

Aus dem Institut für Pathologie am St.-Elisabeth-Krankenhaus Köln-Hohenlind
Akademisches Lehrkrankenhaus für die Universität zu Köln
Leitung: Privatdozent Dr. med. S. Eidt

Vergleich der Messung der messenger (m)RNA-Expression von Prognosefaktoren in Mammakarzinomen mit einem Multigen-Assay

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der ärztlichen Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Noémi Caroline Lode
aus Wermelskirchen

promoviert am 23.06.2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2025

Danksagung

Ich möchte meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner danken, die zu jeder Zeit hinter mir standen und so diese Dissertationsarbeit erst möglich machten.

Herrn Dr. Till Baar möchte ich für den statistische Feinschliff und den Zuspruch danken.

Ich möchte Dr. med. Claudia Schumacher, Dr. med. Katalin Antalffy und Dr. med. Resi Velmans des Brustzentrums Hohenlind danken. Durch diese hochtalentierten Operateurinnen fand ich zu meiner Passion für die Chirurgie. Der freundlichen Vorstellung durch Dr. med. Claudia Schumacher verdanke ich den Kontakt zu PD Dr. med. Sebastian Eidt.

Ich danke dem ganzen Team des Instituts für Pathologie und insbesondere der Molekularpathologie, Violetta Gretz und Dr. Ralph Wirtz, die mir mit Rat und ausgiebigen Erklärungen immer wieder weiterhalfen.

Zuletzt gilt mein großer Dank und meine Bewunderung PD Dr. med. Sebastian Eidt. Ich erfuhr Geduld, Flexibilität, Motivation und eine beeindruckende fachlich Kompetenz während meines Dissertationsbestrebens. Als Betreuer und Doktorvater zeigte er mir immer wieder den richtigen Weg und war verlässlich für mich da.

Widmung
meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	10
2.1. Globale und lokale Epidemiologie des Mammakarzinoms	10
2.2. Risikofaktoren und Früherkennung	10
2.3. Diagnostik	11
2.4. Entwicklung der Genexpressionsdiagnostik	11
2.5. Oncotype DX® als aktuelle S3-Leitlinienkonforme Diagnostik	13
2.6. Karzinogenese, Progression und Klassifikationen	15
2.7. Tumorbiologie	16
2.8. Therapie	18
2.9. Aktueller Forschungsstand zur Nachstellung des Oncotype DX®	19
2.10. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1. Patientinnenkollektiv	21
3.2. Labortechnische Materialien und Methoden	22
3.2.1. Gewebepräparation	23
3.2.2. Beurteilung des Tumorgehalts	23
3.2.3. Extraktion der mRNA	23
3.2.4. RT-PCR	24
3.2.5. Auswertung	26
3.3. Definition intrinsischer Subtypen	27
3.4. Ergebnisse des Oncotype DX®	27
3.5. Statistische Auswertung	27

3.5.1.	Beurteilung der Ergebnisse anhand der Kreuztabellen	29
4.	ERGEBNISSE	31
4.1.	Vergleichbarkeit der Kohorten	31
4.1.1.	Alter	31
4.1.2.	Menopausenstatus	32
4.1.3.	Nodalstatus	33
4.1.4.	Untersuchungsmaterial	33
4.2.	Validität der Untersuchungsmethode	34
4.3.	Vergleich des Recurrence Scores mit den Ergebnissen des Instituts für Pathologie	35
4.3.1.	Hypothese 1: Lineare univariate und multivariate Regression	35
4.3.2.	Hypothese 2: Dichotomisierte Dummy Variablen	38
4.3.3.	Hypothese 3: Intrinsische Subtypen	39
4.4.	Bestätigung der Hypothese 3 anhand der Kohorte 2	41
5.	DISKUSSION	43
5.1.	Kohorten-Vergleichbarkeit	43
5.2.	Ergebnisse der Validitätsprüfung	43
5.3.	Annäherung des Recurrence Scores	44
5.4.	Bedeutung für die klinische Anwendbarkeit	45
5.5.	Stärken und Limitationen	46
5.6.	Fazit	47
6.	LITERATURVERZEICHNIS	49
7.	ANHANG	52
7.1.	Abbildungsverzeichnis	53
7.2.	Tabellenverzeichnis	53
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	54

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AR	Androgen Rezeptor
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA1/2	Breast Cancer Gene 1/2 = Brustkrebs Gen 1/2
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
CALM	Calmodulin
CT	Computertomographie
DAKO	HercepTestTM
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
EGFR	Epidermal growth factor receptor (= epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ER	Östrogenrezeptor
ESR1/2	Östrogenrezeptor 1/2
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin fixiert, Paraffin eingebettet
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
Ggf.	Gegebenenfalls
H2N	HER2-neu
HE	Hämatoxylin-Eosin
HR	Hormonrezeptor
IfP	Institut für Pathologie am St. Elisabeth-Krankenhaus Köln Hohenlind
IHC	Immunhistochemie
ISH	In-situ Hybridisierung
LIN	Lobuläre intraepitheliale Neoplasie
M0/1/...	Fernmetastasen (TNM-Klassifikation)
mRNA	messenger RNA = Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
N0/1/...	Lymphknotenbefall (TNM-Klassifikation)
NPW	Negativer prädiktiver Wert
NST	No specific type = invasives Karzinom ohne spezifischen Typ
PGR	Progesteronrezeptor
PR	Progesteronrezeptor
PCR	Polymerase Chain Reaktion = Polymerasekettenreaktion
PPW	Positiver prädiktiver Wert
RACGAP1	Rac GTPase-aktivierendes Protein 1
RS	Recurrence Score

RT-PCR Real time polymerase chain reaction (= Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)
TNM Tumor Node/Lymphknoten Metastase
UICC Union for International Cancer Control

1. Zusammenfassung

In der Therapieplanung von Mammakarzinomen gibt es eine Vielzahl von messbaren Einflussfaktoren, die sowohl die Prognose als auch das Therapieregime bestimmen. Spezifisch bei neu aufgetretenen, hormonrezeptorpositiven, HER2-neu negativen Tumoren, mit lokal begrenzter Ausbreitung und einem Befall von null bis drei Lymphknoten, wird der Oncotype DX® verwendet. Dies ist eine prognostische und prädiktive Untersuchungsmethode. Durch das Messen diverser Genexpressionen können die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit und der wahrscheinliche Nutzen einer Chemotherapie errechnet werden (Recurrence Score - RS). Da sowohl die Test-Kosten sehr hoch sind als auch die Dauer bis zu einem Ergebnis-Erhalt lang sein kann, wurde in dieser Arbeit eine alternative Untersuchungsmethode geprüft.

Als Datengrundlage dienten die Ergebnisse einer internen Qualitätssicherung des Instituts für Pathologie in Zusammenarbeit mit dem Brustzentrum Hohenlind. Die Daten stammen von konsekutiv untersuchten Gewebeproben von Patientinnen, die im Rahmen ihrer Mammakarzinom-Erkrankung einen Oncotype DX® erhielten. Die Ergebnisse der Kohorte 1 (Findungskohorte) stammen von Proben, die vom November 2014 bis November 2015 untersucht wurden. Die Ergebnisse der Kohorte 2 (Bestätigungskohorte) stammen von Proben, die vom Januar 2020 bis Januar 2021 untersucht wurden. Es wurden sowohl Stanzbiopsien als auch Operationspräparate untersucht. Die Untersuchungsmethode war eine PCR-Messung der extrahierten mRNA von ER, PR, HER2-neu und Ki67.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse mit denen des Oncotype DX® verglichen. Durch die starke Korrelation der Daten gelang eine verlässliche Annäherung des Oncotype DX® RS. Diese Korrelation wurde nach einer Validitätsprüfung mittels dreier Hypothesen getestet: Bei der ersten Hypothese wurde ein linearer uni- oder multivariater Zusammenhang vermutet, der mittels einer Regressionsanalyse angenähert wurde. In der zweiten Hypothese wurde der Zusammenhang mittels dichotomisierter Dummy Variablen angenähert. In der dritten Hypothese wurde der RS des Oncotype DX® mittels der intrinsischen Subtypisierung angenähert. Es konnte gezeigt werden, dass die hausinterne intrinsische Subtypisierung des Instituts für Pathologie, basierend auf den Messergebnissen für PR und Ki67, für die Untergruppe der Luminal A Tumore eine verlässliche Annäherung des RS darstellt. Die Luminal A klassifizierten Tumore zeigten mit einer Wahrscheinlichkeit von > 95% einen RS ≤ 25. Bei dieser Untergruppe könnte auf eine Chemotherapie verzichtet werden, ohne dass ein Oncotype DX® durchgeführt werden müsste.

2. Einleitung

2.1. Globale und lokale Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs steht weltweit an der Spitze der Krebserkrankungen bei Frauen und stellt eine erhebliche Herausforderung für die moderne Medizin dar ⁽¹⁾. Global gesehen werden jährlich etwa 2,1 Millionen Neuerkrankungen registriert und fast 685.000 Todesfälle wurden von der WHO für das Jahr 2020 geschätzt. Das macht das Mammakarzinom zur häufigsten durch Krebs bedingten Todesursache bei Frauen ^(2,3).

In Deutschland macht das Mammakarzinom im Jahr 2020 30,5% aller Krebsneuerkrankungen aus und ist mit einer Inzidenzrate von 70.550 der häufigste maligne Tumor der Frau ⁽⁴⁾. Die standardisierte jährliche Erkrankungsrate lag für das Jahr 2020 bei 112,7 pro 100.000 Einwohner ⁽⁴⁾. In Köln und dem umliegenden Rhein-Erft-Kreis wird die Zahl der Mammakarzinom-Neuerkrankungen auf jährlich etwa 1.690 Fälle geschätzt, bei einer Gesamtbevölkerung von 1.553.109 ^(5,6). Etwa die Hälfte dieser Fälle werden vom Brustzentrum Hohenlind erfasst und anschließend vom Institut für Pathologie am St. Elisabeth-Krankenhaus Köln Hohenlind (IfP) untersucht ⁽⁷⁾.

2.2. Risikofaktoren und Früherkennung

Neben dem fortgeschrittenen Alter erhöht eine familiäre Vorbelastung das Risiko für Brustkrebs ⁽¹⁾. Unter anderem die Genmutationen der *BRCA1* und *BRCA2* Gene spielen hier eine tragende Rolle ⁽⁸⁾. Eine erhöhte Östrogenexposition, sowohl endogen als auch exogen, gilt als negativer Einflussfaktor. So gelten eine frühe Menarche, eine späte Menopause, Nulliparität, Adipositas, östrogenhaltige Kontrazeptiva oder eine Hormonersatztherapie als karzinogen ⁽⁹⁾.

Die Brustkrebsvorsorge beginnt mit der regelmäßigen, eigenständigen, manuellen Abtastung der Brust durch die Patientin ⁽¹⁰⁾. Zur gesetzlichen Früherkennungsuntersuchung für Frauen in Deutschland gehören ab dem 30. Lebensjahr jährlich die Inspektion und Palpation der Brust ⁽¹⁰⁾. Als ergänzende Diagnostik kann die Sonographie der Brust herangezogen werden. Ab dem Alter von 50 Jahren und bis zu der Vollendung des 75. Lebensjahres können Patientinnen an dem Mammographie-Screening-Programm der gesetzlichen Krankenkassen und der kassenärztlichen Bundesvereinigung (KBV) teilnehmen. Das Mammographie-Screening ist ein wichtiges Mittel der Sekundärprävention. Es hat eine Teilnahmerate von ca. 50% ⁽¹¹⁾.

2.3. Diagnostik

Laut der S3-Leitlinie für das Mammakarzinom kann im Rahmen der Früherkennungsuntersuchung oder durch die Selbstuntersuchung eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Das folgende Prozedere folgt dem standardisierten Schema: Anamnese, klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren und Biopsie mit pathologischer Untersuchung. Als bildgebende Verfahren dienen hauptsächlich Sonographie und Mammographie. Bei Karzinomverdacht wird eine Biopsie entnommen. Standardmäßig werden Stanz- oder Vakuumbiopsien unter sonographischer Kontrolle, mammographischer Kontrolle oder MRT-gesteuert durchgeführt. Neben Biopsien der Mamma können bei klinischem Verdacht auch Lymphknoten biopsiert werden. Die Biopsien werden pathologisch aufgearbeitet und können mittels IHC, ISH oder PCR analysiert werden. Bei hormonpositiven, nodal-negativen und HER2-neu negativen Tumoren ist zusätzlich eine Genexpressionsdiagnostik zur genauen Spezifizierung der Tumorbiologie zu empfehlen. Bei erhöhtem Risiko für Fernmetastasierung sollte ein Staging abgeschlossen werden. ⁽¹⁰⁾

2.4. Entwicklung der Genexpressionsdiagnostik

Die Tumorbiologie von Mammakarzinomen wurde neben dem Tumorstadium früh als prognosebestimmend vermutet. Im Laufe der Zeit konnte ein besseres Verständnis der Tumorbiologie erlangt werden, was eine Fokussierung der Fragestellung auf Prognosefaktoren ermöglichte. Es konnte nun anhand der Tumorbiologie vorhergesagt werden, bei welchen Subtypen ein aggressives Tumorverhalten zu erwarten ist ⁽¹²⁾. Dies stellte einen bedeutenden Schritt weg von der klassischen generalisierten Therapie hin zu einer maßgeschneiderten Therapie dar. Seither werden auch heute für die Einteilung in die Subtypen Marker herangezogen, zu denen routinemäßig der Östrogenrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor (PR), der HER2-neu-Rezeptor und der Ki67-Index gehören. Anhand dieser Parameter lassen sich Subtypen, wie Luminal A, Luminal B, HER2-neu-positiv und Triple-negativ ableiten ⁽¹²⁾. Diese Subtypen weisen unterschiedliche Prognosen auf und zeigen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber bestimmten Therapien. Anhand der Subtypisierung und der klinischen Einschätzung der Patientin kann das Therapieregime bestimmt und der Einsatz medikamentöser Therapie und Radiatio empfohlen werden.

Während für die Triple-negativen und Her2-neu-positiven Subtypen eindeutige Behandlungsrichtlinien etabliert wurden, blieb bei primär hormonrezeptorpositiven, HER2-neu-negativen, nicht metastasierten Tumoren die Indikationen für adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapien in einigen Fällen unklar. Das lag an der unklaren Prognose von Luminal A und Luminal B Tumoren. Zudem kam es bei den weit zuvor verbreiteten

immunhistochemischen Untersuchungen immer wieder zu inkonsistenten Ergebnissen auf Grund einer Inter- und Intraobserver-Variabilität. ⁽¹³⁾

In dem "St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer" aus dem Jahre 2013 wurde festgehalten, dass die Chemotherapie bei Patientinnen mit luminalen Tumoren in vielen Fällen nicht zielführend ist und hier ein zurückhaltendes Vorgehen präferiert wird. ⁽¹⁴⁾ Wegen der starken Nebenwirkungen einer Chemotherapie galt es eine Methode zu finden, mithilfe welcher die präzise Einschätzung der Prognosefaktoren gelingt. Somit könnten diejenigen Patientinnen bestimmt werden, die ein hohes Rezidivrisiko und somit einen hohen Nutzen von der Chemotherapie haben würden.

Im Jahr 2004 wurde der „Recurrence Score" (RS), ein auf einer PCR basierender Multigen-Assay, von Genomic Health entwickelt ⁽¹⁵⁾. Dieser sollte später unter dem Namen Oncotype DX® erst als prognostischer Test das Brustkrebs-Rezidivrisiko quantifizieren können und später als prädiktiver Test den Chemotherapienutzen vorhersagen. Im Verlauf folgte die Zulassung weiterer Genexpressionstests. Der MammaPrint Test wurde als erster Test von der FDA zertifiziert. ⁽¹⁶⁾ Im Jahre 2011 standen die Ergebnisse der groß angelegten klinischen Studien von Oncotype DX® und MammaPrint aus, sodass noch keine starke Empfehlung (Grad I) laut dem Marker Utility Grading System ausgesprochen wurde ⁽¹⁷⁾. Im Jahre 2018 erlangte Genomic Health mit Hilfe der TAILORx-Studie diesen Empfehlungsgrad. Die TAILORx-Studie bestätigt die prospektive und prädiktive Bedeutung eines 21-Gen-Tests bei nodalnegativen Patientinnen. Dieser entsprach dem heutigen Oncotype DX®. ⁽¹⁸⁾ In der nachfolgenden RxPonder-Studie konnte selbiges Ergebnis auch bei Patientinnen mit ein bis drei befallenen Lymphknoten erzielt werden. Im Jahre 2019 wurde Genomic Health von Exact Sciences Corp. übernommen ⁽¹⁹⁾.

