immunhistochemisches Ergebnis (Score 2+), wobei in zwei Fällen gleichzeitig ein negatives und in einem Fall ein positives FISH-Ergebnis vorlag. In einem Fall konnte bei einem negativen immunhistochemischen Ergebnis gleichzeitig ein positives FISH-Ergebnis nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Vergleich der Ergebnisse von HER2-FISH und HER2-IHC

			HER2-IHC			Gesamt
			0/1+	2+	3+	
HER2-FISH	negativ	Anzahl % der Gesamtzahl	51 (78.6 %)	2 (3.0 %)	—	53 (81.6 %)
	positiv	Anzahl % der Gesamtzahl	1 (1.5 %)	1 (1.5 %)	10 (15.4 %)	12 (18.4 %)
Gesamt		Anzahl % der Gesamtzahl	52 (80.1 %)	3 (4.5 %)	10 (15.4 %)	65 (100 %)

Anmerkung: IHC, Immunhistochemie; FISH, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

4 Diskussion

Die in verschiedenen Publikationen angegebenen Inzidenzraten für das Auftreten eines lokoregionären Rezidivs variieren je nach bewertetem Patienten- und Tumorkollektiv stark [54, 55, 62, 79-81]. Spronk et al. [63] konnten in einem 2018 veröffentlichten Review ein medianes kumulatives Lokalrezidivrisiko von 6.2 % (SB: 1.9–11.1 %, medianes Follow-up von 10.5 Jahren) ermitteln. Die Vorhersage eines individuellen Rezidivrisikos bleibt dennoch schwierig. Die von einem Lokalrezidiv betroffenen Frauen stellen hinsichtlich der Entwicklung von Fernmetastasen und Mortalität eine Hochrisikogruppe dar [9, 82, 83]. Bei einer optimalen Therapie besteht dennoch eine Chance auf Heilung. Lange orientierte sich das bei Eintreten einer Rezidiverkrankung gewählte Therapieregime an den bei Primärerkrankung erhobenen Rezeptorstatus. Seit den 70er Jahren konnte in Studien jedoch wiederholt gezeigt werden, dass es zwischen Primär- und Rezidivtumoren eines Mammakarzinoms zu einem Wechsel im Biomarkerprofil und damit auch im intrinsischen Subtyp kommen kann [84-86]. Da das Biomarkerprofil maßgeblich die Wahl der Therapie bestimmt, wird heutzutage, wann immer möglich, eine Reevaluation des Biomarkerstatus bei Eintreten einer Rezidiverkrankung angestrebt, um eine optimale Therapie gewährleisten zu können [9, 37, 87]. Trotz der wachsenden Evidenz für eine gewisse Diskordanzrate im Biomarkerprofil bzw. im intrinsischen Subtyp zwischen Primarius und Lokalrezidiv eines Mammakarzinoms wird bis heute kontrovers über die Häufigkeit eines solchen Auftretens diskutiert [83, 86, 88-94]. Im Fokus der Kritik steht insbesondere, dass ein Großteil der Veröffentlichungen mit Angaben zu Diskordanzraten auf der Analyse retrospektiv erhobener Daten basiert [86]. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die „Jetzt-Zeit“ erscheint hierbei aufgrund der sich stetig weiterentwickelnden, sensitiveren Nachweisverfahren (andere Färbemethoden, andere Antikörper, andere Vorbehandlung) schwierig.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde das Biomarkerprofil (ER, PgR, HER2, Ki-67) von gepaarten Primär- und Lokalrezidivtumoren eines Mammakarzinoms erneut unter hoch standardisierten Bedingungen bestimmt. Mit der Herstellung eines TMAs, einer der meist angewandten Gewebehochdurchsatzmethoden, konnte dies gewährleistet werden. Insgesamt wurden 49 gepaarte Tumorproben (Primarius und Lokalrezidiv) zur gleichen Zeit mit der gleichen Methode auf entsprechende Biomarker untersucht und durch denselben Pathologen bewertet, sodass einige wichtige, auf die Diskordanzrate Einfluss nehmende, präanalytische und analytische Variablen (z. B. eine unterschiedliche Vorbehandlung der Gewebeproben, der Gebrauch unterschiedlicher Antikörper für die IHC bzw. FISH oder eine Interobserver-Variabilität bei der Auswertung der Proben) ausgeschlossen werden konnten [22, 95]. In den Fällen, in denen kein Gewebematerial für die TMA-Herstellung gesichert werden konnte (n= 51), erfolgte eine Auswertung der Diskordanzraten basierend auf retrospektiv erhobenen

Rezeptorstatus. In dieser Arbeit wurden somit zwei Kollektive getrennt auf ihre Biomarker- und Subtypendiskordanzraten untersucht.

4.1 Beschreibung der Studienkohorte

Die für das ausgewählte Patientenkollektiv (n= 100) erhobenen klinisch-pathologischen Daten werden im Folgenden auf ihre Validität überprüft. Das mediane Alter bei Erst- und Rezidivdiagnose lag in unserer Studie bei 55 bzw. 64 Jahren. Im Vergleich dazu gab das Robert-Koch-Institut mit 64 Jahren ein deutlich höheres medianes Erkrankungsalter bei Erstdiagnose für die Gesamtheit aller Brustkrebspatientinnen an [2]. In Anbetracht der Tatsache, dass sich unsere Studie ausschließlich auf Patientinnen mit der Entwicklung eines Lokalrezidivs konzentrierte, ist davon auszugehen, dass die Primärtumore unseres Patientenkollektivs generell durch eine erhöhte Aggressivität gekennzeichnet waren und möglicherweise deshalb zu einer früheren Ersterkrankung führten. Damit ist das jüngere Alter bei Primärdiagnose in unserer Studie am ehesten als Selektionsbias zu werten. Bestärkt wird diese Annahme dadurch, dass Studien, die sich ebenfalls nur auf Patientenkollektive mit der Entwicklung einer Rezidivkrankung bezogen, weitestgehend ähnliche Angaben für das Alter bei Primär- und Rezidivdiagnose machten [54, 70, 88, 89, 96].

Die Dauer des Intervalls von der Erst- bis zur Rezidivdiagnose betrug in unserer Studie im Mittel 74 und im Median 63 Monate (SB: 3–232 Monate) und lag damit im Vergleich zu anderen Studienergebnissen im oberen Mittelfeld [70, 88, 91, 92]. Generell variierten die in der Literatur vorzufindenden Angaben über die Dauer des Intervalls von der Erst- bis zur Rezidivdiagnose stark. So zeigte eine Studie von Thompson et al. [88] ein mittleres Intervall von 106.7 Monaten und eine Studie von Montagna et al. [83] ein medianes Intervall von 31.2 Monaten. Am ehesten lässt sich diese Heterogenität darauf zurückführen, dass sich die in den jeweiligen Studien untersuchten Tumore bei Primärdiagnose wesentlich in ihren Tumorcharakteristika und damit gleichzeitig in ihrer Prognose bzw. Aggressivität unterschieden [46, 47, 97]. So zeigte sich der Anteil hormonrezeptorpositiver Primärtumore mit einer tendenziell besseren Prognose und einem entsprechend längerem rezidivfreien Intervall [46] in der von Thompson et al. [88] durchgeführten Studie deutlich höher als in unserer Studie. Gleichzeitig war der Anteil von triple-negativen Primärtumoren mit einer tendenziell schlechteren Prognose [46] in der von Montagna et al. [83] untersuchten Studienkohorte wesentlich höher als in unserer Studie. Darüber hinaus könnten die unterschiedlichen Angaben für die Dauer des Intervalls von Primär- bis Rezidivdiagnose dadurch beeinflusst worden sein, dass sich einige der zum Vergleich herangezogenen Studien in ihre Auswertung nicht ausschließlich auf Lokalrezidive, sondern auch auf Fernmetastasen bezogen [70, 88, 91].