Laut der aktuellen S3-Leitlinie für das Mammakarzinom wird bei hormonrezeptorpositiven Tumoren empfohlen einen Multigen-Test in den Fällen einzusetzen, in denen die konventionellen Prognoseparameter keine eindeutige Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie erlauben. Aktuell gibt es eine Vielzahl von Tests, aus denen die behandelnden Ärztinnen und Ärzte bzw. die Ärztinnen und Ärzte der pathologischen Institute wählen können. In Deutschland gelten folgende Tests als geläufig: Der Oncotype DX®, der Endopredict®, der PAM50/Prosigna® und der MammaPrint. ⁽¹⁰⁾ Diese Tests basieren auf der Untersuchung von teils unterschiedlichen, teils identischen Genen. Somit sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar. Die Einteilung in Risikogruppen anhand der Ergebnisse ist bei allen gleich. Als Konsequenz wird eine Empfehlung für oder gegen eine Chemotherapie gegeben. ⁽²⁰⁾

2.5. Oncotype DX® als aktuelle S3-Leitlinienkonforme Diagnostik

Der Oncotype DX® des US-amerikanischen Unternehmens Exact Sciences Corp. ist einer der Multigen-Assays, die durch die S3-Leitlinie zur Genexpressionsanalyse empfohlen werden. Die Untersuchung beinhaltet die Bestimmung von 21 Genen, davon sind 16 Gene tumorspezifisch, die anderen fünf stellen Referenzgene dar. Aus der Expression der Gene wird die Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs errechnet, welches innerhalb von neun Jahren auftritt. Der RS wird von dieser Wahrscheinlichkeit abgeleitet. Der RS ist ein Prädiktionswert für den Erfolg einer Chemotherapie. Je höher der RS ist, desto eher profitiert die Patientin von einer Chemotherapie. Der RS ist eine kontinuierliche Variable mit Werten zwischen Null und 100 und muss abhängig vom Menopausenstatus und dem Lymphknotenstatus bewertet werden⁽²¹⁾. Neben dem RS werden in dem Befund des Oncotype DX® die Ergebnisse für ER, PR und HER2-neu angegeben. Diese Werte werden ohne Einheit, jedoch auf einer Skala sichtbar mit einer Dezimalstelle angegeben. So kann der ER die Werte von minimal < 3,7 und maximal $\geq 12,5$, der PR die Werte von minimal < 3,2 und maximal von ≥ 10 und der HER2-neu die Werte von minimal <7,6 und maximal ≥ 13 annehmen.

Die Chemotherapie-Empfehlung anhand des RS folgt einem komplexen Schema und bezieht sich auf den sogenannten Chemotherapienutzen (Abbildung 1). Der Chemotherapienutzen wird primär als krankheitsfreies Überleben und sekundär als fernrezidiv-freies Intervall, rezidiv-freies Intervall und Gesamtüberleben definiert.

Im Allgemeinen wird ab einem RS > 25 eine Chemotherapie bei einem geschätzten Chemotherapienutzen von > 15% empfohlen. Bei RS-Werten ≤ 25 wird primär in nodal-positiv und nodal-negativ unterschieden. Als nodal-positiv gilt ein Befall von ein bis drei Lymphknoten. Bei einem nodal-positiven Status wird sekundär der Menopausenstatus beachtet. Bei Frauen im prämenopausalen Status mit einem RS von null bis 25 wird der Chemotherapienutzen auf 2,9% innerhalb von 5 Jahren geschätzt. Im Gegensatz dazu haben postmenopausale Frauen bei einem RS von null bis 25 keinen Chemotherapienutzen. Bei nodal-negativem Status wird sekundär nach dem Alter unterschieden. Bei einem Alter von > 50 Jahren und einem RS ≤ 25 ergibt sich kein Chemotherapienutzen. Bei einem Alter von ≤ 50 Jahren gilt bei einem RS von 0 bis 15 ebenfalls kein Chemotherapienutzen. Bei einem RS von 16 bis 20 besteht ein Chemotherapienutzen von annähernd 1,6% und bei einem RS von 21 bis 25 ein Chemotherapienutzen von annähernd 6,5% innerhalb von 9 Jahren. (^{18, 21})

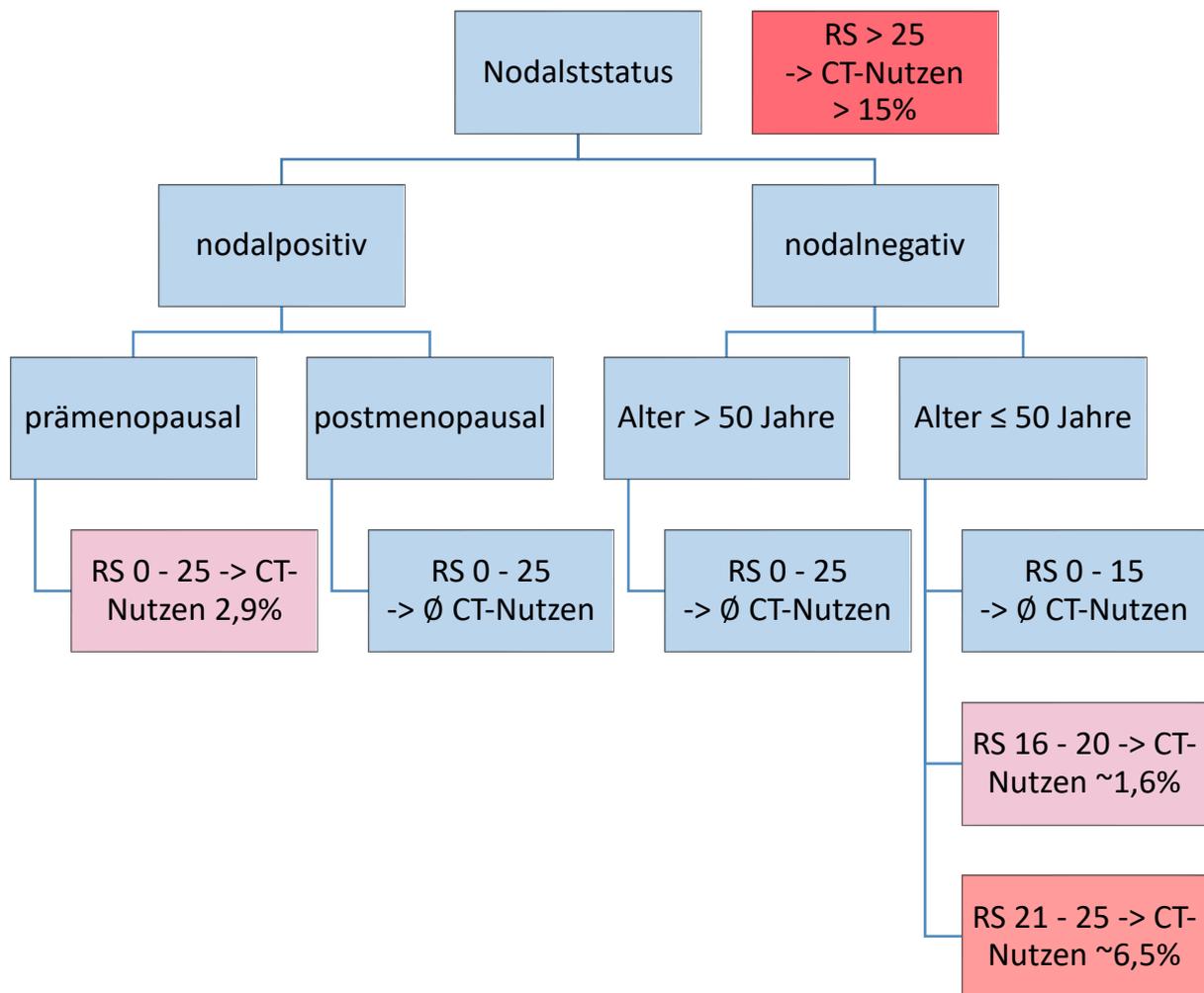


Abbildung 1: Visuelle Darstellung des Chemotherapienutzens (CT-Nutzen) anhand des Nodalstatus, des Alters und des RS nach TAILORx- und RxPonder-Studie. ^(18, 21)

Die Untersuchung des Oncotype DX® wird an FFPE-Stanzbiopsien oder Biopsieproben der Operationspräparate des Tumorgewebes durchgeführt. Es kann ab Probenentnahme bis Erhalt des Ergebnisses der Diagnostik bis zu drei Wochen dauern. In der klinischen Praxis wird der Oncotype DX® erst nach Beendigung der stationären Behandlung angefordert. Um den Auftrag zu erteilen, wird eine Wartezeit von vierzehn Tagen eingehalten, ansonsten würden die Kosten des Oncotype DX® über die Fallpauschale des stationären Aufenthaltes abgerechnet werden. ⁽²²⁾ Bis vor einiger Zeit wurden die Proben in Deutschland in dem Zentrallabor in Viersen gesammelt und vor dort in die USA für die Testung gesendet. Seit Kurzem erfolgt der Versand und Transport der Probe aus der pathologischen Aufarbeitung der Kliniken in das Zentrallabor in Trier und dauert ein bis zwei Tage. Die Untersuchung durch den Oncotype DX® dauert in Deutschland bis zu zehn Tage ab dem Zeitpunkt des Eintreffens der Probe im Zentrallabor. ⁽²³⁾ Die resultierende Wartezeit kann eine Ungewissheit und in vielen Fällen eine psychische Belastung für die Patientinnen bedeuten, da der Beginn einer Chemotherapie bis zur Vorlage des Ergebnisses dementsprechend hinausgezögert wird. ⁽²⁴⁾

Die FFPE-Proben werden nach den Untersuchungen zurück an die Institute für Pathologie geschickt, um diese dort zu archivieren.

Die Kosten der Untersuchung werden seit dem Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschuss (G-BA) vom 20.6.2019 durch die deutschen Krankenkassen übernommen. Die exakten Kosten und somit die finanzielle Belastung der Krankenkassen variieren nach Versicherungsform und Kasse und belaufen sich bei privaten Krankenkassen auf Beträge von ungefähr 3.296,50€ bis 3.644,40€.^(25, 26) Bei privatversicherten Patientinnen muss erst ein Kostenvoranschlag an die Krankenkassen gesendet werden. Die Erstattung der Kosten des Oncotype DX® beträgt 2.832,15 € bei gesetzlich Versicherten.⁽²⁷⁾ Als Voraussetzung für die Erstattung gilt die strenge Indikationsstellung. So können nur Patientinnen mit HR positiven, HER2-neu-negativen, M0-Status und N0- oder N1-Tumoren von der Kostenübernahme des Tests profitieren. Ebenfalls nur in dem Falle, dass die Chemotherapie-Indikation nicht anhand anderer klinischer oder pathologischer Untersuchungen gestellt werden kann. Patientinnen, die unter einem Zweitkarzinom leiden, sind von dieser Untersuchungsmethodik ausgeschlossen.

2.6. Karzinogenese, Progression und Klassifikationen

Histopathologisch zeigt das Mammakarzinom vielfältige Ausprägungen. Vorweg sind Risikoläsionen, Präkanzerosen, präinvasive Tumore und invasive Karzinome zu unterscheiden. Nahezu alle invasiven Mammakarzinome sind Adenokarzinome. Es werden hauptsächlich zwei Typen unterschieden, die NST-Karzinome (Karzinome ohne spezifischen Typ) und die invasiven Karzinome mit spezifischem Typ. Zu den Karzinomen mit spezifischem Typ gehören unter anderem das invasiv lobuläre Karzinom, das tubuläre Karzinom, das kribriforme Karzinom, das muzinöse Karzinom und die neuroendokrinen Tumore. Die Karzinogenese erfolgt bei den lobulären Karzinomen über die LIN. Für die NST-Karzinome ist als Präkanzerose das DCIS beschrieben. Das DCIS bildet die weit überwiegende Mehrzahl der diagnostizierten präinvasiven Tumore.⁽²⁸⁾ Bei den seltenen Tumorformen ist der Wissensstand zur Karzinogenese nicht weit fortgeschritten.

Im Folgenden werden nur die häufigsten Typen beschrieben. Als größter Subtyp zählt die Gruppe der NST-Karzinome, welche 40-75% der invasiven Karzinome ausmacht⁽²⁹⁾. Die Gruppe der NST-Karzinome ist eine heterogene Gruppe und dadurch charakterisiert, dass in der Mehrzahl der Tumorzellverbände keine gruppenspezifischen Charakteristika beobachtet werden. Makroskopisch ist der Tumor nodulär oder sternförmig mit unscharfen Kanten und kann feste oder faserige Anteile haben. Von der Größe kann er < 10 mm bis > 100 mm groß werden und hat meistens grau-weiß-gelbe Anteile. Die mikroskopische Anordnung ist dem E-

Cadherin geschuldet und zeigt sich meist solide, tubulär, strangförmig oder nestförmig. Um die Tumorzellen findet sich zumeist ein desmoplastisches Stroma und teilweise Nekrosen. Gelegentlich zeigen die Tumorzellen ein eosinophiles und ausgedehntes Zellplasma, teils mit regulären, teils mit pleomorphen Nuklei. Auch die Mitoserate kann variieren. 70-80% dieser Karzinome sind ER-positiv (^{30, 31}). In 80% der Fälle lässt sich ein assoziiertes DCIS beobachten (³²).

Unter den invasiven Karzinomen mit speziellem Typ macht mit 5-15% das invasiv lobuläre Mammakarzinom den größten Teil aus (³³). Dieses Karzinom charakterisiert ein disseminiertes Wachstum auf Grund des fehlenden E-Cadherins. Charakteristisch sind sog. „Indian Files“, ketten- bzw. gänsemarschförmig angeordnete Tumorzellen und das Zielscheibenmuster „Targetoid Pattern“, eine ringförmige Anordnung der Tumorzellen um Milchgänge. Es zeigt sich wenig Umgebungsreaktion. Die Tumorzellen selbst haben klassischerweise einen runden oder ovalen Zellkern, der durch ein zentral gelegenes intrazytoplasmatisches Lumen an den Rand der Zelle gedrängt wird. Durch einen dünnen zytoplasmatischen Ring erscheinen die Zellen oftmals wie Siegelringe. Die Mitoserate ist meist niedrig. Invasiv lobuläre Karzinome sind zu 70-90% ER-positiv und zu 60-70% PR-positiv. (³²)

Das Mammakarzinom wird nach der TNM-Klassifikation und in UICC/AJCC Stadien eingeteilt (¹⁰). Es kann zusätzlich auf mikroskopischer Ebene der Differenzierungsgrad bzw. Malignitätsgrad bestimmt werden. Hier gelten G1 Tumore als gut, G2 als mäßig und G3 als gering differenziert. Je höher das Grading, desto schlechter die Prognose. Die zugrunde gelegten Kriterien sind das Ausmaß an Tubulus-Bildung, die Kernpolymorphie und die Mitoserate. (³⁴)

Bei Mammakarzinomen findet die Progression erst auf lokaler Ebene statt. Erst danach folgt die lymphogene und zuletzt die hämatogene Ausbreitung. Die genaue Abschätzung der Prognose erfolgt über die TNM-Klassifizierung, den histopathologischen Gradient und besonders die Tumorbiologie.

2.7. Tumorbiologie

Durch eine Untersuchung der Expression von ER, PR, HER2-neu und Ki67 lassen sich die Tumore in Luminal A, Luminal B, HER2-neu-positiv, triple-negativ und triple-positiv (Tabelle 1) subtypisieren. Die Expression der Marker spielt für das Verhalten der Tumore und die Prognose eine wichtige Rolle. (¹³) Anhand der Subtypen können Aussagen über die Prognose der Erkrankungen gemacht werden. So wird die Therapie anhand der Tumorbiologie entschieden. ER und PR gehören zu den nukleären Rezeptoren, HER2-neu gehört zu den

epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren. Die Therapie triple-positiver Tumore entspricht der von HER2-neu positiven Tumoren, wobei zusätzlich eine antihormonelle Therapie durchgeführt wird. Da die triple-positiven Tumore für die vorliegende Arbeit wenig Relevanz haben, werden Sie im Nachfolgenden nicht weiter beschrieben.

	ER	PR	H2N	Ki67	Konsequenz
Luminal A	+	+	-	niedrig	Antihormonelle Therapie + ggf. CT
Luminal B	+	+	+/-	hoch	
H2N pos.	-	-	+	variabel	CT + Anti-HER2-neu-Therapie
Triple-neg.	-	-	-	variabel	CT
Triple-pos.	+	+	+	variabel	CT + Anti-HER2-neu-Therapie + Antihormonelle Therapie

Tabelle 1: Übersicht zur Subtypisierung und Ausprägung der Rezeptoren ER, PR und H2N, sowie die Ki67 und deren therapeutische Konsequenz. ⁽³¹⁾

Tumore mit einem HER2-neu-positiven Status gelten als HER2-neu-positive Tumore. Bei HR- und HER2-neu-Negativität gilt der Tumor als triple-negativ. Luminal A und Luminal B werden anhand der Expressionsstärke der Hormonrezeptoren definiert. Bei der Subtypisierung in der klinischen Routine mittels der IHC sind die Hormonrezeptor-Messungen als Surrogatmarker zu werten. Diese dienen als eine Annäherung einer ggf. nachgeschalteten mRNA-Diagnostik. Bezüglich des ER- und PR-Status werden die Proben ab einem Anteil von 1% positiv gefärbter Zellen als positiv gewertet. Eine Färbung von 1-9% gilt als gering-positiv und $\geq 10\%$ gilt als positiv. Die Bewertung des HER2-neu-Status basiert auf einer Beurteilung mittels IHC anhand des DAKO-Scores und mittels ISH. Es gilt ein HER2-neu-positiver Status bei einem IHC 3+ oder IHC 2+ bei gleichzeitiger positiver ISH. Als HER2-neu-low werden IHC 1+ oder IHC 2+ bei gleichzeitiger ISH-Negativität bezeichnet. Als HER2-neu negativ gelten IHC 0 bewertete Tumore. ^(35, 36)

Östrogen gilt allgemein als Proliferationsfaktor und kann an die zwei ER-Typen ER α und ER β binden ⁽³⁷⁾. ER α wird durch das ESR1-Gen des Chromosoms 6 codiert und ER β durch das ESR2-Gen des Chromosoms 14. Der ER α ist die Zielstruktur der antihormonellen Therapie mit Tamoxifen. Deswegen gilt die Expressionsmenge auch als Prognosefaktor für den Erfolg dieser Therapie. Der ER β und dessen Rolle in dem Mammakarzinom ist noch nicht ausreichend erforscht.

Die Rolle des Progesterons in Brustkrebs ist Gegenstand aktueller Forschungen. Es besteht eine komplexe Interaktion zwischen dem Progesteron- und dem Östrogensignalweg. Die Wirkung des Progesterons auf das Brustgewebe wurde sowohl als zelldifferenzierend, und

somit als protektiv, als auch als Proliferationsanstoß und somit als kanzerogen beschrieben. ⁽³⁸⁾ Progesteron bindet an den PR, welcher in den zwei Varianten PR α und PR β vorkommt. Beide werden durch das PGR-Gen des Chromosoms 11 codiert. PR β ist im Vergleich zu PR α weniger erforscht und zeichnet sich durch eine zusätzliche spezielle Transaktivierungsdomäne aus. ⁽³⁹⁾

HER2-neu steht für „humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor“. Die Ergänzung mit „neu“ steht für „neural“ und lässt sich auf die Entdeckung des Rezeptors in der Ableitung von Glioblastom-Zellen zurückführen. Der HER2-neu-Rezeptor liegt, anders als die nukleären Rezeptoren, in der Zellmembran. Er weist eine große Ähnlichkeit zum EGFR (Her1) auf und wird der ErbB-Familie zugeordnet. Der HER2-neu, der auf Chromosom 17 codiert wird, wird als Protoonkogen klassifiziert und gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren. Der HER2-neu hat keinen spezifischen Liganden, bei Dimerisierung werden verschiedene Signalwege und somit die Steigerung der Proliferation angestoßen. ^(40, 41) HER2-neu ist die Zielstruktur der Therapie mit Trastuzumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper von HER2-neu, und der Tyrosinkinasehemmer Lapatinib oder Neratinib. ⁽¹⁰⁾

Ki67 beschreibt die proliferative Aktivität von Zellen und wird genutzt, um einen Proliferationsindex zu erstellen. Das Protein Ki67 befindet sich während der Interphase im Zellkern und kann erst immunhistochemisch nachgewiesen und quantifiziert werden, wenn sich die Zellmembran in der Mitose aufgelöst hat. ⁽⁴²⁾ Hier gilt bei inkonsistenten Angaben in der Literatur ein Wert von < 10% als niedrig und > 25% als hoch ⁽⁴³⁾.

2.8. Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms folgt der UICC/AJCC-Stadieneinteilung. Weiterhin bestimmt die Tumorbiologie die Therapieentscheidung. Bei Tumoren ohne Fernmetastasierung ist das Therapieziel primär kurativ. Bei einer vorliegenden Fernmetastasierung ist das Therapieziel palliativ. Therapiemethoden sind die systemische medikamentöse Therapie, die Bestrahlung und, vor allem im kurativen Setting, die operativen Verfahren.

Eine Systemtherapie kann neoadjuvant oder adjuvant durchgeführt werden. Sie besteht aus einer Chemotherapie, ggf. in Kombination mit einer Antikörpertherapie, Immuntherapie und einer Antihormontherapie. Standardmäßig werden zur Chemotherapie Anthracycline und Taxane verwendet, beispielsweise Epirubicin und Paclitaxel. Bei triple-negativen Tumoren können Platinderivate verwendet werden. Bei HER2-neu positiven Tumoren wird die Chemotherapie mit der Antikörpertherapie mittels Trastuzumab und ggf. zusätzlich

Pertuzumab erweitert ⁽³⁶⁾. Zu den Antihormontherapie-Optionen zählen Tamoxifen, Fulvestran, GnRH-Analoga, Aromatasehemmer und weitere. Bei der Auswahl muss sowohl der Menopausenstatus als auch das Tumorstadium beachtet werden.

Bei den operativen Verfahren steht die BET, die brusterhaltende Therapie, mit dem Ziel einer R0-Resektion im Vordergrund. Bei dem inflammatorischen Mammakarzinom ohne neoadjuvante Chemotherapie, bei ungünstigem Tumor-Brustgrößen-Verhältnis, auf Wunsch der Patientin oder bei einer bestehenden Kontraindikation zur postoperativen Bestrahlung sollte die Mastektomie durchgeführt werden. Zusätzlich sollte die operative Lymphknotenentfernung, im Rahmen einer Sentinel-Lymphonodektomie oder der Axilladisektion im Falle von klinisch befallenen Lymphknoten durchgeführt werden.

Ergänzend zur operativen und systemischen Therapie dient die Radiotherapie der Reduktion des Rezidivrisikos und der Mortalität.

2.9. Aktueller Forschungsstand zur Nachstellung des Oncotype DX®

In der Literatur lassen sich einige Ansätze finden, die den Oncotype DX® RS und die damit verbundenen Empfehlungen für oder gegen eine Chemotherapie zu replizieren versuchen. Die Arbeit von Schildgen V. et al. eruiert die mangelnde wissenschaftliche Transparenz des Oncotype DX® und der zugrunde gelegten TAILORx-Studie. In dieser Arbeit scheitert die Nachstellung des Oncotype DX® über die beschriebene Methode mittels RT²-Profiler Multiplex RT-PCR. ⁽⁴⁴⁾ Dies lässt die Frage offen, in wie weit die Studie den ethischen und wissenschaftlichen Anforderung eines „Good clinical practice“ (gute klinische Praxis) entspricht.

Zudem gibt es in der Literatur mehrere Ansätze, eine Alternative des Oncotype DX® anzubieten. Bereits 2013 konnten Klein ME. et al. in Ihrer Studie anhand der immunhistochemischen Messungen von PR, ER, Ki67 und HER2-neu in 54,3-59,4% der Fälle vorhersagen, ob ein RS hoch, mittelhoch oder gering ausfällt. ⁽⁴⁵⁾ In der Studie von Wu S-G. et al. (2019) wird der Verzicht auf den Oncotype DX® und auf die Chemotherapie bei Patientinnen mit PR positivem und G1-2 klassifiziertem invasiv-lobulärem Mammakarzinom empfohlen. Bei diesen Patientinnen konnte in 97% (G1) bzw. in 94% (G2) der Fälle ein RS < 25 nachgewiesen werden.⁽⁴⁶⁾ 2021 konnten Humphris K., Stephenson J. und Kumaraswamy V. eine Annäherung des RS unter der Verwendung der immunhistochemischen Messung von Ki67, ER10 und PR10 anbieten. Hierbei erreichten sie mittels der linearer Regressionsanalyse eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von 78,4%.⁽⁴⁷⁾

Bis zum aktuellen Zeitpunkt konnte kein gleichwertiger PCR-basierter Test den RS des Oncotype DX® verlässlich nachstellen.

2.10. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Die Forschungsfrage, die diese Arbeit beantworten möchte, ist, inwieweit das etablierte, interne mRNA-Messverfahren des IfP eine mögliche diagnostische Alternative zu dem Multigen-Assays Oncotype DX® darstellen kann. Hierzu sollen die institutsinternen Ergebnisse der PCR-basierten Messung der mRNA-Expression der Prognosefaktoren ER, PR, HER2-neu und Ki67 mit dem Oncotype DX® RS korreliert werden. Somit soll die prognostische Einordnung des Multigen-Assays nachgestellt werden.

Hierzu lassen sich die folgenden Hypothesen formulieren:

Hypothese 1: Der RS des Oncotype DX® lässt sich mittels linearer uni- oder multivariater Regression annähern.

Hypothese 2: Der RS des Oncotype DX® lässt sich mittels dichotomisierter Dummy Variablen annähern.

Hypothese 3: Der RS des Oncotype DX® lässt sich mittels Subtypisierung annähern.

Durch die systematische Untersuchung des Zusammenhangs und möglicher prognostischer Aussagen soll ein Beitrag zur Verbesserung des Prozesses der Therapieentscheidungen bei Mammakarzinomen geleistet werden. Potenziell könnten die Ergebnisse dazu beitragen, dass mehr Patientinnen von einer zielgerichteten und individuell angepassten Therapie profitieren können. Es soll eine gleichwertige Alternative zu der kostenintensiven Untersuchung des Oncotype DX® angeboten werden. Die vereinfachte und dezentralisiert durchzuführende Untersuchung soll schnell mindestens gleichwertige Ergebnisse liefern.

3. Material und Methoden

3.1. Patientinnenkollektiv

Der Untersuchungszeitraum dieser Studie ist zweigeteilt. Somit bilden sich zwei Kohorten. Zum einen wurden Daten von November 2014 bis November 2015 erhoben, welche die Kohorte 1 (K1) bilden, zum anderen wurden vom Januar 2020 bis Januar 2021 Daten erhoben, welche die Kohorte 2 (K2) bilden. Die fachfolgend abgebildeten Diagramme folgen einem Farbschema, um die Kohortenzugehörigkeit zu markieren. Diagramme der Kohorte 1 sind orange, die der Kohorte 2 blau gefärbt.

Die Proben stammen von Patientinnen, die dem Brustzentrum des St. Elisabeth-Krankenhauses Hohenlind zur Abklärung oder zur Therapie eines im Rahmen des Mammographie-Screenings entdeckten Mammakarzinoms oder aufgrund eines symptomatischen Mammakarzinoms zugewiesen wurden. Es wurden alle Patientinnen konsekutiv eingeschlossen, für die im Rahmen ihrer Therapieplanung die Untersuchung durch den Oncotype DX® durchgeführt wurde. Es wurden ausschließlich weibliche Patientinnen eingeschlossen. So umfasst die K1 116 und die K2 112 Patientinnen. Voraussetzung für die Durchführung des Oncotype DX® ist ein immunhistochemisch nachgewiesener positiver HR-Status und ein negativer HER2-neu-Status. Eine weitere Voraussetzung ist ein lokal begrenztes Tumorgeschehen (M0). Der Nodalstatus muss negativ (N0) sein, alternativ dürfen ein bis drei positive Lymphknoten vorliegen (N1). Außerdem können nur Patientinnen mit neu diagnostiziertem Mammakarzinom und prätherapeutisch entnommenen Proben eingeschlossen werden. Der Oncotype DX® kann sowohl an Biopsieproben der Operationspräparate als auch an Stanzbiopsien durchgeführt werden.

Für die Auswertung wurden 22 (K1) bzw. 10 Fälle (K2) ausgeschlossen, weil die formalen Kriterien nicht erfüllt wurden. So wurde ein Fall aus der K1 exkludiert, da es sich um einen männlichen Patienten handelte, ein anderer Fall, weil anhand des molekular pathologischen Befundes die Probe als HR-negativ klassifiziert werden musste. Weiterhin exkludiert wurden vier Fälle aus der K1, die in der PCR-Diagnostik als HER2-neu positiv gewertet wurden. Zudem mussten aus K1 und K2 diejenigen Proben ausgeschlossen werden, die einen Tumorgehalt von weniger als 20% aufwiesen, da bei diesen kein verlässliches Ergebnis erwartet werden kann⁽⁴⁸⁾.

Insgesamt resultieren für die weitere Auswertung somit 196 Fälle, wobei 94 der K1 und 102 der K2 zugehören. (Abbildung 2)

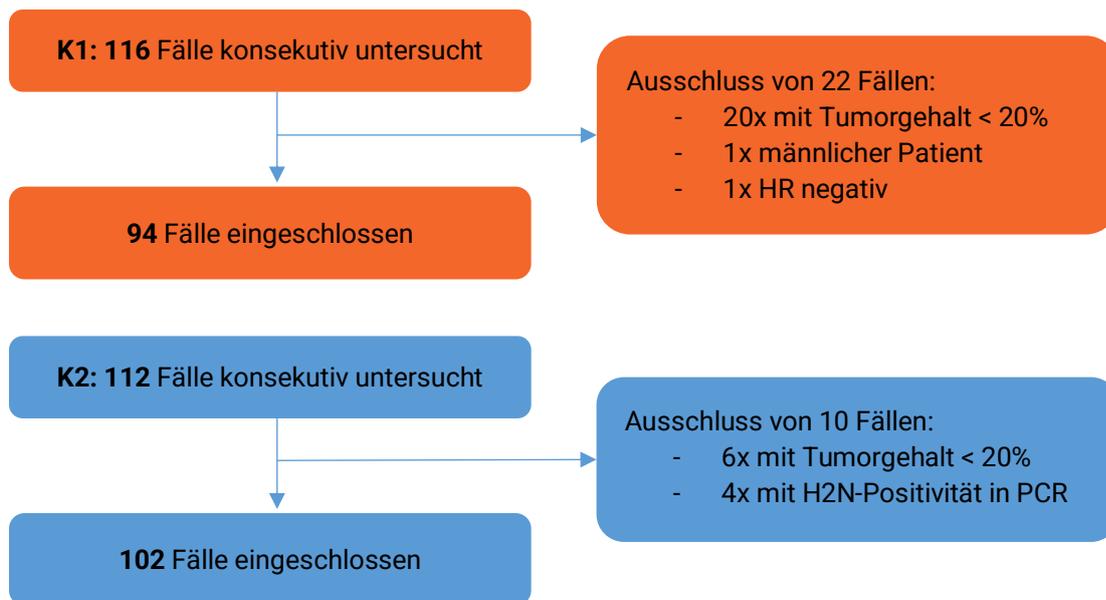


Abbildung 2: Kohorte 1 und 2: Übersicht der Fall-Kollektive und Darstellung der Ausschlusskriterien.

Es wurden in der K1 Frauen im Alter zwischen 34 und 76 Jahren und in der K2 40 bis 77 Jahren getestet. Zur Errechnung des Alters der Patientinnen wurde das Geburtsdatum in Bezug auf das Untersuchungsjahr errechnet. Als Bezugsdatum wurde der 30.06. des jeweiligen Untersuchungsjahres gewählt. Somit ist das Alter als keine genaue Angabe zum Entnahmezeitpunkt, sondern als Näherungswert dessen zu verstehen. Es wurden sowohl prä- als auch postmenopausale Frauen getestet. Es wurden sowohl Stanzbiopsien als auch Operationspräparate für die Untersuchungen verwendet.

3.2. Labortechnische Materialien und Methoden

Die Untersuchungen am Tumormaterial wurden im Rahmen eines Qualitätsmanagement-Programms vom IfP durchgeführt und dokumentiert. Die in dem folgenden Abschnitt beschriebenen labortechnischen Methoden wurden vom IfP in Zusammenarbeit mit der Stratifyer Molecular Pathology GmbH entwickelt. Der Test zur „Brustkrebssubtypisierung“ wurde als Untersuchungsmethode bereits in zahlreichen Studien bezüglich Robustheit und Aussagekraft validiert. ^(13,48) Dabei wurden die mRNA-Expression folgender Parameter gemessen: ESR1, PGR, AR, Ki67, *RACGAP1*, Her2-neu.

Die Biopsieproben der Operationspräparate oder Tumorgewebes-Stanzbiopsien wurden im standardmäßigen Aufbereitungsverfahren nach der Entnahme zugeschnitten, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE). Nach der Aufbereitung wurde die pathologische Routineuntersuchung durchgeführt. Anschließend wurden die FFPE-Blöcke für die Oncotype DX® Diagnostik erst in das Zentrallabor Viersen und von Viersen in die USA verschickt. Die

labortechnischen Untersuchungen des Oncotype DX® wurden in den USA durchgeführt. Teilweise gesammelt mit anderen Proben wurden die FFPE-Blöcke zurück nach Deutschland gesendet. Die Proben wurden, nach Beendigung der relevanten Untersuchungen, in Deutschland archiviert.

3.2.1. Gewebepräparation

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dienten die FFPE-Blöcke, die nach dem Oncotype DX® archiviert waren. Die FFPE-Blöcke wurden auf einer Kühlplatte auf eine Temperatur von -15°C abgekühlt. Anschließend wurden die FFPE-Blöcke getrimmt, sodass eine glatte Fläche mit vollständigem Anschnitt des Untersuchungsmaterials entstand. Von den FFPE-Blöcken wurden für die folgenden Untersuchungen zwei 9 µm und anschließend zwei 1,5 µm dünne Schnitte mit dem Mikrotom abgenommen.

3.2.2. Beurteilung des Tumorgehalts

Die 1,5 µm dünnen Schnitte wurden in ein Wasserbad transferiert und anschließend mit einem Objektträger aufgefangen. Danach wurden die Objektträger bei Raumluft in einem Objektträger-Ständer getrocknet und eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) durchgeführt. Die HE-Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht und so der Tumorgehalt bestimmt.

3.2.3. Extraktion der mRNA

Die 9 µm dünnen Schnitte wurden in Mikroreagenzgefäße gegeben, wobei eines der beiden archiviert wurde. Dieses wurde verwendet, falls eine Messung nicht erfolgreich oder verwertbar war und daher erneut durchgeführt werden musste. Die andere Probe wurde der mRNA-Extraktion mit Hilfe des STRATIFYER-Kits unterzogen. Im ersten Schritt der Extraktion wurde die Probe mit 150 µl Lysis-Puffer versetzt, um das Paraffin zu lösen. Anschließend wurde sie im Thermoblock bei 80°C und 1200 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten lang inkubiert. Um die Zellwände und Zellkerne aufzulösen, wurde die Probe im nächsten Schritt nach Abkühlung auf 65°C mit Proteinkinase K versetzt, um frei flottierende Nukleinsäuren zu erhalten. Dies wurde im Thermoblock bei 65°C und 1200 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten lang inkubiert. Danach wurden 800 µl MagiX-Puffer und 40 µl MagiX-Beads hinzugegeben. Die MagiX-Beads wurden vor dem Gebrauch gemischt. In diesem Schritt banden die Grafit-Beads die negativ geladenen mRNA-Moleküle. Die Mischung wurde im Thermoblock bei Raumtemperatur und 1200 Umdrehungen pro Minute 15 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden die Mikroreagenzgefäße an einen Magneten gehalten und mehrfach invertiert, sodass sich die an die magnetischen MagiX-Beads gebundene mRNA an der zum Magneten

gewandten Seite des Mikroreagenzgefäßes sammeln konnte. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die folgenden Schritte dienten der Reinigung, wobei nacheinander saure, alkoholhaltige und neutrale Waschpuffer verwendet wurden. Die Proben wurden vom Magneten entfernt und es wurde 850 µl Waschpuffer I hinzugegeben. Nach mehrfachem Invertieren wurden die Proben wieder an den Magneten gehalten und mit diesem zusammen invertiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden vom Magneten entfernt und 450 µl Waschpuffer II hinzugegeben. Nach mehrfachem Invertieren wurden die Proben wieder an den Magneten gehalten und mit diesem zusammen mehrfach invertiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen. Die Proben wurde vom Magneten entfernt und 850 µl Waschpuffer III hinzugegeben. Nach mehrfachem Invertieren wurden die Proben wieder an den Magneten gehalten und mit diesem zusammen mehrfach invertiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden abzentrifugiert, an den Magneten gehalten, der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Elutionspuffer hinzugegeben und bei 70°C und 1200 Umdrehungen pro Minute 15 Minuten lang inkubiert, um die mRNA von den MagiX-Beads zu lösen. Die Proben wurden erneut abzentrifugiert und an den Magneten gehalten. Vom mRNA-haltigen Überstand wurden je 50 µl in zwei neue Mikroreaktionsgefäße gegeben, welche mit der Probennummer beschriftet wurden. So präpariert konnten die Proben im Gefrierschrank archiviert werden. Alternativ konnte eines der beiden beschrifteten Proben direkt für die RT-PCR zur Seite gestellt werden, wobei das andere im Gefrierschrank archiviert wurde.