4.2 Biomarker- und Subtypendiskordanzen zwischen Primarius und Lokalrezidiv eines Mammakarzinoms

Verschiedene retro- sowie prospektive Studien beschreiben zwischen Primär- und Rezidivtumoren eines Mammakarzinoms Diskordanzen in der Biomarkerexpression (ER, PgR, HER2 und Ki-67) und im intrinsischen Subtyp. Nur wenige Studien differenzieren in ihrer Auswertung hierbei zwischen Lokalrezidiv und Fernmetastase, sodass sich die angegebenen Diskordanzraten häufig auf beide Formen der Rezidivkrankung beziehen [69, 91, 98]. Studien, die für die jeweiligen Rezidivformen separate Diskordanzraten ermittelten, gaben zwischen Primarius und Lokalrezidiv Diskordanzraten zwischen 5.5 % und 23.1 % für den ER, zwischen 12.0 % und 33.0 % für den PgR, zwischen 1.1 % und 26.3 % für den HER2 und zwischen 18.8 % und 40.0 % für den Ki-67-PI an [83, 86, 88-94, 99]. Für den intrinsischen Subtyp lagen nur sehr wenige Studien vor, die sich ausschließlich auf die Diskordanzrate zwischen Primarius und Lokalrezidiv konzentrierten. Die zum Vergleich herangezogenen Diskordanzraten bezogen sich daher mehrheitlich auf beide Formen der Rezidivkrankung und lagen zwischen 21.0 % und 24.7 % [69, 70, 83, 89, 98].

Auch in dieser Arbeit wiesen einige der untersuchten Tumorpaare diskordante ER-, PgR-, HER2- und Ki-67-Ergebnisse sowie einen intrinsischen Subtypenswitch auf. Da die ermittelten Diskordanzraten in unserer Arbeit zum einen auf der Erhebung retrospektiver Daten und zum anderen auf den Ergebnissen einer TMA-Auswertung basierten, werden die Ergebnisse im Folgenden für beide Kollektive getrennt diskutiert und in den Kontext der aktuellen Studienlage eingeordnet.

Das auf retrospektiven Daten basierende Kollektiv zeigte mit 37.5 % (6/16) die höchste Diskordanzrate für den Ki-67-PI, gefolgt vom PgR mit 29.3 % (12/41), dem HER2 mit 25.9 % (7/27) und abschließend dem ER mit 16.6 % (7/42). Die Anzahl an negativ-Konversionen (n = 20; ER: 4 Fälle, PgR: 8 Fälle, HER2: 5 Fälle, Ki-67: 3 Fälle) überstieg dabei die der positiv-Konversionen (n = 12; ER: 3 Fälle, PgR: 4 Fälle, HER2: 2 Fälle, Ki-67: 3 Fälle), wobei am häufigsten ein PgR-Verlust (n= 8) auftrat. Zu leicht abweichenden Ergebnissen kamen Aurilio et al., die in einer umfangreichen Metaanalyse zwischen Primarius und Lokoregionärem Rezidiv gepoolte Diskordanzraten von 26.0 % (95 % Konfidenzintervall (KI): 21.0–32.0 %) für den PgR, von 16.0 % (95 % KI: 11.0–22.0 %) für den ER und von 6.0 % (95 % KI: 3.0–9.0 %) für den HER2 angaben. Für den ER und PgR zeigten sich damit übereinstimmende, für den HER2 jedoch deutlich niedrigere Diskordanzraten als in unserer Studie. Der am häufigsten beobachtete Rezeptorwechsel war konkordant zu unseren Ergebnissen ein PgR-Verlust.

Ebenfalls verzeichneten Aurilio et al. insgesamt häufiger einen Rezeptorverlust als -zugewinn. Hinsichtlich des Ki-67-PI konnten Montagna et al. [83] in einer retrospektiven Studie (n= 279) zwischen Primarius und lokoregionärem Rezidiv eine Diskordanzrate von 18.8 % nachweisen. Hauptsächlich erfolgte der Switch durch einen Zugewinn von Ki-67 im Rahmen der Rezidiverkrankung. Anders als in unserer Studie wurde für die Differenzierung von hoch bzw. niedrig proliferierenden Tumoren jedoch ein Cut-off-Wert von 14.0 % anstatt 25.0 % gewählt, sodass ein Vergleich nur eingeschränkt möglich war. Für den ER und PgR wiesen Montagna et al. [83] mit 9.0 % und 22.0 % ähnlich hohe und für den HER2 mit 4.0 %, wie Aurilio et al. deutlich niedrigere Diskordanzraten als in unserer Studie nach. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die von uns ermittelten Diskordanzraten für den ER und PgR weitestgehend den Ergebnissen anderer retrospektiver Studien entsprechen. Die von uns ermittelten Diskordanzraten für den Ki-67-PI und den HER2 hingegen lagen im Vergleich deutlich höher.

Die Analyse der TMA-Ergebnisse unseres Kollektivs ergab mit 32.0 % (8/25) die höchste Diskordanzrate für den PgR, gefolgt von 28.0 % (7/25) für den ER und von 7.2 % (2/28) für den HER2. Für den Ki-67-PI lagen ausschließlich konkordante Ergebnisse vor. Damit zeigten sich im Vergleich zum retrospektiven Datenvergleich für den ER und PgR ähnlich hohe und für den HER2 sowie Ki-67 deutlich niedrigere Diskordanzraten. Ebenso kam es wie in ersterem Kollektiv häufiger zu einem Rezeptorverlust (n= 13; ER: 6 Fälle, PgR: 6 Fälle, HER2: 1 Fall) als -zugewinn (n= 4; ER: 1 Fall, PgR: 2 Fälle, HER2: 1 Fall). Insgesamt bestätigen unsere Ergebnisse damit frühere Publikationen, die ebenfalls häufiger einen Wechsel im Hormon- als im HER2-Status sowie häufiger einen Rezeptorverlust als -zugewinn beobachteten [70, 89, 92, 93]. So zeigte eine prospektive Studie von Thompson et al. [88], in der ebenfalls basierend auf einer TMA-Konstruktion die Biomarker von Primarius und Lokalrezidiv reevaluiert und verglichen wurden, Diskordanzraten von 25.0 % für den PgR, von 10.2 % für den ER und von 2.3 % für den HER2. Auch Sho Shiino et al. [89] und Idirisinghe et al. [93] konnten, basierend auf einer matched-pair-Analyse (n= 104 und n= 45) Diskordanzraten von 24.0 % bzw. 33.0 % für den PgR, von 15.4 % bzw. 13.0 % für den ER und von 3.8 % bzw. 2.0 % für den HER2 ermitteln. Für den Ki-67-PI wiesen Carreno et al. [94] mittels einer TMA-basierten matched-pair-Analyse mit 25 Patientinnen eine Diskordanzrate von 40.0 % nach und zeigten damit im Vergleich zu unserer Studie deutlich abweichende Ergebnisse. In 7 von 10 Fällen kam es in Carrenos Studie zu einem Switch von einem niedrig zu einem hoch proliferierenden Tumor, wobei auch in dieser Studie ein anderer Cut-off-Wert (10.0 %) für hoch- bzw. niedrigproliferierende Tumore als in unserer Studie (25.0 %) gewählt wurde.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lassen sich für beide untersuchten Kollektive trotz der ausgeprägten Heterogenität der Analysemethodik, Parallelen in der Verteilung der einzelnen Biomarkerdiskordanzraten erkennen. In Analogie zu einer Vielzahl früherer Publikationen stellte sich für beide Kollektive eine hohe Diskordanzrate für den PgR infolge eines PgR-Verlustes dar, wobei insgesamt häufiger ein Rezeptorverlust als -zugewinn verzeichnet wurde [86, 88, 90]. Darüber hinaus zeigte sich sowohl für das auf TMA- als auch für das auf retrospektiven Daten basierende Kollektiv in 3 der 7 (43.0 %) bzw. 4 der 7 (57.0 %) diskordanten ER-Fälle jeweils ein gleichgerichteter Wechsel im PgR. Dies bestärkt die Annahme, dass die PgR-Expression durch den ER reguliert werden könnte [26]. Hinsichtlich der ermittelten Diskordanzraten für den HER2 und den Ki-67-PI divergierten die Ergebnisse beider Kollektive hingegen deutlich. Mögliche Gründe dafür werden später in dieser Arbeit diskutiert.