3.2.4. RT-PCR

Im nächsten Schritt wurde die RT-PCR vorbereitet. Abbildung 3 zeigt eine Darstellung des Pipettierschemas. Die markierten Primer für *CLAM2*, ER, PR, HER2-neu, AR, Ki67 und *RACGAP* (RG) wurden aus der Tiefkühlung genommen, bei Raumtemperatur aufgetaut, gevortext und zentrifugiert. Es wurde in ein Eppendorf-Tube 252 µl vom 2xMastermix gegeben und mit 201,6 µl Wasser vermischt. Dies wurde als PreMix1 bezeichnet. 6,6 µl der markierten Primer für *CALM2*, ER, PR, HER2-neu, AR, Ki67 und *RACGAP* (RG) wurden je in ein Mikroreagenzgefäß mit Beschriftung von A bis G gegeben. Vom PreMix1 wurden 59,4 µl auf die mit A bis G beschrifteten Mikroreagenzgefäße gegeben. Diese wurden danach gevortext und zentrifugiert. Von den Mikroreagenzgefäßen A bis G wurde im nächsten Schritt zeilenweise auf einer 96er-Well-PCR-Platte (8x12) in jeden Well 5 µl dieser Mischung pipettiert. In einem anderen Mikroreagenzgefäß wurde 246,6 µl 2xMasterMix mit 177,7 µl Wasser und 19,7 µl RT/Taq gemischt, um so den PreMix2 zu erstellen. Als Positivkontrolle wurde auf die erste und zweite Spalte eine quantifizierte Referenz RNA gegeben. Hierzu wurde 71,9 µl PreMix2 mit 8 µl QRef-RNA vermischt. Davon wurde 5 µl je Well verteilt. Als Negativkontrolle gegen Verunreinigung wurde auf der dritten Spalte ausschließlich 5 µl

PreMix2 verteilt. 105,8 µl PreMix2 wurde mit 11,8 µl der Patientinnen-RNA vermisch. Davon wurden 5 µl je Well in einer Spalte gegeben. Da die Testung dreifach durchgeführt wurde, um durch eine Mittelwertbildung die Ergebnisse gegen Ausreißer zu desensibilisieren, wurden pro Probe je 3 Spalten befüllt. Gleichzeitig konnten auf einer Platte so 3 unterschiedliche Proben untersucht werden (Abbildung 4).

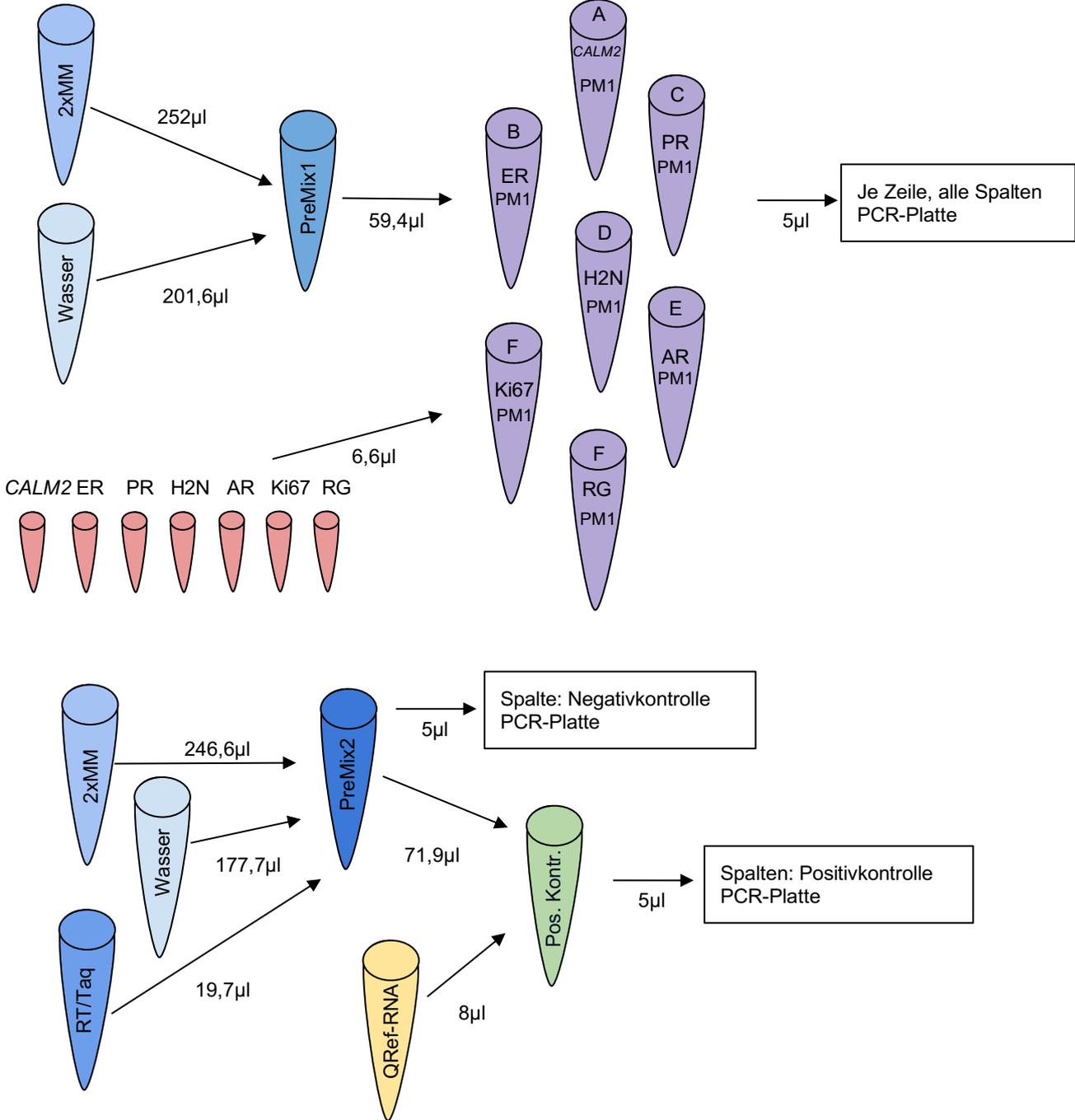


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Pipettierschemas zur Vorbereitung der PCR-Messung

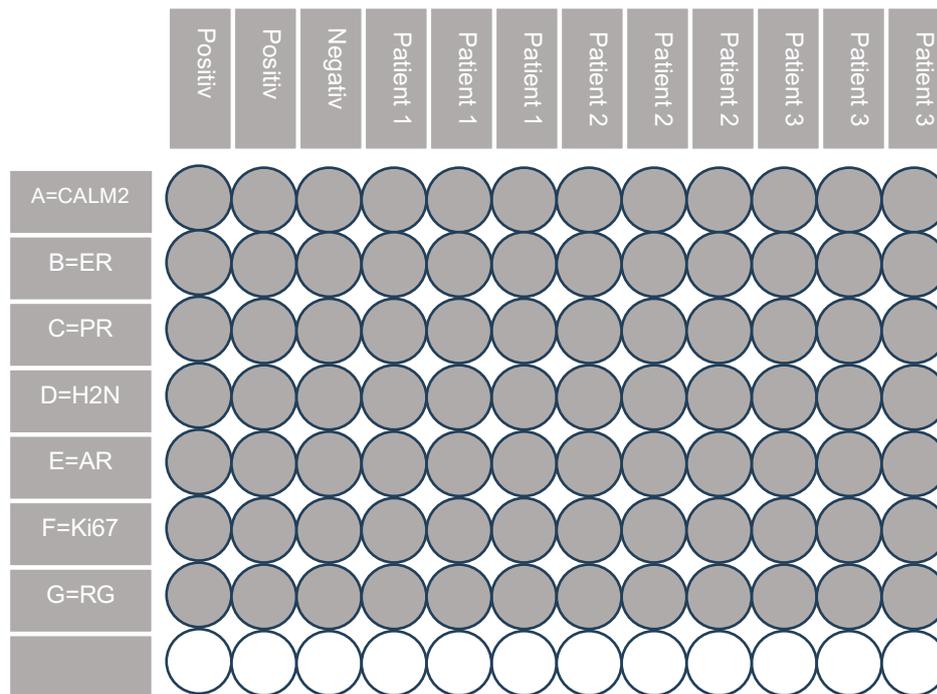


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufteilung der 96er-Well-PCR-Platte

3.2.5. Auswertung

Für die Quantifizierung der Messung diente *CALM2* als Referenzgen. So konnte die Expression der zumessenden Werte im Vergleich zur Marker-Expression von *CALM2* gesetzt werden.

Die Auswertung der RT-PCR Ergebnisse erfolgte über eine standardmäßige Berechnung mittels der ΔCT -Methode. Die ΔCT -Methode ist eine etablierte und einfache Methode zur Kontrolle der Varianz der Ergebnisse. Durch diese werden die Variabilität in der Menge der Ausgangs-RNA oder Unterschiede der Effizienz der RT-PCR-Synthese kontrolliert. So werden die Ergebnisse zusätzlich vergleichbar mit anderen Durchläufen und Proben. Die Rechnung "40 - ΔCT " dient der Vereinfachung. Hierdurch entspricht ein hohes Ergebnis einer hohen Expression. Da ab einem Nachweis bei 40 Zyklen oder mehr das Ergebnis als negativ gelten würde, bricht die Testung hier ab, sodass der Minuend entsprechend gewählt wurde. Somit entstehen keine negativen Ergebnisse. Ein Ergebnis gleich Null, entspricht einem Nicht-Vorhandensein oder einem Vorhandensein unter der Nachweisgrenze. Dies wird als Nicht-Vorhandensein eines Markers gewertet.

$$\text{Berechnete Expression} = 40 - \Delta CT$$

$$\Delta CT(\text{Probe}) = CT(\text{Probe}) - CT(\text{Referenzgen} = \text{Positivkontrolle})$$

Die Ergebnisse wurden tabellarisch gesammelt.

3.3. Definition intrinsischer Subtypen

Vom IfP kann standardmäßig eine Bestimmung der intrinsischen Subtypen durchgeführt werden. Es werden folgende vier Gruppen unterschieden: Luminal A, Luminal B, HER2-neu positiv und Triple Negativ. Der intrinsische Subtyp wird im IfP über die Expressionsstärke verschiedener Marker definiert. Die Grenzwerte wurden durch eine Partitionsanalyse des Programms JMP® bestimmt. Als Luminal A gilt ein Tumor bei einem PR $\geq 36,5$. Ebenfalls gilt ein Tumor als Luminal A bei einem grenzwertig hohem PR zwischen 36,5 und 34,5 und einem Ki67 $< 34,0$. Alle anderen HR-positiven und HER2-neu negativen Tumore werden als Luminal B subtypisiert. Als HER2-neu positiv gelten Tumore mit HER2-neu > 38 . Als Triple Negativ gilt ein Tumor mit ER < 34 und PR < 34 .

3.4. Ergebnisse des Oncotype DX®

Die Einsicht in die Krankenakten der Patientinnen aus dem klinischen Archiv des Brustzentrums Hohenlind wurde unabhängig von den vorliegenden Ergebnissen genommen. Es wurden die Ergebnisse für RS, ER, PR und HER2-neu aus dem Bericht des Oncotype DX® ausgelesen. Zudem wurde der angegebene Nodalstatus auf dem Oncotype DX® Bericht notiert. Aus dem Protokoll des Tumorboards wurde der TNM-Status, das Tumorgrading, der histologische Subtyp und der Menopausenstatus ausgelesen.

Die Informationen wurden den vorhandenen RT-PCR Ergebnissen aus dem IfP über das Geburtsdatum und die Anfangsbuchstaben der Patientinnen zugeordnet und in einer Tabelle zusammengefasst.

3.5. Statistische Auswertung

Die deskriptive und statistische Aufarbeitung wurde mithilfe der Programme Microsoft Excel und SPSS Statistics vom IBM durchgeführt. Die Diagramme wurden mit SPSS Statistics erstellt.

Im Oncotype DX® werden für den RS ganze Zahlen zwischen 0 und 100 angegeben. Bei den Ergebnissen von ER, PR und HER2-neu wurde auf die erste Dezimalzahl gerundet. Da teilweise nur Grenzwerte für ER, PR und HER2-neu angegeben wurden und um eine statistische Auswertung durchführen zu können, wurden diese nicht metrischen Werte durch metrische ersetzt (Tabelle 2). Hierdurch verblieb eine ordinale Wertigkeit des Datensatzes.

Um ein metrisches Skalenniveau beizubehalten, müssten die grenzwertigen Ergebnissen ausgeschlossen werden, was jedoch die Aussagekraft beeinträchtigt würde.

Grenzwerte	Maximalwert	Ersatz	Minimalwert	Ersatz
ER	$\geq 12,5$	13	$< 3,7$	3
PR	≥ 10	11	$< 3,2$	3
H2N	≥ 13	14	$< 7,6$	7

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der Grenzwerte und deren Ersatzwerte für die statistischen Berechnungen

In dem ersten Schritt der statistischen Auswertung wurde die Vergleichbarkeit der Kohorten geprüft. Hierzu wurden die unabhängigen Kohorten 1 und 2 bezüglich Alter, Nodalstatus und Menopausenstatus verglichen. Bei metrischen Variablen wurde zuerst mittel Kolmogorov-Smirnow-Tests die Normalverteilung geprüft, um die Anwendbarkeit parametrischer Tests zu prüfen. Ergab sich eine Normalverteilung, konnte der T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt werden kann. Bei nicht normalverteilten Variablen konnte der Mann-Whitney-U-Test als alternativer Test für unabhängige Stichproben angewandt werden, um die Ränge der abhängigen Variable auf signifikante Unterschiede zu vergleichen. Zur Analyse der nominalen Parameter wurde der Chi-Quadrat Test angewandt, um die, anhand des Anteiles an der Gesamtanzahl erwarteten Werte, mit den tatsächlichen Werten zu vergleichen.

In dem zweiten Schritt wurde überprüft, inwieweit die durch das IfP gemessenen Werte für ER, PR, HER2-neu vergleichbar mit den Ergebnissen des bereits validierten Oncotype DX® sind. Hierzu wurden die Ergebnisse der Kohorte 1 geprüft, welche als Findungskohorte diente. Da es sich, wie zuvor beschrieben, bei den Oncotype DX® Ergebnissen um Daten mit einem ordinalen Messniveau handelte, wurde die Korrelation nach Spearman berechnet. Die Signifikanz des Spearman-Korrelationskoeffizienten bei größeren Stichproben ($n \geq 30$) wurde mittels einer t-Statistik berechnet, die aus dem Korrelationskoeffizienten und der Stichprobengröße abgeleitet und gegen die t-Verteilung geprüft wurde, um den p-Wert zu ermitteln. Eine signifikante Korrelation wurde ab einem p-Wert von $< 0,01$ angenommen.

In dem dritten Schritt wurden die Hypothesen 1-3 anhand von K1 geprüft. Bei Hypothese 1 wurde mittels linearer Regression, univariat und multivariat die Korrelation zwischen den gemessenen Werten von PR, ER, HER2-neu und Ki67 und dem Oncotype DX® RS untersucht. Vorab wurde zur groben Einschätzung der Bedeutung des PR für den RS eine Spearman-Korrelation durchgeführt. Es wurde ein $R^2 > 70\%$ als starken Zusammenhang angestrebt. Bei Hypothese 2 wurde eine Dichotomisierung bezüglich der Parameter RS und PR durchgeführt. Da laut Oncotype DX® ab einem RS > 25 eine starke Empfehlung für eine Chemotherapie gegeben ist, diente dies als Grenzwert. Für den PR-Wert wurde mittels einer

Partitionsanalyse durch das Programm JMP® ein Grenzwert zur Dichotomisierung bestimmt. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Kreuztabelle gemäß dem unter 3.5.1. geschilderten Schema. Bei Hypothese 3 wurden die intrinsischen Subtypen mit dem RS korreliert. Dieser Ansatz kann als Erweiterung der Hypothese 2 gesehen werden, da ein Grenzbereich für PR ergänzt wurde, in welchem zusätzlich die Ki67-Messung herangezogen wurde. Die Bewertung der Ergebnisse der Hypothese 3 erfolgte ebenfalls anhand der Kreuztabelle dem unter 3.5.1. geschilderten Schema.

3.5.1. Beurteilung der Ergebnisse anhand der Kreuztabellen

Die von diagnostischen Tests bekannten Konzepte von Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen prädiktiven Wert wurden auf die Ergebnisse von H2 und H3 übertragen, um so die Vorhersagekraft der Testung zu beschreiben (Tabelle 3).