Basierend auf den erhobenen Biomarkerstatus konnte für beide untersuchten Kollektive in jeweils 21 Fällen ein intrinsischer Subtypenvergleich zwischen Primarius und Lokalrezidiv erfolgen. Ein Subtypenswitch trat für das auf retrospektiven Daten basierende Kollektiv in 33.3 % (7/21) (s. Abbildung 13, S. 40) und für das auf TMA-Ergebnissen basierende Kollektiv in 14.3 % (3/21) (s. Abbildung 18, S. 49) der vergleichbaren Fälle auf. Frühere Publikationen geben für den intrinsischen Subtyp zwischen Primarius und Rezidiverkrankung Diskordanzraten zwischen 21.0 % und 24.7 % an. Im Vergleich liegen die von uns ermittelten Subtypendiskordanzraten damit für das auf retrospektiven Daten basierende Kollektiv etwas höher und für das auf TMA-Ergebnissen basierende Kollektiv etwas niedriger. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen beobachteten frühere Publikationen ebenfalls häufiger einen Subtypenswitch bei Primärtumoren vom Luminal- und HER2-Subtyp als bei Primärtumoren vom TN-Subtyp [69, 70, 83, 89, 98]. Im Unterschied zu unserer Studie bezogen sich die zum Vergleich herangezogenen Publikationen [69, 70, 89, 98] jedoch mehrheitlich auf alle Arten der Rezidiverkrankung und unterschieden folglich nicht zwischen einer Subtypendiskordanz zwischen Primarius und Lokalrezidiv und Primarius und Fernmetastase. Darüber hinaus erfolgte zumeist keine Bestimmung des Ki-67-Wertes, sodass die Subtypendefinition ausschließlich auf der Erhebung der Surrogatparameter ER, PgR und HER2 basierte. Eine Differenzierung der Subtypen Luminal A (ER-/PgR-positiv, HER2-negativ, Ki-67 niedrig) und Luminal B (ER-/PgR-positiv, HER2 negativ, Ki-67 hoch) auf der Basis des Ki-67-Wertes erfolgte damit, anders als in unserer Arbeit, nicht.

Die in der Literatur diskutierten Hypothesen, die den Mechanismus eines Biomarker- bzw. Subtypenswitches zwischen Primarius und Rezidiverkrankung erklären sollen, sind vielfältig. Unter anderem werden die Art der Fixierung und Vorbereitung der IHC-Färbung bzw. FISH,

unterschiedliche Cut-off-Werte für positive Rezeptorstatus, eine Interobserver-Variabilität [22, 95, 100], eine intratumorale Heterogenität [101], eine therapiebedingte Veränderung der Tumorzelle [102], eine genetische Instabilität der Tumorzelle oder eine klonale Selektion einer Tumorzellsubpopulation [103, 104] als Gründe angeführt. Wie anfangs beschrieben, versuchten wir einige der aufgeführten Faktoren durch die Konstruktion eines TMAs auszuschalten. Doch insbesondere die für das retrospektive Kollektiv ermittelten Diskordanzraten, könnten durch einige der genannten Gründe beeinflusst worden sein. So zeigte sich bei einem direkten Vergleich der einzelnen Biomarkerdiskordanzraten, dass das auf retrospektiven Daten basierende Kollektiv deutlich höhere Diskordanzraten für den HER2 (25.9 % vs. 7.2 %) und den Ki-67-PI (37.5 % vs. 0 %) aufwies, als das auf TMA-Ergebnissen basierende Kollektiv. Ursächlich hierfür könnten unter anderem oben genannte technisch-analytische Faktoren sein. Denn ein Großteil der Biomarkerbestimmungen des retrospektiven Kollektivs, vor allem die der Primärtumore, lag teilweise Jahre oder sogar Jahrzehnte zurück. Gleichzeitig kam es im Verlauf zu einer Weiterentwicklung der zum Einsatz kommenden Testverfahren, Fixierungsmethoden, Reagenzien, Antikörper und Bewertungsalgorithmen [22]. Insbesondere die Empfehlungen zur HER2- [29, 105] und Ki-67-Bestimmung [106, 107] unterlagen wiederholt Veränderungen, wobei für die Bestimmung und Evaluation des Ki-67-PI bis heute keine einheitliche internationale Leitlinie vorliegt [40]. Es stellt sich daher die Frage, wie verlässlich und reproduzierbar die retrospektiv erhobenen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen bzw. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen wirklich sind [22, 40, 87, 108]. Unter anderem Amir et al. [109] berichteten nach einer Reevaluation der Tumorproben von sich deutlich zum Originalbericht unterscheidenden Diskordanzraten. Zumindest teilweise erscheint die Entstehung von diskordanten Biomarkerergebnissen, insbesondere für retrospektive Daten, durch technisch-analytische Fehler erklärbar. Dennoch weisen verschiedene Gegebenheiten darauf hin, dass noch andere Faktoren in der Entstehung von Biomarkerdiskordanzen eine Rolle spielen. So geben Aurilio et al. [86] zu bedenken, dass die Anzahl an Rezeptorverlusten und -zugewinnen sowie die Diskordanzraten für die einzelnen Rezeptoren bei einem rein zufälligen Entstehen aufgrund technisch-analytischer Fehler, annähernd gleich hoch sein müssten. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Studien berichten in der Mehrzahl der Fälle von einer höheren Anzahl an Rezeptorverlusten als -zugewinnen und von sich deutlich unterscheidenden Einzelrezeptordiskordanzraten, mit der höchsten Diskordanzrate in der Regel für den PgR, gefolgt vom ER und abschließend dem HER2 [83, 86, 88, 89, 92].

Neben der Ursachenklärung eines Biomarker- bzw. Subtypenswitches stellt sich die Frage nach dessen prognostischer und klinischer Implikation. Hierzu liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor. Verschiedene retrospektive Studien gehen davon aus, dass eine Biomarker- bzw. Subtypendiskordanz zwischen Primarius und Rezidivkrankung mit

einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ist. Insbesondere ein ER- oder HER2-Verlust bzw. ein Wechsel zu einem TN-Subtyp wird hierbei mit einem reduzierten Überleben nach Rezidivkrankung sowie einem reduzierten Gesamtüberleben in Verbindung gebracht [69, 70, 89, 99, 110]. Eine prospektive Studie von Amir et al. [109] hingegen konnte nach Anpassung der Therapie an den jeweiligen Rezeptorstatus der Rezidivkrankung keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Rezeptor-konkordanten (medianes Überleben: 27.6 Monate) und Rezeptor-diskordanten (medianes Überleben: 30.2 Monaten) Tumoren feststellen. Daher gehen Amir et al. vielmehr davon aus, dass die von verschiedenen retrospektiven Studien mit einem reduzierten Überleben in Verbindung gebrachte Rezeptordiskordanz, nicht auf die Rezeptordiskordanz an sich, sondern auf eine inadäquate Therapiewahl zurückzuführen ist. Zu einem ähnlichen Schluss kommen Liedtke et al. [110], die das in ihrer Studie ermittelte reduzierte Überleben von Patientinnen mit rezeptordiskordanten Tumoren zumindest teilweise darin begründet sehen, dass diese aufgrund eines falsch-positiv oder falsch-negativ ermittelten Rezeptorstatus eine ineffektive bzw. keine effektive Therapie erhielten. Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung eines PgR-Verlustes liegen ebenfalls kontroverse Daten vor. Obwohl ein PgR-Verlust keinen maßgeblichen Einfluss auf die therapeutische Entscheidungsfindung hat, werten verschiedene Autoren den PgR-Status in ER-positiven Patientinnen als prädiktiven Marker für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie. Folglich wird ein PgR-Verlust mit einem reduzierten Ansprechen auf eine endokrine Therapie und einem damit verbundenen Shift zu einem aggressiveren Phänotyp mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert [26, 86, 92, 109, 111]. Studiengruppen um Lindström et al. [90], Dieci et al. [70] oder die Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group [112] hingegen konnten einem PgR-Verlust keine prognostische oder prädiktive Bedeutung zumessen. Ob die Höhe bzw. ein Zugewinn oder Verlust von Ki-67 im Rahmen der Rezidivkrankung einen ähnlichen Einfluss auf die Prognose hat wie bei Primärerkrankung, ist bisher unklar. Studien, die die Ki-67-Werte zwischen Primär- und Rezidivtumoren untersuchten, verzeichneten zumeist eine Zunahme von Ki-67 im Rezidivtumor [83, 94, 98]. Insgesamt lagen jedoch nur wenige vergleichbare Daten für den Ki-67-PI vor, was vermutlich am ehesten auf die bis heute mangelnde Standardisierung und Reproduzierbarkeit der immunhistochemischen Bestimmung zurückzuführen ist [40]. Die dringliche Notwendigkeit einer internationalen Standardisierung und Leitlinien-Implementierung zur Ki-67-Bestimmung wird hier nochmals deutlich. Denn insbesondere für Patientinnen mit einem Luminal-Tumor ist eine valide Ki-67-Bestimmung zur Differenzierung der Subtypen Luminal A und Luminal B von großer, vor allem prädiktiver Bedeutung [41-43].

Inwiefern eine erneute Biomarkerbestimmung des Rezidivtumors tatsächlich die klinische Entscheidungsfindung beeinflusst, wurde unter anderem von Amir et al. [109], Thompson et al. [88], Bogina et al. [92] und Curigliano et al. [113] untersucht. Sie bestimmten den Anteil

derjenigen Patientinnen, deren Therapieplanung sich basierend auf den Biomarkerergebnissen der Re-Biopsie änderte. Dies war je nach Publikation in jeweils 14.0 %, 17.5 %, 7.3 % und 12.1 % der untersuchten Gewebeproben der Fall, wobei ein Zugewinn im ER- und HER-Status am häufigsten die Wahl der Therapie beeinflusste [87]. Ob sich ein an den Rezeptorergebnissen der Rezidivkrankung orientierender Therapieplan tatsächlich auf das Überleben von Patienten auswirkt, ist bislang ungeklärt. Amir et al. [109] konnten, wie oben bereits beschrieben, lediglich nachweisen, dass ein rezeptordiskordantes Ergebnis zwischen Primarius und Rezidiv im Vergleich zu einem rezeptorkonkordanten Ergebnis keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patientinnen hat, wenn eine entsprechende Modifikation der Therapie erfolgt war. Die diesbezüglich geringe Datenlage ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich die Durchführung von randomisiert kontrollierten Studien in diesem Setting als schwierig erweist.

4.3 Methodenvergleich: HER2-IHC und HER2-FISH

Der HER2-Status ist, wie in der Einleitung bereits beschrieben, von wichtiger prognostischer sowie prädiktiver Bedeutung. Seine korrekte Bestimmung ist daher obligat. Die derzeit gängigsten Methoden zur Bestimmung des HER2-Status stellen die Immunhistochemie (IHC) und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) dar [105, 107]. Die IHC weist hierbei eine HER2-Überexpression auf Proteinebene und die FISH eine HER2-Genamplifikation auf DNA-Ebene nach. Beide Verfahren werden von der American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) als gleichwertig angesehen. Grundvoraussetzung hierfür sind jedoch hochkonkordante Ergebnisse für die FISH und die IHC. Labore, die eine HER2-Bestimmung durchführen, sind daher dazu angehalten, regelmäßig die Konkordanz zwischen den von ihnen eingesetzten Testverfahren zu kontrollieren [29, 105, 114].

Um die Konkordanzrate beider Testverfahren in unserer Studie zu bestimmen, erfolgte die HER2-Bestimmung für das TMA-basierte Kollektiv sowohl mittels IHC als auch mittels FISH. Für beide Verfahren zeigten sich mit 94.0 % (61/65) in hohem Maße konkordante Ergebnisse. Insgesamt lagen vier diskordante Ergebnisse vor. Davon stellte sich in drei Fällen ein unsicheres IHC-Ergebnis (Score 2+) dar, unter deren Ausschluss sogar eine Konkordanzrate von 98.4 % (61/62) erreicht werden konnte. In einem Fall konnte bei einem negativen IHC-Ergebnis ein positives HER2-FISH-Ergebnis nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache für eine fehlende Überexpression des HER2-Proteins trotz HER2-Genamplifikation werden in der Literatur verschiedene Gründe diskutiert. Unter anderem werden eine mangelhafte Gewebefixation mit einem Antigenverlust, eine nur geringe Genamplifikation, eine Runterregulation der Transkription oder eine post-transkriptionale bzw. post-translationale

Modifikation mit konsekutiv geringeren HER2-Proteinleveln oder aberranten Epitopregionen als Gründe angeführt [115-117]. Insgesamt erfüllten unsere Ergebnisse die Anforderungen der ASCO/CAP [118] zufriedenstellend, sodass von einer hohen Genauigkeit und Reliabilität der von uns eingesetzten Testverfahren ausgegangen werden kann.

4.4 Limitationen

Diese Arbeit weist verschiedene Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten. Zum einen konnte nur für einen Teil des insgesamt kleinen Patientenkollektivs eine Untersuchung auf TMA-Basis erfolgen, sodass ein Großteil unserer Studienergebnisse ausschließlich auf retrospektiven Daten basiert, was die Aussagekraft der Ergebnisse insgesamt mindert. Zum anderen definierten wir das Lokalrezidiv als einen in der ipsilateralen Brust erneut auftretenden Tumor, ohne diesen in Bezug zu der Tumorlokalisation (z. B. Quadrant) der Primärerkrankung zu setzen. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die von uns als Lokalrezidiv gewerteten Tumore eigentlich Zweittumore mit einer entsprechend eigenen Tumorbilogie darstellten. Zudem sind Fehler bei der Erhebung und Auswertung der Daten nicht vollends auszuschließen.