		Oncotype DX®		
H2	H3	RS ≤ 25	RS > 25	
PR < 36,5	Luminal B	A	B	PPW = B / (A + B)
PR ≥ 36,5	Luminal A	C	D	NPW = C / (C + D)
		Spezifität = C / (A + C)	Sensitivität = B / (B + D)	

Tabelle 3: Übertragung der Konzepte von Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW auf die vorliegenden Ergebnisse.

Die Sensitivität zeigte in diesem Fall, wie gut die Fälle identifiziert werden konnten, die einen RS > 25 aufwiesen und somit eine Chemotherapie-Empfehlung benötigten. Es wurde die Anzahl der Fälle mit PR < 36,5 bzw. die Luminal B-Fälle mit gleichzeitig einem RS > 25 (B) geteilt durch die Gesamtanzahl der Patienten mit einem RS > 25 (B+D) berechnet.

Die Spezifität zeigte, wie gut diejenigen Fälle identifiziert wurden, die die Chemotherapie-Empfehlung nicht benötigten. Berechnet wurde dies als die Anzahl der Fälle mit PR ≥ 36,5 bzw. die Luminal A Fälle mit gleichzeitigem RS ≤ 25 (C), geteilt durch die Gesamtanzahl der Patienten mit RS ≤ 25 (A+C).

Der positive prädiktive Wert (PPW) gab die Wahrscheinlichkeit an, inwiefern bei einem PR < 36,5 bzw. bei einem Luminal B klassifiziertem Tumor tatsächlich eine Chemotherapie-Empfehlung gegeben werden kann. Berechnet wurde dies als Anzahl der Fälle mit PR<36,5 bzw. die Anzahl der Luminal B Fälle mit gleichzeitigem RS > 25 (B) geteilt durch die Gesamtanzahl der als PR < 36,5 bzw. Luminal B klassifizierten Fälle (A+B).

Der negative prädiktive Wert (NPW) gab die Wahrscheinlichkeit an, inwiefern bei jemandem, der als $PR \geq 36,5$ bzw. als Luminal A getestet wurde, tatsächlich keine Chemotherapie-Empfehlung benötigt wurde. Berechnet wurde dies als die Anzahl der Fälle mit $PR \geq 36,5$ bzw. der Luminal A Fälle mit gleichzeitigem $RS \leq 25$ (C), geteilt durch die Gesamtanzahl der $PR \geq 36,5$ bzw. Luminal A klassifizierten Fälle (C+D).

4. Ergebnisse

4.1. Vergleichbarkeit der Kohorten

Die Nullhypothese, die im Folgenden geprüft wird, lautet: Kohorte 1 und 2 unterscheiden sich nicht bezüglich der Parameter Alter, Nodalstatus, Menopausenstatus und Untersuchungsmaterial.

4.1.1. Alter

Für das Alter (metrische Variabel) ergibt sich im Kolmogorov-Smirnow-Test keine Normalverteilung (Signifikanzniveau von $p = 0,006$ in der K1 und $p = 0,024$ in der K2; $p < 0,05$) (Tabelle 4).

Tests auf Normalverteilung K1						Tests auf Normalverteilung K2							
Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk				
Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz		
Alter	.112	94	.006	.970	94	.027	Alter	.095	102	.024	.975	102	.051
a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors						a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

Tabelle 4: Test auf Normalverteilung des Parameters Alter mittels Kolmogorov-Smirnov in K1 und K2.

In den Balkendiagramm (Abbildung 5), mit dem Alter in Jahren aufgetragen auf der x-Achse und der Häufigkeit aufgetragen auf der y-Achse in absoluten Zahlen, wird deutlich, dass die K1 eine zweigipflige Altersverteilung mit einem Gipfel bei 49 bis 50 Jahren und einem Gipfel bei 65 bis 66 Jahren aufweist. Das Durchschnittsalter der K1 liegt bei 59,13 Jahren und der Median des Alters liegt bei 60 Jahren. Das Durchschnittsalter der K2 liegt bei 60,37 Jahren, wobei der Median des Alters bei 62 Jahren liegt. K2 weist nur einen Altersgipfel bei 63 bis 64 Jahren auf.

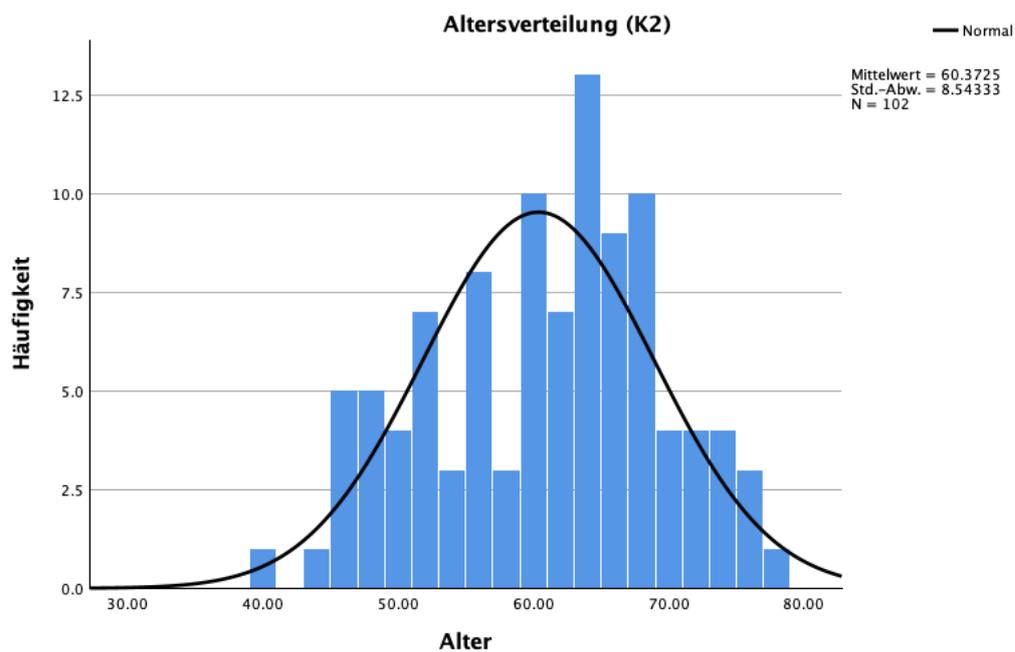
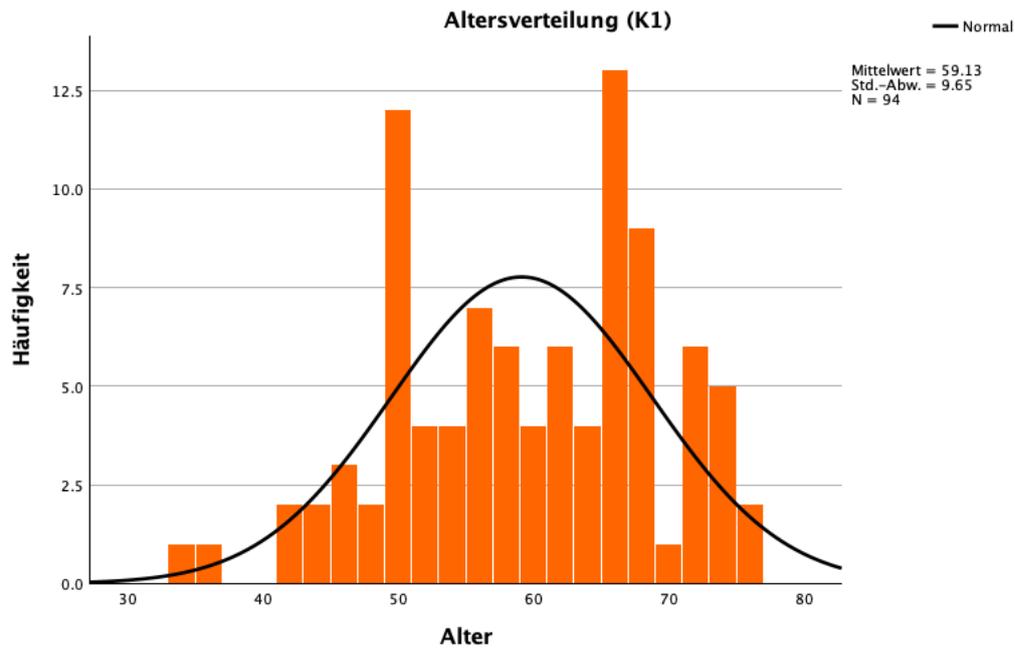


Abbildung 5: Altersverteilung Kohorte 1 und 2 mit Abbildung der Normalverteilungskurve.

Bei dem Mann-Whitney-U-Test ergibt sich eine asymptotische Signifikanz von $p = 0,486$, dies ist $> 0,05$. Somit kann die Nullhypothese bezüglich des Parameters Alter beibehalten werden. Beide Kohorten weisen annähernd dieselbe Verteilung bezüglich des Menopausenstatus auf.

4.1.2. Menopausenstatus

Mit $> 70\%$ ist der Großteil der Patientinnen zum Zeitpunkt der Probenentnahme postmenopausal. Für den Menopausenstatus ergibt sich im Chi-Quadrat-Test ein $p = 0,685$,

was über dem standardmäßig festgelegten α von $> 0,05$ liegt (Tabelle 5). Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beobachtetem und erwartetem Menopausenstatus, und die Nullhypothese kann beibehalten werden.

		Kohorte		Gesamt	
		1	2		
Menopausenstatus	unklar	Anzahl	2	2	4
		Erwartete Anzahl	1.9	2.1	4.0
	prämenopausal	Anzahl	16	15	31
		Erwartete Anzahl	14.9	16.1	31.0
	perimenopausal	Anzahl	7	4	11
		Erwartete Anzahl	5.3	5.7	11.0
	postmenopausal	Anzahl	69	81	150
		Erwartete Anzahl	71.9	78.1	150.0
Gesamt		Anzahl	94	102	196
		Erwartete Anzahl	94.0	102.0	196.0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	1.486 ^a	3	.685
Anzahl der gültigen Fälle	196		

a. 2 Zellen (25.0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1.92.

Tabelle 5: Kreuztabelle mit Gegenüberstellung des Menopausenstatus von K1 und K2 und Chi-Quadrat Test.

4.1.3. Nodalstatus

Für den Nodalstatus ergibt sich ein $p = 0,486$, was über dem standardmäßig festgelegten α von $> 0,05$ liegt (Tabelle 6). Es gibt somit keinen signifikanten Unterschied zwischen beobachtetem und erwartetem Nodalstatus, und die Nullhypothese kann beibehalten werden.

		Kohorte		Gesamt	
		1	2		
Nodalstatus Tumorboard	nodalnegativ	Anzahl	62	72	134
		Erwartete Anzahl	64.3	69.7	134.0
	nodalpositiv	Anzahl	32	30	62
		Erwartete Anzahl	29.7	32.3	62.0
Gesamt		Anzahl	94	102	196
		Erwartete Anzahl	94.0	102.0	196.0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	.485 ^a	1	.486
Anzahl der gültigen Fälle	196		

a. 0 Zellen (0.0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 29.73.

Tabelle 6: Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Test bezüglich des Nodalstatus.

4.1.4. Untersuchungsmaterial

Bezüglich der Art des Untersuchungsmaterials bestehen erhebliche Unterschiede. So wurden in der K1 zu 95,74% Operationspräparate und zu 4,26% Stanzbiopsien verwendet und in der K2 zu 53,92% Operationspräparate und zu 46,08% Stanzbiopsien (Abbildung 6). Somit sind die Kohorten bezüglich dieses Parameters nicht vergleichbar.

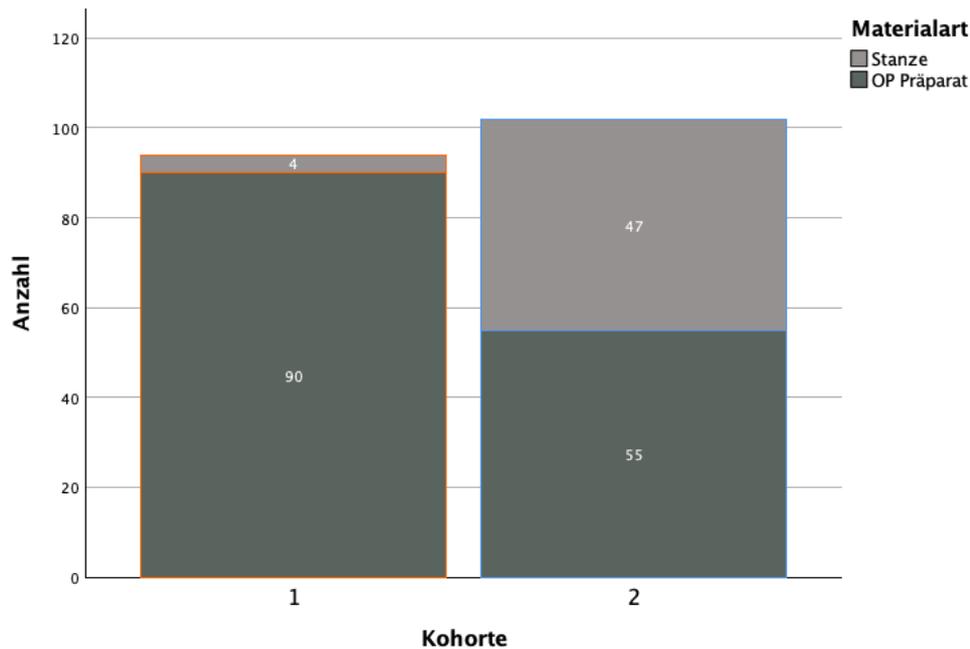


Abbildung 6: Zusammensetzung der Probenart von Kohorte 1 und 2.

4.2. Validität der Untersuchungsmethode

Die Analyse der Validität der Untersuchungsmethode mittels der Spearman-Korrelation zwischen dem internen Testverfahren des IfP und dem Oncotype DX® bezüglich der Werte PR und ER ist signifikant bei $p < 0,001$. Es zeigt sich ein positiver und starker Rangkoeffizient ρ mit $\rho = 0,9$ für ER und mit $\rho = 0,94$ für PR. Die Korrelation der Werte von HER2-neu ist ebenfalls positiv und signifikant mit $p < 0,001$, jedoch ist diese Abbildung mit $\rho = 0,61$ weniger stark. (Tabelle 7)

		Oncotype DX® ER	Oncotype DX® PR	Oncotype DX® H2N	IfP PR	IfP ER	IfP H2N	
Spearman-Rho	Oncotype DX® ER	Korrelationskoeffizient	1.000	.031	.395**	.025	.897**	.279**
		Sig. (2-seitig)	.	.768	<.001	.812	<.001	.006
	Oncotype DX® PR	Korrelationskoeffizient	.031	1.000	-.002	.943**	.131	.097
		Sig. (2-seitig)	.768	.	.986	<.001	.207	.354
	Oncotype DX® H2N	Korrelationskoeffizient	.395**	-.002	1.000	-.041	.290**	.610**
		Sig. (2-seitig)	<.001	.986	.	.698	.005	<.001
	IfP PR	Korrelationskoeffizient	.025	.943**	-.041	1.000	.181	.156
		Sig. (2-seitig)	.812	<.001	.698	.	.080	.134
	IfP ER	Korrelationskoeffizient	.897**	.131	.290**	.181	1.000	.348**
		Sig. (2-seitig)	<.001	.207	.005	.080	.	<.001
	IfP H2N	Korrelationskoeffizient	.279**	.097	.610**	.156	.348**	1.000
		Sig. (2-seitig)	.006	.354	<.001	.134	<.001	.

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).
N=94

Tabelle 7: Korrelation nach Spearman der Messungen von PR, ER und H2N des IfP und des Oncotype DX® der K1. Alle signifikanten Korrelationen sind farbig markiert. Orange markiert eine starke Korrelation, gelb eine mittelstarke Korrelation und grün eine schwache Korrelation.

Zudem fällt eine schwach positive Korrelation (Signifikanzniveau $p < 0,001$) zwischen den Messungen für ER und HER2-neu auf, mit einem $p \leq 0,06$ und einem $0,28 \leq \rho \leq 0,4$ (Tabelle 7).

Auf Grund dieser starken positiven Korrelation ist die mRNA-PCR-Diagnostik des IfP bezüglich ER und PR als eine valide Untersuchungsmethode zu werten. Sie kann im Folgenden als Basis für die weiteren Berechnungen genutzt werden.

4.3. Vergleich des Recurrence Scores mit den Ergebnissen des Instituts für Pathologie

4.3.1. Hypothese 1: Lineare univariate und multivariate Regression

Die Spearman-Korrelationstestung des RS mit dem PR, gemessen durch das IfP und durch den Oncotype DX®, ergibt zum Niveau von $p < 0,001$ eine signifikante Korrelation. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem RS und dem PR des Oncotype DX® beträgt $\rho = -0,68$ und zwischen dem RS und dem PR des IfP $\rho = -0,61$ (Tabelle 8). Des Weiteren ist erneut die Korrelation der Messungen von PR durch das IfP und der Messung von PR durch den Oncotype DX® abgebildet.

Korrelationen K1

			Oncotype DX® RS	Oncotype DX® PR	IfP PR
Spearman-Rho	Oncotype DX® RS	Korrelationskoeffizient	1.000	-.676**	-.609**
		Sig. (2-seitig)	.	<.001	<.001
	Oncotype DX® PR	Korrelationskoeffizient	-.676**	1.000	.943**
		Sig. (2-seitig)	<.001	.	<.001
	IfP PR	Korrelationskoeffizient	-.609**	.943**	1.000
		Sig. (2-seitig)	<.001	<.001	.

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).
N=94

Tabelle 8: Korrelation nach Spearman von K1. Signifikante Korrelationen sind farblich hinterlegt. Orange markiert eine starke Korrelation, gelb eine mittelstarke Korrelation. Es zeigt sich eine negative, signifikante und mittelstarke Korrelation zwischen dem RS und dem PR.

In der linearen Regressionsanalyse mit dem IfP-PR-Wertes als unabhängige Variable und dem RS als abhängige Variable ergibt sich ein $R^2 = 36,8\%$. In der visuellen Darstellung lässt sich eine starke Streuung ablesen (Abbildung 7).

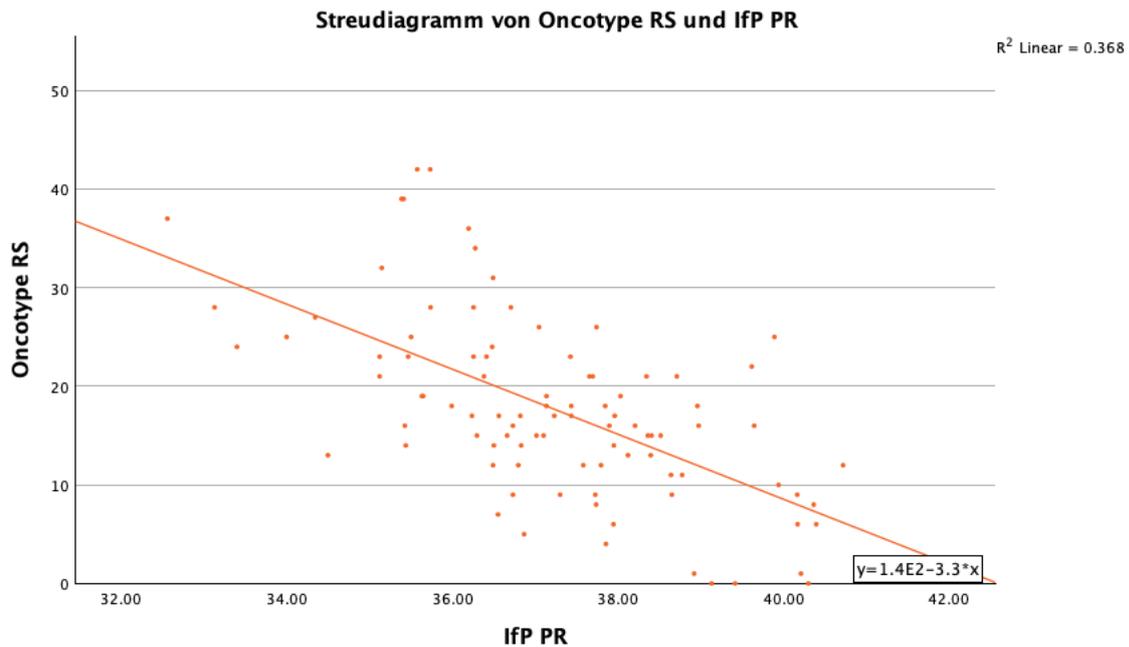


Abbildung 7: Lineare Regression mit IfP-PR als unabhängige Variable und Oncotype DX® RS als abhängige Variable.

Modellzusammenfassung

Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat	Standardfehler des Schätzers
1	.607 ^a	.368	.361	7.414

a. Einflußvariablen : (Konstante), IfP PR

ANOVA^a

Modell		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
1	Regression	2947.859	1	2947.859	53.634	<.001 ^b
	Nicht standardisierte Residuen	5056.566	92	54.963		
	Gesamt	8004.426	93			

a. Abhängige Variable: OncotypeRS
b. Einflußvariablen : (Konstante), IfP PR

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T	Sig.
1	(Konstante)	140.371	16.770		8.370	<.001
	IfP PR	-3.296	.450	-.607	-7.324	<.001

a. Abhängige Variable: OncotypeRS

Tabelle 9: Lineare Regressionsanalyse mit IfP PR als unabhängige Variable und Oncotype DX® RS als abhängige Variable. Mit $R^2 = 36,8\%$ und Signifikanz von $p < 0,001$ ergibt sich eine Regressionsgrade von $RS = 140,371 - 3,296 * PR$

In der ANOVA-Analyse lässt sich ablesen, dass eine hohe Signifikanz gegeben ist. Diese liegt mit $p < 0,001$ unter dem angestrebten Signifikanzniveau von $p < 0,05$. In der Koeffiziententabelle lässt sich die Regressionsgleichung ablesen: $RS = 140,371 - 3,296 * PR$ (Tabelle 9)

In der multivariaten Regressionsanalyse mit dem PR und dem Ki67 als unabhängige Einflussgrößen, erhält man ein korrigiertes $R^2 = 49\%$ mit dem Signifikanzniveau $p < 0,001$. Es ergibt sich folgende Regressionsgleichung: $RS = 33,202 - 3,314 * PR + 3,158 * Ki67$ (Tabelle 10)

Modellzusammenfassung

Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat	Standardfehler des Schätzers
1	.708 ^a	.501	.490	6.626

a. Einflußvariablen : (Konstante), Ki67-C_40-ΔCt_raw, IfP PR

ANOVA^a

Modell		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
1	Regression	4009.117	2	2004.559	45.657	<.001 ^b
	Nicht standardisierte Residuen	3995.308	91	43.904		
	Gesamt	8004.426	93			

a. Abhängige Variable: OncotypeRS

b. Einflußvariablen : (Konstante), Ki67-C_40-ΔCt_raw, IfP PR

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		Sig.
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T	
1	(Konstante)	33.202	26.454		1.255	.213
	IfP PR	-3.314	.402	-.610	-8.239	<.001
	Ki67	3.158	.642	.364	4.916	<.001

a. Abhängige Variable: OncotypeRS

Tabelle 10: Lineare multivariate Regressionsanalyse mit den unabhängigen Variablen IfP-PR und Ki67 und dem Oncotype DX® RS abhängigen Variable. Das korrigierte R^2 liegt bei 49%.

In der multivariaten Regressionsanalyse mit dem PR, Ki67, ER und HER2-neu als unabhängige Einflussgrößen steigert sich das korrigierte R^2 auf 50,6% bei dem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Es ergibt sich folgende Regressionsgleichung: $RS = 38,962 - 3,21 * PR + 3,373 * Ki67 + 0,68 * H2N - 1,142 * ER$ (Tabelle 11).

Modellzusammenfassung

Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat	Standardfehler des Schätzers
1	.726 ^a	.527	.506	6.521

a. Einflußvariablen : (Konstante), IfP ER, Ki67-C_40-ΔCt_raw, IfP PR, IfP H2N

ANOVA^a

Modell		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
1	Regression	4219.729	4	1054.932	24.808	<.001 ^b
	Nicht standardisierte Residuen	3784.697	89	42.525		
	Gesamt	8004.426	93			

a. Abhängige Variable: OncotypeRS

b. Einflußvariablen : (Konstante), IfP ER, Ki67-C_40-ΔCt_raw, IfP PR, IfP H2N

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		Sig.
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T	
1	(Konstante)	38.962	33.089		1.177	.242
	IfP PR	-3.210	.412	-.591	-7.797	<.001
	IfP Ki67	3.373	.647	.389	5.215	<.001
	IfP H2N	.680	.727	.074	.935	.352
	IfP ER	-1.142	.518	-.175	-2.204	.030

a. Abhängige Variable: OncotypeRS

Tabelle 11: Modellzusammenfassung der linearen multivariaten Regressionsanalyse mit den unabhängigen Variablen IfP-PR, IfP-Ki67, IfP-ER und IfP-H2N. Das korrigierte R-Quadrat liegt bei 0,506.

4.3.2. Hypothese 2: Dichotomisierte Dummy Variablen

In der Partitionsanalyse durch das Programm JMP® wurde als Grenzwert $PR \geq 36,5$ bzw. $PR < 36,5$ errechnet. Der Grenzwert für den RS liegt bei $RS \geq 25$ bzw. $RS < 25$.

Wird die dichotomisierte Variable PR auf der x-Achse gegen den RS des Oncotype DX® auf der y-Achse aufgetragen, lässt sich erkennen, dass mit Ausnahme von 3 Fällen (14, 72, 79), alle Proben mit einem $PR \geq 36,5$ einen RS von ≤ 25 aufweisen (Abbildung 8). In der Gruppe der Fälle mit einem $PR < 36,5$ kann keine Korrelation bezüglich des RS des Oncotype DX® und PR abgelesen werden.

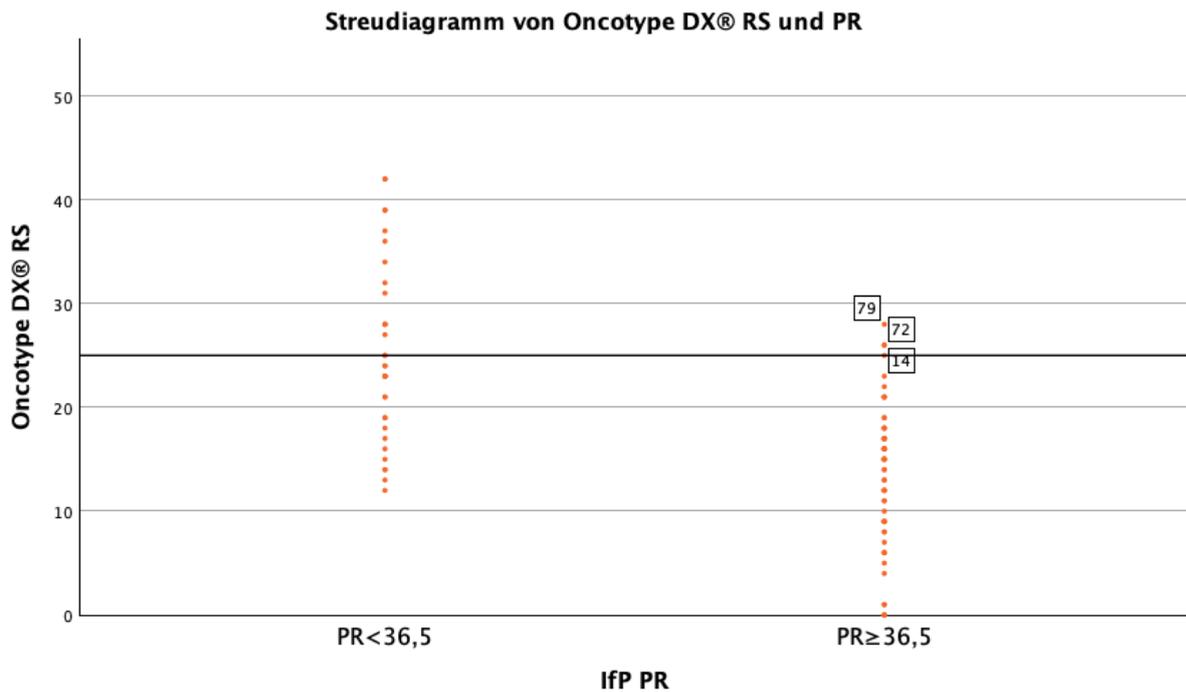


Abbildung 8: Streudiagramm mit Bezugslinien gemäß den Grenzwerten RS = 25 und dichotomisierter Darstellung vom IfP PR.

K1: IfP PR & Oncotype DX® RS

Anzahl

IfP PR	RS nach Oncotype DX®		Gesamt
	RS ≤ 25	RS > 25	
PR < 36,5	19	13	32
PR ≥ 36,5	59	3	62
Gesamt	78	16	94

Tabelle 12: Kreuztabelle mit dichotomisierten Angaben für Oncotype DX® und IfP PR.

Es ergibt sich eine Sensitivität von 81,25% (13/16) und eine Spezifität von 75,64% (59/78). Der positive Vorhersagewert liegt bei 40,63% (13/32), wobei der negative Vorhersagewert bei 95,16% (59/62) liegt. (Tabelle 12)

Bei allen drei „falsch-negativen“ Proben, für die laut Oncotype DX® ein RS > 25 errechnet wurde, jedoch ein PR ≥ 36,5 vorliegt, fällt ein grenzwertig niedriger RS auf:

- 14 (laufende Nummer 14) RS = 26 PR 37,74
- 72 (laufende Nummer 95) RS = 26 PR 37,05
- 79 (laufende Nummer 103) RS = 28 PR 36,71

4.3.3. Hypothese 3: Intrinsische Subtypen

Bei der Korrelation der intrinsischen Subtypen mit dem dichotomisierten Wert des RS zeigt sich ein für Luminal A klassifizierte Tumore mit Ausnahme von 3 Ergebnissen ein RS ≤ 25.

Dies lässt sich in dem Streudiagramm mit den intrinsischen Subtypen auf der x-Achse und dem Oncotype DX® RS auf der y-Achse ablesen. Anhand der Subtypen lässt sich für Luminal B Tumore kein RS ablesen. (Abbildung 9)

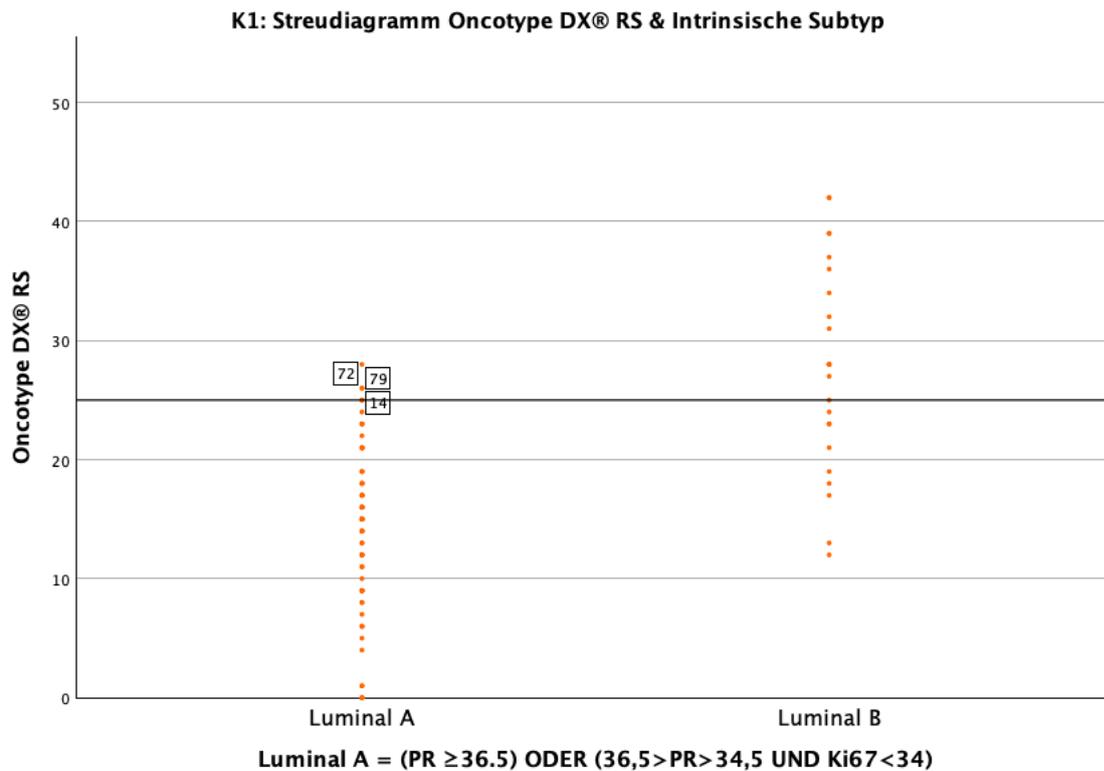


Abbildung 9: Streudiagramm der Subtypen auf der X-Achse und des Oncotype DX® RS auf der Y-Achse. Die Bezugslinie liegt auf y = 25.

Es fallen bei Luminal A klassifizierten Proben dieselben drei Fälle (14, 72, 79) aus dem Schema wie bei Hypothese 2.

K1: Intrinsischer Subtyp nach IfP
Luminal A = (PR ≥ 36.5) OR (36,5 > PR > 34,5 AND Ki67 < 34)
 Anzahl

	Intrinsischer Subtyp nach IfP	RS nach Oncotype DX®		Gesamt
		RS ≤ 25	RS > 25	
	Luminal A	68	3	71
	Luminal B	10	13	23
	Gesamt	78	16	94

Tabelle 13: Kreuztabellen mit Gegenüberstellung der intrinsischen Subtypen und dem RS

Es ergibt sich eine Sensitivität von 81,25% (13/16) und eine Spezifität von 87,18% (68/78). Der positive prädiktive Wert liegt bei 56,52% (13/23) und der negative prädiktive Wert liegt bei 95,77% (68/71). (Tabelle 13)

Im Vergleich zum Testverfahren der Hypothese 2 kann bei Hypothese 3 eine in Bezug auf die Sensitivität gleichwertige und in Bezug auf Spezifität, PPW und NPW bessere diagnostische Genauigkeit erlangt werden. (Tabelle 14)

	H2	□	H3
Sensitivität	81,25%	+ 0	81,25%
Spezifität	75,64%	+ 11,54	87,18%
PPW	40,63%	+ 15,9	56,52%
NPW	95,16%	+ 0,61	95,77%

Tabelle 14: Vergleich H1 und H2 auf diagnostische Genauigkeit.

4.4. Bestätigung der Hypothese 3 anhand der Kohorte 2

Im letzten Schritt der Untersuchung soll die Hypothese 3 an der Bestätigungskohorte getestet werden.

Erneut kann visuell verdeutlicht werden, dass Luminal A klassifizierte Tumore mit einem RS \leq 25 einhergehen. In der K2 zählt nur Fall 8 zu den Ausreißern. (Abbildung 10) Bei diesem Fall lässt sich ebenfalls ein grenzwertig niedriger RS erkennen:

- 8 (laufende Nummer 8) RS = 28 PR 33,97

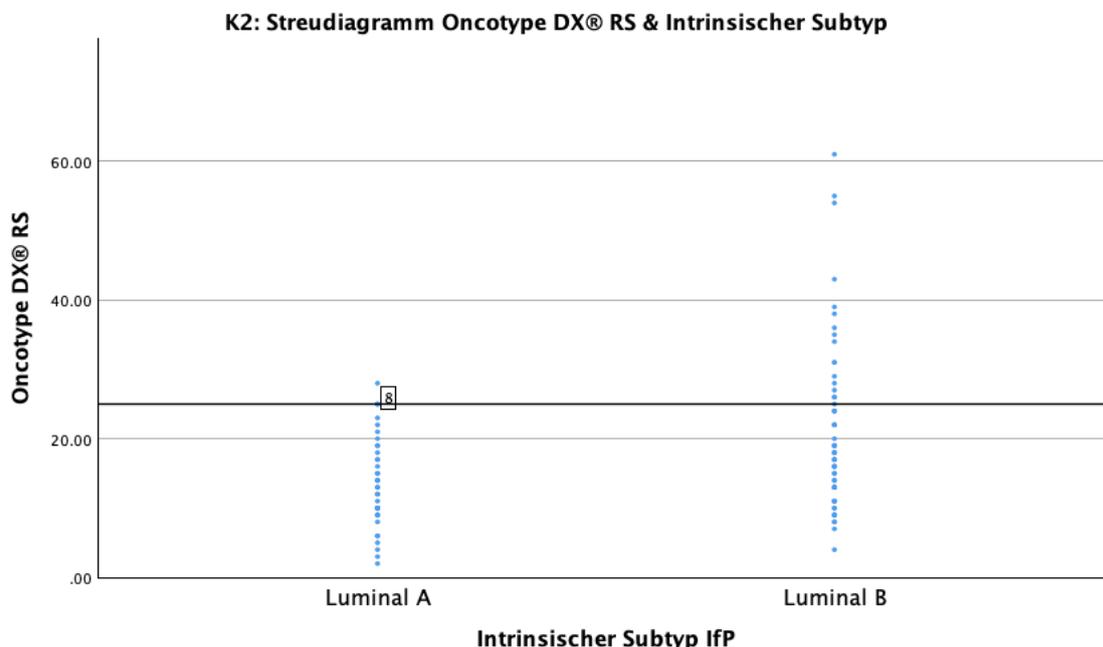


Abbildung 10: Streudiagramm der Subtypen auf der x-Achse und des Oncotype DX® RS auf der y-Achse. Die Bezugslinie bei y = 25.

K2: Intrinsischer Subtyp nach IfP
Luminal A = (PR ≥36.5) OR (36,5>PR>34,5 AND Ki67<34)

Anzahl

		RS nach Oncotype DX®		Gesamt
		RS≤25	RS>25	
Intrinsischer Subtyp nach IfP	Luminal A	39	1	40
	Luminal B	46	16	62
Gesamt		85	17	102

Tabelle 15: Kreuztabelle mit Gegenüberstellung der intrinsischen Subtypen und dem RS.

Bei der K2 ergibt sich somit eine Sensitivität von 94,12% und eine Spezifität von 45,88%. Der positiv prädiktive Wert beträgt 25,81% und der negativ prädiktive Wert 97,5%. (Tabelle 15)

5. Diskussion

5.1. Kohorten-Vergleichbarkeit

Die retrospektive Analyse der beiden Kohorten K1 (n = 94) und K2 (n = 102) zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, Menopausenstatus und Nodalstatus bestanden. Die Altersverteilungen der Kohorten K1 und K2 entsprachen jeweils nicht einer Normalverteilung. In K1 erzeugten 6 Fälle eine zweigipflige Verteilung, während K2 nur einen Gipfel aufwies. Vorgeschrrittenes Alter ist bekanntermaßen der größte Risikofaktor und erklärt den Gipfel bei dem Alter von 63/64 bzw. 65/66 Jahren. ⁽¹⁾ Für den ersten Höhepunkt in K1 konnte keine Erklärung gefunden werden, sodass hier von einer zufälligen Häufung von jüngeren Patientinnen ausgegangen werden muss.

Zwischen den Kohorten bestanden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Probenart. In K1 wurden nahezu keine Stanzbiopsien untersucht, während in K2 annähernd gleich viele Stanzbiopsien wie Operationspräparate verwendet wurden. Diese Unterschiede könnten auf die zunehmende Verwendung neoadjuvanter Chemotherapien und somit den Fortschritt in der Mammakarzinom-Therapie zurückzuführen sein. Seit der Veröffentlichung der S3-Leitlinie 2021 ist die neoadjuvante Therapie, also eine medikamentöse Therapie vor der Operation, in den Vordergrund gerückt. Bei Initiierung der Untersuchung lag bei einem großen Teil der Fälle der K2 kein Operationspräparat vor, sodass die Stanzbiopsie verwendet wurde. Ein später gewonnenes und untersuchtes Operationspräparat wäre auf Grund der durchgeführten neoadjuvanten Chemotherapie nicht aussagekräftig. ^(10,49) Die Relevanz dieses Unterschiedes ist jedoch gering, da bei der Auswertung der Ergebnisse die Zellmenge bzw. das Verhältnis zu dem Housekeeper-Gen berücksichtigt wurde.

5.2. Ergebnisse der Validitätsprüfung

Die vergleichende Messung des IfP für ER und PR korrelierten stark positiv und signifikant mit den entsprechenden Werten des Oncotype DX®. Dies bestätigte die Zuverlässigkeit und die Reproduzierbarkeit des IfP-Tests. Eine vergleichbare Methode wurde durch die Veröffentlichungen von Laible et al. bereits validiert. ⁽⁴⁸⁾

Obwohl die Ergebnisse für HER2-neu signifikant und positiv miteinander korrelierten, war die Korrelationsstärke nur mittleren Grades. Da die untersuchten Proben aus HER2-neu-negativen Tumoren stammten, war die HER2-neu-Expression generell niedrig. Bei solch grenzwertig niedrigen Expressionen sind die Messungen anfälliger für Ausreißer und Variabilität, was eine geringere Korrelationsstärke rechtfertigt, ohne die Messqualität der Methode in Frage zu stellen.

Zudem zeigte sich eine auf dem Niveau von $p \leq 0,006$ signifikante, schwach positive Korrelation zwischen HER2-neu und ER, die der in der Literatur beschriebenen negativen Korrelation entgegensteht⁽⁵⁰⁾. Dieses Ergebnis könnte ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den Proben um HER2-neu-negative Tumore handelte, was die Quantifizierung der Expression in diesem niedrigen Bereich als unzuverlässig erscheinen lässt.

5.3. Annäherung des Recurrence Scores

In Hypothese 1 zeigte sich mittels einer linearen Regression eine signifikante negative Korrelation zwischen dem PR als unabhängige Variable und dem RS als abhängige Variable mit einem korrigierten R^2 von 36,8%. Bei Hinzunahme von Ki67, ER und HER2-neu als unabhängige Einflussgrößen konnte in der multivariaten Regressionsanalyse das korrigierte R^2 auf 50,6% gesteigert werden. Die in der Hypothese 1 erreichten R^2 werden als schwacher Zusammenhang bewertet und liegen unter den in der Literatur allgemein als gut angesehenen Werten von $R^2 > 70\%$.⁽⁵¹⁾ Humphris K. et al. konnten 2021 eine Regressionsgleichung mit einer Vorhersagewahrscheinlichkeit von 78,4% erstellen.⁽⁴⁷⁾ Da ihre Studie, basierend auf den immunhistochemischen Messungen von Ki67, ER10 und PR10, eine andere Wertigkeit hat, sind diese Ergebnisse nicht direkt mit der vorliegenden Studie vergleichbar. Aus dem Verwerfen der Hypothese 1 lässt sich konkludieren, dass der RS nicht verlässlich durch eine Regressionsgleichung nachzubilden ist.

In Hypothese 2 wurde die Korrelation zwischen RS und PR durch eine Dichotomisierung und die Verwendung von Dummy-Variablen approximiert. Die Dichotomisierung erfolgte anhand von Werten, die durch eine Partitionsanalyse ermittelt wurden. Die Überprüfung der Hypothese 2 ergab, dass, abgesehen von drei Ausnahmen, bei einem PR-Wert von mindestens 36,5 der Recurrence Score (RS) bei 25 oder darunter lag (NPW). Daraus resultierte ein sehr starker negativer Vorhersagewert von 95,16%.

Hypothese 3 baute auf dem Ansatz von Hypothese 2 auf, indem ein zusätzlicher Grenzbereich für PR eingeführt wurde, in dem Ki67 berücksichtigt wurde. Die resultierenden Untergruppen entsprachen den intrinsischen Subtypen Luminal A oder Luminal B. Bei den Luminal A Tumoren konnte ein RS von maximal 25 mit einer Genauigkeit von 95,77% vorhergesagt werden, womit im Vergleich zu Hypothese 2 eine Steigerung des negativen Vorhersagewertes erzielt werden konnte. Hypothese 3 erwies sich somit als besten Ansatz und wurde in der Bestätigungskohorte K2 weiter überprüft. Hierbei wurde ein negativer Vorhersagewert von 97,5% erzielt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein hoher PR-Wert mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv korreliert. Ähnliches wurde bei Tumoren mit einem

grenzwertig hohen PR-Wert und einer niedrigen Teilungsrate (Ki67) beobachtet. Dies legt nahe, dass der PR eine protektive Rolle spielt, eine Annahme, die auch durch die wissenschaftliche Literatur gestützt wird (^{52, 53}).

5.4. Bedeutung für die klinische Anwendbarkeit

Die vorliegende Studie stellt einen weiteren Schritt hin zu einer individuellen und optimalen Mammakarzinom-Therapie dar. Historisch wurden viele Ansätze verfolgt, die Therapieplanung luminaler Tumore zu optimieren. Unter anderem galt es zeitweise, das Therapieregime nach der TNM-Klassifikation, nach dem HER2-neu-Status oder dem Tumor-Grading zu richten (siehe Abschnitt 2.4.). Eine reproduzierbare, verlässliche und erfolgreiche Therapieplanung für luminale Tumore konnte erst mit der Einführung des Oncotype DX® und ähnlicher Multigentests erreicht werden. Ein vollständiger Ersatz des Oncotype DX® Tests weiterhin nicht möglich. Die RT-PCR-basierte Subtypisierung sollte viel mehr als ergänzende und vorgeschaltete Diagnostik betrachtet werden.

Durch die Vereinfachung des Oncotype DX® Diagnoseprozesses, der nun nicht mehr eine Versendung der Proben über das Zentrallabor in Viersen in die USA, sondern direkt in das zertifizierte Oncotype DX® Zentrallabor in Trier erfordert, wurde die Diagnostik bereits beschleunigt. Trotz dieser Änderung blieben die Kosten für die Krankenkassen unverändert. Für eine effiziente Gestaltung der Diagnostik könnte die in dieser Arbeit beschriebene Testung und Subtypisierung unmittelbar nach der Probenentnahme in den regional nächstgelegenen Pathologie-Laboren erfolgen. Bei einem hierbei diagnostizierten Luminal A Tumor und einem Patientenalter über 50 Jahren könnte zuverlässig auf die Oncotype DX® Testung sowie auf eine Chemotherapie verzichtet werden. Da bei Luminal B klassifizierten Tumoren kein klarer Zusammenhang gezeigt werden konnte, wäre bei diesem Ergebnis nach einer Subtypisierungstestung weiterhin eine Oncotype DX® Testung erforderlich. Das Anwenden der in dieser Studie präsentierten diagnostischen Methodik beschleunigt somit in vielen Fällen das diagnostische Prozedere und die Therapieplanung. Zudem erlaubt es in Summe eine große Kosteneinsparung für die Krankenkassen.

Die Methode, Oncotype DX® Ergebnisse in Untergruppen zu klassifizieren und Korrelationen zwischen verschiedenen Messungen am selben Tumorpräparat zu identifizieren, wurde bereits in den Studien von Klein ME et al. (2013) und Wu S-G et al. (2019) angewandt (^{45, 46}). In der Studie von Klein ME et al. wurden die RS-Ergebnisse des Oncotype DX® in Gruppen unterteilt, sodass Risikogruppen mit hohem (RS > 30), mittlerem (RS = 18 - 30) und niedrigem (RS < 18) Risiko resultierten. Anhand einer Findungskohorte, welche 817 Fälle umfasste, und einer Bestätigungskohorte von 255 Fällen konnte maximal eine 59,4%-ige Korrelation der

Berechnungen mit den Risiko-Gruppen erreicht werden. Nach Ausschluss der mittleren Risiko-Kategorie konnte eine 100%-ige Korrelation der Risiko-Kategorien mit der sogenannten neuen Magee-Gleichung 2 erreicht werden. Mittels einer linearen Regression wurde die originale Magee-Gleichung aus einer Pilotstudie ⁽⁵⁴⁾ optimiert, sodass drei weitere Magee-Gleichungen resultierten. Die Variablen der neuen Magee-Gleichung 2 sind die Tumorgröße, das Tumor Grading nach dem Nottingham Score ⁽⁵⁵⁾, der HER2-neu-Status, das Ki67 und die immunhistochemischen Messungen von PR und ER an den Tumorpräparaten. Klein ME et al. konkludierten, dass für die Fälle mit hohem oder niedrigem Risiko auf eine Oncotype DX® Untersuchung verzichtet werden könne. In der Studie von Wu s-G et al. wurde ebenfalls die Korrelation mit den Risikogruppen mit hohem (RS > 25), mittlerem (RS = 11 - 25) und niedrigem (RS < 11) Risiko untersucht. Anhand einer Kohorte von 9030 PatientInnen mit invasiv lobulärem Mammakarzinomen wurden die Variablen Alter, Ethnizität, Tumorstadium, Tumor Grading, immunhistochemischer ER- und PR-Status evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass PR-positive Tumore mit einem G1- oder G2-Grading stark mit einem niedrigen oder mittleren Risikostatus korrelieren. Zusätzlich korrelierte mit einer Wahrscheinlichkeit von 41% höheres Alter, G3-Grading und PR-Negativität mit der Zugehörigkeit zur hohen Risikogruppe. Im Vergleich zu den genannten Studien wurde in der vorliegenden Untersuchung lediglich 94 (K1) und 102 (K2) Fällen getestet. Durch den Einsatz einer RT-PCR, als verlässliche und reproduzierbare Untersuchungsmethode, und einer herausragenden Vorhersagekraft von bis zu 97,5% für die Untergruppe der Luminal A Tumore konnten jedoch ähnliche bzw. höherwertige Ergebnisse erzielt werden.

Betrachtet man die globale Prävalenz von Mammakarzinomen ⁽¹⁾, wird klar, dass die vorliegende Untersuchungsmethode Patientinnen weltweit zugutekommen könnte. Durch die geringeren Kosten resultiert eine reduzierte Abhängigkeit von ökonomischen und gesundheitspolitischen Rahmenbedingungen. Durch die Ergebnisse dieser Studie könnte gesundheitspolitisch ein großer Beitrag zur Vereinfachung der Diagnostik bei Mammakarzinomen geschaffen werden.

5.5. Stärken und Limitationen

Eine wesentliche Stärke dieser Studie liegt im Studienaufbau mit zwei unabhängigen Kohorten. So konnten die anhand von K1 formulierten Hypothesen innerhalb derselben Studie mittels der K2 validiert werden. Da konsekutiv alle registrierten Fälle in die Studie eingeschlossen wurden und keine Vorauswahl erfolgte, ist eine starke Generalisierbarkeit und Repräsentativität dieser Studie gegeben. Des Weiteren konnte eine hohe Datenqualität sichergestellt werden, indem jede RT-PCR-Messungen dreifach durchgeführt wurde. Aus den unabhängigen Messergebnissen wurde das arithmetische Mittel gebildet, um kleine

Messschwankungen auszugleichen. Bei großen Abweichungen wurde die Messung wiederholt, womit das Risiko für Flüchtigkeitsfehler minimiert wurde. Da die Ergebnisse retrospektiv verglichen wurden, kann ein Auswertungsbias ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Studie sind generalisierbar und global anwendbar, sofern die technischen Gegebenheiten für zuverlässige PCR-Diagnostik vorhanden sind, was eine weitere Stärke darstellt.

Der Ausschluss von männlichen Patienten erfolgte, da offensichtlich signifikante hormonelle Unterschiede vorliegen und für eine separate Betrachtung die Fallzahl zu niedrig war. Zusätzlich wurden die Proben ausgeschlossen, die im primären Screening als HR-positiv bzw. HER2-neu-negativ klassifiziert waren, für welche jedoch in der endgültigen molekularen Pathologie gegensätzliche Ergebnisse vorlagen. Diese Proben hätten ursprünglich keinen Oncotype DX® Test erhalten müssen, sodass das Einbeziehen in diese Vergleichsstudie die Ergebnisse womöglich verfälscht hätte. Für eine gesonderte Betrachtung war die Fallzahl ebenfalls zu niedrig.

In der vorliegenden Studie konnte die vollständige Nachbildung des RS des Oncotype DX® und die Abbildung der feinen Abstufungen nicht erreicht werden. Ein $RS \leq 25$ bedeutet laut Oncotype DX® nicht automatisch, dass eine Chemotherapie keinen Nutzen bietet (Definition siehe 2.5.). Zum Beispiel liegt bei nodal-negativem Status, einem Alter von ≤ 50 Jahren und einem RS zwischen 16 und 20 der Nutzen einer Chemotherapie bei etwa 1,6%, während der Chemotherapienutzen bei einem RS von 21 - 25 auf etwa 6,5% steigt. Bei nodal-positivem und prämenopausalem Status mit einem $RS \leq 25$ beträgt der Chemotherapienutzen nach fünf Jahren 2,9% ⁽²³⁾. Durch die Subtypisierung kann somit lediglich ein Chemotherapienutzen von unter 15% erkannt werden. Des Weiteren konnte für alle Luminal B klassifizierten Tumoren kein eindeutiger und verlässlicher Zusammenhang nachgewiesen werden, was eine wesentliche Limitation darstellt.

Die Resultate, die auf einer retrospektiven statistischen Analyse basieren, sollten durch eine prospektive klinische und labortechnische Studie validiert werden. Die Datenerhebung erfolgte im Rahmen einer Qualitätssicherung, was die Stichprobengröße je Kohorte auf etwa $n = 100$ limitierte. Ein multizentrischer Ansatz, der die Kohortengröße insgesamt erweitert, wäre sinnvoll, um die angenommene Übertragbarkeit der Testung auf andere Labore zu überprüfen.

5.6. Fazit

Die vorliegende Studie kann einen bedeutenden Beitrag zur Diagnostik des Mammakarzinoms leisten. Die Ergebnisse sind verlässlich und reproduzierbar und können so die Grundlage für

eine solide, personalisierte und optimale diagnostische Methodik sein. Angesichts der ermutigenden Resultate dieser Studie wird empfohlen, die Forschung durch eine prospektive Studie mit einer vergrößerten Untersuchungskohorte fortzusetzen. So kann die Robustheit und Generalisierbarkeit der Ergebnisse weiter gestärkt werden und im breiteren klinischen Kontext validiert werden. Die Implementierung der Erkenntnisse aus dieser Arbeit könnte potenziell die Behandlungsstrategien für Mammakarzinom-Patientinnen optimieren und zu der Personalisierung der Medizin beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021; **71**: 7–33.
- 2 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; **68**: 394–424.
- 3 Cancer today. <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed Nov 20, 2023).
- 4 Krebsdatenregister. Zent. Für Krebsregisterdaten. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html (accessed Oct 24, 2023).
- 5 Köln - Einwohnerzahl bis 2022. Statista. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/322477/umfrage/entwicklung-der-gesamtbevoelkerung-in-koeln/> (accessed Oct 24, 2023).
- 6 Rhein-Erft-Kreis - Einwohnerzahl bis 2022. Statista. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1133318/umfrage/entwicklung-der-gesamtbevoelkerung-im-rhein-erft-kreis/> (accessed Nov 20, 2023).
- 7 Strukturierter Qualitätsbericht 2020 gemäß § 137 Abs. 1 Satz 3 Nr. 6 SGB V. St. Elisabeth-Krankenhaus GmbH
- 8 Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat* 2017; **165**: 193–200.
- 9 Roheel A, Khan A, Anwar F, *et al.* Global epidemiology of breast cancer based on risk factors: a systematic review. *Front Oncol* 2023; **13**: 1240098.
- 10 S3-Leitlinie Mammakarzinom. 2021.
- 11 dpa. Krebsvorsorge: Etwas mehr Frauen gehen zum Mammografie-Screening. Zeit. 2022; published online June 15. <https://www.zeit.de/news/2022-06/15/weniger-einladungen-zum-mammografie-screening-verfallen> (accessed Nov 27, 2023).
- 12 Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; **406**: 747–52.
- 13 Wirtz RM, Sihto H, Isola J, *et al.* Biological subtyping of early breast cancer: a study comparing RT-qPCR with immunohistochemistry. *Breast Cancer Res Treat* 2016; **157**: 437–46.
- 14 Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2011; **22**: 1736–47.
- 15 Paik S, Shak S, Tang G, *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2817–26.
- 16 Device Classification Under Section 513(f)(2)(De Novo). <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/denovo.cfm?ID=DEN070009> (accessed Dec 10, 2023).
- 17 Paik S. Is gene array testing to be considered routine now? *Breast Edinb Scotl* 2011; **20 Suppl 3**: S87-91.
- 18 Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, *et al.* Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018; **379**: 111–21.
- 19 Behuria P. Exact Sciences completes acquisition of Genomic Health for \$2.8bn. Med. Device Netw. 2019; published online Nov 11. <https://www.medicaldevice-network.com/news/exact-sciences-genomic-health/> (accessed Dec 10, 2023).
- 20 Denkert C, Pfitzner BM, Heppner BI, Dietel M. Molekulare Pathologie beim Mammakarzinom: Wertigkeit der Genexpressionsprofile. *Pathol* 2015; **36**: 145–53.
- 21 Kalinsky K, Barlow WE, Gralow JR, *et al.* 21-Gene Assay to Inform Chemotherapy Benefit in Node-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2021; **385**: 2336–47.
- 22 Kassenärztliche Vereinigung Mecklenburg-Vorpommern | Poststationäre Leistungen tragen die Krankenhäuser. https://www.kvmv.de/mitglieder/recht-vertraege/rechtsauskuenfte/Rechtsauskuenfte_29.html (accessed June 22, 2024).

- 23 FAQ und Hilfen | Oncotype DX Breast Recurrence Score® Test | Oncotype IQ® Deutschland. <https://www.oncotypeiq.com/de-de/brustkrebs/patienten/stage-i-iiia-invasive/haufig-gestellte-fragen> (accessed Dec 10, 2023).
- 24 Woolen S, Kazerooni EA, Wall A, *et al.* Waiting for Radiology Test Results: Patient Expectations and Emotional Disutility. *J Am Coll Radiol JACR* 2018; **15**: 274–81.
- 25 Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. EBM: Startschuss für Liposuktion und biomarkerbasierten Test bei Brustkrebs. Dtsch. Ärztebl. 2019; published online Dec 20. <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/108383/EBM-Startschuss-fuer-Liposuktion-und-biomarkerbasierten-Test-bei-Brustkrebs> (accessed Dec 10, 2023).
- 26 MVZHZMD Trier GmbH. .
- 27 19506 - Biomarkerbasierter Test unter Anwendung der Vorgehensweise des Oncotype DX Breast Recurrence Score® gemäß Nr. 30 Anlage I der MVV-RL beim Mammakarzinom. https://www.kbv.de/tools/ebm/html/19506_2900851865583774055776.html (accessed April 8, 2024).
- 28 Siziopikou KP. Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: Current Concepts and Future Directions. *Arch Pathol Lab Med* 2013; **137**: 462–6.
- 29 Elston CW, Ellis IO. The Breast: Volume 13 in the Systemic Pathology Series, 3rd edn. New York: Churchill Livingstone, 1998.
- 30 Bombardieri E, Agresti R, editors. Breast cancer: nuclear medicine in diagnosis and therapeutic options ; with 30 tables. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2008.
- 31 Mammakarzinom - AMBOSS. https://next.amboss.com/de/article/_k05qT#Yd898447472d2880f319e16e718f82b8e (accessed Dec 8, 2023).
- 32 Tavassoli F, Devilee P. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Tumours-Of-The-Breast-And-Female-Genital-Organs-2003> (accessed Dec 6, 2023).
- 33 Winchester DJ, Chang HR, Graves TA, Menck HR, Bland KI, Winchester DP. A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg* 1998; **186**: 416–22.
- 34 Stein H. Grading invasiver Mammakarzinome nach Elston und Ellis. *Pathol* 2007; **28**: 307–307.
- 35 Denkert C, Lebeau A, Schildhaus HU, Jackisch C, Rüschoff J. Neue Therapiemöglichkeiten beim metastasierten HER2-low-Mammakarzinom. *Pathol Heidelb Ger* 2022; **43**: 457–66.
- 36 Modi S, Jacot W, Yamashita T, *et al.* Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2022; **387**: 9–20.
- 37 Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett* 2015; **356**: 231–43.
- 38 Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ. Progesterone and Breast Cancer. *Endocr Rev* 2020; **41**: 320–44.
- 39 Suijkerbuijk KPM, van der Wall E, van Diest PJ. Hormone Receptors in Breast Cancer. In: Badve S, Gökmen-Polar Y, eds. Molecular Pathology of Breast Cancer. Cham: Springer International Publishing, 2016: 45–58.
- 40 Alrhoun S, Sennikov S. The Role of Tumor-Associated Antigen HER2/neu in Tumor Development and the Different Approaches for Using It in Treatment: Many Choices and Future Directions. *Cancers* 2022; **14**: 6173.
- 41 Schettini F, Prat A. Dissecting the biological heterogeneity of HER2-positive breast cancer. *Breast Edinb Scotl* 2021; **59**: 339–50.
- 42 Klöppel G, La Rosa S. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch Int J Pathol* 2018; **472**: 341–9.
- 43 Tumorbilogie bei Brustkrebs | DKG. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/tumorbilogie.html> (accessed Dec 9, 2023).
- 44 Schildgen V, Warm M, Brockmann M, Schildgen O. Oncotype DX Breast Cancer

- recurrence score resists inter-assay reproducibility with RT2-Profiler Multiplex RT-PCR. *Sci Rep* 2019; **9**. DOI:10.1038/s41598-019-56910-0.
- 45 Klein ME, Dabbs DJ, Shuai Y, *et al*. Prediction of the Oncotype DX recurrence score: use of pathology-generated equations derived by linear regression analysis. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2013; **26**: 658–64.
- 46 Wu S-G, Zhang W-W, Wang J, *et al*. Progesterone receptor status and tumor grade predict the 21-gene recurrence score of invasive lobular breast cancer. *Biomark Med* 2019; **13**: 1005–12.
- 47 Humphris K, Stephenson J, Kumaraswamy V. Predicting oncotype DX recurrence scores using locally available immunohistochemical markers: experience in a district general hospital. *J Clin Pathol* 2023; **76**: 252–5.
- 48 Laible M, Schlombs K, Kaiser K, *et al*. Technical validation of an RT-qPCR in vitro diagnostic test system for the determination of breast cancer molecular subtypes by quantification of ERBB2, ESR1, PGR and MKI67 mRNA levels from formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer* 2016; **16**: 398.
- 49 O'Halloran N, Lowery A, Curran C, *et al*. A Review of the Impact of Neoadjuvant Chemotherapy on Breast Surgery Practice and Outcomes. *Clin Breast Cancer* 2019; **19**: 377–82.
- 50 Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JMS. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003; **200**: 290–7.
- 51 mathe-elc. Bestimmtheitsmaß: Was Sie über das Messen der Genauigkeit wissen müssen. Mathe ELC. 2023; published online April 17. <https://mathe-elc.com/statistik/bestimmtheitsmasss/> (accessed March 23, 2024).
- 52 Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, *et al*. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer* 2014; **110**: 565–72.
- 53 Siersbæk R, Kumar S, Carroll JS. Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor α function in breast cancer. *Genes Dev* 2018; **32**: 1141–54.
- 54 Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2008; **21**: 1255–61.
- 55 Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; **19**: 403–10.

7. Anhang

Anhang 1: TNM-Klassifikation (^{10,31})

TNM-Klassifikation	Tumorausbreitung
TX	Keine Beurteilung möglich
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
	Tis (DCIS): Duktales Carcinoma in situ
	Tis (LCIS): Lobuläres Carcinoma in situ
	Tis (Paget): M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T1	Tumorgröße: ≤ 2 cm
	T1mi: Mikroinvasion ≤ 0,1 cm
	T1a: ≤ 0,5 cm
	T1b: > 0,5 cm und ≤ 1 cm
	T1c: > 1 cm und ≤ 2 cm
T2	Tumorgröße: > 2 cm und ≤ 5 cm
T3	Tumorgröße: > 5 cm
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Haut oder Brustwand
	T4a: Infiltration der Brustwand
	T4b: Ulzerationen, Hautödem (inkl. Peau d'orange) oder ipsilaterale Haut-Satelliten-Metastasen
	T4c: T4a + T4b
	T4d: Inflammatorisches Mammakarzinom
N1	Befall beweglicher axillärer Lymphknoten des Levels I–II
pN1	pN1mi: Mikrometastasen
	pN1a: 1–3 axilläre Lymphknoten
	pN1b: Lymphknoten entlang A. mammaria interna (mikroskopisch, aber klinisch nicht erkennbar)
	pN1c: pN1a + pN1b
N2	Befall fixierter axillärer Lymphknoten des Levels I–II oder klinisch diagnostizierter isolierter Befall ipsilateraler Lymphknoten der A. mammaria interna
	N2a: Axilläre Lymphknoten (Level I–II) fixiert
	N2b: Ipsilaterale Lymphknoten der A. mammaria interna
pN2	pN2a: 4–9 axilläre Lymphknoten
	pN2b: Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (klinisch erkennbar) ohne axilläre Lymphknoten
N3	Befall supra- oder infraklavikulärer Lymphknoten (Level III), gleichzeitiger Befall von axillären und Mammaria-interna-Lymphknoten
	N3a: Infraklavikuläre Lymphknoten (Level III)
	N3b: Axilläre Lymphknoten u. Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
	N3c: Supraklavikuläre Lymphknoten (Level III)
pN3	pN3a: ≥ 10 axilläre oder infraklavikuläre Lymphknoten
	pN3b
	Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (klinisch erkennbar) + mind. 1 axillärer Lymphknotenoder
	Sentinel-Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (aber klinisch nicht erkennbar) + mehr als 3 axilläre Lymphknoten
	pN3c: Supraklavikuläre Lymphknoten (ipsilateral)
M	M0: Keine Fernmetastasen
	M1: Fernmetastasen

Anhang 2: Gegenüberstellung UICC/AJCC Stadien und TNM-Klassifikation ⁽³¹⁾

UICC/AJCC Stadien	TNM-Klassifikation
0	Tis, N0, M0
IA	T1, N0, M0
IB	T0–T1, pN1mi, M0
IIA	T0–T1, N1, M0; T2, N0, M0
IIB	T2, N1, M0; T3, N0, M0
IIIA	T0–T2, N2, M0; T3, N1–N2, M0
IIIB	T4, N0–N2, M0
IIIC	Jedes T, N3, M0
IV	Jedes T, jedes N, M1

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Visuelle Darstellung des Chemotherapienutzens (CT-Nutzen) anhand des Nodalstatus, des Alters und des RS nach TAILORx- und RxPonder-Studie. ^(18,21)	14
Abbildung 2: Kohorte 1 und 2: Übersicht der Fall-Kollektive und Darstellung der Ausschlusskriterien.	22
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Pipettierschemas zur Vorbereitung der PCR-Messung.....	25
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aufteilung der 96er-Well-PCR-Platte	26
Abbildung 5: Altersverteilung Kohorte 1 und 2 mit Abbildung der Normalverteilungskurve...	32
Abbildung 6: Zusammensetzung der Probenart von Kohorte 1 und 2.	34
Abbildung 7: Lineare Regression mit IfP-PR als unabhängige Variable und Oncotype DX® RS als abhängige Variable.....	36
Abbildung 8: Streudiagramm mit Bezugslinien gemäß den Grenzwerten RS = 25 und dichotomisierter Darstellung vom IfP PR.....	39
Abbildung 9: Streudiagramm der Subtypen auf der X-Achse und des Oncotype DX® RS auf der Y-Achse. Die Bezugslinie liegt auf y = 25.	40
Abbildung 10: Streudiagramm der Subtypen auf der x-Achse und des Oncotype DX® RS auf der y-Achse. Die Bezugslinie bei y = 25.....	41

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zur Subtypisierung und Ausprägung der Rezeptoren ER, PR und H2N, sowie die Ki67 und deren therapeutische Konsequenz. ⁽³¹⁾	17
---	----

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der Grenzwerte und deren Ersatzwerte für die statistischen Berechnungen.....	28
Tabelle 3: Übertragung der Konzepte von Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW auf die vorliegenden Ergebnisse.....	29
Tabelle 4: Test auf Normalverteilung des Parameters Alter mittels Kolmogorov-Smirnov in K1 und K2.....	31
Tabelle 5: Kreuztabelle mit Gegenüberstellung des Menopausenstatus von K1 und K2 und Chi-Quadrat Test.....	33
Tabelle 6: Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Test bezüglich des Nodalstatus.....	33
Tabelle 7: Korrelation nach Spearman der Messungen von PR, ER und H2N des IfP und des Oncotype DX® der K1. Alle signifikanten Korrelationen sind farblich markiert. Orange markiert eine starke Korrelation, gelb eine mittelstarke Korrelation und grün eine schwache Korrelation.	34
Tabelle 8: Korrelation nach Spearman von K1. Signifikante Korrelationen sind farblich hinterlegt. Orange markiert eine starke Korrelation, gelb eine mittelstarke Korrelation. Es zeigt sich eine negative, signifikante und mittelstarke Korrelation zwischen dem RS und dem PR.	35
Tabelle 9: Lineare Regressionsanalyse mit IfP PR als unabhängige Variable und Oncotype DX® RS als abhängige Variable. Mit $R^2 = 36,8\%$ und Signifikanz von $p < 0,001$ ergibt sich eine Regressionsgrade von $RS = 140,371 - 3,296 * PR$	36
Tabelle 10: Lineare multivariate Regressionsanalyse mit den unabhängigen Variablen IfP-PR und Ki67 und dem Oncotype DX® RS abhängigen Variable. Das korrigierte R^2 liegt bei 49%.	37
Tabelle 11: Modellzusammenfassung der linearen multivariaten Regressionsanalyse mit den unabhängigen Variablen IfP-PR, IfP-Ki67, IfP-ER und IfP-H2N. Das korrigierte R-Quadrat liegt bei 0,506.....	38
Tabelle 12: Kreuztabelle mit dichotomisierten Angaben für Oncotype DX® und IfP PR.	39
Tabelle 13: Kreuztabellen mit Gegenüberstellung der intrinsischen Subtypen und dem RS.	40
Tabelle 14: Vergleich H1 und H2 auf diagnostische Genauigkeit.	41
Tabelle 15: Kreuztabelle mit Gegenüberstellung der intrinsischen Subtypen und dem RS... ..	42

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Es wurden keine Ergebnisse vorab veröffentlicht.