5 Zusammenfassung

Trotz effektiver Therapiemöglichkeiten entwickelt ein gewisser Anteil von Patientinnen nach der Therapie eines primären Mammakarzinoms ein Lokalrezidiv. Maßgeblich entscheidend für das Outcome dieser Patientinnen ist die Wahl einer optimalen Rezidivtherapie. Früher orientierte sich diese an den bei Primärerkrankung erhobenen subtypendefinierenden Biomarkerstatus (Östrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PgR), HER2 und Ki-67). Da verschiedene Studien jedoch nachweisen konnten, dass zwischen Primär- und Rezidivkrankung diskordante Biomarkerstatus bzw. intrinsische Subtypen vorliegen können, erfolgt heutzutage, wann immer möglich, eine Reevaluation entsprechender subtypendefinierender Marker. Trotz der zunehmenden Evidenz für eine gewisse Rate an diskordanten Rezeptorstatus bzw. intrinsischen Subtypen zwischen Primarius und Rezidivkrankung eines Mammakarzinoms wird bis heute kontrovers über die tatsächliche Häufigkeit einer solchen Diskordanz diskutiert. Kritisiert wird insbesondere, dass ein Großteil der Studien mit Angaben zu diskordanten Rezeptorstatus auf retrospektiv erhobenen Daten basiert, deren Verlässlichkeit als unzureichend beurteilt wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen Tissue Microarray (TMA) aus gepaarten Tumorgewebeproben (Primärtumor und Lokalrezidiv) zu erstellen. Dieser sollte dann in einem zweiten Schritt auf die subtypendefinierenden molekularen Marker (ER, PgR, HER2 und Ki-67) erneut untersucht und mögliche Diskordanzraten ermittelt werden. Insgesamt konnten wir 100 Patientinnen identifizieren, die zwischen 1994 und 2015 ein Lokalrezidiv entwickelten und sowohl bei Primär- als auch Rezidivkrankung im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf operativ behandelt wurden. Für 49 Patientinnen konnte eine TMA-basierte Reevaluation erfolgen. Für 51 weitere Patientinnen erfolgte die Bestimmung der Diskordanzraten aufgrund fehlenden Gewebematerials auf der Basis retrospektiv erhobener Daten.

In beiden untersuchten Kollektiven zeigten sich zu einem gewissen Anteil diskordante Einzelrezeptorstatus bzw. intrinsische Subtypenswitches zwischen Primarius und Lokalrezidiv. Die Analyse der TMA-Ergebnisse ergab dabei für den ER, PgR und HER2 eine Diskordanzrate von jeweils 28.0 %, 32.0 % und 7.2 %. Für den Ki-67-PI zeigten sich ausschließlich konkordante Ergebnisse. Für das auf retrospektiven Daten basierende Kollektiv stellten sich für den ER, PgR, HER2 und Ki-67-PI jeweils Diskordanzraten von 16.6 %, 29.3 %, 25.9 % und 37.5 % dar. Insgesamt führten die diskordanten Einzelrezeptorstatus zwischen Primarius und Lokalrezidiv für das auf TMA-Ergebnissen basierende Kollektiv in 14.3 % und für das auf retrospektiven Daten basierende Kollektiv in 33.3 % der vergleichbaren Fälle zu einem Wechsel im intrinsischen Subtyp.

Damit konnten wir die Beobachtungen früherer Publikationen bestätigen und demonstrieren, dass auch unter hoch standardisierten Bedingungen eine gewisse Instabilität der Biomarker im Verlauf des Tumorprogresses vorliegt. Die Ergebnisse bestätigen die dringende

Notwendigkeit einer Re-Biopsie bei Eintreten einer Rezidivkrankung, um eine optimale Therapie gewährleisten zu können. Diese würde neben einer verbesserten prädiktiven Genauigkeit hinsichtlich des Einsatzes spezieller zielgerichteter Therapien zudem Fehldiagnosen und damit unnötige oder sogar falsche Therapien verhindern. Basierend auf den Daten verschiedener Publikationen ist zudem anzunehmen, dass auch zwischen Primarius und Fernmetastase ähnlich häufig diskordante Einzelrezeptorstatus bzw. intrinsische Subtypen auftreten. Daher sollte in jedem Fall auch bei nicht mehr operativ behandelbaren Rezidivfällen (M1) eine erneute Bestimmung der subtypenbestimmenden Biomarker angestrebt werden. Welchen Effekt bzw. prognostischen Vorteil eine Re-Biopsie mit Anpassung der Therapie an den Biomarkerstatus der Rezidivkrankung hat, ist bisher unklar. Es wird jedoch immer deutlicher, dass die molekulare Charakterisierung des Rezidivtumors Ärzte in ihren (Be-)Handlungsentscheidungen wesentlich beeinflusst. Um entsprechende Zusammenhänge zu klären, bedarf es weiterer prospektiver, wenn möglich randomisierter Studien.

6 Summary

Despite effective therapeutic options, a certain number of patients develop a local recurrence after treatment for primary breast cancer. A decisive factor for the outcome of these patients is the choice of an optimal recurrence therapy. Previously, the recurrence therapy was based on the status of the subtype-defining biomarkers (oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), HER2 and Ki-67) determined for the primary tumour. However, various studies have shown that the biomarker status and hence the intrinsic subtype of the recurrent disease may differ from the primary tumour. For that reason, today, a re-evaluation of corresponding subtype-defining markers is carried out whenever possible. Despite the increasing evidence for discordant receptor statuses and intrinsic subtypes between primary and recurrent breast cancer, its actual frequency is still controversially discussed. More precisely, most of the available data on discordant receptor statuses has been collected in retrospective studies, the reliability of which is judged to be insufficient.

Therefore, the aim of this work was to build a tissue microarray (TMA) from paired tumour tissue samples (primary tumour and locoregional recurrence). In a second step, the TMA should then be re-examined for the subtype-defining markers (ER, PgR, HER2 and Ki-67) and corresponding rates of discordance determined. In total we were able to identify 100 patients who developed a locoregional recurrence between 1994 and 2015 and were treated surgically at the University Medical Center Hamburg Eppendorf in both primary and recurrent disease. We performed a TMA-based evaluation for 49 patients and determined the discordance rates for further 51 patients using retrospectively collected data due to missing tissue material.

Both in our TMA-based samples as well as in our samples based on retrospective data, we found rates of discordant single-receptor statuses and intrinsic subtypes. The analysis of the TMA results showed discordance rates for ER, PgR and HER2 in 28.0 %, 32.0 % and 7.2 %, respectively. For Ki-67, the TMA-based collective showed exclusively concordant results. For the collective based on retrospective data, the discordance for ER, PgR, HER2 and Ki-67 was 16.6 %, 29.3 %, 25.9 % and 37.5 %, respectively. Overall, the discordant single-receptor statuses between primary and locoregional recurrence led to a change in the intrinsic subtype in 14.3 % of the TMA-based cases and in 33.3 % of comparable cases in the collective based on retrospective data.

To conclude, we were able to confirm findings from previous studies regarding discordance rates between primary and recurrent breast cancer. This demonstrates that even under highly standardized conditions, there is an instability of the biomarkers in the course of tumour progression. Hence, our results confirm the urgent need for a re-biopsy in case of recurrent disease in order to ensure an optimal therapy. In addition to improved predictive accuracy regarding the use of specific targeted therapies, a re-biopsy may also prevent misdiagnosis and, accordingly, avert unnecessary or wrong therapies. Based on the data of various

publications, we can assume that there is a similar frequency of discordant single-receptor statuses and intrinsic subtypes between primary tumour and distant metastasis (M1). Therefore, an analysis of the subtype-defining biomarkers should also be aimed at in patients with recurrent disease who can no longer be treated surgically because of distant metastasis (M1). The effects of a re-biopsy with a correspondent adaptation of therapy on treatment outcome and prognosis are not conclusive yet. However, it is becoming increasingly clear that the molecular characterization of the recurrent tumour has a significant influence on physicians in their (treatment) decisions. In order to clarify corresponding correlations, further prospective and if possible randomized studies are urgently needed.

7 Abkürzungsverzeichnis

AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AI	Aromataseinhibitor
AR	Antigen Retrieval
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BET	brusterhaltende Operation
CAP	College of American Pathologists
cDNA	complementary DNA
CEP17	centromere enumeration probe for chromosome 17
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED	Erstdiagnose
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Östrogenrezeptor
FFPE	formalinfixiert und paraffineingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GnRHa	gonadotropin-releasing hormone agonist
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIER	heat induced epitope retrieval
HR	Hormonrezeptor
HRP	horseradish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
ISH	In-situ-Hybridisierung
KI	Konfidenzintervall
LA	Luminal A
LB	Luminal B
LK	Lymphknoten
MRM	modifizierte radikale Mastektomie
NACT	neoadjuvante Chemotherapie
OFS	ovarian function suppression
pCR	pathologische Komplettremission
PgR	Progesteronrezeptor

PI	Proliferationsindex
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SB	Streuungsbreite
SERM	selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
Tis	Tumor in situ
TMA	Tissue Microarray
TN	Triple-negativ
UICC	Union for International Cancer Control

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzipien der systemischen (neo)adjuvanten Therapie in Abhängigkeit vom intrinsischen Subtyp	9
Abbildung 2: Selektion des Patientenkollektivs	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mamma-Arrays	16
Abbildung 4: TMA-Konstruktion.....	17
Abbildung 5: IHC mit LINKER-Einsatz	19
Abbildung 6: IHC ohne LINKER-Einsatz	19
Abbildung 7: Ablauf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	27
Abbildung 8: Auswertung der HER2-FISH bzw. der Sondensignale mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	31
Abbildung 9: Kon- bzw. Diskordanzraten des ER-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten	36
Abbildung 10: Kon- bzw. Diskordanzraten des PgR-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten	37
Abbildung 11: Kon- bzw. Diskordanzraten des HER2-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten.....	38
Abbildung 12: Kon- bzw. Diskordanzraten des Ki-67-PI zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten.....	39
Abbildung 13: Kon- bzw. Diskordanzraten von intrinsischen Subtypen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf der Basis retrospektiv erhobener Daten	40
Abbildung 14: Kon- bzw. Diskordanzraten des ER-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse.....	45
Abbildung 15: Kon- bzw. Diskordanzraten des PgR-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse.....	46
Abbildung 16: Kon- bzw. Diskordanzraten des HER2-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse.....	47
Abbildung 17: Kon- bzw. Diskordanzraten des Ki-67-Status zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse.....	48
Abbildung 18: Kon- bzw. Diskordanzraten von intrinsischen Subtypen zwischen Primärtumor und Lokalrezidiv auf Basis der TMA-Ergebnisse.....	49

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der klinisch etablierten prognostischen und prädiktiven Faktoren.....	3
Tabelle 2: Klinisch-pathologische Definition der intrinsischen Subtypen anhand immunhistochemischer Surrogatmarker.....	8
Tabelle 3: Lokoregionäres Rezidiv - Risikofaktoren bei Primärdiagnose	11
Tabelle 4: Inzidenz und Prognose der verschiedenen lokoregionären Rezidive.....	12
Tabelle 5: Verwendete Antikörper ER α /PgR/Ki-67-IHC	20
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien und Kits ER/PgR/Ki-67-IHC	20
Tabelle 7: Verwendeter Antikörper HER2-IHC.....	23
Tabelle 8: Verwendete Reagenzien und Kits HER2-IHC	23
Tabelle 9: Verwendete Sonden HER2-FISH	28
Tabelle 10: Verwendete Reagenzien und Kits HER2-FISH	28
Tabelle 11: Klinisch-pathologische Charakteristika des ausgewählten Patientenkollektivs (n= 100) bei Erst- und Rezidivdiagnose	33
Tabelle 12: Retrospektiv erhobene Biomarkerstatus und intrinsische Subtypen bei Erst- und Rezidivdiagnose (n= 51)	35
Tabelle 13: Zusammenfassung der auf Basis von retrospektiven Daten ermittelten Kon- bzw. Diskordanzraten von ER, PgR, HER2, Ki-67 und intrinsischen Subtypen zwischen Primarius und Lokalrezidiv (n= 51).....	41
Tabelle 14: Auswertbarkeit der fünf TMA-Gewebeschnitte (n= 49).....	43
Tabelle 15: Zusammenfassung der auf TMA-Basis ermittelten Kon- bzw. Diskordanzraten von ER, PgR, HER2, Ki-67 und intrinsischen Subtypen zwischen Primarius und Lokalrezidiv (n= 49).....	50
Tabelle 16: Vergleich der Ergebnisse von HER2-FISH und HER2-IHC.....	51

10 Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Krebs in Deutschland für 2013/2014, 11. Auflage. 2017, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Berlin p. 154. [Online im Internet] URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile. [Stand: 16.07.2018, 14:55].
3. Torre, L.A., et al., Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
4. Dunst, J., et al., Prognostic Significance of Local Recurrence in Breast Cancer after Postmastectomy Radiotherapy. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2001. **177**(10): p. 504-510.
5. Schmoor, C., et al., Role of Isolated Locoregional Recurrence of Breast Cancer: Results of Four Prospective Studies. *Journal of Clinical Oncology*, 2000. **18**(8): p. 1696-1708.
6. Senkus, E., et al., Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2015. **26 Suppl 5**: p. v8-30.
7. Moran, M.S., et al., Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014. **88**(3): p. 553-64.
8. Houssami, N., et al., Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(18): p. 3219-32.
9. Cardoso, F., et al., 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4). *Ann Oncol*, 2018.
10. (AGO), A.G.O.e.V. Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs. Version 2018. [Online im Internet] URL: https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2018-03/Gesamt_deutsch/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2018.pdf. [Stand: 08.12.2018, 17:46].
11. Jänicke, F., V. Müller, and N. Harbeck, Prognostische und prädiktive Faktoren (unter Berücksichtigung von Genexpressionsanalysen), in *Mammakarzinom Interdisziplinär*. 2010, Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg. p. 98-108.
12. Tao, J.J., K. Visvanathan, and A.C. Wolff, Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast*, 2015. **24 Suppl 2**: p. S149-53.

13. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.1, 2018 AWMF Registernummer: 032-045OL. [Online im Internet] URL: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>. [Stand: 15.01.2020, 09:16].
14. Giuliano, A.E., et al., Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(4): p. 290-303.
15. Wittekind, C., TNM Klassifikation maligner Tumoren. 8 ed. 2017, Weinheim: Wiley-VCH.
16. Carter CL, A.C., Henson DE, Relation of Tumor Size, Lymph Node Status, and Survival in 24,740 Breast Cancer Cases. 1989.
17. Patrick L. Fitzgibbons, M.D.L.P., MD; Donald Weaver, MD; Ann D. Thor, MD; D. Craig Allred, MD; M.S.G.R. Gary M. Clark, MD; Frances O'Malley, MD; Jean F. Simpson, MD; James L. Connolly, MD; and M.S.B.E. Daniel F. Hayes, MD; Allen Lichter, MD; Stuart J. Schnitt, MD, Prognostic Factors in Breast Cancer - College of American Pathologists Consensus Statement 1999. 2000.
18. Lakhani S.R., E.I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J. (Eds.). WHO Classification of Tumours of the Breast. 2012; 4. [Online im Internet] URL: <http://drzafariqbal.com/wp-content/uploads/2017/07/Tumours-of-the-Breast-World-Health-Organization-2012.pdf>. [Stand: 23.08.2018, 9:41].
19. Emad A Rakha, J.S.R.-F., Frederick Baehner, David J Dabbs, Thomas Decker, Vincenzo Eusebi, Stephen B Fox, Shu Ichihara, Jocelyne Jacquemier, Sunil R Lakhani, José Palacios, Andrea L Richardson, Stuart J Schnitt, Fernando C Schmitt, Puay-Hoon Tan, Gary M Tse, Sunil Badve and Ian O Ellis*, Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. 2010.
20. Gekle, M., et al., Taschenlehrbuch Physiologie 2010: Thieme.
21. Allred, D.C., Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. Mod Pathol, 2010. **23 Suppl 2**: p. S52-9.
22. Hammond, M.E., et al., American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Clin Oncol, 2010. **28**(16): p. 2784-95.
23. Paterni, I., et al., Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): subtype-selective ligands and clinical potential. Steroids, 2014. **90**: p. 13-29.
24. Davies, C., et al., Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. The Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-784.
25. Eisen, A., et al., Optimal systemic therapy for early breast cancer in women: a clinical practice guideline. Curr Oncol, 2015. **22**(Suppl 1): p. S67-81.
26. Kim, H.J., et al., Progesterone receptor loss correlates with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in estrogen receptor-positive breast cancer. Clin Cancer Res, 2006. **12**(3 Pt 2): p. 1013s-1018s.

27. Ross, J.S., et al., The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*, 2009. **14**(4): p. 320-68.
28. Mitri, Z., T. Constantine, and R. O'Regan, The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract*, 2012. **2012**: p. 743193.
29. Wolff, A.C., et al., Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2014. **138**(2): p. 241-256.
30. Slamon, D., et al., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987. **235**(4785): p. 177-182.
31. Perez, E.A., et al., Trastuzumab emtansine with or without pertuzumab versus trastuzumab with taxane for human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: Final results from MARIANNE. *Cancer*, 2019. **125**(22): p. 3974-3984.
32. Cobleigh, M.A., et al., Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(9): p. 2639-48.
33. Vogel, C.L., et al., Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(3): p. 719-26.
34. Slamon, D.J., 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): p. 783-92.
35. Gianni, L., et al., Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The lancet oncology*, 2012. **13**(1): p. 25-32.
36. Moja, L., et al., Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012(4): p. CD006243.
37. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.0, 2017 AWMF Registernummer: 032-045OL. [Online im Internet] URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>. [Stand: 21.08.2018, 10:46].
38. Inwald, E.C., et al., Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **139**(2): p. 539-52.
39. Petrelli, F., et al., Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. **153**(3): p. 477-91.

40. Harris, L.N., et al., Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(10): p. 1134-50.
41. Gluz, O., et al., West German Study Group Phase III PlanB Trial: First Prospective Outcome Data for the 21-Gene Recurrence Score Assay and Concordance of Prognostic Markers by Central and Local Pathology Assessment. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(20): p. 2341-9.
42. Nitz, U., et al., Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression. *Ann Oncol*, 2014. **25**(8): p. 1551-7.
43. Sonnenblick, A., et al., Final 10-year results of the Breast International Group 2-98 phase III trial and the role of Ki67 in predicting benefit of adjuvant docetaxel in patients with oestrogen receptor positive breast cancer. *Eur J Cancer*, 2015. **51**(12): p. 1481-9.
44. Perou, C.M., et al., Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000. **406**: p. 747.
45. Sorlie, T., et al., Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
46. Metzger-Filho, O., et al., Patterns of Recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(25): p. 3083-90.
47. Voduc, K.D., et al., Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(10): p. 1684-91.
48. Cheang, M.C., et al., Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(10): p. 736-50.
49. Hugh, J., et al., Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1168-76.
50. Harbeck, N. and M. Gnant, Breast cancer. *The Lancet*, 2017. **389**(10074): p. 1134-1150.
51. Parker, J.S., et al., Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1160-7.
52. Wallden, B., et al., Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics*, 2015. **8**: p. 54.
53. Prat, A., et al., Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*, 2013. **18**(2): p. 123-33.
54. Lowery, A.J., et al., Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012. **133**(3): p. 831-841.

55. McGuire, A., et al., Locoregional Recurrence Following Breast Cancer Surgery in the Trastuzumab Era: A Systematic Review by Subtype. *Ann Surg Oncol*, 2017. **24**(11): p. 3124-3132.
56. Harbeck, N., et al., Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions. *Cancer Treat Rev*, 2010. **36**(8): p. 584-94.
57. Albanell, J., et al., Pooled analysis of prospective European studies assessing the impact of using the 21-gene Recurrence Score assay on clinical decision making in women with oestrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative early-stage breast cancer. *Eur J Cancer*, 2016. **66**: p. 104-13.
58. Cardoso, F., et al., 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*, 2016. **375**(8): p. 717-29.
59. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet*, 2012. **379**(9814): p. 432-444.
60. Moosdorff, M., et al., Maastricht Delphi consensus on event definitions for classification of recurrence in breast cancer research. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(12).
61. Dunst, J., et al., Das lokale Rezidiv beim Mammakarzinom. *Der Onkologe*, 2014. **8**(8): p. 867-873.
62. Holleczer, B., et al., Risk of loco-regional recurrence and distant metastases of patients with invasive breast cancer up to ten years after diagnosis - results from a registry-based study from Germany. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 520.
63. Spronk, I., et al., Incidence of isolated local breast cancer recurrence and contralateral breast cancer: A systematic review. *Breast*, 2018. **39**: p. 70-79.
64. Haffty, B.G., et al., Prognosis following local recurrence in the conservatively treated breast cancer patient. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 1991. **21**(2): p. 293-298.
65. Moran, M.S. and B.G. Haffty, Local-Regional Breast Cancer Recurrence: Prognostic Groups Based on Patterns of Failure. *The Breast Journal*, 2002. **8**(2): p. 81-87.
66. Houssami, N., et al., Early detection of second breast cancers improves prognosis in breast cancer survivors. *Ann Oncol*, 2009. **20**(9): p. 1505-10.
67. Newman, L.A., et al., Presentation, treatment, and outcome of local recurrence after skin-sparing mastectomy and immediate breast reconstruction. *Ann Surg Oncol*, 1998. **5**(7): p. 620-6.
68. Tanis, E., et al., Locoregional recurrence after breast-conserving therapy remains an independent prognostic factor even after an event free interval of 10 years in early stage breast cancer. *Eur J Cancer*, 2012. **48**(12): p. 1751-6.
69. McAnena, P.F., et al., Breast cancer subtype discordance: impact on post-recurrence survival and potential treatment options. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 203.

70. Dieci, M.V., et al., Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-institution analysis. *Ann Oncol*, 2013. **24**(1): p. 101-8.
71. Kononen, J., et al., Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998. **4**(7): p. 844-7.
72. Dancau, A.M., et al., Tissue Microarrays. *Methods Mol Biol*, 2016. **1381**: p. 53-65.
73. Bubendorf, L., et al., Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, 2001. **195**(1): p. 72-9.
74. Torhorst, J., et al., Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, 2001. **159**(6): p. 2249-56.
75. Moch, H., et al., Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol*, 2001. **8**(1): p. 14-20.
76. Coons, A.H., H.J. Creech, and R.N. Jones, Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*, 1941. **47**(2): p. 200-202.
77. EnVision FLEX Systems - Manual protocol.pdf.
[Online im Internet] URL:
<http://www.kanidis.gr/common/files/ANOSOISTOCHIMIA/DETECTION/EnVision%20FLEX%20Systems%20-%20Manual%20protocol.pdf>. [Stand: 10.12.2018, 15:12].
78. Berger, J., Kombination der FISH- und TMA-Technik zur Aufklärung der molekularen Architektur des 8q21 Amplikons beim Mammakarzinom, U. Hamburg-Eppendorf, Editor. 2011: Hamburg. p. 7.
79. Katz, A., et al., The influence of pathologic tumor characteristics on locoregional recurrence rates following mastectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001. **50**(3): p. 735-42.
80. Wallgren, A., et al., Risk factors for locoregional recurrence among breast cancer patients: results from International Breast Cancer Study Group Trials I through VII. *Journal of Clinical Oncology*, 2003. **21**(7): p. 1205-1213.
81. Ribelles, N., et al., Pattern of recurrence of early breast cancer is different according to intrinsic subtype and proliferation index. *Breast Cancer Res*, 2013. **15**(5): p. R98.
82. Clemons, M., et al., Locoregionally recurrent breast cancer: incidence, risk factors and survival. *Cancer Treatment Reviews*, 2001. **27**(2): p. 67-82.
83. Montagna, E., et al., Breast cancer subtypes and outcome after local and regional relapse. *Ann Oncol*, 2012. **23**(2): p. 324-31.
84. Rosen, P.P., et al., Estrogen receptor protein (ERP) in multiple tumor specimens from individual patients with breast cancer. *Cancer*, 1977. **39**(5): p. 2194-200.
85. Brennan MJ, D.W., Appleby DE, The variability of estrogen receptors in metastatic breast cancer. *The American Journal of Surgery*, 1979.

86. Aurilio, G., et al., A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(2): p. 277-89.
87. Amir, E., et al., Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer Treat Rev*, 2012. **38**(6): p. 708-14.
88. Thompson, A.M., et al., Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS). *Breast Cancer Res*, 2010. **12**(6): p. R92.
89. Shiino, S., et al., Prognostic Impact of Discordance in Hormone Receptor Status Between Primary and Recurrent Sites in Patients With Recurrent Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, 2016. **16**(4): p. e133-40.
90. Lindstrom, L.S., et al., Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(21): p. 2601-8.
91. Macfarlane R, S.M., Speers C et al., Molecular alterations between the primary breast cancer and the subsequent locoregional/metastatic tumor. . *Oncologist*, 2012.
92. Bogina, G., et al., Comparison of hormonal receptor and HER-2 status between breast primary tumours and relapsing tumours: clinical implications of progesterone receptor loss. *Virchows Arch*, 2011. **459**(1): p. 1-10.
93. Idirisinghe, P.K., et al., Hormone receptor and c-ERBB2 status in distant metastatic and locally recurrent breast cancer. Pathologic correlations and clinical significance. *Am J Clin Pathol*, 2010. **133**(3): p. 416-29.
94. Carreno, G., et al., Local recurrence after mastectomy for breast cancer: analysis of clinicopathological, biological and prognostic characteristics. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **102**(1): p. 61-73.
95. Gown, A.M., Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol*, 2008. **21 Suppl 2**: p. S8-s15.
96. Kapoor, T., et al., Analysis of patient-detected breast cancer recurrence. *Breast Dis*, 2017. **37**(2): p. 77-82.
97. Park, S., et al., Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*, 2012. **21**(1): p. 50-7.
98. Nishimura, R., et al., Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis. *World J Surg Oncol*, 2011. **9**: p. 131.
99. Yang, Y.F., et al., Discordances in ER, PR and HER2 receptors between primary and recurrent/metastatic lesions and their impact on survival in breast cancer patients. *Med Oncol*, 2014. **31**(10): p. 214.
100. Gong, Y., et al., Optimal fixation conditions for immunocytochemical analysis of estrogen receptor in cytologic specimens of breast carcinoma. *Cancer*, 2004. **102**(1): p. 34-40.

101. Martelotto, L.G., et al., Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res*, 2014. **16**(3): p. 210.
102. Rossi, L., et al., Expression of ER, PgR, HER-2, and Ki-67 in core biopsies and in definitive histological specimens in patients with locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019.
103. Edgerton, S.M., et al., erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2003. **11**(3): p. 214-21.
104. Arslan, C., et al., Variation in hormone receptor and HER-2 status between primary and metastatic breast cancer: review of the literature. *Expert Opin Ther Targets*, 2011. **15**(1): p. 21-30.
105. Wolff, A.C., et al., Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(20): p. 2105-2122.
106. Bustreo, S., et al., Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*, 2016. **157**(2): p. 363-371.
107. Lebeau, A., et al., [Update of the German S3 breast cancer guideline : What is new for pathologists?]. *Pathologe*, 2019. **40**(2): p. 185-198.
108. Perez, E.A., et al., HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(19): p. 3032-8.
109. Amir, E., et al., Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(6): p. 587-92.
110. Liedtke, C., et al., Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann Oncol*, 2009. **20**(12): p. 1953-8.
111. Bartlett, J.M., et al., Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(12): p. 1531-8.
112. Davies, C., et al., Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
113. Curigliano, G., et al., Should liver metastases of breast cancer be biopsied to improve treatment choice? *Ann Oncol*, 2011. **22**(10): p. 2227-33.
114. Wolff, A.C., et al., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2007. **131**(1): p. 18-43.

115. Goud, K.I., et al., Evaluation of HER-2/neu status in breast cancer specimens using immunohistochemistry (IHC) & fluorescence in-situ hybridization (FISH) assay. Indian J Med Res, 2012. **135**: p. 312-7.
116. Eswarachary, V., et al., HER2/neu Testing In 432 Consecutive Breast Cancer Cases using FISH and IHC - A Comparative Study. J Clin Diagn Res, 2017. **11**(4): p. Ec01-ec05.
117. Wang, S., et al., Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. J Clin Pathol, 2000. **53**(5): p. 374-81.
118. Antonio C. Wolff*, M.E.H.H., David G. Hicks*, Mitch Dowsett*, Lisa M. McShane*, Kimberly H. Allison,, J.M.S.B. Donald C. Allred, Michael Bilous, Patrick Fitzgibbons, Wedad Hanna, Robert B. Jenkins, Pamela B. Mangu,, and E.A.P. Soonmyung Paik, Michael F. Press, Patricia A. Spears, Gail H. Vance, Giuseppe Viale, and Daniel F. Hayes*, Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer - American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. 2013.

11 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Isabell Witzel, die mich durch ihre stetige Motivation, Inspiration und Geduld enorm unterstützt hat.

Für die konstruktive Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie möchte ich mich bei PD Dr. med. Eike Burandt und allen anderen beteiligten Personen bedanken. Insbesondere ist hier PD Dr. rer. nat. Ronald Simon zu erwähnen, der meine Arbeit durch seine Anregungen und Gedanken maßgeblich geprägt hat.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen wundervollen Freunden. Danke für eure bedingungslose Unterstützung. Ich bin sehr froh, euch an meiner Seite zu wissen.

12 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe 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 zu Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: