

Tumorbiologie und Diagnostik des primären Mammakarzinoms



UNI-MED Verlag AG
Bremen - London - Boston

Korrekturabzug

Vetter, Martina; Kantelhardt, Eva:

Tumorbiologie und Diagnostik des primären Mammakarzinoms/Martina Vetter, Eva Kantelhardt.-

1. Auflage - Bremen: UNI-MED, 2015

(UNI-MED SCIENCE)

ISBN 978-3-8374-1492-9

Copyright 2015
UNI-MED Verlag AG
28323 Bremen

© 2015 by UNI-MED Verlag AG, D-28323 Bremen,
International Medical Publishers (London, Boston)
Internet: www.uni-med.de, e-mail: info@uni-med.de

Printed in Europe

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle dadurch begründeten Rechte, insbesondere des Nachdrucks, der Entnahme von Abbildungen, der Übersetzung sowie der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Weg bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Die Erkenntnisse der Medizin unterliegen einem ständigen Wandel durch Forschung und klinische Erfahrungen. Die Autoren dieses Werkes haben große Sorgfalt darauf verwendet, dass die gemachten Angaben dem derzeitigen Wissensstand entsprechen. Das entbindet den Benutzer aber nicht von der Verpflichtung, seine Diagnostik und Therapie in eigener Verantwortung zu bestimmen.

Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden nicht besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann also nicht geschlossen werden, dass es sich um einen freien Warennamen handele.

UNI-MED. Die beste Medizin.

In der Reihe UNI-MED SCIENCE werden aktuelle Forschungsergebnisse zur Diagnostik und Therapie wichtiger Erkrankungen "state of the art" dargestellt. Die Publikationen zeichnen sich durch höchste wissenschaftliche Kompetenz und anspruchsvolle Präsentation aus. Die Autoren sind Meinungsbildner auf ihren Fachgebieten.

Korrekturabzug

Copyright 2015

UNI-MED Verlag AG

28323 Bremen

Vorwort und Danksagung

Wir bedanken uns ganz herzlich bei allen Autorinnen und Autoren dieses Buches für Ihre Bereitschaft und Ausdauer. Ohne das Engagement der Kolleginnen und Kollegen aus Labor und Klinik wäre es nicht möglich gewesen, dieses Buch zur Tumorbiologie und Diagnostik des Mammakarzinoms mit der Vielfalt der Aspekte zusammen zu stellen.

Wir haben Inhalte zur Biologie, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms inklusive verschiedener angewandten Techniken und klinischer Studien aufgeführt. Kolleginnen und Kollegen aus der Grundlagenforschung als auch aus der translationalen Forschung, die im klinischen Alltag aktiv sind, haben ihr Fachwissen aus der Literatur, von Kongressen und aus Diskussionsrunden verschiedener Gremien klar formuliert und prägnant zusammengefasst. Ergänzungen sind immer möglich und wir denken, mit der ersten Ausgabe dieses Buches erfolgreich zu starten. Wir geben den interessierten Laien, den Lernenden aus Studium und Ausbildung im Bereich Medizin und Krankenpflege, den jungen Berufsanfängern und vielleicht auch den erfahrenen Onkologen ein Lehrbuch bzw. ein Nachschlagwerk zu verschiedenen Aspekten des Mammakarzinoms von der Diagnostik bis zur Behandlung von Brustkrebs-Patientinnen. Anregungen nehmen wir gerne entgegen.

Die vielfältigen Fragestellungen aus dem Bereich Forschung und die genauen Formulierungen von Zielen und Endpunkten in Studienprotokollen und deren Umsetzung und Auswertung inklusive der Nachbeobachtungen der Patientinnen der letzten Jahrzehnte hatten vielseitige Erfolge. Fortschritte im Bereich Diagnostik und Früherkennung sind zu verzeichnen, aber auch eine verbesserte Prognose der Erkrankung durch eine an die Patientin und den Tumor angepasste Therapie.

Immer mehr Patientinnen können kurativ behandelt werden. Die Weiterentwicklung von modernen, zielgerichteten Therapien kann auch Patientinnen in der palliativen Lebenssituation helfen.

Wir möchten allen aktiv Tätigen in diesem Bereich weiterhin Kraft wünschen, die Entstehung und Behandlung dieses Krankheitsbildes weiter zu hinterfragen und zu verstehen, um den betroffenen Patientinnen eine Heilung von ihrer Krankheit zu ermöglichen.

Halle an der Saale, im April 2015

Eva Kantelhardt und Martina Vetter

Geleitwort

Der klinische Fortschritt bei Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms ist heute mit dem Anspruch der Patientinnen auf eine personalisierte Medizin eng verbunden. Auf kaum einem anderen Gebiet wird dies sichtbarer als auf dem der Tumorbiologie und Biomarker. Neue vielversprechende zielgerichtete Medikamente erfordern den Nachweis von Zielstrukturen am Tumorgewebe. Immer neuere und kostengünstigere Methoden erlauben die detaillierte Analyse des Tumorgewebes in immer kürzerer Zeit; kommerzielle Anbieter drängen auf den Markt.

Doch dieser technische Fortschritt birgt auch Gefahren: Nicht alles methodisch Messbare ist auch klinisch sinnvoll. Ein unzureichend validierter Biomarkertest ist für Patientinnen genauso gefährlich wie ein unzureichend erprobtes Medikament. Aufgrund der einfacheren Verfügbarkeit ist die Hemmschwelle beim Einsatz von Biomarkern oft erschreckend niedrig. Hier ist enorme Sachkenntnis der Kliniker gefragt, um nur methodisch und klinisch validierte Tests für die Therapieentscheidung im klinischen Alltag einzusetzen.

Dieses Buch hilft interessierten Laien, Lernenden in Studium und Ausbildung, jungen Berufsanfängern und sicher auch erfahrenen Pflegenden und Klinikern den so wichtigen Überblick auf dem sich rasch weiter entwickelnden Gebiet der Tumorbiologie zu gewinnen und zu bewahren. Den Herausgeberinnen ist es gelungen, erfahrene Autoren für die einzelnen Unterkapitel zu finden, die die anspruchsvolle Thematik anschaulich darstellen. Dafür gebührt ihnen und den Autoren Dank und Anerkennung.

München, im November 2014

Prof. Dr. med. Nadia Harbeck

UNI-MED Verlag AG
28323 Bremen

Widmung

Immer wieder sind wir begeistert über das unermüdliche Engagement und den Wissensdurst vieler Menschen aus Forschung und Klinik, das Krankheitsbild der Brustkrebserkrankung zu hinterfragen und besser zu verstehen. Die Fragestellungen sind so vielfältig wie die Erkrankung selber: Wie entsteht ein Tumor? Warum wachsen manche Tumoren schnell und manche langsamer? Warum sind manche Tumoren so aggressiv und andere wieder nicht? Was bestimmt diese Eigenschaften?

Nach der Diagnose Brustkrebs stürzen so viele Entscheidungen auf die Patientin ein, die sie verstehen möchte und sie möchte auch am Entscheidungsprozess der Behandlung teilnehmen. Als Patientinnen-Initiative begleiten wir betroffene Frauen und ihre Familien und informieren über das Krankheitsbild. Aber auch die Forschung liegt uns am Herzen und wo wir auch können, möchten wir alle Aktiven in den Laboren, Kliniken, Praxen und Sekretariaten unterstützen und ermuntern, hartnäckig das Wissen um die Entstehung und Behandlung des Brustkrebses zu erweitern und zu veröffentlichen, damit alle Zugang dazu haben.

Das vorliegende Buch ist ein weiterer Beitrag, gemeinsam Verantwortung für den Fortschritt im Kampf gegen Brustkrebs zu tragen. Bedanken möchten wir uns bei jeder Autorin und jedem Autor für die exzellente Darstellung komplexer Zusammenhänge und bei Eva Kantelhardt und Martina Vetter für die Herausgabe des Buches.

Augsburg, im November 2014

*Dr. med. Petra Stieber und Ursula Goldmann-Posch
Vorstandsmitglieder
mamazone - Frauen und Forschung gegen Brustkrebs e.V.
www.mamazone.de*

UNI-MED Verlag AG
28323 Bremen

Autoren

Dr. rer. nat. habil. Frank Bartel
Institut für Pathologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Magdeburger Str. 14
06097 Halle (Saale)
Email: frank.bartel@medizin.uni-halle.de
Kap. 2.

Dr. rer. nat. John C. Castle
TRON – Translationale Onkologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz gGmbH
Building 708
Langenbeckstr. 1
55131 Mainz
Email: john.castle@tron-mainz.de
Kap. 9.

Dr. med. Oleg Gluz
Brustzentrum Niederrhein
Evangelisches Krankenhaus Bethesda Mönchengladbach GmbH
Ludwig-Weber-Straße 15
41061 Mönchengladbach
Email: gluz@bethesda-mg.de
oleg.gluz@wsg-online.com
Kap. 3.

Dr. med. Eva Kantelhardt
Klinik und Poliklinik für Gynäkologie am Universitätsklinikum Halle (Saale)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Ernst-Grube-Str. 40
06120 Halle (Saale)
Email: eva.kantelhardt@medizin.uni-halle.de
Kap. 1.

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Thomas Karn
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Frankfurt
Goethe-Universität
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt am Main
Email: t.karn@em.uni-frankfurt.de
Kap. 3.

Dr. rer. nat. Anthony Kong
TRON – Translationale Onkologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz gGmbH
Building 708
Langenbeckstr. 1
55131 Mainz
Email: anthony.kong@tron-mainz.de
Kap. 9.

Univ.-Prof. Dr. med. Hans Kreipe
Institut für Pathologie
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Str. 1
30625 Hannover
Email: kreipe.hans@mh-hannover.de
Kap. 5.

Priv.-Doz. Dr. med. Cornelia Liedtke
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck
Email: cornelia.liedtke@uksh.de
Kap. 8.

Prof. Dr. med. Volkmar Müller
Klinik und Poliklinik für Gynäkologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Email: vmueller@uke.de
Kap. 7.

Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pantel
Institut für Tumorbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Email: pantel@uke.de
Kap. 7.

Priv.-Doz. Dr. med. Brigitte Rack
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinikum Innenstadt Ludwig-Maximilians-Universität
Maistrasse 11
80337 München
Email: Brigitte.Rack@med.uni-muenchen.de
Kap. 8.

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Sabine Riethdorf
Institut für Tumorbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Email: s.riethdorf@uke.de
Kap. 7.

Prof. Dr. med. Claus M. Schlotter
FA für Gynäkologie und Geburtshilfe
Gynäkologische Onkologie
European Laboratory Association
Roggenkampstraße 12
49477 Ibbenbüren
Email: cschlotter@t-online.de
Kap. 6.

Univ.-Prof. Dr. med. Marcus Schmidt
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenkrankheiten
Universitätsmedizin
Johannes Gutenberg-Universität
Langenbeckstr. 1
55131 Mainz
Email: marcus.schmidt@unimedizin-mainz.de
Kap. 4., 9.

Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Thomssen
Klinik und Poliklinik für Gynäkologie am Universitätsklinikum Halle (Saale)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Ernst-Grube-Str. 40
06120 Halle (Saale)
Email: christoph.thomssen@medizin.uni-halle.de
Kap. 4.

Dr. rer. nat. Martina Vetter
Klinik und Poliklinik für Gynäkologie am Universitätsklinikum Halle (Saale)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Ernst-Grube-Str. 40
06120 Halle (Saale)
Email: martina.vetter@medizin.uni-halle.de
Kap. 1., 2., 4., 6.

Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser
Institut für Pathologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Magdeburger Str. 14
06097 Halle (Saale)
Kap. 2.

Priv.-Doz. Dr. med. Isabell Witzel
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
Martinstraße 52
20246 Hamburg
Email: i.witzel@uke.de
Kap. 6.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung und Grundlagen	18
1.1.	Mammographiescreening	18
1.2.	Leitlinien in Deutschland	18
1.3.	Tumorgewebe und Markerbestimmung	18
1.4.	Literatur	20
2.	Molekulare Diagnostik beim Mammakarzinom	22
2.1.	Veränderte Signalwege in Tumorzellen	23
2.2.	Expressionsarrays	24
2.3.	Detektion von Mutationen	25
2.4.	Literatur	28
3.	Genexpressionsprofile zur Risikoabschätzung und Prädiktion des Therapieansprechens beim Mammakarzinom	30
3.1.	Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms	30
3.2.	Gezielte Entwicklung von Gensignaturen	31
3.3.	Prognostische Multigentests	32
3.4.	Prädiktive Gensignaturen für das Ansprechen auf Chemo- oder Hormontherapie	35
3.5.	Zukünftige Entwicklungen und "Second Generation" Signaturen	35
3.6.	Literatur	38
4.	uPA/PAI-1-Test zur Risikoabschätzung bei nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen	44
4.1.	Rationale der Risikoabschätzung beim nodal-negativen Mammakarzinom	44
4.2.	Grundlagen von Invasion und Metastasierung	45
4.3.	uPA/PAI-1 als Prognosefaktor beim Mammakarzinom – der Beginn	46
4.4.	Entwicklung von Biomarkern beim Mammakarzinom	47
4.5.	uPA/PAI-1 als Prognosefaktor beim Mammakarzinom – die Weiterentwicklung	48
4.6.	uPA/PAI-1 in der Einschätzung der Fachgesellschaften	50
4.7.	Literatur	50
5.	Pathologie: Histologische Sicherung des Mammakarzinoms und Biomarker für die Prognose und Prädiktion	54
5.1.	Einleitung	54
5.2.	Histologische Typisierung	56
5.3.	TNM-Klassifikation	56
5.4.	Histopathologisches <i>Grading</i>	58
5.5.	Hormonrezeptoren	58
5.6.	Ki-67	60
5.7.	HER2	61
5.8.	Tripel-Negativität	63
5.9.	Molekulare Expressionsprofile	64
5.10.	Literatur	65

6.	HER2 – Stellenwert in der Diagnostik und Therapie für das Gesamtbehandlungskonzept beim Mammakarzinom	70
6.1.	Einleitung	70
6.1.1.	Das HER2-Onkogen	70
6.1.2.	Klinischer Stellenwert von HER2	71
6.1.3.	Prädiktiver Wert	71
6.2.	Stellenwert in der Diagnostik	71
6.2.1.	HER2-Genamplifikation	72
6.2.1.1.	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	72
6.2.1.2.	Chromogene <i>in-situ</i> -Hybridisierung (CISH)	72
6.2.1.3.	Silver-enhanced <i>in-situ</i> hybridization (SISH)	72
6.2.2.	Überexpression des HER2-Proteins	72
6.2.3.	Definition der HER2-Positivität	73
6.2.4.	Intratumorale Heterogenität – low level HER2-Status	73
6.2.5.	Extrazelluläre Domäne von HER2	74
6.3.	Anti-HER2-gerichtete Therapieansätze	74
6.3.1.	Trastuzumab	74
6.3.2.	Lapatinib	75
6.3.3.	Pertuzumab	77
6.3.4.	Antikörper-Wirkstoff-Konjugat T-DM1 (Trastuzumab Emtansine)	77
6.3.5.	Vakzinierung	78
6.4.	Neoadjuvante Therapieansätze	78
6.5.	Adjuvante Therapieansätze	79
6.6.	Metastasierte Situation	79
6.6.1.	Trastuzumab	79
6.6.2.	Lapatinib	79
6.6.3.	Pertuzumab	80
6.6.4.	Trastuzumab-DM1 (T-DM1)	80
6.7.	Klinische Probleme bei HER2-Positivität	80
6.8.	Literatur	81
7.	Disseminierte und zirkulierende Tumorzellen, zirkulierende DNA und RNA im Blut – Biomarker beim Mammakarzinom?	84
7.1.	Hintergrund	84
7.2.	Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	84
7.2.1.	Methodische Aspekte des Nachweises	84
7.2.2.	Prognostische Relevanz zum Zeitpunkt der Primärdiagnose	84
7.2.3.	Prognostische Relevanz nach Abschluss der adjuvanten Therapie	85
7.3.	Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut	86
7.3.1.	Methodische Aspekte	86
7.3.2.	Bedeutung des Nachweises von CTC in der metastasierten Situation	86
7.3.2.1.	CTC als prognostischer Faktor	86
7.3.2.2.	CTC im Rahmen des Therapiemonitorings	86
7.3.2.3.	CTC zur Optimierung der Therapie durch Identifikation von Targets für therapeutische Ansätze	87
7.4.	Bedeutung des Nachweises von CTC in der adjuvanten Situation	87
7.5.	Zirkulierende DNA und RNA im Blut	88
7.5.1.	Methoden zum Nachweis	88
7.5.2.	Datenlage	88
7.6.	Literatur	89

8.	Tumorbiologische Diagnostik und Testverfahren beim Mammakarzinom – Praktische Anwendung und Studien	94
8.1.	Stellenwert tumorbiologischer Testverfahren in der Klinik.....	94
8.2.	Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms.....	94
8.3.	uPA/PAI-1	95
8.4.	Zirkulierende Tumorzellen	95
8.5.	Hereditäres Mammakarzinom	96
8.6.	Aktuelle Studien mit tumorbiologischem Schwerpunkt	96
8.7.	Literatur.....	102
9.	Application of Next Generation Sequencing to Breast Cancer	104
9.1.	Introduction.....	104
9.2.	The technology platform.....	104
9.3.	Genomic landscape of breast tumors.....	108
9.4.	Clinical use	111
9.5.	References	113
10.	Anhang	118
	Index	121

UNI-MED Verlag AG
28323 Bremen

Korrekturabzug

Copyright 2015

UNI-MED Verlag AG

28323 Bremen

Einführung und Grundlagen

1. Einführung und Grundlagen

In den letzten Jahren wurde eine steigende Inzidenz für das Mammakarzinom in Deutschland festgestellt, die wahrscheinlich auf verbesserte Früherkennungsmaßnahmen und konsequenter Dokumentation zurückzuführen ist. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird sich die Zahl der Krebserkrankungen weltweit bis 2030 fast verdoppeln [1]. Für das Mammakarzinom schätzt man in Deutschland ca. 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Obwohl die Inzidenz seit den 1980er Jahren steigt, so sinkt doch seit Mitte der 1990er Jahren die Mortalität der an Brustkrebs erkrankten Frauen. Dennoch versterben weltweit jährlich etwa 18.000 Mammakarzinom-Patientinnen in Folge ihrer Erkrankung [2].

1.1. Mammographiescreening

Die onkologische Versorgung hat besonderen Stellenwert im Gesundheitswesen unserer Gesellschaft, so wurde 2013 das Gesetz zur Weiterentwicklung der Krebsfrüherkennung und zur Qualitätssicherung durch klinische Krebsregister verabschiedet. Das Mammographiescreening wurde in die gesetzliche Krebsfrüherkennung aufgenommen und erfolgt über schriftliche Einladungen an Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren, 2013 lag die Teilnehmerate bei 54 %. Will man einen Einfluss auf die Senkung der Morbidität und Mortalität nachweisen, ist aber eine Teilnehmerate an Screening-Programmen von über 75 % notwendig. Die Kosten für die gesetzliche Krebsfrüherkennung werden von den Krankenkassen bezahlt, der Anspruch ist im Sozialgesetzbuch verankert.

In der präoperativen Diagnostik ergänzen die verschiedenen Bildgebungsverfahren (Mammographie, Mammasonographie) die klinische Untersuchung der Patientin. Eine Magnetresonanztomographie (MRT) ist nur in Ausnahmefällen bei speziellen Indikationen (z.B. Verdacht auf Narbenrezidiv) indiziert. Es werden wohl häufiger zusätzliche Herde diagnostiziert, was mit einer erhöhten Mastektomie rate einhergeht, aber leider nicht zu einer Reduktion der Lokalrezidive in den letzten Jahren geführt hat.

Mit der Bildgebung stehen qualitätsgesicherte apparative Untersuchungen zur Verfügung, die entweder im Screening, als Früherkennung oder zur

Abklärung eines Tastbefundes sowie zur Kontrolle der Gegenseite durchgeführt werden.

1.2. Leitlinien in Deutschland

Herausgeber der interdisziplinären S3-Leitlinie als Leitlinienprogramm Onkologie für die Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms ist die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), die Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und die Deutsche Krebshilfe e.V. unter Beteiligung vieler Aktiver, Autoren, Koordinatoren und Sprecher. Sie wird seit 2004 alle vier Jahre aktualisiert [3]. Ergänzend hierzu werden im jährlichen Rhythmus die Empfehlungen der Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO e.V.) unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus Wissenschaft und klinischer Forschung für die praxisnahe Umsetzung aktualisiert (www.ago-online.de). Ziel ist die Etablierung von Standards zur Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen, um Sicherheit in der Behandlung und Betreuung der Patienten zu gewährleisten.

1.3. Tumorgewebe und Markerbestimmung

Die Empfehlungen für Therapieentscheidungen nach der histologisch gesicherten Diagnose Mammakarzinom werden in den interdisziplinär besetzten Tumorboards der zertifizierten Brustzentren ausgesprochen. Klinische Merkmale (Alter, Menopausenstatus, Geschlecht) und pathologische Faktoren des Tumors (s. auch Kap. 5.) werden zusammengefasst und in Hinblick auf die Prognose der Patientin und die Prädiktion einzelner Marker bezüglich des Therapieansprechens bewertet. Dies kann zielgerichtete Therapien betreffen (z.B. anti-HER2-Therapien) aber auch die Prädiktion für den Einsatz von Zytostatika. In den letzten Jahren haben ergänzende molekularbiologische Laboruntersuchungen am Tumorgewebe immer mehr an Bedeutung gewonnen, besonders in Fällen, in denen der Verlauf der Erkrankung mit den zur Verfügung stehenden klinischen und pathologischen Daten nicht zufriedenstellend vorhergesagt werden kann. Diese Patientinnen haben

ein mittleres Rezidivrisiko, für sie kann keine eindeutige Therapieempfehlung ausgesprochen werden. Abbildung 1.1 zeigt eine optimale Klassifizierung mit entsprechender Therapieempfehlung. Mit den Daten der molekularbiologischen Tests und Auswertungen erhofft man sich eine klare Prognoseabschätzung bzw. eine Aussage, von welcher Therapie die Patientin profitiert.

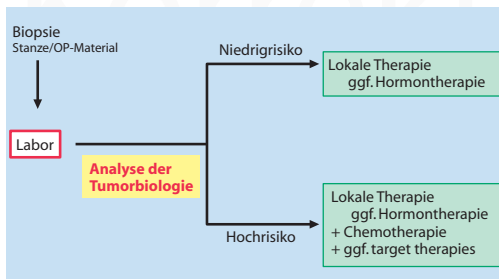


Abb. 1.1: Gewünschte Stratifizierung.

Ausgangspunkt der Analysen ist einerseits der Tumor als *natives Gewebe* (schockgefroren unter flüssigem Stickstoff) oder als sogenanntes FFPE-Gewebe (FFPE: formalin fixed paraffin embedded) (☞ auch Abb. 1.2, Ausgangsmaterial für die Routineanalysen in den Pathologien). Für das FFPE-Gewebe wird das Resektat intraoperativ in 4 %iges, gepuffertes Formalin gelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Bedingungen für die Denaturierung des Gewebes mit Formalin hängt vom Volumen des Gewebes ab, ggf. wird ein großes Resektat oder ein Abladat lamelliert, um die standardisierten Bedingungen einzuhalten. Als Faustregel gilt das zehnfache Volumen an Fixativ mit einer Eindringzeit von 1 mm pro Stunde.

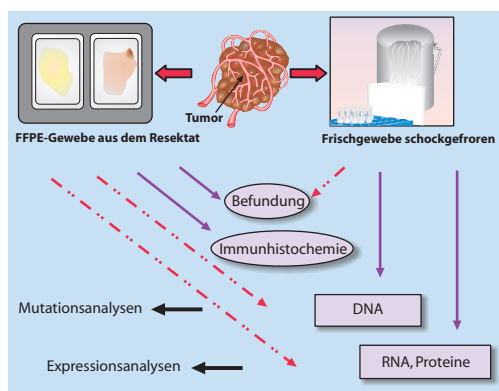


Abb. 1.2: Ausgangsmaterial für Laboranalysen (Routine und Forschung).

An dem FFPE-Material werden die mikroskopischen Untersuchungen für die Diagnose und weiterführende immunhistochemische Analysen (z.B. Hormonrezeptorbestimmung, HER2-Überexpression, ☞ Kap. 5.) durchgeführt. Aus dem FFPE-Gewebe kann sowohl DNA als auch RNA für molekularbiologische Analysen isoliert werden. Nukleinsäuren, die aus FFPE-Gewebe isoliert werden, sind von minderer Qualität und bestehen aus kürzeren Fragmenten als bei Präparationen aus Frischgewebe (max. ca. 150 Basenpaare). Mittlerweile werden validierte Expressionstests mit mRNA aus FFPE-Gewebe auf dem Markt angeboten (☞ auch Kap. 3.: Oncotype DX® von Genomic Health, EndoPredict® von Sividon, BluePrint® und MammaPrint® von Agendia, Prosigna™ von NanoString). DNA aus FFPE-Material eignet sich für somatische Mutationsanalysen (☞ Kap. 2.). Die Analysen für Keimbahnmutationen werden an DNA der Leukozyten des peripheren Bluts vorgenommen (z.B. BRCA 1/2 Mutationsanalysen).

Proteinlysate aus FFPE-Gewebe können bis heute mit keinem validierten Test quantitativ bestimmt werden. Für die Messung der Proteinexpression ist zum aktuellen Zeitpunkt die Immunhistochemie die geeignete Methode, auch wenn nur eine semi-quantitative Messung möglich ist. Isolierungen von Proteinen aus nativem Gewebe (Stanzbiopsien oder Gewebe aus OP-Material, ☞ Abb. 1.3) eignen sich für ELISA-Assays wie dem FEMTELLE® Test für die Bestimmung der Prognosemarker uPA/PAI-1 (☞ Kap. 4.). Wie in Abb. 1.4 zusammengefasst, stehen noch weitere Methoden zur Messung der Aktivität von Onkogenen (mRNA, Proteine) zur Verfügung, die sich aber nur an nativen Molekülen isoliert aus Frischgewebe durchführen lassen. Für die Asservierung des Frischgewebes ist eine Logistik in der Ambulanz und Klinik erforderlich, und klinische Studien zeigen die Machbarkeit, dass auch in der Routine natives Gewebe schockgefroren und für die Analysen zu den Laboren versendet werden kann (NNBC 3-Europe, NCT 01222052).

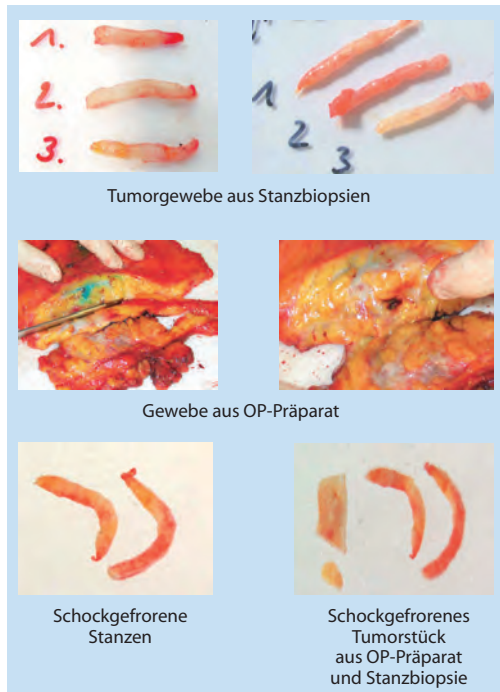


Abb. 1.3: Tumorgewebe aus präoperativen Stanzen und operativ entferntem Gewebe nach einer Mastektomie (grau: Tumormaterial, dunkelrote Einfärbung: Stanzdefekt – eingebluteter Stanzkanal außerhalb des Tumors, roter Punkt im Tumor: intratumoraler Stanzkanal).

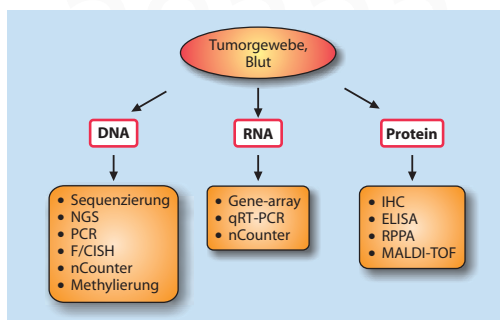


Abb. 1.4: Methoden für die Markerbestimmung aus Biomaterial.

Die verbesserten Heilungschancen nach der Diagnose Mammakarzinom der letzten Jahre sind auf die optimierten adjuvanten und neoadjuvanten Therapien zurückzuführen. Dennoch gibt es immer wieder Krankheitsverläufe, die ganz offensichtlich auf ein Therapieversagen zurückzuführen sind. Welche genotypische und phänotypische

Variabilität der Tumore eine Ursache dafür sind, werden zukünftige Forschungsdaten zeigen können. Genauso wichtig ist die anschließende zügige Translation von diagnostischen und therapeutischen Innovationen in den medizinischen Alltag der Kliniken, Ambulanzen und Praxen.

Ausblick

- Marker zur Risikoabschätzung der Erkrankung
- Marker zur Vorhersage des Ansprechens auf Therapien
 - Entwicklung neuer Marker im Labor: Grundlagenforschung, translationale Forschung
 - Testung der Marker in klinischen Studien
 - Bei Bestätigung: Überführung in der Routine
 - Aufnahme in die S3-Leitlinien und die AGO-Empfehlungen

1.4. Literatur

1. Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C: *Krebs in Deutschland 2009/2010: 9. Ausgabe*. 9th edition. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.); 2013.

http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html

2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [<http://globocan.iarc.fr>]

3. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Langversion 3.0, Aktualisierung 2012, AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL

Molekulare Diagnostik beim Mammakarzinom

2. Molekulare Diagnostik beim Mammakarzinom

Mit Entschlüsselung des menschlichen Genoms und zunehmend besserer Kenntnis genetischer und epigenetischer Veränderungen bei malignen Tumorerkrankungen ergeben sich grundsätzliche neue Möglichkeiten der spezifischen Behandlung. Im Falle des Mammakarzinoms erfolgt die Analyse der Tumorproben mit Hilfe moderner molekularbiologischer Nachweisverfahren. Speziell ist es möglich, anhand des RNA-Expressions-musters der Tumore einen prognostisch signifikanten molekularen Subtyp der Erkrankung zu erfassen. Andere prognostische und prädiktive Biomarker können durch gezielte Überprüfung von Veränderungen auf DNA-Ebene und/oder durch Bestimmung der Expression spezifischer Proteine analysiert werden. Diese Analysen, die zusätzlich zur "gewöhnlichen" histologischen Untersuchung eines jeden Tumorgewebes erfolgen, dienen dazu, den Krankheitsverlauf beziehungsweise das Ansprechen von Wirkstoffen, die wichtige Signalwege im Tumor blockieren, vorherzusagen.

Erstmals fand diese systematische "step-by-step" Diagnostik bei der Führung des metastasierten Mammakarzinoms Anwendung. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Handelsname Herceptin®) gegen HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) an eine HER2-Überexpression gekoppelt ist, die immunhistochemisch oder mittels *in-situ*-Hybridisierung am Tumorgewebe bestimmt werden kann (☞ auch Kap. 6.). Dieses Vorgehen, als personalisierte Medizin bezeichnet, beschreibt in diesem Zusammenhang die Therapieempfehlung eines Medikaments, wenn eine vorherige Analyse des Tumormaterials zum Nachweis spezieller Biomarker erfolgt ist. Das *National Institute of Health* definiert einen Biomarker als Parameter, mit dem sich "eine Eigenschaft objektiv messen lässt, um sie als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder pharmakologische Antworten auf eine therapeutische Intervention heranzuziehen" [1].

Neben der histologischen Diagnose und der TNM-Klassifikation (☞ Kap. 5.) kann bei verschiedenen Tumorentitäten die molekularpathologische Untersuchung eines Tumors in Bezug auf therapiere-

levante Veränderungen ein wichtiger Schritt zur Abschätzung der Prognose und Prädiktion des Therapieansprechens sein. Die Strategien gezielter Therapieansätze beeinflussen das Tumormikromilieu (z.B. Inhibierung der Angiogenese, Modulation des Immunsystems) bzw. der Tumorzellen (intrazelluläre und extrazelluläre Zielmoleküle). Die meisten der gegenwärtig angewendeten zielgerichteten Therapien (*targeted therapies*) sind entweder monoklonale Antikörper ("abs", z.B. Trastuzumab, Handelsname *Herceptin*®, Bevacizumab, Handelsname *Avastin*®) oder *small molecules*, die als Tyrosinkinase-Inhibitoren fungieren ("ibs", z.B. Lapatinib, Handelsname *Tykerb*® (USA) bzw. *Tyverb*® (Europa)). Da Antikörper in der Regel die Zellmembran nicht passieren können, sind diese gegen extrazelluläre Moleküle, wie Wachstumsfaktorrezeptoren oder deren Liganden, gerichtet, während *small molecules* in die Zelle diffundieren können und so intrazellulär wirken können. Darüber hinaus ist es möglich, DNA-Reparaturmechanismen wie PARP-1 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1) durch entsprechende Inhibitoren zu hemmen, mit der Folge eines Untergangs von Tumorzellen (☞ Tab. 2.1).

Zielprotein	Medikament	Molekularpathologischer Test (falls erforderlich)
HER2	Trastuzumab	HER2-Expressions-, Amplifikationsstatus
HER2	T-DM1	HER2-Expressions-, Amplifikationsstatus
Tyrosin-Kinasen	Lapatinib, Sorafenib	
PARP	PARP-Inhibitoren	BRCA1/2-Mutationsstatus
mTOR	Everolimus	
VEGF	Bevacizumab	
RANKL	Denosumab	

Tab. 2.1: Auswahl der in Deutschland in der Brustkrebstherapie zugelassenen Antikörper und *small molecules*.

2.1. Veränderte Signalwege in Tumorzellen

■ RAS/RAF/MEK-Signalweg

Die Sequenzierung des Genoms von zahlreichen Tumorentitäten hat gezeigt, dass jede Tumorart, ja sogar der individuelle Tumor durch einzigartige Mutationen charakterisiert ist. Gleichwohl konnten Signaltransduktionswege identifiziert werden, die in vielen Tumorarten verändert sind, insbesondere

- der RAS/RAF/MEK-Weg und
- der PIK3CA/AKT/mTOR-Weg

Beide Signalwege werden durch Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) angeschaltet. Für die aberrante Aktivierung dieser Signalwege stehen im Wesentlichen zwei Mechanismen im Vordergrund. Aktivierende Mutationen (Punktmutationen, Insertionen, Deletionen) von Proto-Onkogenen führen zu einer konstitutiven Aktivierung der Proteine (z.B. EGFR,

KRAS). Amplifikationen eines Proto-Onkogens bewirken eine Überexpression des jeweiligen Gens (z.B. HER2).

Der EGF-Rezeptor gehört zur Familie der ERBB-Rezeptoren (ERBB1-4) und ist ein transmembranäres Glykoprotein, das aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Funktion besteht (siehe auch Kap. 6.). Nach dessen Aktivierung werden Prozesse wie z.B. Zellproliferation und -überleben, Angiogenese und Migration und somit die Tumorentstehung und -ausbreitung beeinflusst. BRAF ist Bestandteil der RAS-RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionskaskade, über die die Weiterleitung extrazellulärer Wachstumssignale, z.B. die Bindung eines Wachstumsfaktors an dessen Rezeptor, an intrazelluläre Effektoren erfolgt. RAS fungiert als Aktivator von BRAF, während MEK ein Effektor von BRAF ist. Phosphoryliertes ERK stellt den Endpunkt des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweges dar und reguliert als Transkriptionsfaktor essentielle zelluläre Prozesse wie Wachstum

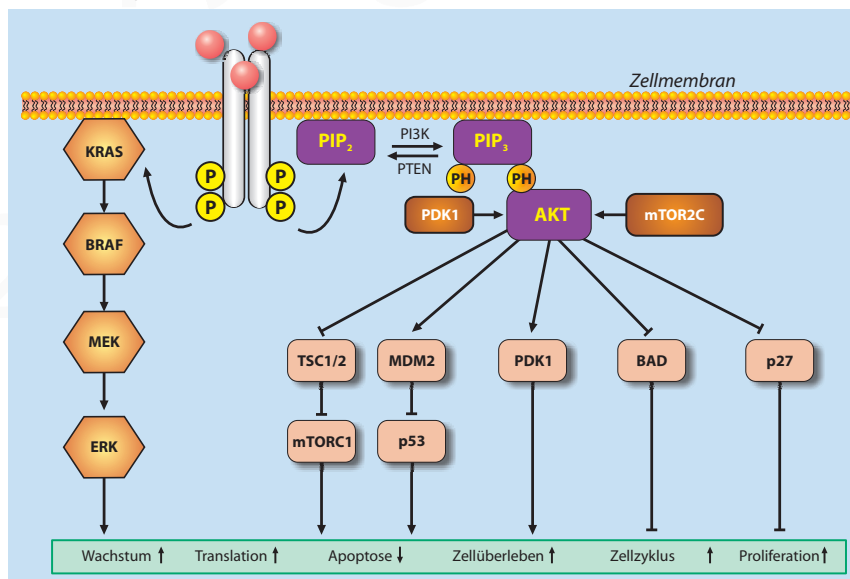



Abb. 2.1: Signaltransduktionswege über die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Die Bindung von Liganden an die extrazelluläre Domäne von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) führt zu deren Dimerisierung und Phosphorylierung der intrazellulären Domänen. Durch Aktivierung der RTKs kommt es nachfolgend zur Aktivierung von KRAS, BRAF, der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MEK) und weiterer Downstream-Effektoren. Neben KRAS wird durch die RTKs auch das Onkogen PIK3CA (katalytische Untereinheit der PI3-Kinase) aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von AKT und zahlreichen Effektoren des Signalweges. In der Zelle werden dadurch Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Migration und Angiogenese positiv beeinflusst. In vielen Tumorarten spielt die aberrante Aktivierung der RAS/RAF/MEK- und PIK3CA/AKT/mTOR-Signaltransduktionswege eine wichtige Rolle bei der Tumorigenese. Neue, zielgerichtete Therapiekonzepte zielen auf die Blockierung dieser Signalwege ab.

und Proliferation. Neue therapeutische Konzepte zielen daher auf deren Blockade und der nachgeschalteten-Effekte (*downstream*) auf verschiedenen Ebenen ab.

■ PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Genetische und biochemische Daten zeigen, dass die Aktivierung des PI3K/AKT-Pathways zur Tumorgenese des Mammakarzinoms beiträgt. Molekulare Veränderungen des PI3K/AKT-Signalwegs kommen in über 30 % der Mammakarzinome vor. Dazu zählen *gain-of-function*-Mutationen des PIK3CA-Gens (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase, katalytische Untereinheit α , kodiert für die katalytische Untereinheit p110 α von PI3K,  Abb. 2.1), Mutationen des AKT1-Gens, Amplifikationen des AKT2-Gens sowie der Verlust der Phosphatase PTEN [2]. Mutationen im PIK3CA-Gen kommen im Wesentlichen in zwei Hotspot-Regionen vor, in der helikalen (Exon 9, cosmid 775, H1047R) sowie in der katalytischen Domäne (Exon 20, cosmid 763, E545K). Die Expression der mutierten Untereinheit führt zur Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation und kann mit einem schlechteren Ansprechen gegenüber Trastuzumab und Lapatinib assoziiert sein.

■ PARP-Inhibitoren bei BRCA-mutierten TNBC


Das dreifach-negative Mammakarzinom (*triple negative breast cancer*, TNBC) macht etwa 15 % aller Brustkrebserkrankungen aus. Unter anderem aufgrund der Wirkungslosigkeit von endokrinen und gegen HER2-gerichtete Medikamenten weisen diese Patientinnen eine schlechte Prognose auf. Da tripel-negative Tumore auf genomischer Ebene häufig mit BRCA-Mutationen assoziiert sind, wird vermutet, dass die Inaktivierung der BRCA-Gene durch hereditäre oder somatische Mutationen mit der Entstehung von TNBC in Zusammenhang steht. Eine wichtige Aufgabe von BRCA1 und BRCA2 liegt in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen. In Tumoren, in denen eine BRCA-Inaktivierung vorliegt, erfolgt die DNA-Reparatur nicht durch homologe Rekombination, sondern verstärkt durch PARP-vermittelte Nukleotidexzisions-Reparatur. Daher kann die Inhibition von PARP als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt genutzt werden [3]. Werden BRCA-mutierte Tumoren mit PARP-Inhibitoren behandelt, führt dies zu einer Sensitivierung gegenüber

DNA-schädigenden Substanzen (z.B. Cisplatin) und Bestrahlung. Während der PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza®) im Jahre 2014 die Empfehlung der Zulassungsbehörden für die Behandlung von platin sensitiven Ovarialkarzinomen erhalten hat, liegen für das Mammakarzinom bislang keine vergleichbar positiven Studiendaten vor. Da bei TNBC-Patientinnen mit einer unselektierten Familienhistorie der Anteil von BRCA1/2-Mutationen zwischen 8 und 14 % liegt [4], ist es sinnvoll, den BRCA-Mutationsstatus vor einer möglichen PARP-Inhibitortherapie zu bestimmen.

■ Epigenetische Alterationen

Die aberrante Methylierung regulatorischer Gene ist ein charakteristisches Merkmal vieler Tumorarten, darunter auch für das Mammakarzinom. Zu den epigenetischen Veränderungen transformierter Zellen zählen die globale Hypomethylierung, die fokale Hypermethylierung sowie Histonmodifikationen [5]. Epigenetische Alterationen treten oftmals bereits in einem sehr frühen Stadium der Tumorentwicklung auf [6]. So ist beispielsweise der Promotor des RASSF1A-Gens in 85 % der DCIS und in über 90 % der invasiven Mammakarzinome hypermethyliert [7]. RASSF1A ist ein Tumorsuppressorgen, das häufig durch die Methylierung des Promotors und nicht durch Mutationen inaktiviert ist, wie dies bei p53 bzw. BRCA1/2 der Fall ist [6]. Neben RASSF1A konnte auch für andere Gene, z.B. CDKN2A, MGMT, FOXC1, eine Promotormethylierung nachgewiesen werden [7]. Kontrovers diskutiert wird, ob die Bestimmung des Methylierungsstatus relevanter Gene in Körperflüssigkeiten (*liquid biopsies*) künftig zur Früherkennung von Tumoren beitragen könnte.

2.2. Expressionsarrays

Die Expression der Steroidhormonrezeptoren (ER, PgR) und des HER2-Status spielt bei der immunhistochemischen Zuordnung der Tumore zu den intrinsischen Typen und der therapeutischen Stratifizierung des Mammakarzinoms eine bedeutende Rolle. Die präzise Bestimmung dieser Marker ist die Grundlage für die Auswahl der adjuvanten medikamentösen Therapie. Durch Genexpressionsanalysen mit Hilfe von cDNA-Arrays konnte die molekulare Heterogenität der Mammakarzinome gezeigt werden ( Kap. 3.). Die Anzahl der mRNAs, die eine molekularbiologische Klassifizie-

rung in die intrinsischen Subtypen ermöglichen, konnte von mehreren Tausend Genen [8] deutlich reduziert werden [9,10]. Aktuell erfolgt im klinischen Alltag aus praktischen Gründen eine Subtypisierung mittels immunhistochemisch nachgewiesener ER-, PgR-, Ki67- und HER2-Expression (☞ Kap. 3. und 5.).

Für die Durchführung prädiktiver molekularer Tests an soliden Tumoren ist eine makro- und histopathologische Fachkenntnis erforderlich.

Die Mutationstestung bei soliden Tumoren wird in der Regel an Dünnschnitten formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter Gewebeprobe (FFPE-Gewebe) durchgeführt, an denen bereits die histopathologische Diagnostik stattgefunden hat und die in den Archiven eines pathologischen Instituts gelagert sind. Es soll hervorgehoben werden, dass – unabhängig von der nachfolgend verwendeten Methode zur Mutationsbestimmung – die vorherige morphologische Untersuchung des Gewebes eine unabdingbare Voraussetzung der molekularen Analyse ist, um einen hohen Anteil von Tumorzellen sicherzustellen. Die Verwendung dieser Proben für prädiktive Analysen erfordert zwingend eine Reevaluation der Gewebeprobe, eine kurze histologische Beschreibung mit Identifizierung des invasiven, biologisch aktiven Tumoranteils und eine Anreicherung invasiven Tumorgewebes durch Entfernung zusätzlich in dem Gewebeschnitt erfassten nicht tumorösen Gewebes (Makrodissektion) oder durch selektives Laser-gestütztes Herausschießen einzelner invasiver Tumorzellen aus dem Gewebsverband (Mikrodissektion), wobei der Anteil am Tumorgenom grundsätzlich mindestens 30 % betragen sollte [11, 12]. Obwohl die zur weiteren Bearbeitung erforderlichen molekularpathologischen Techniken jenseits pathologischer Institute auch in molekularbiologischen Laboratorien durchgeführt werden können, ist es aus den eben skizzierten Gründen extrem wichtig, dass die Untersuchungen an einem Institut mit histopathologischer Fachexpertise durchgeführt werden (☞ Abb. 2.2).

teils und eine Anreicherung invasiven Tumorgewebes durch Entfernung zusätzlich in dem Gewebeschnitt erfassten nicht tumorösen Gewebes (Makrodissektion) oder durch selektives Laser-gestütztes Herausschießen einzelner invasiver Tumorzellen aus dem Gewebsverband (Mikrodissektion), wobei der Anteil am Tumorgenom grundsätzlich mindestens 30 % betragen sollte [11, 12]. Obwohl die zur weiteren Bearbeitung erforderlichen molekularpathologischen Techniken jenseits pathologischer Institute auch in molekularbiologischen Laboratorien durchgeführt werden können, ist es aus den eben skizzierten Gründen extrem wichtig, dass die Untersuchungen an einem Institut mit histopathologischer Fachexpertise durchgeführt werden (☞ Abb. 2.2).

2.3. Detektion von Mutationen

Die Amplifikation des entsprechenden Genabschnitts mittels PCR und die anschließende Sanger-Sequenzierung stellen die klassische Methode zur Mutationsanalyse dar. Auf diese Weise lassen sich alle DNA-Sequenzveränderungen in dem jeweiligen Abschnitt erfassen. Zudem erlaubt die Analyse des Elektropherogramms eine visuelle Qualitätskontrolle der Sequenzierung. Als Nachteil erweist sich jedoch die geringe Sensitivität. Bei einem Anteil von weniger als 20 % Zellen mit mu-

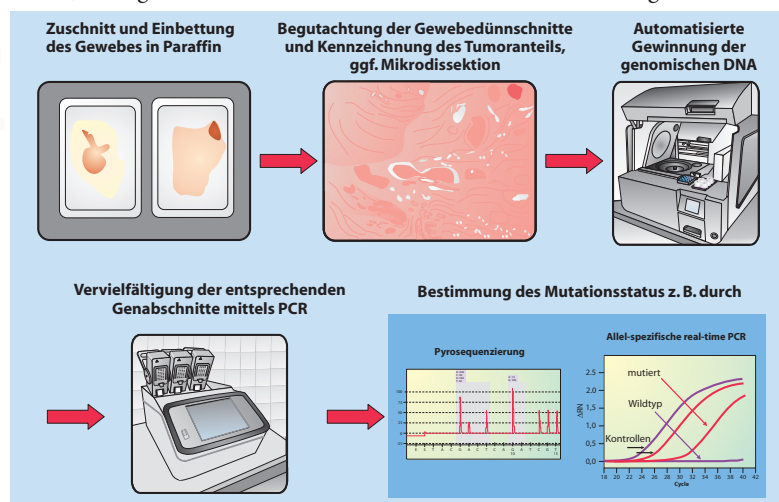


Abb. 2.2: Workflow der histologischen und molekularpathologischen Analyse. Ein wichtiger Schritt ist die Beurteilung des Gewebedünnschnitts durch einen erfahrenen Pathologen zur Identifizierung des Tumorareals. Da die molekularpathologische Diagnostik häufig an Formalin-fixiertem Material durchgeführt wird, müssen alle Methoden (PCR, Sequenzierung usw.) daraufhin optimiert werden. Die geringe Menge an Ausgangsmaterial und die schlechte DNA-Qualität des fixierten Gewebes stellen weitere große Herausforderungen dar.

tiertem Allel in der Probe lassen sich Mutationen nicht mehr sicher nachweisen. Methoden, die auf quantitativer real-time PCR (qPCR oder auch RT-PCR genannt) und mutationsspezifischen Sonden basieren, bieten eine höhere Sensitivität (bis zu einem Anteil von 5 % Zellen mit mutiertem Allel), es können jedoch nur Mutationen nachgewiesen werden, für die ein spezifischer Test validiert ist. Die Pyrosequenzierung ist ebenso sensitiv wie die real-time PCR, ist jedoch nicht auf bestimmte Mutationen beschränkt, sondern ermöglicht auch die Detektion seltenerer bzw. unbekannter Mutationen. Die strikte Korrelation zwischen der Menge an eingebautem Nukleotid und emittierter Lichtintensität erlaubt darüber hinaus eine genaue Bestimmung des Anteils an mutiertem Allel in der untersuchten Probe.

Die Zahl der bislang identifizierten genetischen Veränderungen in Tumoren, die potentielle therapeutische Ziele darstellen und somit die individuelle Behandlung der Patienten ermöglichen, wächst ständig. Gleichzeitig macht dies auch eine immer umfangreichere molekularpathologische Diagnostik erforderlich. In der diagnostischen Routine wird die Mutationsanalyse i.d.R. durch Sequenzierung durchgeführt, die eine sehr zeitaufwendige und teure Methode ist.

Durch Einsatz neuartiger Sequenzierverfahren, die unter dem Stichwort *next generation sequencing* (NGS, *deep sequencing*) zusammengefasst werden, ist es möglich, effizient und parallel eine ganze Reihe von tumorspezifischen und therapie relevanten Genveränderungen (Mutationen, Genamplifikationen, Translokationen) zu detektieren. Diese haben gemeinsam, dass – im Gegensatz zur herkömmlichen Sanger-Sequenzierung – einzelne Moleküle nach klonaler Amplifikation sequenziert werden können. Dadurch werden Mutationen auch vor einem hohen Hintergrund an Wildtyp-Allel erfasst. Diese hohe Sensitivität ist gerade in der molekularpathologischen Diagnostik ein großer Vorteil, z.B. bei Tumoren mit einem hohen Anteil an Stroma (u.a. Fibroblasten, Endothelzellen) und Entzündungszellen. Aus Zeit- und Kostengründen ist es in der täglichen Routinediagnostik jedoch nicht erforderlich, eine *whole genome*-Sequenzierung durchzuführen, sondern es ist vielmehr sinnvoller, ein definiertes Set an Mutationen (*cancer panel*) für die jeweilige Tumorart zu bestimmen. Zwischenzeitlich existieren für verschiedene Tumor-

arten kommerzielle Plattformen, die an die Erfordernisse und die Ausstattungen eines molekularpathologischen Labors angepasst sind. Insbesondere müssen hier neben der Zeit- und Kosteneffizienz auch die Besonderheiten (geringe Ausbeute, oftmals geringe Qualität der DNA) des in der Molekularpathologie verwendeten FFPE-Materials berücksichtigt werden. Ein Beispiel für den Einsatz von NGS-Methoden ist die BRCA1/2-Mutationsanalyse bei Patientinnen mit familiär gehäuftem Auftreten von Mammakarzinomen und Patientinnen, die für eine PARP-Inhibitortherapie in Frage kommen. Bisher sind mehr als 1.000 Mutationen im BRCA1- und über 800 Mutationen im BRCA2-Gen beschrieben worden. Die Mutationen verteilen sich dabei auf alle Exons der jeweiligen Gene. So genannte *hot spots*, also Genabschnitte, in denen gehäuft Mutationen auftreten, sind für BRCA1 und BRCA2 nicht bekannt. Eine daher erforderliche Komplettssequenzierung aller 22 kodierenden Exons des BRCA1-Gens und aller 26 Exons des BRCA2-Gens stellt eine Herausforderung für jedes molekularpathologische Labor dar.

Es kommt erschwerend hinzu, dass der Mutationsnachweis auch an Biopsiematerial von Mammastanzen erfolgen muss (besonders bei neoadjuvanter Therapie). Hier steht nur wenig Tumorgewebe zur Verfügung. Der Anreicherung von Tumorzellen durch Mikrodissektion nach einer histologischen Begutachtung des Gewebeschnitts kommt in dieser Konstellation besondere Bedeutung zu.

Aktuelle Bestrebungen konzentrieren sich u.a. auch darauf, Methoden zum Nachweis von tumorspezifischen Mutationen in zirkulierender, zellfreier DNA (cfDNA) zu entwickeln [13, 14]. In Bezug auf die Diagnose, Prognose, Follow-Up und Theragnostik bei Tumorerkrankungen wird die Analyse von cfDNA als großer Durchbruch betrachtet, da in cfDNA z.B. Promotormethylierung, Mutationen, Heterozygotieverlust sowie Mikrosatelliteninstabilitäten detektiert werden können [15]. Darüber hinaus ist cfDNA noch vor zirkulierenden Tumorzellen im Blut nachweisbar. Das Prinzip der *liquid biopsies* könnte in Zukunft die Analyse von Tumorgewebestücken und Biopsien ergänzen, wird sie jedoch nicht ersetzen können. Für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass p53- und PIK3CA-Mutationen in cfDNA nachweisbar sind und die Menge der mutierten cfDNA mit der Tumorlast korrelierte [16].

Diese vergleichsweise wenig invasive Methode der Probengewinnung ist wesentlich risikoärmer als eine herkömmliche Gewebeentnahme für eine Biopsie und daher insbesondere zum Therapie-monitoring geeignet (§ Kap. 7.). Die Analyse der cfDNA ist jedoch noch weit von einem Einsatz in der Routinediagnostik entfernt, da zahlreiche Fragen, wie beispielsweise zur Herkunft und die Stabilität der cfDNA, noch offen sind. Darüber hinaus fehlen noch standardisierte Protokolle und Nachweisverfahren. Zudem sind weitere Studien und Maßnahmen zur Qualitätssicherung erforderlich, wie dies in einer aktuellen Stellungnahme der AG Molekularpathologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie formuliert wurde [17].

Der Trend zu einer immer umfangreicheren prädiktiven molekularpathologischen Stufen-diagnostik führt zu einem molekular-diagnostischen Dilemma.

Der Einsatz von NGS-Techniken in der molekularen Diagnostik ermöglicht den simultanen Nachweis verschiedener Arten molekularer DNA-Aberrationen und damit die Durchführung multipler paralleler Analysen an limitiertem Material. Im Rahmen dieser sogenannten Panel-Sequenzierungen können alle für eine Tumorentität relevanten Gensequenzen in einem Ansatz parallel untersucht werden. Trotz der überzeugenden Leistungsfähigkeit dieser Methode bleiben Fragen, die derzeit einem breiten diagnostischen Einsatz in Deutschland entgegenstehen: Zum einen kann die Technik nur in molekularpathologischen Laboren mit hohem Durchsatz wirtschaftlich eingesetzt werden, zum anderen ist die ethisch wichtige Frage nach einer Übermittlungspflicht aller, auch der nicht speziell geforderten Analyseergebnisse, nicht abschließend geklärt.

Die Änderung der Behandlungskonzepte hin zu einer immer besser auf die einzelne Patientin zugeschnittenen Therapieempfehlung erfordert eine umfangreiche prädiktive Diagnostik. Diese grundsätzlich wünschenswerte Entwicklung kann in einigen Fällen zu einem diagnostischen Dilemma führen, da verfügbare Proben primär der histomorphologischen Diagnostik dienen. Dies kann insbesondere im Fall der neoadjuvanten Therapie dann ein Problem werden, wenn in der Stanzbiopsie nur wenig Tumorgewebe erfasst ist und dann

entschieden werden muss, welche Analysen priorisiert werden (§ Kap. 3.).

Ausblick

Die Einführung molekularer diagnostischer Tests führt nicht zu einer Abnahme der Notwendigkeit histologischer Untersuchungen, da die neuen Technologien die etablierten Verfahren nicht verdrängen, sondern ergänzen. Bestand die Aufgabe des Pathologen früher in der reinen diagnostischen Dienstleistung, so ist das Fach heute interdisziplinär aufgestellt und tief in die klinischen Abläufe integriert. Die morphologische Begutachtung des Materials ist zwingend zur Festlegung der Tumorklassifikation erforderlich und im Rahmen der weiteren Untersuchungen, um sicherzustellen, dass ausreichend Tumorgewebe für die molekularpathologische Diagnostik zur Verfügung steht. Die neuen Verfahren stellen hohe Anforderungen an die Einhaltung von Qualitätsstandards. So sollten alle Schritte der molekularpathologischen Diagnostik in einem pathologischen Institut erfolgen, das sich regelmäßig an externen Ringversuchen zur Qualitätssicherung beteiligt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Behandlung von Tumorerkrankungen in einer Umbruchphase befindet. Bereits jetzt stehen für viele Tumorarten so genannte neue Wirkstoffe zur Verfügung, die gezielt Aktivierungsmechanismen in Tumorzellen ausschalten. Die weitere molekulare Charakterisierung von Tumoren und die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern stellt Kliniker und Forscher vor große Herausforderungen. Auf den ersten Blick wird dem Patienten bei einem negativen Testergebnis eine Therapie vorenthalten, gleichzeitig können aber unnötige und nebenwirkungsreiche Therapien vermieden werden. Mit Hilfe der Integration von histologischer und molekular-pathologischer Diagnostik wird es in Zukunft möglich sein, Tumoren noch weitaus präziser zu klassifizieren und somit jedem Patienten eine individuelle, maßgeschneiderte Therapie anbieten zu können.

Prognostische Faktoren

- erlauben Aussagen zum Krankheitsverlauf der Patienten. Sie sind unabhängig von einer Therapie.

Prädiktive Faktoren

- dienen der Identifizierung von Patienten, die sehr wahrscheinlich von einer bestimmten Therapie profitieren werden. Mithilfe von aussagekräftigen Biomarkern (HER2-Status, Genexpressionsprofile, ER/PgR-Status u.a.).

2.4. Literatur

1. Biomarkers Definitions Working, G., Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. 69(3): 89-95.
2. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 2006. 7(8): 606-19.
3. Lee, J.M., J.A. Ledermann, and E.C. Kohn, PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Ann Oncol*, 2014. 25(1): 32-40.
4. Evans, D.G., et al., Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer. *J Med Genet*, 2011. 48(8): 520-2.
5. Jovanovic, J., et al., The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol*, 2010. 4(3): 242-54.
6. Jones, P.A. and S.B. Baylin, The epigenomics of cancer. *Cell*, 2007. 128(4): 683-92.
7. Klajic, J., et al., Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer*, 2013. 13: 456.
8. Perou, C.M., et al., Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000. 406(6797): 747-52.
9. Parker, J.S., et al., Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 2009. 27(8): 1160-7.
10. Haibe-Kains, B., et al., A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst*, 2012. 104(4): 311-25.
11. Normanno, N., et al., KRAS mutations testing in colorectal carcinoma patients in Italy: from guidelines to external quality assessment. *PLoS One*, 2011. 6(12): e29146.
12. Ross, J.S., Clinical implementation of KRAS testing in metastatic colorectal carcinoma: the pathologist's perspective. *Arch Pathol Lab Med*, 2012. 136(10): 1298-307.
13. Thierry, A.R., et al., Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*, 2014. 20(4): 430-5.
14. Mouliere, F., et al., Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Translational Oncology*, 2013. 6(3): 319-U281.
15. Schwarzenbach, H., D.S. Hoon, and K. Pantel, Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 2011. 11(6): 426-37.
16. Dawson, S.J., et al., Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2013. 368(13): 1199-209.
17. Dahl, E., et al., [Chances and risks of blood-based molecular pathological analysis of circulating tumor cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) in personalized cancer therapy : Positional paper from the study group on liquid biopsy of the working group for molecular pathology in the German Society of Pathology (DGP)]. *Pathologe*, 2014: 1-6.

Genexpressionsprofile zur Risikoabschätzung und Prädiktion des Therapieansprechens beim Mammakarzinom

3. Genexpressionsprofile zur Risikoabschätzung und Prädiktion des Therapieansprechens beim Mammakarzinom

Die Brustkrebsforschung der letzten Jahrzehnte hat gezeigt, dass es sich bei diesem häufigsten Karzinom der Frau, nicht um eine einzelne, immer gleich verlaufende Erkrankung handelt. Vielmehr geht man davon aus, dass Brustkrebs eine sehr heterogene Erkrankung ist und das Krankheitsbild verschiedene Subtypen umfasst. Diese Heterogenität ist von großer Bedeutung für die angestrebte individualisierte Medizin, da sich die Subtypen des Brustkrebses sowohl hinsichtlich ihrer Prognose als auch ihres Therapieansprechens unterscheiden.

3.1. Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms

Verschiedene histologisch unterscheidbare Subtypen des Mammakarzinoms sind der Pathologie schon lange bekannt und werden in die Diagnostik routinemäßig mit einbezogen [1]. Als zur Jahrtausendwende die Microarray-Technologie zur Bestimmung des gesamten zellulären Genexpressionsprofils Einzug in die Labore hielt, wurden auch sogenannte "intrinsische", molekulare Subtypen des Mammakarzinoms definiert [2]. Unterschieden wurde hier zwischen dem "Basal-like" Subtyp, dem "HER2-like" Subtyp und den beiden "Luminal A" und "Luminal B" Subtypen. Diese molekularen Subtypen zeigten Unterschiede in ihrer Prognose und dem Ansprechen auf medikamentöse Therapien [3]. So weist z.B. der Basal-like Brustkrebs eine schlechte Prognose auf [4], zeigt jedoch ein relativ gutes Ansprechen auf Chemotherapie [5–7]. In der folgenden Zeit wurde ver-

sucht, die durch Microarray-Analysen definierten Subtypen durch weniger aufwendige Techniken nachzuweisen, um sie einfacher im klinischen Alltag detektieren zu können. Verwendung fanden hierbei der Einsatz von RT-PCR-Methoden [8,9] oder Panels von immunhistochemischen Markern [10–12]. Vergleicht man die molekularbiologisch bestimmten Subtypen mit der Einteilung aufgrund der bereits aus der pathologischen Begutachtung verfügbaren Parameter wie Hormonrezeptor- und HER2-Status sowie histologisches Grading oder Ki-67, so zeigt sich, dass tripel-negative Karzinome ein gutes Surrogat für den basal-like Subtyp darstellen können. Weiterhin repräsentieren HER2-positive Karzinome gut den HER2-like Subtyp. Mammakarzinome der "luminalen" Subtypen sind im Allgemeinen Östrogen-Rezeptor (ER)-positiv, wobei die Unterscheidung von Luminal A und Luminal B am schwierigsten zu definieren ist. Vorgeschlagen wurde als mögliche einfache Definition z.B. die Gleichsetzung von Luminal B mit ER-positiven high grade (G3) Tumoren sowie ER+/HER2+ doppelt positiven Karzinomen [3,13,14] sowie die weitere Hinzunahme des Progesteron-Rezeptors (PgR) [15] (Tab. 3.1). Allerdings liegt die Übereinstimmung dieser Surrogat-Einteilungen mit den durch Genexpressionsprofile bestimmten Subtypen im Allgemeinen nur im Bereich von 75 % [16]. Auf der anderen Seite ist jedoch anzumerken, dass auch die ursprüngliche Definition der molekularen Subtypen selbst aufgrund von Expressionsprofilen mit großen Unsi-

Molekularer Subtyp	Basal-like	HER2-like	Luminal A	Luminal B
ER-positiv	0-19 %	25-59 %	91-100 %	91-100 %
PR-positiv	6-13 %	25-30 %	70-74 %	41-53 %
HER2-positiv	9-13 %	66-71 %	8-11 %	15-24 %
Ki-67	high	high	low	high
Grade G3	88-93 %	55-89 %	13-30 %	41-62 %
Prognose	schlecht	schlecht	gut	mittel/schlecht
Chemotherapie-Benefit	hoch	mittel	niedrig	mittel

Tab. 3.1: Molekulare Subtypen und immunhistochemische Marker (abgewandelt nach [16]).

cherheiten behaftet ist, wie verschiedene Arbeiten gezeigt haben [17-19].

Zusätzlich zu den oben genannten wurden noch weitere Subtypen beschrieben, die jedoch durch dieses einfache System nicht bestimmbar sind. Dazu gehört zum einen der *Normal-like* Subtyp, für den jedoch nicht klar ist, inwieweit er artifiziell aufgrund des Anteils von gesundem Gewebe in der Tumorprobe auftreten kann. Zum anderen wurden noch zwei weitere Subtypen des tripel-negativen Mammakarzinoms entdeckt, nämlich der *molecular-apocrine*- [20] und der *Claudin-Low*-Subtyp [21], die jedoch nur etwa ein Drittel der tripel-negativen Karzinome repräsentieren [22].

Eine mögliche biologische Erklärung für das Auftreten der verschiedenen Brustkrebssubtypen lässt sich aus dem Stammzell-Konzept der Entwicklung der weiblichen Brustdrüse ableiten. Es wird dabei angenommen, dass die maligne Transformation an verschiedenen Punkten der Reifung von Vorläuferzellen (Progenitorzellen) auftreten kann [23]. Die speziellen Differenzierungseigenschaften der entsprechenden *cell of origin* werden dabei quasi eingefroren und spiegeln sich im Tumorsubtyp, seinen intrinsischen Eigenschaften und damit auch in Prognose und therapeutischen Ansatzmöglichkeiten wider [24].

3.2. Gezielte Entwicklung von Gensignaturen

Die oben genannten intrinsischen molekularen Subtypen des Mammakarzinoms wurden a priori durch "*unsupervised*" Methoden identifiziert. Das Ziel solcher Methoden ist, zunächst zu definieren, welche immanenten Subklassen einer Erkrankung unterschieden werden können, unabhängig von einem möglichen prognostischen Zusammenhang. Erst im anschließenden Vergleich der dabei identifizierten Gruppen mit den klinischen Parametern wurde die prognostische Bedeutung der intrinsischen molekularen Subtypen beobachtet. Ein solcher "*unsupervised*" Ansatz zur Analyse von Genexpressionsprofilen wurde auch in anderen Arbeiten erfolgreich beim Mammakarzinom eingesetzt [25]. Ein ganz unterschiedliches Vorgehen wird dagegen in "*supervised*" Analysen verfolgt. Hier werden Gewebeproben zu Beginn aufgrund der Unterschiede im Krankheitsverlauf der Patientinnen oder z.B. ihrem Ansprechen auf eine thera-

peutische Intervention eingeteilt. Daraufhin wird dann versucht, durch bioinformatische Methoden eine Gensignatur aus dem gesamten Genexpressionsprofil zu bestimmen, die sich als Prädiktor für die Prognose der Patientin oder das therapeutische Ansprechen eignen könnte [26]. Eine solche supervised Analyse führte zur Identifikation der "70-Gen-Signatur" durch Arbeitsgruppen des niederländischen Krebsinstituts in Amsterdam [27,28], auf der der MammaPrint®-Test beruht. Hierbei wurden durch Microarray-Analyse bestimmte Genexpressionsprofile von 78 nodal-negativen Patientinnen mit Mammakarzinomen, die keine adjuvante Therapie erhalten hatten, verwendet, und zwei Gruppen von Patientinnen verglichen: Solche mit einem Rezidiv innerhalb von 5 Jahren und solche mit einem Rezidiv-freien Intervall von mindestens 5 Jahren [27]. Durch ein ähnliches Vorgehen wurde auch die Rotterdam-76-Gen-Signatur identifiziert [29,30]. Ebenfalls durch eine supervised Analyse-Strategie von Microarray-Daten wurde die "*Genomic Grade*" Signatur entwickelt. Wobei hier als Stratifizierungsparameter nicht der Krankheitsverlauf der Patientinnen Verwendung fand, sondern das histologische *Grading* von einer Kohorte von Tumoren, die vom Pathologen entweder als G1 oder als G3 kategorisiert worden waren [31]. Ein äußerst kritischer Punkt, der beim Einsatz von supervised Methoden unbedingt zu beachten ist, besteht im Problem des multiplen Testens, das zur Inflation des Signifikanzniveaus führt [32]. Trotz der Verwendung entsprechender statistischer Methoden wie der Kontrolle der *False Discovery Rate*, ist daher die Validierung von identifizierten Signaturen an unabhängigen Kohorten zwingend notwendig, um das Maß des "*Overfittings*" der Methode zu bestimmen [33]. Um dieses Problem zu einem gewissen Grade zu reduzieren, bietet sich der "Kandidaten-Gen-Ansatz" an. Er wurde z.B. bei der Entwicklung des Recurrence Score® (RS) verwendet. Ausgangspunkt war hier ein mittels qPCR an Paraffinmaterial bestimmtes Expressionsprofil von 250 Kandidatengenen, die aufgrund von Literatur, Studiendaten und publizierten Microarray-Analysen ausgewählt wurden [34,35]. Nur diese relativ geringe Zahl an Markern (Genen) wurde für die Findungsanalyse in einer Kohorte von 447 Patientinnen eingesetzt. Aufgrund des Zusammenhangs mit dem Auftreten von Rezidiven wurden 16 Gene ausgewählt und ein prognostischer Algorith-

mus entwickelt, der weitere 5 Referenz-Gene einschloss. Dieser prospektiv-entwickelte Algorithmus wurde dann an einer unabhängigen retrospektiven Kohorte (NASBP-B14) validiert [35]. Ein ähnliches Vorgehen wurde auch für die Entwicklung des EndoPredict®-Tests angewandt [36].

3.3. Prognostische Multigen-tests

Im Folgenden sollen einige Gensignaturen und daraus entwickelte Multigentest kurz vorgestellt und verglichen werden. Meist liegt die primäre Bedeutung der Tests vor allem in der Abschätzung der Prognose der Patientin, auch wenn spätere Überprüfungen z.T. eine prädiktive Wertigkeit der Signaturen für das Therapieansprechen aufgezeigt haben. Weiterhin fällt auf, dass sich viele der Gensignaturen in ihrem prognostischen Wert gleichen und sich auch die Einteilung der Patientinnen stark überschneidet, selbst wenn keine Überlapung zwischen den untersuchten Gene besteht [26]. Nachfolgende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ursache dieser Redundanz größtenteils darin liegt, dass die meisten prognostischen Gensignaturen vor allem die Proliferation des Tumors bestimmen [37]. Diese ist wiederum mit einer Vielzahl unterschiedlicher Marker korreliert, die letztendlich vergleichbare Informationen liefern. Die größte Rolle spielt die Proliferation dabei für die Unterschiede in der Prognose von ER-positiven Mammakarzinomen (Luminal A und Luminal B), wohingegen tripel-negative (TNBC) und HER2-positive Karzinome meist generell durch einer höhere proliferative Aktivität gekennzeichnet sind. Daher werden Tumoren dieser letzteren beiden Gruppen (TNBC, HER2-positiv) auch von fast allen Gensignaturen größtenteils einer schlechten Prognose zugeordnet. Der große Einfluss der Proliferation kann weiterhin dazu beitragen, dass gerade jene Patientinnen mit einem ungünstigen Testergebnis von der adjuvanten Chemotherapie profitierten und die prognostischen Tests dadurch eine gewisse prädiktive Wertigkeit besitzen [38-40].

■ MammaPrint® Assay / 70-Gen-Signatur

Der MammaPrint® Assay der Firma Agendia basiert auf der Entwicklungsarbeit von Rosetta Pharmaceuticals Inc. und dem Niederländischen Krebsinstitut (NKI) [27]. Wie oben bereits angespro-

chen, wurden in diesen Untersuchungen Microarray-Analysen von 78 Tumoren prämenopausaler, nodal-negativer Brustkrebspatientinnen durchgeführt. Die durch *supervised* Analyse entwickelte 70-Gen-Signatur wurde in einer zweiten Studie von 234 prämenopausalen Patientinnen ohne weitere adjuvante Therapie validiert [28], deren Wert allerdings durch den Einschluss der 78 Fälle der Findungskohorte eingeschränkt wird. Weitere Studien konnten die prognostische Wertigkeit der Gensignatur auch für andere Gruppen (z.B. postmenopausale Patientinnen, neoadjuvante Therapie) bestätigen [40,42,43]. Der aufgrund dieser Signatur von Agendia entwickelte kommerzielle MammaPrint® Assay verwendet zudem zur Standardisierung die mRNA-Expression von insgesamt 1900 Genen. Bis vor Kurzem konnte der MammaPrint® Assay nur an Frischgewebe durchgeführt werden und der Versand der Proben war nur durch ein spezielles Transport-Medium (RNA*Retain*™, Asuragen Inc., Austin, TX) möglich. Seit 2012 ist die Durchführung des MammaPrint® Assays auch mit Paraffin-Material möglich und wird gemeinsam mit weiteren Tests zur molekularen Subtypisierung (Blueprint®, TargetPrint®, TheraPrint®) angeboten (s.u.). Zur abschließenden Evaluation der klinischen Wertigkeit des Tests wurde die prospektive MINDACT-Studie, deren Rekrutierung 2011 abgeschlossen wurde, durchgeführt. In ihrem Rahmen soll die Wertigkeit von MammaPrint® im Vergleich zu den üblichen klinischen Variablen bei Patientinnen mit 0-3 befallenen Lymphknoten untersucht werden [44]. Zwei weitere prospektive klinische Studien, bei denen MammaPrint® eingesetzt wird, sind die neoadjuvanten I-SPY1- und I-SPY2-Trials [45, 46].

■ Oncotype DX®

Einer der ersten und gleichzeitig am besten untersuchten prognostischen Multigen-Tests ist der Oncotype DX® Assay. Mithilfe einer quantitativen PCR wird das Expressionsprofil anhand der RNA, die aus dem Paraffinblock des Primärtumors isoliert wird, mittels fünf Referenzgenen und 16 weitere Gene bestimmt, die durch ihren Zusammenhang mit Angiogenese, Proliferation, Invasion und Metastasierung eine prognostische Bedeutung für das Auftreten eines Brustkrebsrezidivs besitzen. Aufgrund eines speziell entwickelten Algorithmus entsprechend der Wertigkeit der einzelnen Fakto-

ren wird der sogenannte Recurrence Score® entwickelt, der sich am Risiko für eine Metastasierung innerhalb von 10 Jahren nach Erstdiagnose orientiert [35]. Dabei wurde ursprünglich eine *Low-Risk* Gruppe bei Werten unter 18, eine *Intermediate-Risk* Gruppe bei Werten von 18-30 und eine *High-Risk* Gruppe (>30) definiert. In einer Validierungsstudie konnte bei nodal-negativen Patientinnen gezeigt werden, dass die *High-Risk* Gruppe hinsichtlich ihrer Prognose von einer zusätzlichen Chemotherapie deutlich profitiert, während ein solcher Effekt in der *Low-Risk* Gruppe nur minimal ist [38]. Die Ergebnisse zur intermediären Risiko Gruppe sind jedoch noch unklar. Hier werden von der prospektiven Studie (*Trial Assigning Individualized Options for Treatment TAILORx*) erste Ergebnisse für 2014 erwartet. Albain et al. [47] konnten zudem für nodal-positive Karzinome zeigen, dass Patientinnen mit einem hohem Recurrence Score®, die eine CAF Chemotherapie erhielten, ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben aufwiesen, verglichen mit jenen, die eine alleinige Tamoxifen Therapie erhalten hatten. In der *Low-Risk* und *Intermediate-Risk* Gruppe hingegen, war dieser Vorteil nicht zu beobachten. In 2011 wurde der RxPONDER Trial (SWOG S1007) gestartet [48], in welchem Oncotype DX® bei nodal-positiven Patientinnen eingesetzt wird und auch ein Vergleich mit dem PAM50 Assay (s.u.) erfolgt. Bei neoadjuvant behandelten Patienten zeigt sich ein positiver Zusammenhang zwischen Recurrence Score® und der Rate an pathologischen Komplettremissionen [39]. Analysen zur Reproduzierbarkeit des Testergebnisses demonstrieren, dass die Heterogenität des Tumors bei ein und derselben Patientin nur geringe Auswirkungen auf den Recurrence Score® besitzt [49]. Durch den Einsatz von Oncotype DX® scheint in bis zu 18 % der Fälle auf eine Chemotherapie verzichtet werden zu können [50, 51]. Auch im Rahmen der prospektiven, randomisierten Plan B Studie wurde demonstriert, dass anhand eines konservativen Recurrence Score® Schwellenwertes von 11 ca. 20 % der Patientinnen eine Chemotherapie erspart werden konnte [52]. Vergleiche von PAM50 und Oncotype DX® wiesen darauf hin, dass die *Low-Risk* Gruppe vor allem Luminal-A Tumoren enthält [53]. Die Korrelationsanalyse aus der Plan B Studie zeigt jedoch, dass die *Low-Risk* Subgruppe, nur aus ca. 2/3 der Luminal A Tumoren (basierend auf einer immun-

histochemischen Definition u.a. mittels Ki-67) besteht [52]. Obwohl es sich weiterhin in den meisten Fällen mit hohem Recurrence Score® um G3 Tumoren handelt, sind doch bis zu 70 % aller histologisch als G3 eingestuft Karzinome nicht in der Gruppe mit hohem Recurrence Score®. Der klinische Stellenwert der Diskordanzen zwischen molekularen Subtypen, Recurrence Score® und klassischen Prognosefaktoren soll im Rahmen weiterer Studien geklärt werden. Als ein zusätzlicher Vorteil des Oncotype DX®-Assays wird die Bestimmung von ER, PgR und HER2 anhand der mRNA diskutiert. Für den Vergleich von ER- und PgR-Bestimmung durch Immunhistochemie (leitlinienbasiert) und der mRNA-Messung durch Oncotype DX® zeigten sich gute Konkordanzraten [54,55], bezüglich der HER2-Bestimmung bestanden jedoch beträchtliche Diskrepanzen [56,57].

■ Intrinsische Subtypen und IHC4 Score

Obwohl wie bereits einleitend angesprochen die durch Genexpressionsprofile bestimmten intrinsischen Subtypen nicht direkt auf die Standardparameter ER, PgR, und HER2 übertragbar sind, so lassen sie sich doch mit Hilfe dieser Marker und zusätzlichem Grading bzw. einem Proliferationsmarker wie Ki-67 in gewisser Weise reproduzieren. Dieses Vorgehen wurde so auch in den St. Gallen-Empfehlungen vorgeschlagen und entsprechende therapeutische Konsequenzen abgeleitet [14]. Aufgrund der drei Rezeptoren und Ki-67 lässt sich ein immunhistochemischer Score (IHC4) erstellen. Die prognostische Wertigkeit des IHC4 Score zeigte bei einem Sub-Kollektiv von 1125 Patientinnen mit ER-positivem Brustkrebs in der ATAC-Studie (Tamoxifen vs. Anastrozol), die keine zusätzliche Chemotherapie erhalten hatten, vergleichbare Ergebnisse wie der Oncotype DX® Test [58].

■ Intrinsische Subtypen aufgrund des PAM50 Assays

Der PAM50 Assay erlaubt eine Unterscheidung der vier intrinsischen Subtypen durch eine quantitative PCR, die an RNA aus Paraffingewebe isoliert, durchgeführt wird [8,9]. Zudem wurde von NanoString Technologies Inc ein PAM50 Assay für das nCounter® Analyse System [59] unter der Bezeichnung Prosigna™ entwickelt. PAM50 beruht auf den in den ursprünglichen Arbeiten von Perou und Sorlie beschriebenen knapp 2000 “intrinsic

genes”, die auf 50 Markergene reduziert wurden. Zusätzlich wird mit dem PAM50 Assay nach einem speziell entwickelten Algorithmus ein *risk of recurrence Score* (ROR) berechnet [8]. In einer auf dem San Antonio Breast Cancer Symposium 2011 vorgestellten Analyse im Rahmen der TransATAC Studie war der ROR Score dem IHC4 Score zumindest gleichwertig und dem Oncotype DX® in prognostischer Hinsicht zum Teil überlegen [60]. Speziell ordnete der ROR Score hier eine kleinere Zahl von Patienten der intermediären Risikogruppe zu. Bei einer auf dem IMPAKT Meeting 2012 vorgestellten Analyse aus der GEICAM 9906 Studie zeigte sich, dass die immunhistochemische Definition des molekularen Subtyps und der quantitative IHC4-Score eine vergleichbare prognostische Aussagekraft hatten, während die Definition anhand von PAM50 einen signifikant höheren prognostischen Wert aufwies [61].

■ **Intrinsische Subtypen durch BluePrint®**

Auch von Agendia, dem Anbieter des MammaPrint® Assays, wird seit 2010 ein Test angeboten, der es erlauben soll, die intrinsischen Subtypen zu bestimmen. Der als BluePrint® bezeichnete Assay verwendet 80 Gene und definiert die drei Gruppen Basal-like, HER2, und Luminal [62]. Die erweiterte Unterscheidung zwischen dem Luminal A und Luminal B Subtyp kann durch zusätzliche Anwendung des MammaPrint® Assays ermittelt werden. In drei Studien mit insgesamt über 1200 Patientinnen, die auf dem San Antonio Breast Cancer Symposium 2012 präsentiert wurden [63-65], zeigten sich Übereinstimmungen zwischen Immunhistochemie von ER/PgR/HER2 und BluePrint® für 85-96 % der Luminal Tumoren sowie 80-98 % der TNBC/Basal-Like Tumoren, aber nur 39-58 % der HER2-positiven Subgruppe.

■ **BCI (“two gene ratio”) und Genomic Grade Index**

Der *Genomic Grade Index* wurde wie oben beschrieben zur Verbesserung des histologischen *Gratings*, speziell der besseren Klassifizierung der intermediären Gruppe der G2 Tumore entwickelt [31]. In mehreren Untersuchungen wurde seine prognostische Wertigkeit vor allem bei ER-positiven Karzinomen sowie auch seine prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie bestätigt [66,67]. Der GGI basiert auf 97 Genen, deren Expression hauptsäch-

lich mit der Proliferation assoziiert ist, und erlaubt daher auch die prognostisch wichtige Unterscheidung zwischen Luminal A und Luminal B Tumoren. Während der Test ursprünglich durch Affymetrix Profiling an Frischgewebe durchgeführt wurde, existierten auch Ansätze, die eine Bestimmung über qPCR auch am Paraffinblock ermöglichen. In Europa war der Test unter dem Namen MapQuantDx™ Genomic Grade der Firma Ipsogen erhältlich. Der Test wurde jedoch zwischenzeitlich auf 5 Gene reduziert und mit dem “two-gene expression ratio” Assay zum Breast Cancer Index® (BCI; bioTheragnostics Inc. San Diego) vereinigt [68]. Der “two-gene expression ratio” Assay ist ein auf quantitativer PCR basierender Assay, der das Verhältnis der Expression der beiden Genen HOXB13 und IL17BR zueinander bestimmt. Auch er ist als Marker für das Rezidivrisiko von ER-positiven nodal-negativen Mammakarzinomen beschrieben [69] und konnte in mit Tamoxifen behandelten Kollektiven bestätigt werden [70-72].

■ **EndoPredict®**

Der EndoPredict® ist ein Test, der ebenfalls auf einer quantitativen PCR an Paraffinmaterial des Tumors beruht. Er wird von der Firma Sividon angeboten und misst und verrechnet die Expression von acht Krebs-assoziierten Genen sowie drei Referenzgenen. Die Gene wurden aufgrund von Microarray-Daten selektiert und der Algorithmus an PCR-Messungen weiterer Proben entwickelt. Anschließend wurde der Test an 1702 Patientinnen der ABCSG-6 und ABCSG-8 Studien validiert [36,73]. Der Test kombiniert die Daten aus der RNA-Analyse mit den klinischen Daten zum Nodalstatus und Tumorgroße im sogenannten EPclin Score. Damit nimmt er eine gewisse Sonderstellung unter den anderen angesprochenen Assays ein. Die Analyse erfolgt dezentral in molekularbiologisch arbeitenden Laboren, die für den Test zertifiziert wurden [74].

■ **Mammostrat®**

Der Mammostrat® Test untersucht fünf Marker (p53, HTF9C, CEACAM5, NDRG1 and SLC7A5) immunhistochemisch am Paraffingewebe. Aus den Färberegebnissen wird ein prognostischer Score (3 Gruppen) berechnet [75]. An ER-positiven Mammakarzinomen der NSABP B14 und B20 Studie zeigte der Score eine prognostische

Wertigkeit [76]. Der Test wurde weiterhin auch mit dem Oncotype DX® verglichen [77].

3.4. Prädiktive Gensignaturen für das Ansprechen auf Chemo- oder Hormontherapie

Zur Prädiktion des Ansprechens auf neoadjuvante Chemotherapie bei Brustkrebs wurden bereits eine ganze Reihe von Gensignaturen ermittelt und publiziert [5,6,78-81]. Einige dieser Signaturen ließen sich auch in unabhängigen Kollektiven validieren [82], jedoch ist ihre Bedeutung im Allgemeinen auf die Anwendung in ER-positiven oder in gemischten Kollektiven beschränkt. Bei tripel-negativem Brustkrebs (TNBC) zeigt leider keine einzige der bisherigen publizierten Gensignaturen eine Prädiktion des Ansprechens auf neoadjuvante Chemotherapie [83]. Auch neue spezifische prognostische Signaturen für TNBC [22] sind in dieser prädiktiven Hinsicht für eine klinische Entscheidungsfindung leider noch nicht geeignet [84]. Wie oben bereits genannt, zeigen einige der eigentlich prognostischen Signaturen auch eine gewisse prädiktive Relevanz. So weisen z.B. sowohl PAM50 [85,85] als auch Oncotype DX® bezüglich adjuvanter [38,47] Chemotherapie sowie neoadjuvanter Chemotherapie [39] einen prädiktiven Wert auf. Der Einsatz von PAM50 nach einer neoadjuvanten endokrinen Therapie könnte weiterhin eine Bedeutung zur Detektion von Therapie-resistenten Zellen besitzen [86]. Für den Bereich der endokrinen Therapie wurden auch weitere spezielle Signaturen erfolgreich entwickelt. So basiert der "Sensitivity to endocrine therapy" (SET) Index auf der Annahme, dass die Aktivität ER-regulierter Gene aussagekräftiger hinsichtlich der Sensitivität gegenüber endokriner Therapie ist, als der ER-Status allein. Im SET-Index werden 165 durch Genexpressionsanalyse identifizierte Gene verrechnet, die mit der Expression von ER signifikant korrelierten. In der initialen Studie [87] wurden an einer Tamoxifen-behandelten Kohorte Schwellenwerte für drei Risikoklassen entwickelt und anschließend an einer unabhängigen zweiten Kohorte validiert. Durch den Vergleich mit Kohorten ohne adjuvante Behandlung konnte zudem gezeigt werden, dass der SET-Index den Benefit von einer Tamoxifen-Behandlung vorhersagt und nicht einen reinen prognostischen Faktor darstellt [87]. Die prädiktive Bedeutung des SET-Index und

seine Unabhängigkeit von anderen Signaturen konnte kürzlich auch in einer verblindeten Studie unabhängig validiert werden [88]. Durch Kombination des SET-Index mit weiteren Signaturen für das Ansprechen bzw. Nicht-Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie wurde zudem ein komplexer genomischer Prädiktor entwickelt, der es erlaubt, bereits vor der neoadjuvanten Therapie das spätere krankheitsfreie Überleben (DFS) von gleicher Güte vorherzusagen wie es eine pathologische Komplettremission (pCR) erlaubt [89].

3.5. Zukünftige Entwicklungen und "Second Generation" Signaturen

Im "IMPAKT 2012 Working Group Consensus Statement" zur klinischen Anwendung von prognostischen Multigen-Tests vertrat die Mehrheit der Autoren die Ansicht, dass analytische und klinische Validität von Oncotype DX® und MammaPrint® überzeugend sind, jedoch noch keiner der Assays eine robuste Evidenz bezüglich einer praktischen klinischen Relevanz besitzt, indem eine Änderung der Behandlung aufgrund eines Testergebnisses das klinische Outcome verbessert [90]. Die Autoren schlagen vor, Modelle zu entwickeln, die den Einfluss klinisch-pathologischer Prognosefaktoren [91] mit Expressions-Assays integrieren und den klinischen Nutzen in prospektiven Studien zu validieren. Zum Teil wurde für prognostische Signaturen beobachtet, dass sich ihre Aussagekraft in erster Linie auf Frührezidive bezieht [30], was durch entsprechende primäre Findungskollektive verursacht sein könnte. Allerdings zeigen aktuelle Analysen, dass auch Spätrezidive durch RNA-Expressionstests wie EndoPredict® oder BCI identifiziert werden können [72,92]. Auch die aktuellen Empfehlungen der AGO-Kommission Mamma (März 2014) nehmen zu kommerziell erhältlichen Multigen-Tests Stellung (☞ Tab. 3.2), wobei die neuen Ergebnisse zu späten Rezidiven Berücksichtigung fanden. Bezüglich der klinischen Bedeutung der Tests empfiehlt die Kommission eine mögliche Anwendung ausschließlich bei ausgewählten Patientinnen (☞ Tab. 3.3). Im Falle von ER-positiven Tamoxifen-behandelten Tumoren zeigen die meisten Tests eine hohe Konkordanz zueinander [93]. Den kommerziell verfügbaren Tests mit den entsprechenden Gensignaturen ist

	70-Gen-Signatur (MammaPrint®) [§]	21-Gen-Recurrence- Score (Oncotype DX®) [§]	8-Gen-Signatur (EndoPredict®) [§]	PAM 50 (Prosigna®) [§]
Hersteller	Agendia	Genomic Health	Sividon	Nano String
Assay-Typ	70-Gen-Assay	21-Gen-Recurrence- Score	11-Gen-Assay	50-Gen-Assay
Gewebetyp	Frischgewebe	FFPE	FFPE	FFPE
Technik	Microarrays für RNA	qRT-PCR	qRT-PCR	qRT-PCR
Zentrales Labor	ja	ja	nein	nein
Indikation und untersuchte Population	<ul style="list-style-type: none"> • prognostisch • N0-1, <61 Jahre 	<ul style="list-style-type: none"> • prognostisch • N0-1, ER+ • endokrin behandelt 	<ul style="list-style-type: none"> • prognostisch • (prä-)post- menopausal • N0-1, ER+HER2- • endokrin behandelt 	<ul style="list-style-type: none"> • prognostisch • postmenopausal • N0-1, ER+HER2- • endokrin behandelt
Klinische Validierung	ja	ja	ja	ja
Registrierung	FDA-Zulassung als "In Vitro Dia- gnostic Multiva- riate Index Assay (IVDMIA)"	Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) + College of Ameri- can Pathologists (CAP)-accredited ref lab	CE-Zulassung	FDA 510(k)- Zulassung
Prognose nach 5 Jahren (Spätrezidive)	nicht separat gezeigt	nein	ja	ja
Prädiktive Aussage (Chemo- therapie-Benefit)	gering untersucht	ja*	nicht gezeigt	nicht gezeigt
Prospektiv- retrospektive Evidenz (% rekrutierter Patienten)	Multicenter- Validierung	NSABP B-14 (14 %) NSABP B-20 (28 %) ECOG 2197 (16 %) SWOG 8814 (40 %) ATAC (30 %)	ABCSG 6 (19 %) ABCSG 8 (36 %)	MA.12 (59 %) MA.5 (66 %) ABCSG 8 (44 %) ATAC (16 %)
Prospektive Evidenz (aus- stehend)	MINDACT (beendet)	TAILORX (N0, beendet) RxPONDER (N1, laufend)	-	-

Tab. 3.2: Vergleich kommerziell erhältlicher Multigen-Tests zur Prognose des Mammakarzinoms (Aktuelle Empfehlungen der AGO-Kommission Mamma vom 27.3.2014).

[§] Validierte klinische Daten nur für diesen Assay vorhanden.

* Studie durchgeführt vor HER2-Testung, HER2-positive Patienten können eingeschlossen worden sein.

Faktor	LoE2009	CTS	AGO
• 21-Gen-Recurrence-Score (Oncotype DX®) § (N0-1 ER+ HER2-, endokrin behandelt)			
- N0	I	B	+ *
- N1	II	B	+/-
• 8-Gensignatur (EndoPredict®) § (postmenopausal, N0-1 ER+ HER2-, endokrin behandelt)			
- N0	I	B	+ *
- N1	II	B	+/-
• 70-Gensignatur (MammaPrint®), N0-1			
• PAM 50 (Prosigna™) § (postmenopausal, N0-1 ER+ HER2-, endokrin behandelt)			
	II	B	+/-
• IHC4 (zentrale Pathologie, publizierter Algorithmus) #			
	I	B	+/-

Tab. 3.3: Evidenzlevel zur klinische Bedeutung von Multigen-Tests nach den aktuellen Empfehlungen der AGO-Kommission Mamma (März 2014). * Sollte nur bei ausgewählten Patientinnen angewandt werden, wenn alle anderen Kriterien keine Therapieentscheidung zulassen. § Validierte klinische Daten nur verfügbar für diesen Assay. # Cuzick et al., J Clin Oncol 29: 4273-4278, 2011.

gemein, dass sie generell vor allem Tumoren vom Luminal A Subtyp, also ER-positiven Mammakarzinomen mit niedriger Proliferation, eine gute Prognose zuweisen. Auf der anderen Seite werden ER-negative Karzinome und HER2-positiv sowie solche vom Luminal-B Subtyp, also ER-positiv Tumore mit hoher Proliferation, von praktisch allen Gensignaturen als "high-risk" eingeordnet [3]. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass auch innerhalb dieser Gruppen wie z.B. tripel-negativen Karzinome (TNBC) Subgruppen mit sehr deutlichen Unterschieden in ihrer Prognose zu differenzieren sind [22]. Diese Ergebnisse wurden nur möglich durch Subtyp-spezifische Analysen, bei denen die molekularen Subtypen getrennt untersucht wurden [3,84]. So erlauben Gensignaturen, die die Infiltration der Tumorgewebe durch verschiedene Arten von Immunzellen bestimmen, innerhalb der ER-negativen Karzinome prognostische Unterschiede zu differenzieren und auch das Ansprechen auf neoadjuvante Chemotherapie vorherzusagen [94-96]. Solche Signaturen, die nur unter Verwendung eines speziellen Subtypen entwickelt werden, um den Einfluss der Subtypen selbst auf Prognose und Prädiktion zu umgehen, werden als Signaturen der "zweiten Generation" bezeichnet.

Ein anderes Beispiel für mögliche zukünftige Entwicklungen liefert das Projekt "RecurrenceOnline". Die Strategie dieses nicht-kommerziellen Ansatzes

ist es, an Stelle von individuellen Assays eine verbreitete Microarray-Plattform (Affymetrix) zu verwenden, um ein globales Genexpressionsprofil einer Tumorprobe zu erstellen, das anschließend die Auswertung entsprechend eines Test-Algorithmus erlaubt und auch auf zukünftige Auswertungsmöglichkeiten flexibel reagieren kann [97]. Ähnliche Überlegungen existieren zur Whole Genome Sequenzierung von Tumoren. Die explosive Entwicklung in den Jahren 2011-2013 mit der Publikation von über 1.000 Genomsequenzen von Mammakarzinomen hat gezeigt, dass sich zwar auch auf genomischer Ebene Unterschiede zwischen den molekularen Subtypen finden, jedoch nur eine äußerst geringe Zahl von Mutationen redundant auftritt [98-101]. Nur für drei Gene wurden bei mindestens 10 % aller Patientinnen Mutationen gefunden (TP53, PIK3CA und GATA3), nur sechs Gene fanden sich bei mindestens 5 % der Patientinnen verändert. Die Mehrheit der etwa 20.000 identifizierten somatischen Mutationen bei 500 Patientinnen traten dagegen nur sporadisch auf [101]. Erst eine weitere massive Zunahme der Fallzahlen der Tumorgenom-Sequenzierung kann hier eine Korrelation dieser seltenen Ereignisse mit der Krankheitsentwicklung ermöglichen. Trotzdem ist zu erwarten, dass durch das rapide Vorschreiten der Methodik der personalisierten Tumorsequenzierung auch genetische Korrelate und mögliche Ursachen für die durch Genexpression-

stest identifizierten, klinisch relevanten Subgruppen des Mammakarzinoms identifiziert werden können.

3.6. Literatur

1. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 718–30
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–52
3. Kaufmann M, Pusztai L. Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: Consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer* 2011; 117: 1575–82
4. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98: 10869–74
5. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 5678–85
6. Rody A, Karn T, Solbach C, et al. The erbB2+ cluster of the intrinsic gene set predicts tumor response of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial. *Breast* 2007; 16: 235–40
7. Minckwitz G von, Untch M, Blohmer J, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30: 1796–804
8. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 1160–7
9. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 5222–32
10. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 5367–74
11. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1368–76
12. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009; 101: 736–50
13. Hugh J, Hanson J, Cheang MCU, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 1168–76
14. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H. 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.* 2011; 22: 1736–47
15. Prat A, Cheang MCU, Martín M, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal a breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 203–9
16. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 2011; 378: 1812–23
17. Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 339–49
18. Mackay A, Weigelt B, Grigoriadis A, et al. Microarray-Based Class Discovery for Molecular Classification of Breast Cancer: Analysis of Interobserver Agreement. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2011; 103: 662–73
19. Weigelt B, Pusztai L, Ashworth A, Reis-Filho JS. Challenges translating breast cancer gene signatures into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 58–64
20. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24: 4660–71
21. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010; 12: R68
22. Rody A, Karn T, Liedtke C, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R97
23. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med* 2009; 15: 842–4
24. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; 469: 314–22
25. Ahr A, Holtrich U, Karn T, Kaufmann M. Gene-expression profiling and identification of patients at high risk of breast cancer. *Lancet* 2002; 360: 174
26. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 790–800
27. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530–6

28. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 1999–2009
29. Wang Y, Klijn JGM, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 671–9
30. Desmedt C, Piette F, Loi S, et al. Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 3207–14
31. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98: 262–72
32. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003; 95: 14–8
33. Simon R. Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7332–41
34. Cronin M, Pho M, Dutta D, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 35–42
35. 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
36. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, et al. A New Molecular Predictor of Distant Recurrence in ER-Positive, HER2-Negative Breast Cancer Adds Independent Information to Conventional Clinical Risk Factors. *Clinical Cancer Research* 2011; 17: 6012–20
37. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 2008; 10: R65
38. Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 3726–34
39. Gianni L, Zambetti M, Clark K, et al. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7265–77
40. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010; 119: 551–8
41. Yang M, Rajan S, Issa AM. Cost effectiveness of gene expression profiling for early stage breast cancer: a decision-analytic model. *Cancer* 2012; 118: 5163–70
42. Wittner BS, Sgroi DC, Ryan PD, et al. Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 2988–93
43. Mook S, Schmidt MK, Weigelt B, et al. The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age. *Ann. Oncol.* 2010; 21: 717–22
44. Rutgers E, Piccart-Gebhart MJ, Bogaerts J, et al. The EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial is feasible: results of the pilot phase. *Eur. J. Cancer* 2011; 47: 2742–9
45. Barker AD, Sigman CC, Kelloff GJ, Hylton NM, Berry DA, Esserman LJ. I-SPY 2: an adaptive breast cancer trial design in the setting of neoadjuvant chemotherapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009; 86: 97–100
46. Esserman LJ, Berry DA, DeMichele A, et al. Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: results from the I-SPY 1 TRIAL - CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30: 3242–9
47. Albain KS, Barlow WE, Shak S, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 55–65
48. Gonzalez-Angulo AM, Barlow WE, Gralow JR, et al. A Randomized Phase III Clinical Trial of Standard Adjuvant Endocrine Therapy +/- Chemotherapy in Patients (pts) with 1-3 Positive Nodes, Hormone Receptor (HR)-Positive and HER2-Negative Breast Cancer with Recurrence Score (RS) of 25 or Less: SWOG S1007. *Cancer Research* 2011: Abstract OT1-03-01
49. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res.* 2006; 8: R25
50. Eiermann W, Rezai M, Kümmel S, Kühn T, Warm M, Friedrichs K, Schneeweiss A, Markmann S, Eggemann H, Hilfrich J, Jackisch C, Witzel I, Eidtmann H, Bachinger A, Hell S, Blohmer J. The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for ER-positive, node-negative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted change in chemotherapy use. *Ann. Oncol.* 2013; 24: 618-24
51. de Boer RH, Baker C, Speakman D, Chao CY, Yoshizawa C, Mann GB. The impact of a genomic assay (Oncotype DX) on adjuvant treatment recommendations in early breast cancer. *Med. J. Aust.* 2013; 199: 205-8

52. Gluz O et al. S4-3: Prospective Comparison of Risk Assessment Tools in Early Breast Cancer (Recurrence Score, uPA/PAI-1, Central Grade, and Luminal Subtypes): Final Correlation Analysis from the Phase III WSG-Plan B Trial. *Cancer Research* 2012; Abstract S4-3
53. Kelly CM, Bernard PS, Krishnamurthy S, et al. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX®) and the PAM50 breast cancer intrinsic Classifier™ in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncologist* 2012; 17: 492–8
54. Badve SS, Baehner FL, Gray RP, et al. Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immunohistochemistry by local and central laboratories and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction by central laboratory. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 2473–81
55. Gluz O et al. Prospective comparison of recurrence score and independent central pathology assessment of prognostic tools in early breast cancer (BC): Focus on HER2, ER, PR, Ki-67 results from the phase III WSG-Plan B trial. *ASCO Meeting Abstracts* 552 2012: 552
56. Christgen M, Harbeck N, Gluz O, Nitz U, Kreipe HH. Recognition and handling of discordant negative human epidermal growth factor receptor 2 classification by Oncotype DX in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30: 3313-4; author reply 3314-5
57. Dabbs DJ, Klein ME, Mohsin SK, Tubbs RR, Shuai Y, Bhargava R. High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 4279–85
58. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 4273–8
59. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26: 317–25
60. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, Ferree S, Storhoff J, Schaper C, Cuzick J. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 2783-90
61. Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 203-9
62. Krijgsman O, Roepman P, Zwart W, et al. A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; 133: 37–47
63. Cristofanilli M, Turk M, Kaul K, et al. Molecular Subtyping Improves Stratification of Patients into Diagnostically More Meaningful Risk Groups. *San Antonio Breast Cancer Symposium* 2012: P3-05-01
64. Viale G, Slaets L, Bogaerts J, Rutgers E, van't Veer L, Piccart-Gebhart MJ, de Snoo FA, Stork-Sloots L, Russo L, Dell'Orto P, van den Akker J, Glas A, Cardoso F; TRANSBIG Consortium & the MINDACT Investigators. High concordance of protein (by IHC), gene (by FISH; HER2 only), and microarray readout (by Target-Print) of ER, PgR, and HER2: results from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial. *Ann. Oncol.* 2014; 25: 816-23
65. Glück S, de Snoo F, Peeters J, Stork-Sloots L, Somlo G. Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013; 139: 759-67
66. Liedtke C, Hatzis C, Symmans WF, et al. Genomic grade index is associated with response to chemotherapy in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 3185–91
67. Toussaint J, Sieuwerts AM, Haibe-Kains B, et al. Improvement of the clinical applicability of the Genomic Grade Index through a qRT-PCR test performed on frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics* 2009; 10: 424
68. Ma X, Salunga R, Dahiya S, et al. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 2601–8
69. Ma X, Hilsenbeck SG, Wang W, et al. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 4611–9
70. Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN, et al. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 2080–7
71. Jansen MPH, Sieuwerts AM, Look MP, et al. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 662–8
72. Sgroi DC, Sestak I, Cuzick J, Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder B, Erlander MG, Dunbier A, Sidhu K, Lopez-Knowles E, Goss PE, Dowsett M. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-

- positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol.* 2013; 14: 1067-76
73. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, et al. EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Ann. Oncol.* 2013; 24: 640-7
74. Kronenwett R, Bohmann K, Prinzler J, et al. Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC Cancer* 2012; 12: 456
75. Ring BZ, Seitz RS, Beck R, et al. Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 3039-47
76. Ross DT, Kim C, Tang G, et al. Chemosensitivity and stratification by a five monoclonal antibody immunohistochemistry test in the NSABP B14 and B20 trials. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 6602-9
77. Acs G, Kiluk J, Loftus L, Laronga C. Comparison of Oncotype DX and Mammostrat risk estimations and correlations with histologic tumor features in low-grade, estrogen receptor-positive invasive breast carcinomas. *Mod. Pathol.* 2013; 26: 1451-60
78. Ayers M, Symmans WF, Stec J, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 2284-93
79. Hess KR, Anderson K, Symmans WF, et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 4236-44
80. Thuerigen O, Schneeweiss A, Toedt G, et al. Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 1839-45
81. Juul N, Szallasi Z, Eklund AC, et al. Assessment of an RNA interference screen-derived mitotic and ceramide pathway metagene as a predictor of response to neoadjuvant paclitaxel for primary triple-negative breast cancer: a retrospective analysis of five clinical trials. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 358-65
82. Tabchy A, Valero V, Vidaurre T, et al. Evaluation of a 30-gene paclitaxel, fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy response predictor in a multicenter randomized trial in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 5351-61
83. Popovici V, Chen W, Gallas BG, et al. Effect of training-sample size and classification difficulty on the accuracy of genomic predictors. *Breast Cancer Res.* 2010; 12: R5
84. Karn T, Pusztai L, Holtrich U, et al. Homogeneous datasets of triple negative breast cancers enable the identification of novel prognostic and predictive signatures. *PLoS ONE* 2011; 6: e28403
85. Cheang MCU, Voduc KD, Tu D, et al. Responsiveness of intrinsic subtypes to adjuvant anthracycline substitution in the NCIC.CTG MA.5 randomized trial. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 2402-12
86. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, et al. Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype - ACOSOG Z1031. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 2342-9
87. Symmans WF, Hatzis C, Sotiriou C, et al. Genomic index of sensitivity to endocrine therapy for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 4111-9
88. Karn T, Hatzis C, Symmans F, et al. 12O_PR: SET Index Predicts Response to Endocrine Therapy Rather Than Prognosis Independently of Other Genomic Signatures in a Blinded Validation Study. *Cancer Research* 2012: Abstract P2-10-17
89. Hatzis C, Pusztai L, Valero V, et al. A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer. *JAMA* 2011; 305: 1873-81
90. Azim HA, Michiels S, Zagouri F, et al. Utility of prognostic genomic tests in breast cancer practice: The IMPAKT 2012 Working Group Consensus Statement. *Ann. Oncol.* 2013; 24: 647-54
91. Tang G, Cuzick J, Costantino JP, et al. Risk of recurrence and chemotherapy benefit for patients with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: recurrence score alone and integrated with pathologic and clinical factors. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 4365-72
92. Dubsy P, Brase JC, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, Dietze O, Luisser I, Klug E, Sedivy R, Bachner M, Mayr D, Schmidt M, Gehrman MC, Petry C, Weber KE, Fisch K, Kronenwett R, Gnant M, Filipits M; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSCG). The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br. J. Cancer.* 2013; 109: 2959-64
93. Prat A, Parker JS, Fan C, et al. Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Ann. Oncol.* 2012; 23: 2866-73
94. Rody A, Holtrich U, Pusztai L, et al. T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-

negative and HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2009; 11: R15

95. Bianchini G, Qi Y, Alvarez RH, et al. Molecular anatomy of breast cancer stroma and its prognostic value in estrogen receptor-positive and -negative cancers. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 4316–23

96. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 105–13

97. Györfy B, Benke Z, Lánckzy A, et al. RecurrenceOnline: an online analysis tool to determine breast cancer recurrence and hormone receptor status using microarray data. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; 132: 1025–34

98. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546–58

99. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell.* 2013; 153: 17-37

100. Karn T. High-throughput gene expression and mutation profiling: current methods and future perspectives. *Breast Care (Basel).* 2013; 8: 401-6

101. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61–70

uPA/PAI-1-Test zur Risikoabschätzung bei nodal-negativen Mammakarzinom- Patientinnen

4. uPA/PAI-1-Test zur Risikoabschätzung bei nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen

4.1. Rationale der Risikoabschätzung beim nodal-negativen Mammakarzinom

In den letzten Dekaden hat die Mortalität am Mammakarzinom in den westlichen Industrieländern weiter abgenommen [1]. Gründe für diese Abnahme liegen zum einen in der verbesserten Früherkennung und zum anderen im postoperativen Einsatz von medikamentösen adjuvanten Therapien [2].

Die durch die verbesserte Früherkennung bedingte Behandlung von Patientinnen mit zunehmend kleineren und meist auch nodal-negativen Mammakarzinomen stellt eine Herausforderung für die behandelnden Ärzte dar.

Auf der einen Seite haben Mammakarzinome, die in früheren Stadien entdeckt werden, eine bessere Prognose als Mammakarzinome in fortgeschrittenen Stadien. Auf der anderen Seite haben adjuvante systemische Therapien zu einer deutlichen Verbesserung des Überlebens, nicht nur der nodal-positiven sondern auch der nodal-negativen Patientinnen geführt [3, 4]. Dieser Fortschritt in der adjuvanten Therapie hat zu Konsensusempfehlungen geführt, die eine adjuvante systemische Therapie für nahezu alle Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom empfehlen [5].

Um Über- wie auch Untertherapie der Patientinnen zu vermeiden, ist es sinnvoll, die geeignete adjuvante Therapiestrategie anhand einer sorgfältigen Risikoabschätzung der individuellen Patientin vorzunehmen.

Risiko	Nach St. Gallen 2009 [40]	CP-Algorithmus nach der NNBC 3-Europe Studie [34]	UP-Algorithmus nach der NNBC 3-Europe Studie [33]
Niedriges Risiko	alle folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> pN0, G1, T ≤ 2 cm, HR+, V0, L0, Alter ≥ 35 Jahre 	alle folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> N0, G1, HR+, HER2-, V0, Alter ≥ 35 Jahre oder N0, G2, HR+, HER2-, V0, Alter ≥ 35 Jahre, T ≤ 2cm 	<ul style="list-style-type: none"> N0, G1 oder N0, G2, Alter ≥ 35 Jahre, uPA und PAI-1 niedrig
Mittleres Risiko	<ul style="list-style-type: none"> N0 und mind. ein Risiko: G2-3, T > 2 cm, HER2+, HR-, V1, Alter < 35 Jahre oder N1, HR+, HER2- 		
Hohes Risiko	<ul style="list-style-type: none"> N > N1 oder N1, HR- oder N1, HER2+ 	<ul style="list-style-type: none"> N+ oder N0, G2, HR+, HER2-, V0, Alter ≥ 35 Jahre und pT > 2 cm oder N0 und mind. ein Risiko: G3, T > 2 cm, HER2+, HR-, (ER+/PgR-), V1, L1, Alter < 35 Jahre 	<ul style="list-style-type: none"> N+ oder N0, G3 oder N0, G2, Alter < 35 Jahre oder N0, G2, Alter ≥ 35 Jahre, uPA und/oder PAI-1 erhöht

Tab. 4.1: Risikoeinteilungen des Mammakarzinoms. T ≤ 2 cm low (bis pT1c) und ≥ 35 Jahre low (wenn die weiteren Kriterien stimmen), orientiert an St. Gallen 2007.

Zweifelsehne ist der axilläre Nodalstatus der wichtigste pathologische Risikofaktor für eine Risikostratifizierung des Mammakarzinoms [6, 7].

Da allerdings vor allem durch die verbesserte Früherkennung die Gruppe der Patientinnen ohne befallene axilläre Lymphknoten immer größer wird, gewinnen zusätzliche prognostische Faktoren an Bedeutung. Aufgrund des vergleichsweise geringen zusätzlichen Nutzens einer Chemotherapie bei bestimmten Subgruppen eines nodalnegativen Mammakarzinoms, die ohnehin eine exzellente Prognose aufweisen, müssen Nutzen und Risiken einer potentiell nebenwirkungsträchtigen Therapie sorgfältig gegeneinander abgewogen werden. In der aktuellen Metaanalyse der *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (EBCTCG) konnte gezeigt werden, dass eine anthrazyklin- und taxanhaltige Chemotherapie die brustkrebsassoziierte 10-Jahres-Mortalität um etwa ein Drittel senkt. Die Autoren erwähnten allerdings explizit, dass dies allerdings entscheidend vom Ausgangsrisiko der Patientin ohne Chemotherapie abhängt. Patientinnen mit einem geringen absoluten Risiko haben daher nur einen geringen absoluten Nutzen durch eine adjuvante Chemotherapie [4].

4.2. Grundlagen von Invasion und Metastasierung

Ein entscheidendes Merkmal von malignen Tumoren ist die Fähigkeit zur Invasion in das umliegende Gewebe mit Durchbruch durch die Basalmembran. Dieser Prozess ermöglicht es den Tumorzellen, Anschluss an das Gefäßsystem zu bekommen und sich nach Austritt aus dem Gefäßsystem in anderen Organen anzusiedeln, was zur Entstehung von Metastasen führt [8]. Dieser Prozess der Invasion und konsekutiven Metastasierung unterscheidet benigne von malignen Tumoren und ist für die betroffenen Patienten von entscheidender prognostischer Bedeutung. Aus einer lokalisierten Situation bei einem primären Mammakarzinom, die grundsätzlich eine kurative Therapie mit dem Ziel der Heilung der Patientin ermöglicht, wird beim Vorliegen von Fernmetastasen eine chronische Erkrankungssituation, in der eine dauerhafte Heilung kaum möglich ist. So einfach der Prozess von Invasion und Metastasierung

in seinen klinischen Implikationen ist, so komplex ist der zugrundeliegende Mechanismus [9]. Mechanistisch betrachtet spielen bei dem Prozess der Invasion zwei Faktoren eine entscheidende Rolle. Zum einen die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen und Integrinen und zum anderen die Bildung von extrazellulären Proteasen, die die Basalmembran und das umgebende Gewebe zerstören und so eine Invasion ermöglichen [9].

Bei dem Prozess der Invasion spielt die komplexe Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Zellen des neoplastischen umgebenden Stromas eine entscheidende Rolle ebenso wie Änderungen im zellulären Phänotyp der Tumorzellen zwischen epithelial und mesenchymal (sog. epitheliale-mesenchymale Transition) [3]. Neben den genannten Vorgängen stehen am Beginn des Invasionsprozesses extrazelluläre Proteasen. Neben Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Cathepsinen sind Serinproteasen involviert. Diese Proteasen führen zu einer enzymatischen Spaltung von zellulären Adhäsionsmolekülen, zu einem Abbau der Basalmembran (z.B. Typ IV Collagen, Laminin, Vitronectin) und von Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Fibrin, Fibrinonectin, Proteoglykane) sowie zu einer Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen und ermöglichen so Invasion und Metastasierung [10]. Eine der am besten charakterisierten tumorassozierten Proteasen ist die Serin-Protease Plasminogen Aktivator vom Urokinasetyp (uPA). uPA ist eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Als wesentlicher Bestandteil des fibrinolytischen Systems ist sie an der Umwandlung von Plasminogen zu einem aktiven Enzym, Plasmin, beteiligt. Durch aktives Plasmin kommt es dann zu dem erwähnten proteolytischen Abbau von Basalmembran und EZM. uPA wird in inaktiver Form von Leukozyten, Fibroblasten und einer Vielzahl von unterschiedlichen malignen Tumoren sezerniert. Es wird proteolytisch im Extrazellulärraum oder gebunden an den Urokinaserezeptor (uPAR) aktiviert [11]. Der aktive uPA besteht aus zwei Polypeptid-Ketten mit einer C-terminalen Serin-Proteinase-Domäne und einer N-terminalen A-Kette. uPA wird physiologisch inhibiert durch *Plasminogen Aktivator Inhibitor-1* und *-2* (PAI-1 und PAI-2). Nach Inhibition des Aktivators uPA durch PAI-1 wird der Komplex aus uPAR/uPA/PAI-1 nach Endozytose im Zytoplasma abgebaut und der Rezeptor wieder

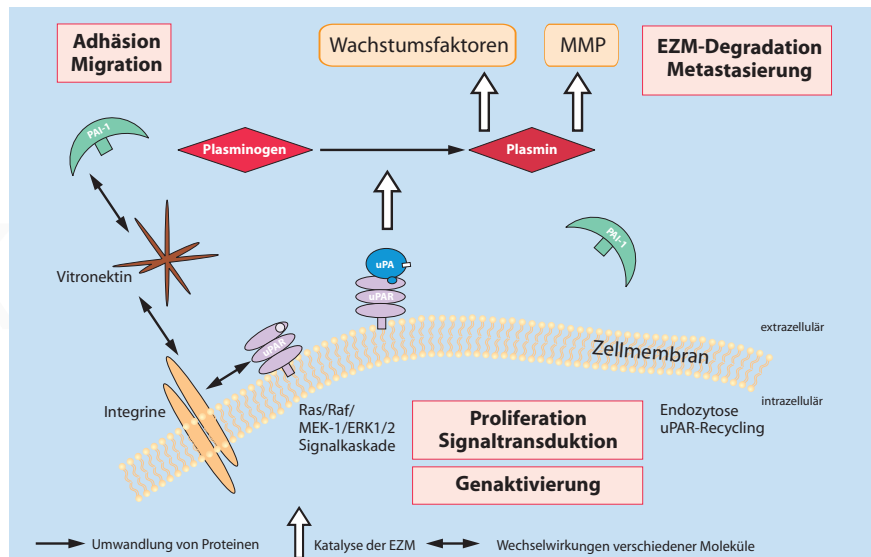


Abb. 4.1: Biologisches Modell des Plasminogen-Aktivator-Systems: An den Rezeptor gebundenes uPA konvertiert durch Proteolyse Plasminogen zum aktiven Plasmin, das u.a. über Matrix-Matelloproteinasen (MMP) und Wachstumsfaktoren die Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) katalysiert. Nach Inhibition des Aktivators (uPA) durch PAI-1 wird der Komplex aus uPAR/uPA/PAI-1 nach Endozytose im Zytoplasma abgebaut und der Rezeptor wieder an die Zelloberfläche zurückgeführt. Wechselwirkungen zwischen PAI-1 und Vitronektin beeinflussen die Zelladhäsion. Die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden zum Kern stimuliert die Zellproliferation und Migration. Erhöhte Konzentrationen von uPA und /oder PAI-1 korrelieren mit einem erhöhtem Metastasierungsrisiko.

an die Zelloberfläche zurückgeführt (Abb. 4.1), wodurch sich der beschriebene Prozess wiederholt.

Neben der beschriebenen Degradation von Basalmembran und EZM kommt es zu weiteren Effekten. Zum einen beeinflussen Wechselwirkungen zwischen PAI-1 und Vitronektin die Zelladhäsion. Zum anderen stimuliert die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden zum Kern die Zellproliferation und Migration (Abb. 4.1). Auch wird durch uPA die Angiogenese gefördert und die Apoptose reduziert [12].

Zusammengefasst ist es daher nicht überraschend, dass ein Zusammenhang zwischen dem uPA/PAI-1-Status und der Prognose von verschiedenen Malignomen besteht [12].

4.3. uPA/PAI-1 als Prognosefaktor beim Mammakarzinom – der Beginn

Am eingehendsten sind uPA und PAI-1 als Prognosefaktoren beim Mammakarzinom untersucht worden. Duffy et al. konnten bereits 1988 erstmals

zeigen, dass Patientinnen mit einer erhöhten Aktivität von uPA im Primärtumor ein kürzeres erkrankungsfreies Überleben (DFS) hatten [13]. In weiter führenden Untersuchungen konnte diese Arbeitsgruppe auch eine unabhängige prognostische Bedeutung von uPA nachweisen [14]. In der multivariaten Analyse war die prognostische Bedeutung von uPA sowohl für das DFS als auch für das Gesamtüberleben (OS) bei 166 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom unabhängig von den etablierten klinisch-pathologischen Faktoren Tumorgroße, axillärer Nodalstatus und Östrogenrezeptor-Status. Diese retrospektiv erhobenen Ergebnisse konnten in ihrer prognostischen Aussagekraft von zahlreichen anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden [15-17].

Eng verknüpft mit uPA ist sein Inhibitor PAI-1. Dieser Inhibitor hemmt allerdings nicht das Auftreten von Invasion und Metastasierung, sondern ist ähnlich wie uPA mit einer gesteigerten Invasivität assoziiert. Dies wird nicht nur mit der Degradierung der Basalmembran sondern auch mit einer Modulation der Zelladhäsion [18] und der Angiogenese [19] in Verbindung gebracht. Jänicke und Mitarbeiter konnten erstmals beim Mamma-

karzinom zeigen, dass erhöhte Konzentrationen von PAI-1 mit einer verschlechterten Prognose assoziiert sind [20]. In ihrer Arbeit wurde PAI-1 ebenso wie uPA in Extrakten von 115 primären Mammakarzinomen mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) quantitativ nachgewiesen. uPA und PAI-1 zeigten eine positive signifikante Korrelation ($R=0,4$, $p<0,001$) und waren signifikant mit dem Überleben korreliert. Höhere Konzentrationen waren mit einem kürzeren DFS und OS assoziiert. In einer zweiten darauf aufbauenden Arbeit konnten Jänicke et al. bei 247 prospektiv gesammelten Gewebextrakten von primären Mammakarzinomen mittels ELISA nachweisen, dass sowohl uPA als auch PAI-1 signifikant mit dem Überleben korrelierten [21]. Speziell in der Untergruppe der nodal-negativen Mammakarzinome konnte eine Gruppe mit niedriger Gewebekonzentration an uPA und PAI-1 identifiziert werden, die ein sehr geringes Rückfallrisiko (DFS 93 % nach 3 Jahren) aufwies. Demgegenüber hatten Patientinnen mit erhöhtem uPA und PAI-1 lediglich ein DFS von 55 %.

Dieselbe Arbeitsgruppe bestätigte den starken prognostischen Effekt von PAI-1 bei 316 Mammakarzinompatientinnen auch bei einer längeren Nachbeobachtungszeit von 77 Monaten (Median). Zwar waren in der univariaten Analyse neben den etablierten klinisch-pathologischen Faktoren wie Tumorgroße, Nodalstatus, Hormonrezeptor-Status, histologischer Differenzierungsgrad nach Optimierung des Grenzwertes sowohl uPA als auch PAI-1 signifikant mit dem Überleben assoziiert. In der multivariaten Analyse verblieb allerdings neben dem axillären Nodalstatus lediglich PAI-1 als unabhängig signifikant [22]. Bei der Subgruppe der nodalnegativen Patientinnen konnte durch Hinzunahme von uPA zu PAI-1 eine Gruppe mit einem niedrigen Rezidivrisiko von 7,7 % identifiziert werden. Diese Niedrigrisikogruppe mit niedrigen uPA (<3 ng/mg Gesamtprotein) und PAI-1 (<14 ng/mg Gesamtprotein) Konzentrationen umfasste in dieser Untersuchung 53 % [22].

Auch Harbeck et al. zeigten, dass PAI-1 multivariat einen stärkeren prognostischen Einfluss im untersuchten Kollektiv ($n=276$) hatte als uPA [23]. Der Einfluss war am stärksten in der nodal-negativen Subgruppe. Da in dieser Untersuchung die Mehrzahl der nodal-negativen Patientinnen keine adjuvante Therapie erhalten hatten, spekulierten die

Autoren, dass diese Biomarker ein prädiktives Potential für das Therapieansprechen haben [23].

In einer weiteren Publikation bezogen sich Harbeck et al. dann vor allem auf die klinisch relevante Gruppe der adjuvant unbehandelten nodal-negativen Patientinnen. Bei 269 Patientinnen mit einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 60 Monaten konnten sie nachweisen, dass uPA/PAI-1 mit der Prognose unabhängig signifikant assoziiert ist [24]. Patientinnen mit Erhöhung zumindest einer dieser beiden Invasionsfaktoren hatten ein erhöhtes Rückfallrisiko ($p<0,001$; Relatives Risiko 4,8; 95 % Konfidenzintervall (CI) 2,5-9,1). Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass beide Invasionsfaktoren am besten in Kombination zur Risikoabschätzung eingesetzt werden sollten.

Diese ausschließlich unizentrischen Daten liefern allerdings noch keine ausreichende Evidenz für den Einsatz von uPA/PAI-1 zur Risikoabschätzung in der täglichen Praxis.

4.4. Entwicklung von Biomarkern beim Mammakarzinom

Zusätzlich zu den etablierten klinisch-pathologischen Faktoren wie Tumorgroße, Nodalstatus und histologischem Differenzierungsgrad wurden zahlreiche moderne tumorbiologisch orientierte prognostische und prädiktive Faktoren in den letzten Dekaden untersucht. Von diesen sind allerdings nur der Hormonrezeptor-Status und der HER2-Status mit einem hohen Evidenzlevel breit akzeptiert und werden in der klinischen Praxis eingesetzt. Um die Qualität der Forschung über Biomarker zu verbessern, wurden die Empfehlung REMARK (*Reporting Recommendations of Tumor Marker Prognostic Studies*)-Kriterien eingeführt. REMARK beschreibt, welche Informationen, wie zum Beispiel Studiendesign, primäre Hypothese, Patienten- und Gewebecharakteristika, Nachweismethoden und statistische Analysemethoden, bei der Publikation einer Biomarkerstudie aufgeführt werden sollten [25]. Abhängig von der Qualität einer Biomarkerstudie können unterschiedliche Evidenzlevel für die einzelnen Marker vergeben werden (Tab. 4.2a) [26]. Um das höchste Evidenzlevel zu erreichen, musste ein Biomarker prospektiv im Rahmen einer prospektiv randomisierten Studie untersucht werden. Mittlerweile wurde eine Modifikation dieser Evidenzlevel für Biomar-

	A	B	C	D
Art	prospektiv	Prospektiv mit Archivgewebe	Prospektiv/Beobachtung	Retrospektiv/Beobachtung
Klinische Studie	Prospektiv, Tumormarker primäres Studienziel	Prospektiv, Tumormarker nicht primäres Studienziel	Prospektive Beobachtungsstudie	Keine prospektiven Elemente

Tab. 4.2a: Kategorien von Tumormarkerstudien.

Level of Evidence	Kategorie aus Tab. 4.2a	Validierungsstudie
I	A	Nicht erforderlich
I	B	Mindestens eine mit konsistenten Ergebnissen
II	B	Keine oder inkonsistente Ergebnisse
II	C	Mindestens 2 mit konsistenten Ergebnissen
III	C	Keine oder nur eine mit konsistenten Ergebnissen oder inkonsistente Ergebnisse
IV-V	D	Nicht ausreichend

Tab. 4.2b: Level of Evidence von Tumormarkerstudien.

ker eingeführt, die bereits vorliegendes und archivierte Gewebe stärker berücksichtigt [27]. Nach wie vor wird allerdings eine *a priori* Untersuchung in prospektiven randomisierten Studien als Goldstandard angesehen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass solche Studien zur Evaluation von Biomarkern allerdings organisatorisch und finanziell sehr aufwendig sind, wurden effizientere "prospektiv-retrospektive" Ansätze unter Verwendung von archiviertem Material aus prospektiven Studien beschrieben (☞ Tab. 4.2b).

4.5. uPA/PAI-1 als Prognosefaktor beim Mammakarzinom – die Weiterentwicklung

Die Validierung der oben diskutierten Pilotdaten für die Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 wurde in einer prospektiv randomisierten multizentrischen Studie "Chemo-N0" durchgeführt, in der gezeigt werden konnte, dass uPA/PAI-1 adjuvant unbehandelte nodal-negative Patientinnen in eine Niedrig- und eine Hochrisikogruppe stratifizieren können [28]. Das 3-Jahres-Rückfallrisiko für Patientinnen mit niedrigem uPA und/oder PAI-1 betrug 6,7 %. Die Rückfallrate bei Patientinnen mit erhöhten Werten für uPA und/oder PAI-1 lag bei 14,7 % ($P = 0,006$). Die Patientinnen mit erhöhten

Proteasen wurden zwischen Beobachtung und einer adjuvanten Chemotherapie mit Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluorouracil (CMF) randomisiert. Hier zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend für eine bessere Prognose durch CMF in der intention-to-treat Analyse (HR=0,56; 95 % CI=0,25–1,28). Die 10-Jahres-Ergebnisse der prospektiven Chemo-N0-Studie haben die prognostische Bedeutung der Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 im Primärtumorgewebe bei nodal-negativen Tumoren bestätigt. Harbeck et al. konnten zeigen, dass nodal-negative Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1 ohne adjuvante Therapie ein 10-Jahres-Rezidivrisiko von 12,9 % hatten und dass Patientinnen mit erhöhtem uPA/PAI-1 von einer CMF-Chemotherapie profitierten (HR 0,48; 95CI 0,26–0,88; $p=0,019$) [29]. Eine aktuelle pharmakoökonomische Analyse bestätigte die Kosteneffektivität der Bestimmung [30].

Um das wie oben angesprochene höchste Evidenzniveau für uPA/PAI-1 zu erreichen, wurden Metaanalysen aus gepoolten Daten durchgeführt. Eine umfassende Analyse von 8.377 Patientinnen aus 16 Studiengruppen zeigte die gute Reproduzierbarkeit der Untersuchungsmethode und bestätigte die enge Assoziation von uPA und PAI-1 mit der Prognose beim Mammakarzinom [31]. Sowohl bei nodal-positiven als auch bei nodal-nega-

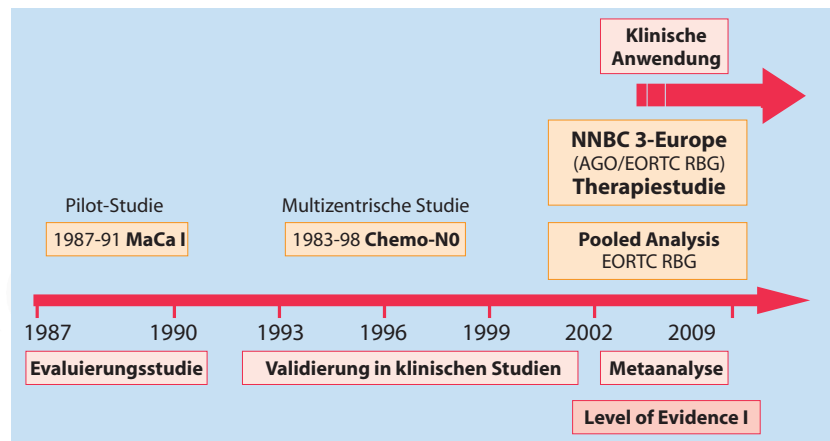


Abb. 4.2: Validierung der Prognosemarker uPA und PAI-1.

tiven Patientinnen war uPA und PAI-1 multivariat unabhängig mit einem verkürzten DFS und OS assoziiert. Speziell in der Gruppe der adjuvant unbehandelten nodal-negativen Patientinnen ($n=3.362$) zeigte sich eine starke und unabhängige Assoziation der Proteasen mit DFS und OS. Im Cox-Modell hatten die Invasionsfaktoren eine zu den traditionellen Prognosefaktoren zusätzliche prognostische Bedeutung in Bezug auf DFS und OS.

Der prädiktive Einfluss der Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 wurde ebenfalls in einem gepoolten Kollektiv anhand von 3.424 primären Mammakarzinomen evaluiert, die eine adjuvante endokrine und/oder Chemotherapie erhalten hatten [32]. Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 83 Monaten profitierten speziell Patientinnen mit erhöhter uPA- und/oder PAI-1 Konzentration im Primärtumor von einer adjuvanten Chemotherapie. Dieser Effekt zeigte sich in einer signifikanten Interaktion zwischen den Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 und dem Effekt der adjuvanten Chemotherapie ($p<0,003$; Hazard Ratio [HR]=0,68; 95 % CI =0,53-0,88). Im Gegensatz zu dem verstärkten Effekt einer adjuvanten Chemotherapie bei erhöhter Konzentration von uPA/PAI-1 zeigte sich keine Assoziation bei einer adjuvanten endokrinen Therapie [32]. Die Autoren postulierten, dass uPA/PAI-1 nicht nur unabhängige Aussagen für das Überleben liefern, sondern auch durch ihre prädiktive Bedeutung ein "Maßschneidern" adjuvanter Therapiekonzepte ermöglichen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die *Node-Negative Breast Cancer 3* (NNBC 3)-Europe-Stu-

die als multizentrische Studie durchgeführt. In dieser prospektiv randomisierten Studie wurden nodal-negativen Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und erhöhten uPA- und/oder PAI-1 Konzentrationen zwischen 6 Zyklen 5-Fluorouracil/Epirubicin/Cyclophosphamid (FEC) oder 3 Zyklen FEC gefolgt von 3 Zyklen Docetaxel randomisiert [33]. Im Anschluss daran erhielten die Patientinnen bei positivem Hormonrezeptor-Status eine adjuvante endokrine Therapie. Die Patientinnen mit niedrigen Konzentrationen von uPA und PAI-1 erhielten keine adjuvante Chemotherapie und bei positiven Hormonrezeptor-Status eine adjuvante endokrine Therapie. Parallel zu uPA/PAI-1 wurde auch ein klinisch-pathologischer Risikoalgorithmus evaluiert und zur Risikostratifikation benutzt. Dieser Risikoalgorithmus zeigte retrospektiv bei nodal-negativen und adjuvant unbehandelten Patientinnen eine von Adjuvant unabhängige Assoziation mit DFS und OS [34]. Zusammengefasst sind diese Algorithmen in Tab. 4.1.

Ein praktisches Problem bei der Bestimmung der Proteine uPA und PAI-1 ist die Verwendung von frischem Gewebe. Untersuchungen am Paraffingewebe mittels RT-PCR oder Immunhistochemie sind nicht ausreichend validiert und werden für den Routineeinsatz nicht empfohlen [35]. Die Option einer Untersuchung dieser beiden Invasionsfaktoren am Paraffingewebe mittels Protein Microarrays zeigt Assoziationen mit Akt, ERK und Stat3, ohne dass man derzeit valide prognostische Informationen aus dieser neuen Methode ziehen kann [36]. Ursprünglich waren uPA/PAI-1 am Frischmaterial nach Operation des Mammakarzi-

noms gemessen worden. Darüber hinaus scheint es sich bei der Überexpression dieser Faktoren um ein generell onkologisches Prinzip zu handeln: Auch bei anderen Karzinomen (Magenkarzinom, Blasenkarzinom, Rektumkarzinom etc.) konnten hohe Konzentrationen dieser Faktoren im jeweiligen Tumorgewebe mit einer ungünstigen Prognose korreliert werden [37].

Um die Möglichkeit der Vereinfachung der Gewebeerfassung zu prüfen, wurde uPA/PAI-1 an Gewebe aus Stanzbiopsien untersucht. In dieser Pilot-Untersuchung konnte eine signifikante Korrelation der aus der Stanze gemessenen Werte mit denen aus Operationsmaterial gezeigt werden (R für uPA=0,789 und für PAI-1=0,907; jeweils $p < 0,001$); der positive prädiktive Wert war 0,94, der negative prädiktive Wert betrug 1,00 [38].

4.6. uPA/PAI-1 in der Einschätzung der Fachgesellschaften

Die Empfehlungen zur Verwendung von neueren Biomarkern beim Mammakarzinom wurden von der *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) zuletzt 2007 aktualisiert [39]. Zusätzlich zu ER und HER2 wurden noch Biomarker wie uPA/PAI-1 und bestimmte Genexpressionsalgorithmen für den praktischen Einsatz empfohlen. Auch die *Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie* (AGO) führt seit 2002 auf dem Boden der oben aufgenommenen Evidenz uPA/PAI-1 mit dem höchsten Empfehlungsgrad LoE 1A auf.

Insgesamt lassen uPA/PAI-1 eine verbesserte Risikoabschätzung speziell bei nodal-negativen Mammakarzinomen zu. Es ist entscheidend, dass ein unkritischer oder unsachgemäßer Einsatz nicht zu einer Unter- oder Fehltherapie der Patientinnen führen darf.

4.7. Literatur

1. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V: UK and USA breast cancer deaths down 25 % in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet* 2000, 355:1822
2. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, Mandelblatt JS, Yakovlev AY, Habbema JDF, Feuer EJ: Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353:1784-1792
3. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R: Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011, 378:771-784
4. Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M, Pritchard K: Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 2012, 379:432-444
5. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H: 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.* 2011, 22:1736-1747
6. Fisher ER, Costantino J, Fisher B, Redmond C: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. Cancer* 1993, 71:2141-2150
7. Chia SK, Speers CH, Bryce CJ, Hayes MM, Olivetto IA: Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22:1630-1637
8. Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3:453-458
9. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100:57-70
10. Polyak K, Weinberg RA: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9:265-273
11. Laufs S, Schumacher J, Allgayer H: Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* 2006, 5:1760-1771
12. Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 1997, 72:1-22
13. Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ: Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 1988, 62:531-533
14. Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen P: Urokinase-plasminogen activator,

- a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.* 1990, 50:6827–6829
15. Jänicke F, Schmitt M, Ulm K, Gössner W, Graeff H: Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet* 1989, 2:1049
16. Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Bontenbal M, Jänicke F, Klijn JG: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res.* 1992, 52:6101–6105
17. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmitt M, Foekens JA, Eppenberger-Castori S: Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16:3129–3136
18. Czekay R, Loskutoff DJ: Plasminogen activator inhibitors regulate cell adhesion through a uPAR-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 2009, 220:655–663
19. Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declercq P, Carmeliet P, Foidart J, Noel A: Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene* 2004, 23:6986–6990
20. Jänicke F, Schmitt M, Graeff H: Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin. Thromb. Hemost.* 1991, 17:303–312
21. Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H: Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1993, 24:195–208
22. Harbeck N, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates RE, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt M: Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. *Breast Cancer Res. Treat.* 1999, 54:147–157
23. Harbeck N, Alt U, Berger U, Krüger A, Thomssen C, Jänicke F, Höfler H, Kates RE, Schmitt M: Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsins B, D, and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7:2757–2764
24. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M: Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20:1000–1007
25. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM: Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23:9067–9072
26. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ: Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88:1456–1466
27. Simon RM, Paik S, Hayes DF: Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009, 101:1446–1452
28. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M: Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, 93:913–920
29. Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep CGJ, Lisboa BW, Lux MP, Beck T, Hasmüller S, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C: Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur. J. Cancer* 2013, 49:1825–1835
30. Jacobs VR, Kates RE, Kantelhardt E, Vetter M, Wursterlein R, Fischer T, Schmitt M, Jänicke F, Untch M, Thomssen C, Harbeck N: Health economic impact of risk group selection according to ASCO-recommended biomarkers uPA/PAI-1 in node-negative primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013, 138:839–850
31. Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CGJF, Ulm K, Peyrat J, Martin P, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl P, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G et al.: Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002, 94:116–128
32. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JGM, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA: Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res.* 2002, 62:4617–4622

33. Kantelhardt EJ, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Augustin D, Hanf V, Meisner C, Paepke D, Schmitt M, Sweep F, Minckwitz G von, Martin P, Jaenicke F, Thomssen C, Harbeck N: Prospective evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6×FEC versus 3×FEC/3×Docetaxel. *BMC Cancer* 2011, 11:140
34. Schmidt M, Victor A, Bratzel D, Boehm D, Cotarelo C, Lebrecht A, Siggelkow W, Hengstler JG, Elsässer A, Gehrman M, Lehr H, Koelbl H, Minckwitz G von, Harbeck N, Thomssen C: Long-term outcome prediction by clinicopathological risk classification algorithms in node-negative breast cancer - comparison between Adjuvant!, St Gallen, and a novel risk algorithm used in the prospective randomized Node-Negative-Breast Cancer-3 (NNBC-3) trial. *Ann. Oncol.* 2009, 20:258–264
35. Malinowsky K, Böllner C, Hipp S, Berg D, Schmitt M, Becker KF: UPA and PAI-1 analysis from fixed tissues - new perspectives for a known set of predictive markers. *Curr. Med. Chem.* 2010, 17:4370–4377
36. Wolff C, Malinowsky K, Berg D, Schragner K, Schuster T, Walch A, Bronger H, Höfler H, Becker K: Signaling networks associated with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissues: new insights from protein microarray analysis. *J. Pathol.* 2011, 223:54–63
37. Schmitt M, Mengele K, Napieralski R, Magdolen V, Reuning U, Gkazepis A, Sweep F, Brünner N, Foekens J, Harbeck N: Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2010, 10:1051–1067
38. Thomssen C, Harbeck N, Dittmer J, Abraha-Spaeth SR, Papendick N, Paradiso A, Lisboa B, Jaenicke F, Schmitt M, Vetter M: Feasibility of measuring the prognostic factors uPA and PAI-1 in core needle biopsy breast cancer specimens. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009, 101:1028–1029
39. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC: American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25:5287–5312
40. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, and enn HJ: Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann. Oncol.* 2009, 20: 1319-1329

**Pathologie: Histo-
logische Sicherung des
Mammakarzinoms und
Biomarker für die
Prognose und Prädiktion**

5. Pathologie: Histologische Sicherung des Mammakarzinoms und Biomarker für die Prognose und Prädiktion

5.1. Einleitung

Verschiedene Subtypen beim Mammakarzinom

Beim Mammakarzinom wird erstmalig offensichtlich, wie aus tumorbiologischen Eigenschaften ein neues Klassifikationsprinzip entsteht, das wegen seiner auf therapeutische Konsequenzen ausgerichteten Pragmatik die traditionelle histomorphologische Klassifikation (*Typing, Staging* und *Grading*, siehe unten) überlagert. Die auf molekularen Genexpressionsprofilen beruhenden intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms sind in immunhistochemischer Translation zu klinisch-pathologischen Kategorien geworden.

Dabei werden ein

- tripel-negativer ("basaler")
- die Hormonrezeptor-positiven Typen Luminal A und Luminal B sowie der
- Hormonrezeptor-negative HER2-Typ unterschieden. Dass der Rezeptorenstatus eine eigene Klassifikationsgrundlage bilden kann, die den übrigen pathologischen Einteilungsprinzipien zumindest ebenbürtig ist, entspricht der klinischen Erfahrung und wurde durch molekulare Studien nahegelegt [1].

Über mRNA-Expressionsprofile ohne Korrelation zu Proteindaten wurden dabei die intrinsischen Subtypen

- Luminal A-Typ
- Luminal B-Typ
- HER2-Typ
- basaler Phänotyp

unterschieden [1]. Der sogenannte Normaltyp stellt wahrscheinlich ein Artefakt dar und hat keinen weiteren Eingang in die Literatur gefunden. Diese Typen lassen sich nicht direkt in immunhistochemische Algorithmen übertragen [2,3]. Es bestehen allerdings zumindest partielle Überlappungen:

- gut differenziertes, niedriggradiges, hoch-Östrogenrezeptor-positives Mammakarzinom ("Luminal A-Phänotyp")
- Schlecht differenziertes, hochgradiges (G3), hoch- oder niedrig-Östrogenrezeptor-positives Mammakarzinom ("Luminal B-Phänotyp")
- HER2 überexprimierendes und amplifiziertes Mammakarzinom ("HER2-Phänotyp")
- Tripel-negatives Mammakarzinom ("Basaler Phänotyp")

Die zunächst molekular definierten intrinsischen Subtypen haben operationale Begriffe geschaffen, die Grundlage einer auf Therapieoptionen ausgerichteten pragmatischen Klassifikation des Mammakarzinoms geworden sind.

Die Ungenauigkeit, dass die immunhistochemischen Entsprechungen nicht nachgewiesen wurden (z.B. durch prozentuale Schwellenwerte für den erforderlichen Anteil durch hochmolekulares,

	Luminal A	Luminal B HER2-negativ	Luminal B HER2-positiv	HER2 (non-luminal)	Tripel-negativ (basal-like*)
ER	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
PgR	positiv (≥20 %)	positiv/negativ	positiv/negativ	negativ	negativ
HER2	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ
Ki-67	<20 %	≥20 %			
G	G1, G2	G2, G3	G2, G3	G2, G3	G1, G2, G3

Tab. 5.1: Immunhistochemische Charakterisierung der intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms [20]. **ER** = Östrogenrezeptor; **PgR** = Progesteronrezeptor; **HER2** = humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2; **G** = Grading. *Die tripel-negativen und die basal-like Mammakarzinome sind nur in etwa 60-80 % deckungsgleich.

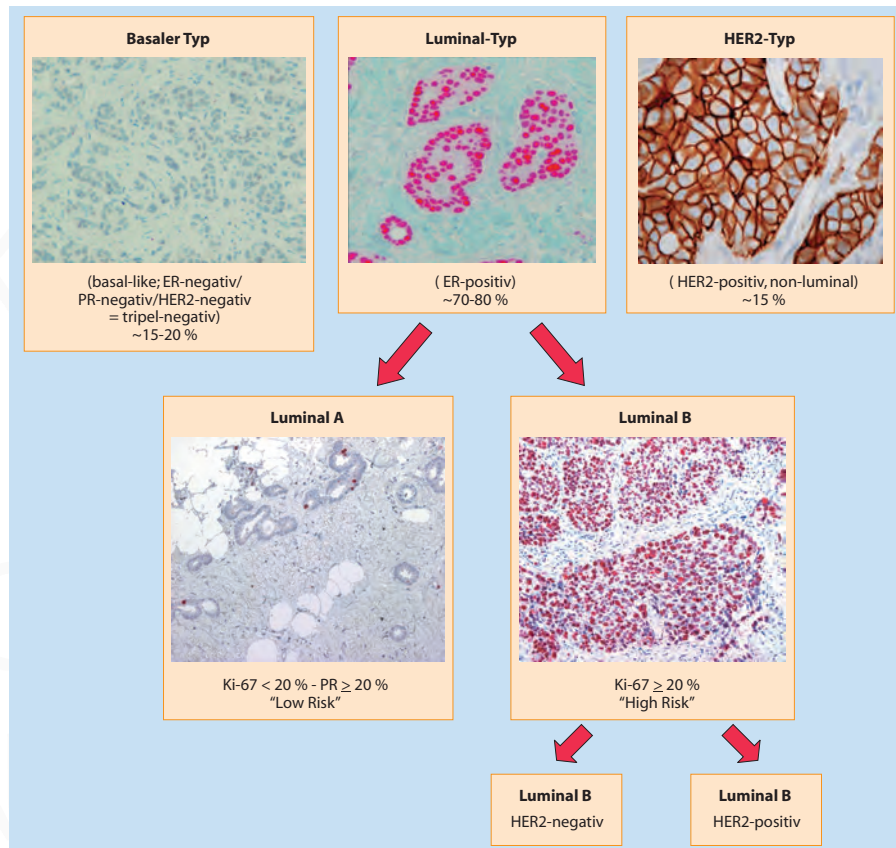


Abb. 5.1: Die intrinsischen Typen des Mammakarzinoms sind eigentlich durch Genexpressionsprofile definiert, jedoch werden immunhistochemische Analoga, wie hier durch den St. Gallen-Konsens, zunehmend angewandt [20].

“basales” Zytokeratin markierter Zellen), sondern anhand klinischer Studiendaten und Erfahrungen gesetzt wurden, hat dem Konzept der “intrinsischen Typen” keinen Abbruch getan. Vielmehr wurden die etablierten und definierten Begriffe der Rezeptorpositivität oder -negativität mit der neuen Terminologie eingängiger bezeichnet und von einem bloßen Attribut zu einem den übrigen pathologischen Einteilungen (*Typing, Grading, Staging*) ebenbürtigem Klassifikationsprinzip erhoben (Abb. 5.1).

Allerdings ist dies mit den folgenden Einschränkungen geschehen:

- Gegenwärtig besteht keine allgemein gültige “Übersetzung” aller molekular definierten intrinsischen Typen (z.B. basaler Typ, Luminal A/B-Typ) in immunhistochemische Definitionen sowohl in Hinblick auf Marker als auch auf Schwellenwerte

- Der basale Typ zeigt eine nur partielle bis zu ca. 80 % betragende Überschneidung mit der tripel-negativen Untergruppe des duktal invasiven Mammakarzinoms (ER <1 % und PgR <1 % und HER2 0/1+/2+ ohne Amplifikation)
- Keiner der in der Pathologie angewandten Marker (Ki-67, *Grading*, Recurrence Score®, EndoPredict® etc.) kann zuverlässig zwischen Luminal A-Typ und Luminal B-Typ differenzieren
- RNA-Expressionsanalysen können zur Bestimmung des intrinsischen Typs eines Tumorherdes zu Therapie Zwecken herangezogen werden - dies vorzugsweise in Studien

Der luminal Typ des Mammakarzinoms beinhaltet nach den Genexpressionsprofilen von Perou et al. [1] zwei Subtypen mit einer günstigen (Luminal A) und einer ungünstigen Prognose (Luminal B). Die Unterscheidung zwischen luminalem Typ A und B ist zu einem Stellvertreter für die in vielen

Einzelfällen ungeklärte Frage geworden: Ist eine alleinige endokrine Therapie des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms ausreichend oder sollte sie mit einer Chemotherapie kombiniert werden? Wegen des Surrogatcharakters wird die Unterscheidung zwischen luminalem Subtyp A und B in der Klinik und in Studien häufig mit der Stratifizierung in endokrine Therapie oder chemoendokrine Therapie allein gleich gesetzt.

Gleichzeitig verlieren die traditionellen pathologischen Kategorien, die zur Beantwortung dieser Frage herangezogen werden können (Tumorgroße, axillärer lymphonodulärer Ausbreitungsstatus), an Bedeutung [4]. Bei bis zu drei befallenen axillären Lymphknoten kann unter Umständen auf eine Chemotherapie verzichtet und eine alleinige endokrine Therapie durchgeführt werden.

Da es aber zurzeit keine ausreichend evidenzbasierte verbindliche Antwort auf die Frage zur Abgrenzung von luminalem Typ A und Typ B gibt [5], sind verschiedene Faktoren in Diskussion, die eine Kategorisierung in Typ a und Typ B eindeutig machen könnten[6a]:

- Höhe der Hormonrezeptor-Expression
- Histopathologisches Grading
- Proliferationsaktivität (z.B. Höhe der Ki-67-Expression)
- HER2-Status
- Molekulare Expressionsprofile

Im St. Gallen-Konsens 2009 wurde zwischen hochpositiven Karzinomen (Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor >50 %), die auch bei positivem Lymphknotenstatus (1-3) für eine alleinige hormonelle Therapie in Betracht kommen, und schwächer exprimierenden Tumoren unterschieden, bei denen eine relative Indikation für Chemotherapie gesehen wurde [4]. Wo die Grenze zwischen einer hohen und niedrigen Rezeptorpositivität verläuft, kann nicht sicher angegeben werden. Im St.-Gallen-Konsens wurden 50 % angenommen [4].

Es ist zwar naheliegend, unterschiedliches biologisches Verhalten des Tumors und therapeutisches Ansprechen zu erwarten, wenn in einem Karzinom nur 5 % der Zellen oder annähernd 100 % der Zellen Östrogenrezeptor-positiv sind dafür gibt es jedoch nur begrenzte Evidenz und keine reproduzierbaren Schwellenwerte. Ebenso ist unklar, ob

die Abwesenheit des Progesteronrezeptors den Luminal B-Typ konstituieren kann.

Die Höhe der Expression des Östrogenrezeptors- und oder des Progesteronrezeptors kann daher nicht zur Unterscheidung von Luminal A- und B-Typ herangezogen werden.

5.2. Histologische Typisierung

Die *World Health Organization* (WHO)-Klassifikation der Mammakarzinome unterscheidet 37 verschiedene Typen invasiver Karzinome. Die häufigsten Formen sind das nicht weiter zu spezifizierende invasive Mammakarzinom (früher duktal invasiv), das ca. 70-80 % ausmacht, und das invasive lobuläre Karzinom mit einem Anteil von etwa 10-15 % aller Fälle. Zwar weiß man, dass besondere Formen wie das tubuläre oder das muzinöse Mammakarzinom eine bessere Prognose aufweisen, jedoch gilt beim Mammakarzinom, dass das Grading weit wichtiger ist als die histologische Subtypisierung. Zudem ist die Reproduzierbarkeit der Differenzierungskriterien, z.B. beim medullären Mammakarzinom, eingeschränkt und histologische typenspezifische Studien existieren kaum. Dennoch verbinden sich mit der Angabe z.B. eines lobulären Subtyps wichtige Zusatzinformationen und biologische Besonderheiten. Das lobuläre Mammakarzinom ist häufiger multifokal und beidseitig ausgebildet, in der Bildgebung und Palpation schwer zu erfassen, fast immer vom luminalen Typ und metastasiert besonders (Pleura, Peritoneum, Leber und Knochen, aber nicht ZNS).

5.3. TNM-Klassifikation

Nach wie vor ist die TNM-Klassifikation von großer klinischer Bedeutung, auch wenn die in einer Tumorgroße zusammengefassten Kategorien sehr heterogen sind. Ein pT1c-Tumor reicht von 1-2 cm Größe und kann dabei mit einem Durchmesser von 1,1 cm ein Volumen von 0,6 cm³ aufweisen, bei 1,9 cm Durchmesser beträgt das Volumen mit 4,5 cm³ bereits knapp das Achtfache.

Die Feststellung der anatomischen Ausbreitung eines Tumors bleibt ein wichtiger prognostischer Parameter. Dadurch, dass Mammakarzinome im Rahmen der Früherkennung in initialen Stadien diagnostiziert werden, verliert jedoch das klassische Unterscheidungsmerkmal der Tumorgroße

an Bedeutung. Zudem erscheint die diskontinuierliche Klassifikation in Größenkategorien nach dem TNM-System nur bedingt die Biologie wiederzuspiegeln. Dennoch bleibt die Tumorgröße ein für die Therapie weiterhin einflussreicher Risikoparameter. Auch die Absiedlung in die regionalen Lymphknoten stellt eine wichtige prognostische Information dar und muss bei jedem Mammarkarzinom erfasst werden. Viele Anstrengungen sind unternommen worden, das Staging zu präzisieren und kleinste Lymphknotenabsiedlungen (Einzelzell dissemination und Mikrometastasen) nachzuweisen. Überraschenderweise zeigte sich je-

doch, dass der mit vergrößertem Aufwand zu erreichende Nachweis okkulten Metastasen einen so geringen Zusatznutzen birgt, dass der Aufwand nicht gerechtfertigt erscheint [6]. Diese große Studie an 3.887 Patientinnen kommt zu dem Schluss, dass okkulte Metastasen zwar die Prognose verschlechtern, dieser Effekt jedoch so gering ist (1,2 % auf 5 Jahre), dass der hohe Aufwand einer systematischen Suche mittels Immunhistochemie nicht zu rechtfertigen ist [6]. In der MIRROR-Studie [7] wurde gezeigt, dass Einzelzellnachweis und Mikrometastasen zu einer signifikant schlechteren Prognose führen und sich dabei in ihrem

Tumorstadium lokal: pT	Tumorstadium regionale Lymphknoten: pN	Tumorstadium Fernmetastasen: M
<ul style="list-style-type: none"> • pT0 Kein Tumor nachweisbar • pTis <i>In-situ</i>-Karzinom ohne Invasion • pT1mic Mikroinvasion bis 0,1 cm • pT1 bis 2 cm <ul style="list-style-type: none"> - pT1a ≤ 0,5 cm - pT1b > 0,5 cm bis 1 cm - T1c > 1 cm bis 2 cm • pT2 > 2 cm bis 5 cm • pT3 > 5 cm • pT4 Jede Größe mit Infiltration von Brustwand und/oder Haut <ul style="list-style-type: none"> - pT4a Brustwand - pT4b Hautulkus, Orangenhaut, cutaner Satellitenknoten - pT4c 4a plus 4b - pT4d Inflammatorisches Karzinom 	<ul style="list-style-type: none"> • pN0 Keine oder wenig Tumorzellen nachweisbar (nicht mehr als 200 in einer Schnittebene oder < 0,2 mm) • pN1 1-3 Lymphknoten befallen, mindestens eine > 2 mm <ul style="list-style-type: none"> - pN1mic > 0,2 mm und/oder > 200 Zellen und < 2 mm • pN2 4-9 Lymphknoten befallen, mindestens 1 > 2 mm • pN3 10 oder mehr axilläre und/oder infraclaviculäre Lymphknoten 	<ul style="list-style-type: none"> • M0 Klinisch keine Metastasen • M1 Klinischer Metastasenachweis

Tab. 5.2: TNM-Klassifikation Brustkrebs.

prognostischen Effekt nicht unterscheiden. Daher wird eine immunhistochemische Analyse von Sentinel-Lymphknoten für notwendig erachtet. Dieser Befund wurde von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt [8-10]. Möglicherweise kommen die prognostischen Effekte der Mikrometastasen aufgrund einer immer effektiver werdenden Therapie nicht zum Tragen. Um die Sensitivität des Lymphknotenmetastasen nachweises zu erhöhen, stehen neben der konventionellen Histologie an Paraffinschnitten und Schnellschnitt histologie an Kryoschnitten [11] molekularbiologische Verfahren (OSNA RT-PCR) zur Verfügung, die aber noch nicht in die Routine-Diagnostik integriert sind [12-14].

Große Erwartungen sind auch geknüpft an den Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark [15] und zirkulierende Tumorzellen [16]. Für die erstere Bestimmung wird heparinisiertes Knochenmark benötigt, das über Spezialzentrifugeneinsätze in großer Zellzahl auf Objektträger aufgebracht und immunhistochemisch (Antikörper A45-B/B3 oder CK 8/18 und 8/19) auf Zytokeratin-positive Zellen untersucht wird. Dabei zählt allein die Detektion des Antigens unabhängig von der Intensität; auch in geringer Zahl vorhandene zytologisch als normal erscheinende Zellen gelten als positiv. Trotz vorliegender prospektiver Studien [16] wurde die Evidenz vom ASCO und in den in Deutschen Leitlinien nicht als ausreichend für eine Empfehlung angesehen.

Verschiedene Verfahren zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen sind demnach ebenfalls nicht empfohlen. Derartige immunzytologische Assays zum Einzelzellnachweis werden bis auf wenige Ausnahmen nicht durch Pathologische Institute durchgeführt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die prognostische Bedeutung von Einzelzellabsiedlungen und Mikrometastasen im axillären Lymphknoten gering ist und den generellen Einsatz immunhistochemischer Nachweismethoden nicht rechtfertigt. Hämatogene Mikrometastasen und zirkulierende Tumorzellen spielen außerhalb von Studien derzeit keine Rolle.

5.4. Histopathologisches Grading

Das histopathologische *Grading* hat seine prognostische Potenz in mehreren Studien unter Beweis gestellt wenn es durch einen Geübten oder zentral erfolgt [3]. Es ist eine zuverlässige Methode, um zwischen einem hohen (G3) und einem niedrigen Rezidivrisiko (G1) der Patientin zu unterscheiden.

Von Kritikern wird es dagegen als nicht präzise und reproduzierbar genug für eine zuverlässige Stratifizierung angesehen [17]. Besonders problematisch ist, dass ein Großteil der Tumore mit einem Anteil von 35-50 % in die prognostisch nicht eindeutige G2-Gruppe fällt.

Dennoch haben mehrere Studien gezeigt, dass die Unterscheidung von luminalem A- und B-Typ mit Hilfe des *Grading*s hinsichtlich des Therapieansprechens gute Korrelationen liefert. Hierbei wurde der Luminal B-Typ mit einem histopathologischen Grad 3 gleichgesetzt [18, 19]. Nach dem St. Gallen Konsens 2011 kann bei Fehlen von Proliferationsdaten das histopathologische *Grading* als Surrogatparameter eingesetzt werden [20].

Prospektive Studien sind erforderlich, um die Wertigkeit des *Grading*s im Vergleich zu anderen verfügbaren Methoden der Stratifikation insbesondere innerhalb der luminalen Tumorgruppe zu überprüfen.

5.5. Hormonrezeptoren

Der immunhistochemische Nachweis der Expression der Steroidhormonrezeptoren (ER/PgR) im Tumorgewebe stellt den am längsten etablierten prädiktiven Marker in der Pathologie dar und bildet das Äquivalent des luminalen Phänotyps.

Das Verfahren ist gut reproduzierbar [21] und in Ringversuchen werden stringente Ergebnisse erzielt [22]. Diese Gruppe bildet die größte Untergruppe der Mammakarzinome mit einem Anteil von 70-80 %.

Beim Vergleich von Analysen an Stanzbiopsien und Resektaten zeigte sich an über 500 Fällen eine >97 %ige Konkordanz beim Östrogenrezeptor, während diese für den Progesteronrezeptor wegen der felderförmigen Expression deutlich geringer war [von Wasielewski et al. unveröffentlicht].

Klassifikation	ASCO/CAP 2010 [23]	Remmele-Score [23b]	Allred-Score [23a]	St. Gallen-Konsensus 2009 [4]
Bewertung	Prozentualität	Färbeintensität (1-3) x Prozentualität (1-4) = max. 12	Färbeintensität (1-3) + Prozentualität (1-5) = max. 8	Prozentualität
		> 0 bis <10 % = 1	>0 bis 1% = 1	Schwach positiv: >0 bis 49 %
		10 bis <50 % = 2	>1 % bis 10 % = 2	
		50 % bis 80 % = 3	>10 % bis 33 % = 3	Hoch positiv: ≥50 %
		>80 % = 4	>33 % bis 66 % = 4	
			>66 % bis 100 % = 5	
Positiv	Positiv ≥1 %	Positiv ≥3 (Score)	Positiv ≥3 (Score) 1% mäßig gefärbt	Positiv >0 (%)
Negativ	Negativ <1 %	Negativ ≤2 (Score)	Negativ ≤ 2 (Score)	Negativ 0 (%)
Diskrepante Positivitätsgrenze im Vergleich zu ASCO/CAP		1 % mindestens stark gefärbt	1 % mindestens mäßig gefärbt	>0 % bis <1 %
Diskrepante Negativitätsgrenze im Vergleich zu ASCO/CAP		49 % schwach gefärbt; 9% mäßig gefärbt	1 % schwach gefärbt	>0 % bis <1 %

Tab. 5.3: Klassifikation der Hormonrezeptor-Expression.

Wegen der Option zur neoadjuvanten Therapie ist eine Rezeptoranalyse am Tumorgewebe von Stanzbiopsien indiziert.

Bei der Einstufung eines Herdes als Steroidrezeptor-positiv (und damit als "luminaler-Typ") hat ein Meinungswandel stattgefunden. Es werden nicht mehr bestimmte Prozentsätze (z.B. 10 % der Tumorzellen) für die Befundung eines positiven Hormonrezeptor-Status gefordert, sondern jede detektierte Expression gilt als potenziell responsiv [4]. Die Leitlinien der *American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists* (ASCO/CAP *Guidelines*) geben eine Grenze von 1 % an [23, 24a]. Insofern kommt es darauf an, auch minimale Prozentsätze positiver Zellen im Befund mitzuteilen und nicht über den aus Anzahl der gefärbten Zellen und Intensität der Färbung gemittelten Score Rezeptorpositivität oder -negativität festzulegen (Tab. 5.1).

Wie aus der Tabelle 5.3 hervorgeht, sind alleinige Score-Angaben zur Beurteilung der Rezeptorpositivität nicht sinnvoll, da es Fälle gibt, die nach dem Remmele- oder Allred-Score negativ, nach den neuen Empfehlungen von ASCO/CAP oder St. Gallen aber Östrogenrezeptor-positiv sind.

Die biologische Signifikanz einer alleinigen Progesteronrezeptor-Expression bleibt unklar und kann Folge eines Färbeartefaktes sein. Auch wird der Progesteronrezeptor eher als prognostischer, denn als prädiktiver Marker angesehen, der nicht geeignet ist, das Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie vorher zu sagen [23].

Eine mögliche Alternative zur Festlegung des Rezeptorstatus mittels Immunhistochemie ist die Quantifizierung der Expression über die mRNA, wie sie z.B. beim Recurrence Score® durchführt wird [32]. Dieses Verfahren wurde von den ASCO/CAP-Leitlinien jedoch nicht als ausreichend durch Studien abgesichert angesehen [23].

5.6. Ki-67

Wie aus Abbildung 5.1 ersichtlich, haben die St. Gallen-Empfehlungen 2011 einen Versuch unternommen, den molekularbiologisch ermittelten intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms eine immunhistochemische Definition zuzuordnen [20] (Abb. 5.1).

Bemerkenswert ist dabei der hohe Stellenwert, der dem Proliferationsmarker Ki-67, der seit 30 Jahren bekannt ist und in zahlreichen Studien zum Mammakarzinom eingesetzt worden ist, eingeräumt wird [24,25].

Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, das von der G1- bis zur M-Phase exprimiert wird und nur in der G0-Phase des Zellzyklus nicht nachweisbar ist. Im Gegensatz zu anderen Markern wie PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, ein Co-Faktor der DNA-Polymerase) oder Topoisomerase II α , wird das Ki-67-Protein ausschließlich im Rahmen der Proliferation und nicht auch während der DNA-Reparatur exprimiert. Ferner wird es schneller in der Zelle degradiert, was die Auswertbarkeit erleichtert.

Verschiedene Antikörper stehen zum Nachweis von Ki-67 im Gewebe zur Verfügung, die auch am Paraffin eingebetteten Routinematerial zuverlässig anwendbar sind (z.B. Mib1, Ki-S5, SP6). Die Ki-67-Expression wird als Prozentsatz positiv markierter Tumorzellkerne bezogen auf alle Tumorzellen angegeben [25].

Es konnte gezeigt werden, dass mit der Bestimmung von Ki-67 an Stanzbiopsien der endgültige Grad der Proliferation zuverlässiger vorhergesagt werden kann als mit der Zählung von Mitosen, da hierfür häufig nicht genügend Gesichtsfelder bei der mikroskopischen Auswertung zur Verfügung stehen [26]. Mithilfe von Ki-67 lässt sich die histopathologische Graduierung der Tumorzellen objektivieren, wobei Grenzwerte von

- $\leq 10\%$ entsprechend G1
- $> 10\%$ bis $< 25\%$ entsprechend G2
- $\geq 25\%$ entsprechend G3

angegeben werden [27].

Hinsichtlich der prognostischen Aussage existieren für Ki-67 auch zweiteilige Systeme, wobei die Grenze zwischen niedrigem und erhöhtem Risiko

unterschiedlich gezogen wird, z.B. bei 13,5 % [28] und 20 % [25].

Metaanalysen an 15.790 Patienten ergaben, dass hinsichtlich des Gesamtüberlebens Ki-67 trotz der unterschiedlich genutzten *cut-off*-Werte eine Hochrisikogruppe identifizieren kann [29]. In Stanzbiopsien sagt der Ki-67-Wert das endgültige *Grading* zuverlässiger voraus als das *Grading* selbst [30].

Als prädiktiver Marker kann Ki-67 Auskunft über die Wirksamkeit und das Ansprechen auf endokrine Therapien geben [28]. Bezüglich des Ansprechens auf eine Chemotherapie ergab sich, dass die höher Ki-67-exprimierenden Tumoren nach Behandlung mit Docetaxel ein signifikant reduziertes Rezidivrisiko aufweisen [31]. Bei der neoadjuvanten Therapie sagt ein hoher Ki-67-Wert eine gesteigerte Ansprechwahrscheinlichkeit auf eine Chemotherapie voraus [32,33].

Trotz dieser Qualitäten ist Ki-67 bisher noch kein allgemein empfohlener Prognosemarker, da eine Standardisierung nicht gegeben ist. So sind folgende Kriterien nicht vereinheitlicht:

- Verschiedene Grenzwerte zwischen Hoch- und Niedrigrisiko (10 %, 13,5 %, 15 %, 20 %)
- Auswahl der zu quantifizierenden Tumorregion (Areal höchster Ki-67-Markierung oder alle Felder mit Tumorzellen)
- Zahl der zu analysierenden Zellen (100-1.000)
- Semiquantitative Schätzung in 5 %-Schritten oder Einzelzellauszählung
- Unterschiedliche Antikörper und divergente Antigenaufbereitungen führen zu unterschiedlichen Werten wie ein Ringversuch gezeigt hat [34]

Einen Versuch der Konsensfindung hat es im Jahr 2011 gegeben [35]. Dabei wurden die folgenden Empfehlungen gegeben:

- MIB1 als Standardantikörper
- Mindestens 3 Gesichtsfelder bei stärkster Vergrößerung mit mindestens 500 Zellen auswerten
- Auszählen an der Invasionsfront
- Ausschließlich nukleäre Färbung
- Farbeintensität irrelevant

- Ein einheitlicher Grenzwert ist nicht definierbar. Eine entsprechende Angabe in Hinblick auf Prognose, Prädiktion oder Monitoring sollte nur erfolgen, wenn die lokal verwandte Methodik mittels des jeweiligen Studienmaterials validiert wurde

Bei der gegebenen methodischen Heterogenität sah sich die Expertengruppe außerstande, einen einheitlichen Grenzwert anzugeben und unterscheidet sich dadurch von den St. Gallen-Empfehlungen [35, 20]. Auf die Problematik einer subjektiv beeinflussten Auswertung der Ki-67-Färbung, gerade in dem Bereich, in dem der Grenzwert der St. Gallen-Empfehlung liegt, hat eine jüngste Studie aus der Schweiz hingewiesen [36]. Zusammenfassend objektiviert die Proliferationsbestimmung mit Ki-67 das *Grading* und kann wichtige prognostische und prädiktive Zusatzinformationen liefern. In einem Zwischenbereich von 11-25 % bestehen Unklarheit über die Grenzwerte und eingeschränkte Reproduzierbarkeit. An Gewebestanden ist die Graduierung mit Ki-67 dem traditionellen Mitosezählen überlegen.

5.7. HER2

Ein nach älteren Untersuchungen [37] 30 % betragender, tatsächlich aber deutlich geringerer Anteil der invasiven Mammakarzinome weist eine Überexpression oder Amplifikation von HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) auf und kommt für eine kombinierte Antikörper- und Chemotherapie in Betracht.

Eine HER2-Überexpression oder HER2-Amplifikation zeigt nicht nur einen aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung auf, sondern auch eine potentielle Behandelbarkeit durch gezielte Therapien an.

In Deutschland, Österreich und der Schweiz erfassen seit 2010 mehr als 50 Pathologien regelmäßig die Anzahl ihrer positiven und negativen HER2-Fälle, wobei bis heute Daten von 33.703 Bestimmungen vorliegen.

Danach beträgt die Positivitätsrate (HER2 3+, 2+/amplifiziert) 16,01 % aller invasiven Mammakarzinome [38].

Seit den ersten Arbeiten von Slamon et al [37] ist die enge Korrelation zwischen Überexpression und Amplifikation bekannt.

Hinsichtlich der Bestimmung an Tumorstanzen gilt das unter dem Aspekt der neoadjuvanten Therapie für die Steroidhormonrezeptoren oben festgestellte. Es konnte gezeigt werden, dass die immunhistochemische HER2-Bestimmung (ggf. mit nachfolgendem FISH-Test) auch an der Stanzbiopsie genügend sicher ist [39], wobei Konkordanz zwischen Stanze und Resektat von 86 bis 100 % angegeben werden und diskordante Färberegebnisse vor allem auf eine Überfärbung an der Stanze zurück zu führen sind. Eigene Untersuchungen an über 500 Fällen [von Wasielewski et al. unveröffentlicht] zeigten eine Konkordanz >95 %. Die AGO-Leitlinie verlangt eine Validierung der Immunhistochemie an der Stanzbiopsie. Um eine möglichst hohe Zuverlässigkeit der Immunhistologie zu gewährleisten, wird von internationalen und deutschen Leitlinien eine ausreichende Fixationszeit (mindestens 6 Stunden) auch für die Stanzbiopsien empfohlen [40].

Wir ziehen eine Fixierung über Nacht vor, und die o.g. Konkordanzdaten wurden an entsprechend prozessiertem Material erzielt.

Hinsichtlich der Kategorisierung von HER2-Befunden haben sich die von ASCO und CAP gemachten Empfehlungen durchgesetzt und wurden von der AGO Mamma übernommen. In jüngster Zeit sind sie in die Diskussion geraten, da aufgrund der Reproduzierbarkeit die Ratio HER2 : Centromer 17 von >2,2 festgesetzt wurde, während in den Studien von einer Ratio ≥ 2 als amplifiziert ausgegangen wurde [23]. Nach Aussage der Autoren der ASCO/CAP-Leitlinien zur HER2-Bestimmung liegen keine ausreichenden Daten vor, um Patientinnen mit einer Ratio ≥ 2 und $\leq 2,2$ von einer Trastuzumab-Therapie auszuschließen [23]. Ferner ist die Ratio ein möglicherweise irreführender Wert, da die Centromerregion des Chromosom 17 in ca. 25 % der Fälle von Amplifikationen betroffen sein kann, was die Aussagefähigkeit der Ratio einschränkt [41a].

Eine Studie mit 132 Fällen hat sich dem Problem der Ratiobildung und den scheinbar polysomen Fällen gewidmet, bei denen eine Vermehrung der Kopienzahl von HER2 nicht als therapierelevante Amplifikation gilt [41]. Bei 132 Fällen einer durch-

schnittlichen Signalzahl für Zentromer 17 $> 2,6$ wurde mit anderen auf Chromosom 17 lokalisierten Genen (SMS, RARA, p53) die Polyploidie nachbestimmt. Viele Fälle konnten daraufhin nicht mehr als polysom angesehen werden und der HER2-Status war entsprechend zu korrigieren. Aus 43,9 % nicht amplifizierten wurden amplifizierte Fälle und 92,9 % der Grenzfälle erschienen jetzt amplifiziert. Da 52,4 % der Fälle mit 4-6 HER2-Kopien zu amplifizierten Fällen nach der neuen Ratio wurden, bietet der alternative Gebrauch der absoluten Signalzahl (>6) ohne Ratio keine Gewähr, dass amplifizierte Fälle übersehen werden. Ungefähr 90 % der hochgestuften Fälle stellen sich immunhistochemisch als HER2 2+ dar [41]. Hier bleiben weitere Studien abzuwarten.

Die letzte Zahl zeigt, dass mit einer Nutzung des alternativen Positivkriteriums, das die der Leitlinien statt der Ratio vorsehen (>6 HER2-Signale/Zelle) das Problem der Unterschätzung nur zum Teil ausgeräumt werden kann. Auch die Immunhistochemie löst das Problem nicht auf, da mehr als 90 % der hoch gestuften Fälle immunhistochemisch einen HER2 2+-Status auf wiesen.

Da sich invasive und intraduktale Tumoranteile hinsichtlich der HER2-Amplifikation oder -expression unterschiedlich verhalten können [42], sollte nur die invasive Komponente ausgewertet werden.

Während die Leitlinien von einer Gleichwertigkeit von immunhistochemischer Detektion und *in-situ*-Hybridisierung ausgehen, wurde die mangelnde Standardisierbarkeit und erhöhte Falsch-Positiv- und Falsch-Negativ-Rate der Immunhistochemie problematisiert [43]. Demgegenüber sei die *in-situ*-Hybridisierung im Vergleich von fixiertem zu nativem Gewebe und bei der Vorhersage eines Therapieansprechens wesentlich zuverlässiger und nur in weniger als 5 % der Fälle nicht auswertbar [ebd.].

Aus den Ringversuchen der *Deutschen Gesellschaft für Pathologie* ergab sich, dass die eindeutig negativen und positiven (HER2 0, 1 und 3) Proben einen sehr hohen Grad der Reproduzierbarkeit in der Immunhistochemie aufwiesen und Diskordanzen vor allem bei den 2+-Fällen zu beobachten waren

Positiver HER2-Status	Grenzwertiger HER2-Status	Negativer HER2-Status
<ul style="list-style-type: none"> • Immunhistochemischer Score 3+ (gleichmäßige, starke, die gesamte Zellzirkumferenz erfassende Membranfärbung von >10 % der invasiven Tumorzellen) • <i>und/oder</i> durchschnittliche HER2-Gen-Kopienzahl ≥ 6 pro Zellkern in mindestens 20 zusammenhängenden invasiven Tumorzellen • <i>und/oder</i> ISH/CISH-Ratio positiv: HER2/Chromosom-17-Quotient ≥ 2 in mindestens 20 zusammenhängenden invasiven Tumorzellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunhistochemischer Score 2+ (schwache bis mäßige oder ungleichmäßige, die gesamte Zellzirkumferenz erfassende* Membranfärbung von >10 % der invasiven Tumorzellen oder starke komplette Membranreaktion in ≤ 10 % der invasiven Tumorzellen) • <i>oder</i> durchschnittliche HER2-Gen-Kopienzahl ≥ 4 bis < 6 pro Zellkern • Bei grenzwertigem Testergebnis sind weitere diagnostische Maßnahmen zur Festlegung des HER2-Status erforderlich, was durch eine zusätzliche IHC, ISH und/oder Analyse einer anderen Gewebeprobe bewirkt werden kann 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunhistochemischer Score 0 und 1+ (keine Membranreaktion oder schwache, nicht die gesamte Zellzirkumferenz erfassende Membranfärbung von >10 % der Tumorzellen*) • <i>oder</i> durchschnittliche HER2-Gen-Kopienzahl < 4 pro Zellkern • <i>oder</i> ISH-Ratio negativ: HER2/Chromosom-17-Quotient < 2 bei < 4 HER2-Signalen

Tab. 5.4: Bewertung der HER2-Analyse [61]. *Bei einigen seltenen Fällen von mikropapillären und glandulär wachsenden Mammakarzinomen kann eine inkomplette, aber starke basolaterale U-förmige Membranfärbung vorliegen, die obwohl inkomplett mit einer HER2-Amplifikation einhergeht [61]. In diesen Fällen ist daher trotz inkompletter Färbung als 2+ zu kategorisieren und eine ISH vorzunehmen.

[22]. Hier kann aber durch Schulung ein deutlicher Verbesserungseffekt erzielt werden [22].

Ein zweistufiges Vorgehen mit primärer Immunhistochemie und sekundärer *in-situ*-Hybridisierung bei 2+-Fällen hat sich allgemein durchgesetzt. Als Referenzlabor beobachten wir dabei eine >98 % Übereinstimmung zwischen einem standardisiert und im Färbeautomaten ermitteltem HER2 3+-Status und einer Amplifikation.

Bei den 2+-Fällen sind polyploide Tumoren überrepräsentiert, und nur in etwa 20 % findet sich eine Amplifikation. Zur Sicherstellung einer reproduzierbaren HER2-Detektion im Paraffingewebe sind die folgenden Maßnahmen zu empfehlen:

- Standardisierte Fixierung in gepuffertem Formalin, d.h. in einem 10-fachen Volumenüberschuss an Fixans und ausreichend lange (mindestens 6 h, besser über Nacht), was sich eher an Stanzen realisieren lässt
- Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen auf jedem Immunschnittpräparat einschließlich und besonders einer 2+-Kontrolle
- Großzügige Indikationsstellung zum Zweitverfahren (*in-situ*-Hybridisierung)
- Fortlaufende Erfassung der Positiv- und Negativrate (14 bis 18 % sollten positiv sein)
- Regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen (UK NQAS-ICC, Nordi-QC, Ringversuche der *Deutschen Gesellschaft für Pathologie* [22])
- Gegebenenfalls Inanspruchnahme von Referenzlaboren zur Parallelbestimmung
- Vorgehen nach Leitlinien (☞ Tab. 5.4)

Die Messung der HER2-RNA, wie sie z.B. im Rahmen des Recurrence Score® anfällt, bietet keine sichere Alternative zu den immunhistochemischen Verfahren, da falsch negative Befunde nicht selten sind [44, 45].

Eine in der Literatur vielfach diskutierte Frage betrifft die der Tumorheterogenität. Allerdings zeigen Studien an Hirnmetastasen [46] und andere Vergleiche zwischen Primärtumor und Metastasen einen hohen Grad der Übereinstimmung von 87-100 %. Anders als bei den Steroidhormonrezeptoren kommt es dabei eher zu einer neu auftretenden Expression als zu einem Verlust [19].

Da bei einem intramammären Rezidiv nach brusterhaltender Therapie nicht davon ausgegangen

werden kann, dass klonale Identität besteht und ein Zweitumor ausgeschlossen ist, erscheint eine Neubestimmung sinnvoll. Auch bei Metastasen kommen Änderungen des Expressionsstatus vor, sodass – wann immer möglich – eine Neubestimmung am Metastasengewebe erfolgen sollte.

Ungefähr die Hälfte aller HER2-überexprimierenden oder amplifizierten Mammakarzinomfälle zeigt auch eine Hormonrezeptor-Positivität [47], sodass sich die Frage der Zuordnung zum luminalen oder HER2-Typ stellt.

Da die Expression von HER2 die Empfindlichkeit gegenüber einer endokrinen Therapie herabsetzt und mit einem aggressiveren Verlauf assoziiert ist, wurde die Untergruppe der ER- und HER2-positiven Mammakarzinome in die Luminal B-Kategorie eingeordnet [20]. Da insgesamt nur 16 % der Mammakarzinome HER2-positiv sind, kann diese Eigenschaft nur bei einem kleineren Teil der Östrogenrezeptor-positiven Fälle für die Zuordnung zur luminalen A- oder B-Gruppe angewandt werden (☞ Abb. 5.1).

5.8. Tripel-Negativität

Eine weitere, durch Genexpressionsstudien zunächst beschriebene Entität, die dann rasche Verbreitung in der Literatur gefunden hat, ist der sogenannte basale Phänotyp [1]. Dieser lässt sich noch schwerer als der Luminal A- oder B-Typ in immunhistochemische Definitionen übertragen.

Es ist schon seit langer Zeit bekannt, dass die Expression von EGFR mit einer Östrogenrezeptor-Negativität und einem erhöhten Progressionsrisiko assoziiert ist [48]. Insofern bestätigt die molekulare Definition die klinische Beobachtung einer prognostisch ungünstigen Untergruppe Steroidhormonrezeptor-negativer Mammakarzinome mit aggressivem Verlauf und frühem Rezidiv innerhalb der ersten zwei Jahre. Die molekulare Abgrenzung von den luminalen Typen ergibt sich durch ein differentes RNA-Expressionsprofil (Zytokeratine 5, 17; Laminin, Fettsäurenbindungsprotein, Östrogenrezeptor) [49].

Mit der Bezeichnung “basal” ist allerdings nicht der Ursprung von der basalen Myoepithelschicht der Milchgänge verbunden, wie Genexpressionsstudien zeigen [50]. Das immunhistochemische Äquivalent für den rein molekular definierten Subtyp ist noch nicht einheitlich definiert.

Folgende Marker werden in den zahlreichen Studien in wechselnder Kombination benutzt: basale Zytokeratine 5, 14, 17; EGFR, p63, c-kit, SM actin, P-Cadherin.

Nicht nur die Markerkombination ist dabei uneinheitlich, sondern auch die Grenzwerte, ab der ein Tumor als positiv angesehen werden kann. Die Angaben schwanken zwischen 10 % und 50 % [18]. Dabei gelten die Zytokeratine 4 und 14 sowie EGFR als die entscheidenden Marker [51].

Hervorzuheben ist noch, dass die molekular definierte Gruppe morphologisch sehr heterogen ist und Karzinome unterschiedlicher Histogenese und Subtypen (duktal invasiv, metaplastisch, atypisch medullär, myoepithelial, adenoidzytisch) umfasst.

Von besonderem Interesse ist, dass BRCA1-assoziierte Tumoren und sporadische Tumoren mit Inaktivierung von BRCA1, z.B. durch Hypermethylierung, gehäuft einen basalen Phänotyp aufweisen [51]. Da Inhibitoren der Polyadenosin-Ribosyl-Transferase (sog. PARP-Inhibitoren) in Phase I-Studien bei BRCA1-mutierten Karzinomen eine besondere Wirksamkeit entfaltet haben, rückte der basale Phänotyp weiter in den Mittelpunkt des Interesses [52].

Solange jedoch keine einheitliche immunhistochemische Definition vorliegt, scheint es sinnvoll, die Tripel-Negativität als Surrogat-Marker heranzuziehen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass der basale Phänotyp und der tripel-negative Phänotyp zu 60-80 % ein und dasselbe Kollektiv von Mammakarzinomen bezeichnen [52].

Jedoch ist die Überlappung nicht vollständig, wie aus verschiedenen Beobachtungen hervorgeht. So haben tripel-negative Karzinome mit Expression basaler Marker einen ungünstigeren Verlauf. Ferner exprimieren 8 % der luminalen und auch der HER2-Typen basale Zytokeratine [52].

Dennoch spricht vieles dafür, den Begriff des tripel-negativen Karzinoms als operationalen Terminus zu gebrauchen, da die zu seiner Anwendung nötigen Marker ER, PgR und HER2 bei jedem Mammakarzinom im Rahmen der konventionellen Diagnostik bestimmt werden.

Einschränkend muss festgestellt werden, dass es wegen der oben beschriebenen unterschiedlichen Bewertungen der Östrogenrezeptor-Expression (Tab. 5.1) Unschärfen zu den Rändern gibt. Es finden sich in der Literatur unterschiedliche Grenzwerte Östrogenrezeptor-positiver Zellen: ER <1 %, <5 %, <10 %.

Auch ist nicht klar, wie mit den Grenzfällen bei der HER2-Bestimmung (Tab. 5.3) umzugehen ist. Ob immer die niedrig-gradigen Tumoren, die es auch unter den tripel-negativen Fällen gibt, aus den Studien ausgeschlossen wurden, ist nicht immer ersichtlich.

Zu diesen Tumoren, die zwar tripel-negativ, aber eher niedrig-gradig maligne sind, gehören myoepitheliale Karzinome und Karzinome vom Speicheldrüsentyp.

5.9. Molekulare Expressionsprofile

Eine wesentliche Verbesserung der Differenzierung zwischen Luminal A und B-Typ wird durch Genexpressionsmessungen wie MammaPrint® oder Recurrence Score® erwartet. Allerdings sind diese prognostischen Verfahren noch auf Studien beschränkt und die Ergebnisse der großen Studien MINDACT und TAILORx bleiben abzuwarten. Zwar liegen retrospektive Studien an prospektiv organisierten Studien vor, die jedoch dem Aussagegrad einer prospektiven Studie nicht gleichgesetzt werden können, da aufgrund der nur 14-40 % retrospektiv untersuchten Fälle ein Selektionseffekt nicht ausgeschlossen werden kann. Wichtig erscheint auch, dass dabei ein Vergleich mit den konventionellen Verfahren, wie z.B. in der "Plan-B-Studie", erfolgt. Wird nämlich das Grading standardisiert und ebenfalls unizentrisch durchgeführt und werden immunhistochemische Parameter hinzugezogen (ER, PgR, HER2), ergibt sich keine wesentliche Zusatzinformation durch den Recurrence Score® gegenüber traditionellen pathologischen Parametern. Darauf haben mehrere Studien hingewiesen [53,54]. Darüber hinaus wird auch mit dem Recurrence Score® eine Intermediärgruppe nicht unerheblicher Größe kreiert, die zwischen 30 und 50 % beträgt, sodass ein ähnliches Problem wie beim histopathologischen Grading aufgeworfen wird.

Benutzt man diesen Test, um gerade die intermediäre Risikogruppe, die mit den konventionellen Parametern entsteht, weiter aufzutrennen, fallen 66 % in die uneindeutige Mittelgruppe [55].

Einen neuen dichotomen molekularen Assay bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren ist der EndoPredict®-Test, der bisher aber nur retrospektiv und an zwei Studien validiert worden ist [56]. Im Gegensatz zu den anderen, oben genannten molekularen Expressionsprofilen kann der EndoPredict®-Test dezentral durchgeführt und damit gemeinsam mit den übrigen pathologischen Bestimmungen erhoben, kritisch gewertet und durch die lokale Pathologie in der Tumorkonferenz vertreten werden. Allerdings handelt es sich um einen prognostischen und keinen prädiktiven Test, da das chemotherapeutische Ansprechen der über dem Schwellenwert liegenden Tumorfälle nicht untersucht worden ist.

Bei der Analyse der verschiedenen beim Mammakarzinom prognostischen Genexpressionsprofile stellte sich überraschenderweise heraus, dass sie in nur wenigen einzelnen Genen übereinstimmten. Allerdings konvergieren sie alle darin, dass sie die Zellproliferation als den entscheidenden tumorbiologischen Parameter identifizieren [49,57].

Im Recurrence Score®, in dem neben 15 anderen Tumor-RNA-Molekülen die Ki-67-mRNA mit erfasst wird, ist die Proliferation mit dem höchsten Gewichtungsfaktor versehen [58]. Dieser Befund weist noch einmal auf die Bedeutung der Proliferation als dem entscheidenden prognostischen Marker beim Mammakarzinom hin.

5.10. Literatur

- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Aksten LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-52.
- Da Silva L, Clarke C, Lakhani SR. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 2007; 60:1328-32.
- Gusterson B. Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 9 2009; :128-34.
- Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009; 20:1319-29.
- Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, Ellis P, Harris A, Bergh J, Foekens JA, Klijn JG, Larsimont D, Buyse M, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart MJ, Sotiriou C. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol.* 2007; 25:1239-46.
- Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, Skelly JM, Anderson SJ, Harlow SP, Julian TB, Mamounas EP, Wolmark N. Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2011;364:412-21.
- de Boer M, van Deurzen CH, van Dijk JA, Borm GF, van Diest PJ, Adang EM, Nortier JW, Rutgers EJ, Seynaeve C, Menke-Pluymers MB, Bult P, Tjan-Heijnen VC. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361:653-63.
- Bulte CS, van der Heiden-van der Loo M, Hennipman A (2009) Axillary recurrence rate after tumour negative and micrometastatic positive sentinel node procedures in breast cancer patients, a population based multicenter study. *Eur J Surg Oncol* 35:25-31.
- Maaskant-Braat AJ, van de Poll-Franse LV, Voogd AC, Coebergh JW, Roumen RM, Nolthenius-Puylaert MC, Nieuwenhuijzen GA. Sentinel node micrometastases in breast cancer do not affect prognosis: a population-based study. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;127:195-203
- Pugliese M, Stempel M, Patil S, Hsu M, Ho A, Traina T, Morrow M, Cody H 3rd, Gemignani ML. The clinical impact and outcomes of immunohistochemistry-only metastasis in breast cancer. *Am J Surg.* 2010;200:368-73.
- Jensen AJ, Naik AM, Pommier RF, Vetto JT, Troxell ML. Factors influencing accuracy of axillary sentinel lymph node frozen section for breast cancer. *Am J Surg.* 2010; 199:629-35.
- Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A, Akiyama F. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: A comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer.* 2011;117:4365-74
- Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder C, Batic O, Jonat W, Tiemann K. One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch.* 2009;454:203-10.
- Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, Ueda S, Mano M, Masuda N, Takeda M, Tsujimoto M, Yoshidome K, Inaji H, Nakajima H, Komoike Y, Kataoka TR, Nakamura S, Suzuki K, Tsugawa K, Wakasa K, Okino T, Kato Y, Noguchi S, Matsuura N. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-

- step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2879-84.
15. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353:793-802.
 16. Pantel K, Riethdorf S. Pathology: are circulating tumor cells predictive of overall survival? *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6:190-1.
 17. Dalton LW, Pinder SE, Elston CE, Ellis IO, Page DL, Dupont WD, Blamey RW. Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement. *Mod Pathol.* 2000;13:730-5.
 18. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, Belau A, Khandan F, Hauschild M, Thomssen C, Högel B, Darb-Esfahani S, Mehta K, Loibl S. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Nov;124(1):133-40.
 19. Minckwitz von G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J, Jackisch C, Kaufmann M, Konecny GE, Denkert C, Nekljudova V, Mehta K, Loibl S. Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol.* 2012;30:1796-804.
 20. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24:2206-23.
 21. Collins LC, Marotti JD, Baer HJ, Tamimi RM. Comparison of estrogen receptor results from pathology reports with results from central laboratory testing. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:218-21
 22. Wasielewski von R, Hasselmann S, Rüschoff J, Fissler-Eckhoff A, Kreipe H. Proficiency testing of immunohistochemical biomarker assays in breast cancer. *Virchows Arch.* 2008; 453:537-43.
 23. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:2784-95.
 - 23a. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998; 11:155-168.
 - 23b. Remmele W and Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987;8:138-140.
 24. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol.* 2005; 16:1723-39.
 25. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11:174-83.
 26. Kwok TC, Rakha EA, Lee AH, Grainge M, Green AR, Ellis IO, Powe DG. Histological grading of breast cancer on needle core biopsy: the role of immunohistochemical assessment of proliferation. *Histopathology.* 2010;57(2):212-9.
 27. Wasielewski von R, Klöpffer K, Lück HJ, Kreipe H. Improvement of breast cancer grading in punch biopsies: grading with the Ki-67 marker. *Pathologe* 2006; 27:337-45.
 28. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, Maiorano E, MacGrogan G, Braye SG, Ohlschlegel C, Neven P, Orosz Z, Olszewski WP, Knox F, Thürlimann B, Price KN, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Gusterson BA, Goldhirsch A; Breast International Group Trial 1-98. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol.* 2008;26:5569-75.
 29. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008;17:323-34.
 30. O'Shea AM, Rakha EA, Hodi Z, Ellis IO, Lee AH. Histological grade of invasive carcinoma of the breast assessed on needle core biopsy - modifications to mitotic count assessment to improve agreement with surgical specimens. *Histopathology.* 2011;59:543-8.
 31. Penault-Llorca F, André F, Sagan C, Lacroix-Triki M, Denoux Y, Verrièle V, Jacquemier J, Baranzelli MC, Bibeau F, Antoine M, Lagarde N, Martin AL, Asselain B, Roché H. Ki67 expression and docetaxel efficacy in pa-

- tients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:2809-15.
32. Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS, Smith IE, Dowsett M. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 116:53-68.
33. Minckwitz von G, Sinn HP, Raab G, Loibl S, Blohmer JU, Eidtmann H, Hilfrich J, Merkle E, Jackisch C, Costa SD, Caputo A, Kaufmann M; German Breast Group. Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R30.
34. Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, Rüdiger T, Müller-Hermelink HK, Kreipe H. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol.* 2002; 198:292-9.
35. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF; International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1656-64.
36. Varga Z, Diebold J, Dommann-Scherrer C, Frick H, Kaup D, Noske A1, Obermann E, Ohlschlegel C, Padberg B, Rakoczy C, Sancho Oliver S, Schobinger-Clement S, Schreiber-Facklam H, Singer G, Tapia C, Wagner U, Mastropasqua MG, Viale G, Lehr HA. How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA study of the Swiss working group of breast and gynecopathologists. *PLoS One.* 2012;7(5):e37379.
37. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707-12.
38. Choritz H, Büsche G, Kreipe H; Study Group HER2 Monitor (2011) Quality assessment of HER2 testing by monitoring of positivity rates. *Virchows Arch.* 2011; 459:283-9.
39. Lebeau A, Turzynski A, Braun S, Behrhof W, Fleige B, Schmitt WD, Grob TJ, Burkhardt L, Hölzel D, Jackisch C, Thomssen C, Müller V, Untch M. Reliability of human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemistry in breast core needle biopsies. *J Clin Oncol.* 2010; 28:3264-70.
40. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25:118-45.
40. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA, McConkey C, Jordan S, Twelves CJ, Cameron DA, Thomas J, Campbell FM, Rea DW, Provenzano E, Caldas C, Pharoah P, Hiller L, Earl H, Poole CJ (2010) Predictive markers of anthracycline benefit: a prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601). *Lancet Oncol* 11:266-74
41. Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC, Kandalaf PL, Wiley JC, Kussick SJ, Gown AM. Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy. *J Clin Oncol.* 2011; 29:4168-74
42. Lehmann U, Glöckner S, Kleeberger W, von Wasielewski HF, Kreipe H. Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 2000; 156:1855-64.
43. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol.* 2009; 10:1323-33
44. Christgen M, Harbeck N, Gluz O, Nizze U, Kreipe H. Recognition and handling of discordant negative human epidermal growth factor receptor 2 classification by Oncotype DX in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:3313-4..
45. Dabbs DJ, Klein ME, Mohsin SK, Tubbs RR, Shuai Y, Bhargava R. High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study. *J Clin Oncol.* 2011;29:4279-85.
46. Gaedcke J, Traub F, Milde S, Wilkens L, Stan A, Ostertag H, Christgen M, von Wasielewski R, Kreipe HH. Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. *Mod Pathol.* 2007; 20:864-70.
47. Untch M, Gelber RD, Jackisch C, Procter M, Baselga J, Bell R, Cameron D, Bari M, Smith I, Leyland-Jones B, de Azambuja E, Wermuth P, Khasanov R, Feng-Yi F, Constantine C, Mayordomo JI, Su CH, Yu SY, Lluch A, Senkus-Konefka E, Price C, Haslbauer F, Suarez-Sahui T, Srimuninnimit V, Colleoni M, Coates AS, Piccart-Gebhart MJ, Goldhirsch A; HERA Study Team. Estimating

- the magnitude of trastuzumab effects within patient subgroups in the HERA trial. *Ann Oncol*. 2008;19:1090-6.
48. Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*. 1987;1(8547):1398-402.
49. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360:790-800.
50. Bockmeyer CL, Christgen M, Müller M, Fischer S, Ahrens P, Länger F, Kreipe H, Lehmann U (2011) MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 130:735-45.
51. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363:1938-48
52. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, Koo IC, Sherman BM, Bradley C. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2011;364:205-14.
53. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO, Howell A, Buzdar AU, Forbes JF. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:4273-8.
54. Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod Pathol*. 2008; 21:1255-61.
55. Kelly CM, Krishnamurthy S, Bianchini G, Litton JK, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Pusztai L. Utility of oncotype DX risk estimates in clinically intermediate risk hormone receptor-positive, HER2-normal, grade II, lymph node-negative breast cancers. *Cancer*. 2010;116: 5161-7.
56. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R, Jelen A, Sevelde P, Freibauer C, Müller V, Jänicke F, Schmidt M, Kölbl H, Rody A, Kaufmann M, Schroth W, Brauch H, Schwab M, Fritz P, Weber KE, Feder IS, Hennig G, Kronenwett R, Gehrman M, Gnant M; EP Investigators. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 6012-20.
57. Ignatiadis M, Sotiriou C. Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology* 2008; 75:104-11.
58. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Bahner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multi-gene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2817-26.
59. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101:736-50.
60. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC. Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and Her2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:e458
61. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997-4013.

HER2 – Stellenwert in der Diagnostik und Therapie für das Gesamtbehandlungs- konzept beim Mammakarzinom

6. HER2 – Stellenwert in der Diagnostik und Therapie für das Gesamtbehandlungskonzept beim Mammakarzinom

6.1. Einleitung

Eine Zielstruktur in der Therapie von Mammakarzinomen stellen die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren dar. Besondere Aufmerksamkeit wurde in den letzten Jahren dem Humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (c-erbB-2 oder HER2/*neu* oder HER2) geschenkt. Das neu-Onkogen wurde aus Neuro-Glioblastomen von Ratten im Jahre 1984 durch die Arbeitsgruppe von Robert A. Weinberg am *Whitehead Institute for Biomedical Research*, Cambridge, USA entdeckt und von Axel Ullrich und Kollegen kloniert [1a]. Die klinische Relevanz von HER2 wurde zwei Jahre später erkannt als Dennis Slamon (*University of California*, Los Angeles) eine Untergruppe von Mammakarzinompatientinnen identifizierte, deren Tumore durch eine Amplifikation des HER2-Gens charakterisiert waren [1b].

Die nachfolgende Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen HER2, dessen Einsatz inzwischen als Standardtherapie beim HER2-positiven Mammakarzinom gilt sowie die Weiterent-

wicklung von innovativen anti-HER2 gerichteten Therapieansätzen (Lapatinib, Pertuzumab, T-DM1) stellt eine noch immer andauernde Erfolgsgeschichte in der translationalen Forschung dar.

6.1.1. Das HER2-Onkogen

Das HER2-Gen ist auf Chromosom 17q lokalisiert und kodiert einen 185 kDa großen transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptor. Ein eigener Ligand für den Rezeptor ist nicht bekannt. Vielmehr stabilisiert HER2 durch Homo- und Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren der HER-Familie wie dem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-1 (EGFR, HER1), HER3 oder HER4 die Funktion der Rezeptoren. Die nachgeschalteten Signalkaskaden in der Zelle werden aktiviert, die für Zellproliferation, Tumorneubildung, Zellmobilität, Invasion, Angiogenese verantwortlich sind und zum Überleben der Tumorzelle führen. Die heterodimere Formation HER2/HER3 weist die intensivste Signalstärke [2]. HER2 ist der häufigste Dimerisierungspartner für die anderen Rezeptoren der HER-Familie.

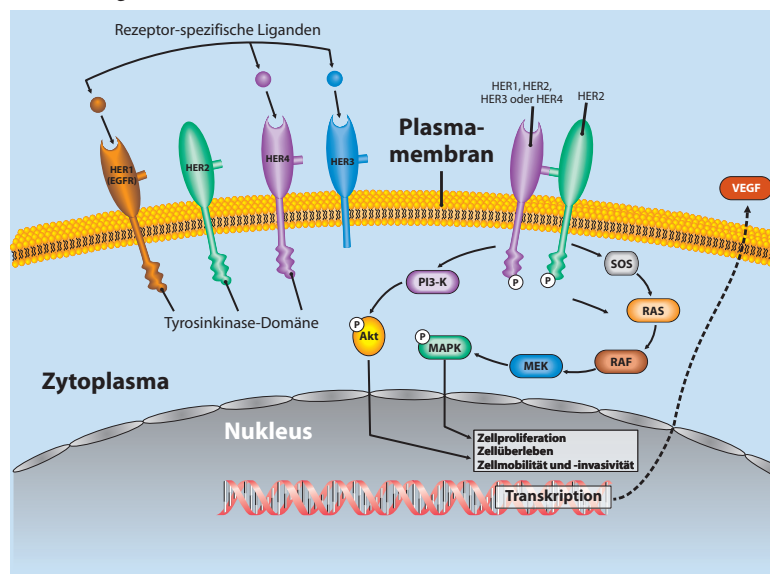


Abb. 6.1: HER-Familie und intrazelluläre Signalkaskade. Eine Homo- oder Heterodimerisierung führt zur Aktivierung der Signalkaskade (modif. nach C. Hudis, *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*, New York) [3].

6.1.2. Klinischer Stellenwert von HER2

Das Protein HER2 wird in ca. 15-20 % der frühen Mammakarzinome immunhistochemisch detektiert und der Krankheitsverlauf der Patientinnen ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert [1, 4, 5]. Klinisch werden luminal-HER2-positive (ca. 6,5 %) und nichtluminal-HER2-positive (ca. 7,1 %) Karzinome unterschieden (Abb. 6.2).

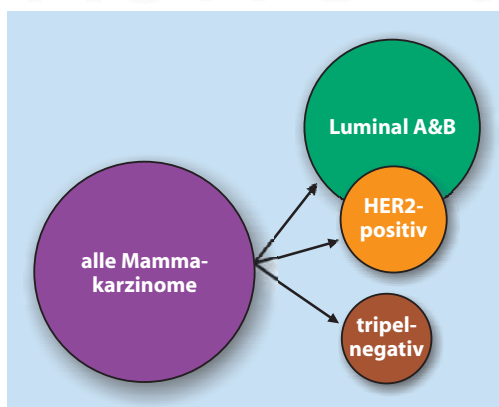


Abb. 6.2: Relative Verteilung der HER2-positiven Mammakarzinome in der Gruppe aller Mammakarzinome.

Die Entwicklung einer zielgerichteten Antikörpertherapie gegen HER2 (Trastuzumab, Herceptin®, Genentech, San Francisco, USA) hat zu einem deutlichen Überlebensvorteil in der Therapie des Mammakarzinoms geführt [6-8]. Diese Therapie wurde 1998 für die metastasierte Situation, 2006 für die adjuvante Therapie des nodal-positiven Mammakarzinoms und 2008 für die adjuvante Therapie des nodal-negativen Mammakarzinoms zugelassen [9]. Inzwischen gehört sie zum Standard des adjuvanten sowie palliativen Behandlungskonzepts beim Mammakarzinom. Weitere anti-HER2 gerichtete Therapieansätze sind zwischenzeitlich entwickelt worden, hierzu gehören der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib, der Antikörper Pertuzumab und das an ein Zytostatikum gekoppelte Trastuzumab-Emantasine (T-DM1). Bedingung für die Therapie ist eine HER2-Überexpression bzw. Amplifikation des Primärtumors bestimmt mittels Immunhistochemie oder FISH-Analyse. Es ist allerdings immer noch unklar, wie das Therapieansprechen unter der Therapie optimal beurteilt werden kann. Dies gilt vor al-

lem für die palliative Therapie. Aber auch in der neoadjuvanten und adjuvanten Therapiesituation fehlen Marker, die ein Therapieansprechen vorhersagen können.

6.1.3. Prädiktiver Wert

Die Detektion von HER2 ist der einzige geeignete prädiktive Marker, der das Ansprechen auf die HER2-zielgerichtete Therapie vorhersagen kann. Die Kombination von Hormonrezeptor- und HER2-Status kann als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine neoadjuvante anthrazyklin- und/oder taxanhaltige Chemotherapie verwendet werden. Die höchsten pathologischen Komplettremissions-Raten (pCR-Raten; ypT0 & ypN0) können bei Hormonrezeptor-negativen/HER2-positiven Tumoren erreicht werden, deutlich niedrigere Raten bei Hormonrezeptor-positiven/HER2-positiven Tumoren.

Das Erreichen einer pathologischen Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie ist bei HER2-positiven Patientinnen mit einer signifikanten Risikoreduktion für ein Rezidiv und geringerer Mortalität assoziiert. HER2-Positivität kann mit einer Resistenz gegenüber endokriner Therapie aufgrund von Interaktionen ("Crosstalk") zwischen HER2-Signaltransduktion und den Östrogen-Stoffwechselwegen verbunden sein [10].

PIK3CA-Mutationen kommen häufiger bei HER2-positiven als bei tripel-negativen Tumoren (21 % vs. 7 %) vor. Bestehen Mutationen, ist die pathologische komplette Remission trotz dualer HER2-Blockade erniedrigt.

6.2. Stellenwert in der Diagnostik

■ Nachweismethoden für HER2

Die optimale Bestimmungsmethode von HER2 steht aktuell nicht fest und es wird vielmehr von diskordanten Ergebnissen verschiedener zentraler und dezentraler Untersuchungsmethoden berichtet [11, 12].

Die HER2-Genamplifikation, die Amplifikation der mRNA bzw. die Expression des HER2-Proteins können mit unterschiedlichen Methoden bestimmt werden, wobei in diesem Kapitel nur auf die gängigsten Verfahren eingegangen werden soll.

6.2.1. HER2-Genamplifikation

6.2.1.1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Bei der FISH werden Zellen von Paraffinschnitten aus Tumorgewebe mit einer HER2- Gensonde und ggf. einer Kontroll-Sonde (Zentromerprobe für das Chromosom 17) hybridisiert und mit Hilfe eines Mikroskops die Anzahl der Hybridisierungssignale ausgewertet (☞ Abb. 6.3).

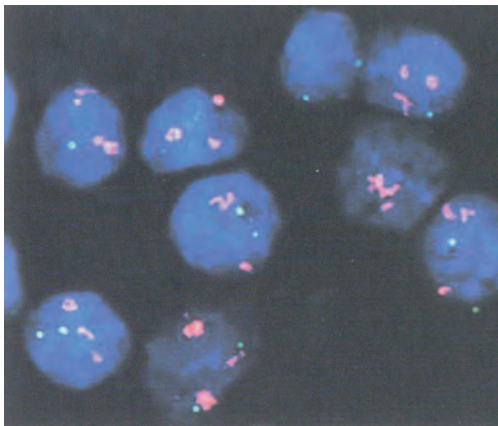


Abb. 6.3: HER2-Bestimmung durch FISH bei einem HER2-positivem Mammakarzinom mit dem 2-Farben-PathVysion-Test (Abbott/Vysis). Rote Signale = HER2-Kopien; Grüne Signale = Chromosom 17 Kopien (CEP 17). Tumorzellen mit starker HER2-Amplifikation. Das Verhältnis HER2 zu CEP 17 ist größer und bedeutet HER2-Positivität (Prof. Dr. R. Bollmann, Patholog. Institut Bonn-Duisdorf; Prof. Dr. A. Bankfalvi, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen).

Es wird entweder die Anzahl der Kopie des HER2-Gens ausgezählt oder das Verhältnis der Anzahl der Kopie des HER2-Gens zum Zentromer bestimmt. Anhand der Anzahl der Signale kann die HER2-Amplifikationsrate bestimmt werden. Dabei werden beim PathVysion Kit die HER2-Genkopien mit den Genkopien des Zentromers des Chromosoms 17 in Relation gesetzt und die Ratio bestimmt. Ein positiver HER2-Status ist hier definiert als Quotient der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Gensignale und der durchschnittlichen Anzahl der CEP 17-Zentromersignale (HER2/CEP17 Ratio) von 2,0 oder mehr in mindestens 20 kohäsiven Zellen. Bei anderen HER2-Testsystemen wird nur die Anzahl der HER2-

spezifischen Signale pro Tumorzellkern bestimmt. Ein Durchschnittswert von ≥ 6 HER2-Signalen pro Tumorzellkern wird hierbei dann als Amplifikation bezeichnet. 4 oder 5 HER2-Genkopien pro Zellkern werden als fraglich amplifiziert angesehen (☞ Tab. 6.2).

6.2.1.2. Chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH)

CISH verwendet anstelle eines Fluoreszenz-Farbstoffes ein Chromogen zur Sondenmarkierung. Dies macht die Auswertung der Gensignale mit einem Lichtmikroskop möglich und vereinfacht dadurch auch die Beurteilung der Tumormorphologie. Mittels Peroxidase-Reaktion werden die HER2-Gensignale als braune Punkte sichtbar. Die CISH-Technik verwendet allerdings – anders als die FISH-Technik – keine Sonde zur Darstellung des Zentromers von Chromosom 17, so dass eine direkte Aussage über eine eventuell vorhandene Polyploidie nicht möglich ist.

Eine endgültige Übereinkunft über den Stellenwert der CISH-Technik in der HER2-Diagnostik ist noch nicht getroffen.

6.2.1.3. Silver-enhanced *in-situ* hybridization (SISH)

SISH verwendet ebenfalls ein Chromogen zur Sondenmarkierung. Die Visualisierung erfolgt wie bei der CISH mit einem Lichtmikroskop, die HER2-Gensignale erscheinen als schwarze, die Zentromer 17-Gensignale als rote Signale. Der INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe cocktail assay (HER2 Dual ISH) wurde von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen.

6.2.2. Überexpression des HER2-Proteins

■ Immunhistochemie

Es existiert ein standardisierter Antikörper der Firma DAKO, mit welchem die HER2-Expression semiquantitativ durchgeführt wird. Dabei werden zum einen die Färbereaktion sowie die Anzahl der gefärbten Zellen beurteilt (☞ Tab. 6.1 + Abb. 6.4).

Score	Reaktionsmuster	Bewertung
0	keine Färbereaktion oder < 10 % der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran	negativ
1+	> 10 % der invasiven Tumorzellen mit schwacher inkompletter Markierung der Zellmembran	negativ
2+	> 10 % der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbintensität gering bis mittelgradige oder starke zirkuläre Markierung der Zellmembran in < 30 %	schwach positiv (geringe HER2-Überexpression)
3+	> 30 % der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbintensität stark	stark positiv (starke HER2-Überexpression)

Tab. 6.1: Auswertung der Immunhistochemie zur HER2-Bestimmung. Es werden die Färbereaktion sowie die Anzahl der gefärbten Zellen beurteilt.

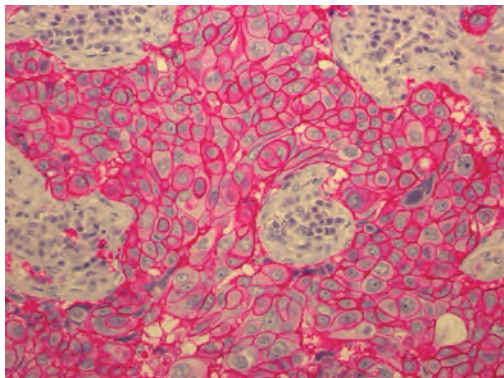


Abb. 6.4: HER2-positives invasiv-duktales Mammakarzinom (DAKO-Score 3+) (Pathol. Institut Klinikum Lüdenscheid, Prof. Dr. J. Friemann).

6.2.3. Definition der HER2-Positivität

Frühe Studien mit Trastuzumab in der metastasierten Situation schlossen Patientinnen ein, deren HER2-Status mittels Immunhistochemie und dem Antikörper 4D5 oder CB-11 auf Formalinfixiertem Paraffingewebe bestimmt worden war.

Die Färbereaktion wurde als negativ (0 und 1+) bzw. positiv (2+ und 3+) bewertet. Nur Patientinnen mit 2+ oder 3+-Färberegebnis wurden in die Studien eingeschlossen. Retrospektive Analysen zeigten dann allerdings, dass nur Patientinnen mit 3+ Färberegebnis von Trastuzumab profitierten. Nur ca 25 % der Patientinnen mit 2+ Färbereaktion zeigten tatsächlich eine Genamplifikation in der FISH-Analyse.

Die FDA hat 2 immunhistochemische Assays (HercepTest™; DAKO, Carpinteria, CA; und PATHWAY; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) und drei Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs (FISH)-Assays (PathVysion; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL; INFORM; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ und pharmDx™, DAKO, Glostrup, Denmark) zugelassen. Die *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) und das *College of American Pathologists* (CAP) haben Guidelines für die Beurteilung der HER2-Positivität erstellt, die 2013 erweitert wurden (☞ Tab. 6.2).

In der klinischen Praxis wird meist die preisgünstigere Immunhistochemie durchgeführt und nur bei unklaren Befunden (IHC 2+) durch eine (F)ISH-Analyse ergänzt (☞ Abb. 6.5). Eine eindeutige HER2-Positivität liegt vor, wenn eine starke komplette zirkuläre Membranfärbung von über 10 % invasiver Zellen vorliegt (IHC 3+).

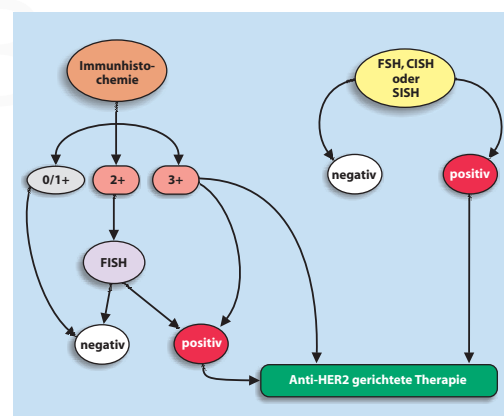


Abb. 6.5: Algorithmus zur Bestimmung der HER2-Positivität.

6.2.4. Intratumorale Heterogenität – low level HER2-Status

Ein Teil der Tumoren von Brustkrebspatientinnen zeigt eine intratumorale Heterogenität, so dass die

HER2-Status	IHC	ISH
positiv	3+	<ul style="list-style-type: none"> • Single Probe durchschnittliche HER2-Genkopien > 6 Signale pro Zellkern • Duale Probe HER2/CEP17 Ratio ≥ 2 mit durchschnittlichen HER2-Genkopien ≥ 4 Signalen pro Zellkern • Duale Probe HER2/CEP17 Ratio ≥ 2 mit einer durchschnittlichen HER2-Genkopien < 4 Signalen pro Zellkern • Duale Probe HER2/CEP17 Ratio < 2 mit einer durchschnittlichen HER2-Genkopien ≥ 6 Signalen pro Zellkern
unklar	2+	<ul style="list-style-type: none"> • Single Probe durchschnittliche HER2-Genkopien ≥ 4 und < 6 Signalen pro Zellkern • Duale Probe HER2/CEP17 Ratio < 2 mit durchschnittlichen HER2-Genkopien ≥ 4 und < 6 Signalen pro Zellkern
negativ	0 und 1+	<ul style="list-style-type: none"> • Single Probe durchschnittliche HER2-Genkopien < 4 Signalen pro Zellkern • Duale Probe HER2/CEP17 Ratio < 2 mit durchschnittlichen HER2-Genkopien < 4 Signalen pro Zellkern

Tab. 6.2: Definition des HER2-Status in Abhängigkeit von der Immunhistochemie und der *in-situ*-Hybridisierung nach der American Society of Clinical Oncology (ASCO) und dem College of American Pathologists (CAP) 2013 [13].

HER2-Expression nicht die definierten Kriterien für die HER2-Positivität erfüllt (☞ Tab. 6.2). Ob Patientinnen mit intratumoraler Heterogenität für HER2 eine anti-HER2-gerichtete Therapie erhalten sollen, ist unklar, wird jedoch zum aktuellen Zeitpunkt nicht empfohlen. Es gibt Hinweise darauf, dass auch Patientinnen mit low-level HER2-Status eine eher ungünstige Prognose haben.

6.2.5. Extrazelluläre Domäne von HER2

Die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors kann von der Zelloberfläche abgeschilfert (sog. *cleavage, shedding*) und als 105 kDa schweres Protein im Serum nachgewiesen werden. Die Abspaltung der extrazellulären Domäne lässt einen “gestutzten” oder “verstümmelten” Rezeptor zurück (*truncated p95 protein*, p95 HER2) und kann zur HER3-Phosphorylierung führen und damit den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren.

Die p95-Expression bzw. der trunkierte Rezeptor p95 HER2, der seine extrazelluläre Domäne verloren hat, wird mit einer Trastuzumab-Resistenz in Verbindung gebracht, hierzu gibt es jedoch widersprüchliche Studienergebnisse.

In einigen Studien wurde die Wertigkeit der Serumbestimmung in der metastasierten und adjuvanten Therapiesituation untersucht. In einer ge-

poolten Analyse von 7 Studien mit Trastuzumab first-line mit und ohne Chemotherapie konnte gezeigt werden, dass Patientinnen bei einem Abfall von Serum-HER2 unter der Therapie ein höheres Ansprechen auf die Therapie mit Trastuzumab (57 % vs. 28 %) und ein verlängertes progressionsfreies Überleben aufwiesen [14]. Trotzdem schlussfolgerte eine separate Analyse von 63 Studien, dass Serum-HER2 nicht konsistent mit dem Outcome der Patientinnen korrelierte [15]. Die Untersuchung von Serum-HER2 wird in der klinischen Routine nicht empfohlen.

6.3. Anti-HER2-gerichtete Therapieansätze

6.3.1. Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin®) ist ein rekombinanter, humanisierter monoklonaler IgG1-Antikörper (rhMAB4D5), der aus einer Säugetierzelllinie (Ovarialzellen des chinesischen Hamsters) im kontinuierlichen Durchflussverfahren gewonnen wird. Trastuzumab ist in Europa seit 2000 als erste zielgerichtete anti-HER2-Therapie zugelassen. Trastuzumab ist Standard in der neoadjuvanten, adjuvanten und palliativen Therapie des Mammakarzinoms.

■ Wirkungsweise

Trastuzumab bindet an die extrazelluläre Domäne von HER2, verhindert die Hetero- bzw. Homodimerisierung des Rezeptors und hat durch Unterbrechung der HER2-vermittelten Signaltransduktionswege einen ausgeprägten antiproliferativen Effekt. Ein durch natürliche Killerzellen vermittelter zytotoxischer Effekt führt zur Endozytose und zum Abbau des Rezeptors (Abb. 6.6) [16].

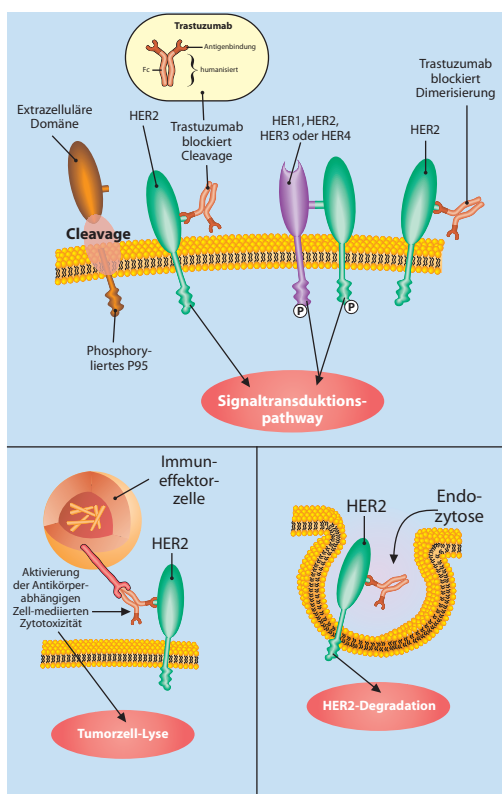


Abb. 6.6: Wirkung von Trastuzumab an der Tumorzelle. Trastuzumab blockiert die Abspaltung der extrazellulären Domäne (*Cleavage, Shedding*) und verhindert die Dimerisierung (Homo-/Hetero-), durch zytotoxische Effekte nach Internalisierung kommt es zur Auflösung des Rezeptors in der Zelle (mod. n. C. Hudis, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York) [3].

De novo und erworbene Trastuzumab-Resistenzen stellen in der Behandlung des frühen und fortgeschrittenen HER2-positiven Mammakarzinoms ein klinisches Problem dar [10]. Ursachen können unter anderem sein: Downregulation oder Fehlen des Phosphatase- und Tensin-Homologs PTEN,

PIK3-CA Mutationen oder die Kombination von PIK3-CA Mutation und PTEN-Verlust.

■ Dosis und Dauer der Trastuzumab-Therapie

Die Gabe erfolgt meist nach einer Initialdosis von 8 mg/kg Körpergewicht (KG) in einer Dosierung von 6 mg/kg KG alle drei Wochen i.v., im Rahmen einer wöchentlichen Chemotherapie auch als wöchentliche Gabe mit 2 mg/kg KG nach einer Initialdosis von 4 mg/kg KG, meist in Kombination mit einer Anthrazyklin/Taxan-haltigen oder Anthrazyklin-freien taxanhaltigen Chemotherapie.

Seit August 2013 ist eine subkutane Formulierung von Trastuzumab zugelassen, nachdem in der HannaH-Studie die Nichtunterlegenheit der dreiwöchentlichen s.c. Gabe von 600 mg gegenüber der dreiwöchentlichen i.v. Gabe von 6 mg/kg KG bei HER2-positivem Mammakarzinom im Frühstadium bewiesen wurde.

Für die sechsmonatige Therapie mit Trastuzumab konnte die Gleichwertigkeit zur standardmäßigen einjährigen Therapie nicht bewiesen werden.

Die Daten der HERA-Studie zeigen, dass eine zweijährige, adjuvante Trastuzumab-Therapie im Vergleich zur einjährigen Therapie keine Vorteile bzgl. des rezidivfreien und Gesamt-Überlebens erbringt, aber die Nebenwirkungsrate erhöht.

■ Nebenwirkungen

Zu den Nebenwirkungen gehören grippeähnliche Symptome und Fieber, die meist nur bei der Erstgabe auftreten. Kardiale Dysfunktionen treten bei ca. 5 % der Patientinnen auf. Der Mechanismus der kardialen Dysfunktion unter der anti-HER2-Therapie kann durch den HER2-Signaltransduktionsweg im Kardiomyozyten erklärt werden. HER2-Signalling ist für eine normale Herzfunktion wichtig und schützt den Kardiomyozyten vor Schäden aufgrund von Hypoxie oder oxidativem Stress. Vor einer, während (alle 3 bis 6 Monate) und am Ende einer anti-HER2-gerichteten Therapie sollte die Ejektions-Fraktion des linken Ventrikels (LVEF) durch Echokardiographie untersucht werden. Patientinnen mit einer LVEF <50 % haben ein höheres Risiko einer Myokardschädigung durch die Therapie zu erwarten.

6.3.2. Lapatinib

Ein weiterer anti-HER2-gerichteter Therapieansatz besteht in der intrazellulären Blockade der Ty-

rosinkinase. Im Gegensatz zu Trastuzumab stellt Lapatinib keinen Antikörper dar, sondern wirkt als kleines Molekül (*“small molecule”*) intrazellulär und hemmt dort als dualer Tyrosinkinase-Inhibitor die Tyrosinkinase-Komponente der HER1- und HER2-Rezeptoren.

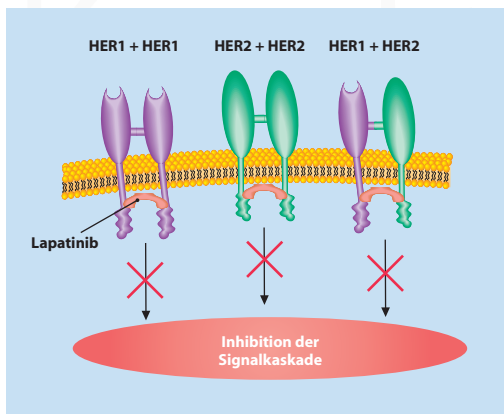


Abb. 6.7: Lapatinib blockiert das *“Signaling”* über HER1- und HER2-Homodimere (1+1, 2+2) und -Heterodimere (1+2), indem es die intrinsische Kinaseaktivität des Rezeptors im Zytoplasma durch die Blockierung der ATP-Bindestelle hemmt. Es kommt zu keiner Signaltransduktion zum Kern, Proto-Onkogene werden nicht aktiviert.

■ Wirkungsweise

Lapatinib bindet reversibel an die zytoplasmatische ATP-bindende Stelle der Kinase, verhindert dadurch eine Rezeptor-Phosphorylierung und Aktivierung und blockiert MAPK/Akt-Signaltransduktionswege (Abb. 6.1).

Wegen der im Vergleich zu den Antikörpern geringen Molekülgröße wird vermutet, dass Lapatinib besser die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Lapatinib wird unter dem Handelsnamen Tykerb® (USA) bzw. Tyverb® (Europa) vermarktet. In Europa ist Lapatinib seit 2008 zugelassen

- in Kombination mit Capecitabin bei Patientinnen mit fortgeschrittener oder metastasierter Erkrankung, die nach vorangegangener Therapie, die Anthrazykline und Taxane sowie in der metastasierten Situation Trastuzumab einschloss, progredient verläuft,
- in Kombination mit Trastuzumab bei Patientinnen mit Hormonrezeptor-negativer metastasierter Erkrankung, die nach vorangegangener

ne(r/n) Trastuzumab-Therapie(n) in Kombination mit Chemotherapie progredient verläuft und

- in Kombination mit einem Aromatase-Inhibitor bei postmenopausalen Frauen mit Hormonrezeptor-positiver metastasierter Erkrankung, die derzeit nicht für eine Chemotherapie vorgesehen sind.

■ Nebenwirkungen

Bei der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren ist auf Wechselwirkungen zu achten:

- CYP3A4-Induktoren wie Antibiotika (Rifampicin), Antikonvulsiva (Phenytoin, Carbamazepine, Barbiturate), antiretrovirale Medikamenten (Efavirenz, Nevirapine), oralen Glucocorticoiden (Dexamethasone, Prednison), die die Lapatinib-Konzentration vermindern.
- CYP3A4-Inhibitoren wie u.a. Antibiotika (Clarithromycin), Antimykotika (Itraconazol, Ketoconazol), antiretrovirale Verbindungen (Amprenavir, Ritonavir), Kalziumblocker (Verapamil, Diltiazem), Antidepressiva (Nefazodon, Fluvoxamin), G1 agierende Verbindungen (Cimetidin, Aprepitant) und CYP3A4 inhibierende Früchte wie die Grapefruit, die die Lapatinib-Konzentration erhöhen können.

Hauptnebenwirkungen der Lapatinibtherapie bestehen in Diarrhoe (46 %), Hautausschlägen (32 %) und Pruritus (22 %). Auch unter Lapatinib sollte eine regelmäßige Kontrolle der linksventrikulären Auswurfraction (LVEF) erfolgen. Die Gabe von Lapatinib in Bezug auf die Nahrungsaufnahme sollte standardisiert werden, zum Beispiel durch Einnahme immer eine Stunde vor der ersten Tagesmahlzeit. In Abhängigkeit z.B. vom Fettgehalt in der Mahlzeit wird die Bioverfügbarkeit von Lapatinib durch die Nahrung bis um das 4-fache erhöht. Zudem ist die Bioverfügbarkeit in Abhängigkeit von der Art der Nahrung um etwa das 2- bis 3-fache höher, wenn Lapatinib eine Stunde nach einer Mahlzeit im Vergleich zu einer Stunde vor der ersten Tagesmahlzeit eingenommen wird.

■ Dosis und Dauer der Lapatinib-Therapie

Bei der Kombination Lapatinib/Capecitabin beträgt die empfohlene Dosis für Lapatinib 1250 mg (d.h. fünf Tabletten) einmal täglich, fortlaufend eingenommen.

Die empfohlene Dosis für Capecitabin beträgt 2000 mg/m²/Tag, aufgeteilt in Einzelgaben im Abstand von 12 Stunden an den Tagen 1-14 eines 21-tägigen Behandlungszyklus.

Bei der Kombination Laptinib/Trastuzumab beträgt die empfohlene Dosis für Lapatinib 1000 mg (d.h. vier Tabletten) einmal täglich, fortlaufend eingenommen. Die empfohlene Dosis für Trastuzumab beträgt 4 mg/kg KG als intravenöse (i.v.) Initialdosis, gefolgt von 2 mg/kg KG i.v. in wöchentlichen Abständen. Bei der Kombination Lapatinib/Aromatase-Inhibitor beträgt die empfohlene Dosis für Lapatinib 1500 mg (d. h. sechs Tabletten) einmal täglich, fortlaufend eingenommen.

6.3.3. Pertuzumab

Wie Trastuzumab ist Pertuzumab ein humanisierter monoklonaler Antikörper. Er verhindert die Bildung von HER2-Dimeren. Die Kombination aus Trastuzumab und Pertuzumab ermöglicht eine noch umfassendere HER2-Blockade.

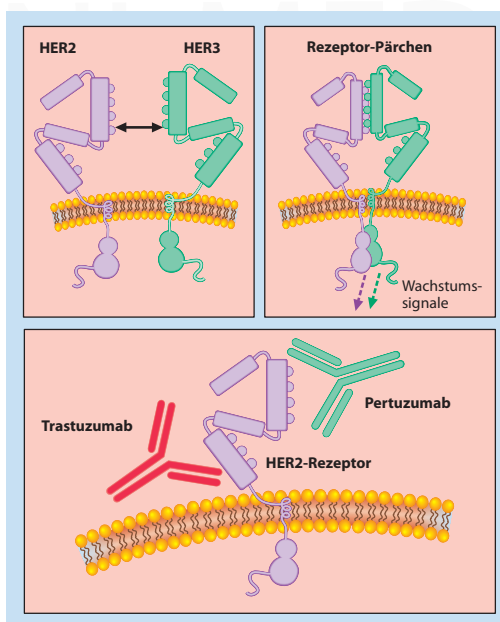


Abb. 6.8: Wirkungsweise der Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab auf Krebszellen.

■ Wirkungsweise

Trastuzumab und Pertuzumab binden an verschiedene Epitope des HER2-Rezeptors. Trastuzu-

ma bindet an die HER2-Subdomäne IV, Pertuzumab an die Dimerisierungs-Subdomäne II. Pertuzumab hemmt die Bildung von HER2-Dimeren wie HER2/HER1 (EGFR) und HER2/HER3, markiert wie Trastuzumab HER2-positive Tumorzellen für die Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität und unterdrückt verschiedene HER-Signaltransduktionskaskaden (Abb. 6.1).

Zugelassen ist Pertuzumab derzeit in der metastasierten Situation in Kombination mit Trastuzumab und Docetaxel (analog zur Cleopatra Studie). In der neoadjuvanten Therapie ist der Antikörper in den USA bereits zugelassen. In der adjuvanten Situation wird und wurde der Antikörper bislang in Studien untersucht.

■ Nebenwirkungen

Die Nebenwirkungen sind gering und bestehen in Neutropenien, die jedoch primär während der Chemotherapie auftreten, ferner Diarrhoe, Rash und Mukositiden. Bei einer Pertuzumab Monotherapie wurden in absteigender Häufigkeit Diarrhoe (48 %), Übelkeit (34 %), Erbrechen (24 %), Fatigue (17 %), Asthenie (17 %) Rückenschmerzen (17 %) und Akne (10 %) beobachtet. Die Inzidenz kardialer Ereignisse war bislang unter der dualen HER2-Blockade nicht erhöht [17].

■ Dosis und Dauer der Pertuzumab-Therapie

Pertuzumab wird mit einer Initialdosis von 840 mg i.v. absolut, gefolgt von 420 mg i.v. alle 3 Wochen appliziert.

6.3.4. Antikörper-Wirkstoff-Konjugat T-DM1 (Trastuzumab Emtansine)

■ Wirkungsweise

Das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat T-DM1 (Trastuzumab Emtansine) vereint die zielgerichtete Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Hemmung der HER2-Signalübertragung, Unterbindung des Sheddings, Initiierung der Antikörper abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität) und die zytotoxische Potenz des Maytansin-Derivats DM1 zu einem innovativen dualen Wirkmechanismus. Verbunden sind beide durch einen systemisch stabilen Linker, der gewährleistet, dass der Antikörper das Zytotoxin in inaktiver Form zur Tumorzelle transportiert. T-DM1 wird dann über HER2 in die Tumorzelle internalisiert. Hierdurch sollen normale Zellen weniger angegriffen werden.

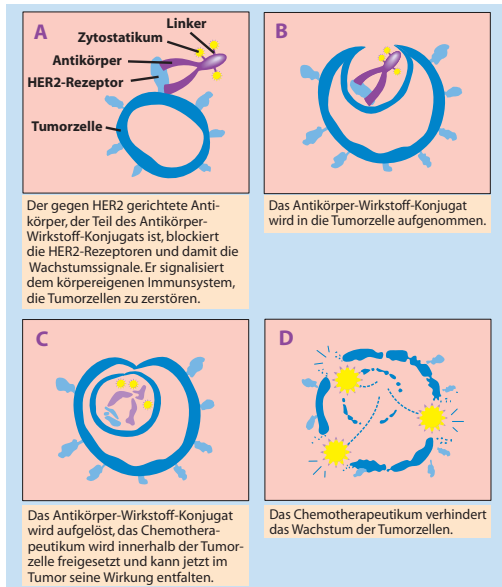


Abb. 6.9: Wirkungsweise des Antikörper-Wirkstoff-Konjugats T-DM1.

T-DM1 (Kadcyla®) ist als Einzelsubstanz zur Behandlung von Patientinnen mit HER2-positivem, inoperablem lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs indiziert, die zuvor, einzeln oder in Kombination, Trastuzumab und ein Taxan erhalten haben. Die Patientinnen sollen entweder eine vorherige Behandlung gegen die lokal fortgeschrittene oder metastasierte Erkrankung erhalten oder ein Rezidiv während oder innerhalb von sechs Monaten nach Beendigung der adjuvanten Behandlung entwickelt haben.

■ Nebenwirkungen

Grundlage der Zulassung waren die Resultate der EMILIA-Studie, einer internationalen Phase-III-Studie zum Vergleich von T-DM1 mit der Kombination von Lapatinib und Capecetabin. Hier lagen die Nebenwirkungen im T-DM1-Arm vor allem in Thrombozytopenien und Leberwerterhöhungen.

■ Dosis und Dauer der T-DM1-Therapie

T-DM1 wird als i.v.-Infusion mit 3,6 mg/kg KG alle 3 Wochen appliziert. Dosisreduktionen bei toxischen Effekten auf 3 mg/kg Körpergewicht bzw. 2,4 mg/kg Körpergewicht sind möglich. T-DM1 wird bis zum Progress der Erkrankung in der metastasierten Situation oder bis zum Auftreten von nicht-tolerierbaren Nebenwirkungen verabreicht.

■ T-DM1 und Pertuzumab

Es war davon auszugehen, dass die Kombination Pertuzumab/T-DM1 die HER2-downstream-Signale und damit die Tumorneubildung intensiver unterbindet. Für diese Situation gibt es adjuvante Therapiestudien, deren Ergebnisse in naher Zukunft zu erwarten sind (Kaitlin-Studie).

6.3.5. Vakzinierung

Es liegen erste Daten einer explorierenden Optimierungstudie der Phase I/II bei Patientinnen mit HER2-immunohistochemischen 1+, 2+ und 3+ nach Leitlinien behandelten Mammakarzinomen (Operation, systemische Therapie, Strahlentherapie) vor. Die Vakzinierung mit E75, einem Leukozyten-antigen (HLA)A2/A3-HER2 Peptid und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) wurde als adjuvante Therapie durchgeführt, um ein Rezidiv der Erkrankung zu verhindern [18]. Die Vakzinierung war sicher und führte zu einer Expansion von E75-spezifischen zytotoxischen T-Zellen. Der weitere klinische Einsatz bleibt abzuwarten.

6.4. Neoadjuvante Therapieansätze

Die Kombination einer neoadjuvanten Chemotherapie mit einer einjährigen Trastuzumab-Therapie ist zur Standardtherapie beim HER2-positiven Mammakarzinom geworden. Die Hinzunahme von Trastuzumab zur Chemotherapie hat zur deutlichen Verbesserung der pathologischen Komplettremissionsraten auf über 50 % geführt (kein Nachweis invasiver oder nicht-invasiver Tumoranteile in der Brust und den axillären Lymphknoten).

Dies ist insofern bedeutend, als die pathologische Komplettremission bei Patientinnen mit HER2-positiven Tumoren auch mit einer höheren Heilungsrate assoziiert ist. Es wird empfohlen, bei HER2-positiven Tumoren die Möglichkeit der neoadjuvanten Therapie mit der Patientin aktiv zu besprechen. Deutschland ist weltweit führend in der Durchführung von neoadjuvanten Therapiestudien (Gepar-Studien der *German Breast Group*) [19].

Eine Metaanalyse basierend auf 12 großen neoadjuvanten Studien unter Einschluss von über 6000 Patientinnen aus den AGO/GBG-Studien mit ins-

gesamt 12.993 Patientinnen ergab für HER2-positive/Hormon-Rezeptor-negative Patientinnen durch eine Chemotherapie plus Trastuzumab eine Erhöhung der pCR-Rate von 31 % auf 50 %, für HER2-positive/Hormon-Rezeptor-positive Patientinnen eine Erhöhung von 18 % auf 30 %.

Inwieweit eine duale HER2-Blockade die pCR-Rate erhöhen kann, wurde für Lapatinib und Trastuzumab untersucht. Die Hinzunahme von Lapatinib zu Trastuzumab führt zu einer Erhöhung der pCR-Raten unter Inkaufnahme größerer Nebenwirkungen [20].

Die Hinzunahme von Pertuzumab hat zu einer weiteren Steigerung der pCR-Raten geführt und ist deshalb in den USA inzwischen in der neoadjuvanten Situation zugelassen [21]. Weitere Kombinationspartner wie orale PI3K-Inhibitoren werden in Studien untersucht (NeoPhoebe-Studie der GBG).

6.5. Adjuvante Therapieansätze

Trastuzumab reduziert das Risiko eines Rezidivs innerhalb der ersten drei Jahre um die Hälfte. Dieser Effekt war in allen Studien vergleichbar, unabhängig von der gering unterschiedlichen Patientenpopulation und Art der Chemotherapie.

Die einjährige Therapie ist der zweijährigen gleichwertig (*Herceptin Adjuvant Trial*, HERA), jedoch werden bei der zweijährigen mehr kardiale Nebenwirkungen gesehen [22]. Die sechsmonatige Trastuzumabgabe ist der einjährigen unterlegen [23]. Das Gesamtüberleben wurde um absolut 2,7 % nach 3 Jahren bzw. 1,6 % nach 4 Jahren gesteigert, das rezidivfreie Überleben wurde um 6,4 % gesteigert (78,6 % vs. 72,2 %). Die Tumorbiologie scheint für die Prognose wichtiger zu sein als die Tumorgröße. Patientinnen mit HER2-positivem, kleinem Mammakarzinom können von der adjuvanten Gabe von Trastuzumab zusätzlich zu einer Chemotherapie profitieren. Bei Tumoren ab einer Größe von 0,5-1,0 cm sollte die adjuvante Therapie mit Chemotherapie plus Trastuzumab mit der Patientin besprochen werden.

Die Lapatinib-Monotherapie ist mit der Standard-anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab nicht vergleichbar (TEACH-Studie), die duale Blockade mit Trastuzumab und Lapatinib führte im Rahmen der ALTTO-Studie nicht zu einer Verbesserung des Überlebens.

Für die adjuvante duale Blockade mit Trastuzumab und Pertuzumab stehen die Daten der APHINITY-Studie noch aus (Studienstart 2011), die das rezidivfreie Überleben unter einer adjuvanten Chemotherapie, gefolgt von einer einjährigen Therapie mit Trastuzumab und Pertuzumab mit der Standardtherapie aus einer Chemotherapie und der einjährigen alleinigen Trastuzumab-Therapie vergleicht.

6.6. Metastasierte Situation

6.6.1. Trastuzumab

Trastuzumab erhöhte erstmals neben dem progressionsfreien Intervall auch das Gesamtüberleben in der metastasierten Situation um fünf Monate. Dieser Überlebensvorteil war bislang durch kein Therapieschema so gesehen worden [24]. Trastuzumab ist in der metastasierten Situation zusätzlich zur Chemotherapie zugelassen und kann nach abgeschlossener Chemotherapie als Monotherapie fortgesetzt werden. Die Kombination mit einem Aromatasehemmer ist weniger effektiv, aber seit 2007 in Europa zugelassen, so dass auch Frauen, die HER2-positive Tumoren haben, aber nicht für eine Chemotherapie vorgesehen sind, von einer anti-HER2-gerichteten Therapie profitieren können. Die Gabe von Trastuzumab bleibt auch bei Progress über die weiteren Therapieschritte bestehen. Ein regelmäßiges kardiales Monitoring sollte erfolgen.

6.6.2. Lapatinib

Lapatinib ist der Therapie mit Trastuzumab hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens unterlegen, hinsichtlich des Gesamtüberlebens gibt es keinen Unterschied, jedoch kommt es vermehrt zu Therapieabbrüchen.

Eine alleinige Kombination von Lapatinib und Trastuzumab ist bei Patientinnen mit HER2-positiven und Hormonrezeptor-negativen Tumoren nach Progress unter Trastuzumab seit 2013 zugelassen, nachdem in der EGF 104900-Studie ein Überlebensvorteil von 8 Monaten im Vergleich zur Lapatinibmonotherapie gesehen wurde.

Die Kombination von Capecitabin und Lapatinib ist als Zweitlinientherapie beim metastasierten Mammakarzinom zugelassen. Dieser Kombination wird eine bessere Wirksamkeit intrazerebral nachgesagt, nachdem in der EGF-100151-Studie

weniger Hirnmetastasen in der Gruppe mit Capecitabin plus Lapatinib auftraten.

Lapatinib ist ebenfalls zugelassen beim metastasierten, HER2-positiven und Hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom in der Postmenopause in Kombination mit einem Aromatasehemmer (Letrozol). Wie auch während und nach einer Trastuzumab-Therapie sollte bei jeder anderen anti-HER2-Therapie alle drei bis sechs Monate eine Kontrolle der Herzfunktion erfolgen. Bei Abfall der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LEVF) ist Trastuzumab, Lapatinib oder Pertuzumab sofort zu pausieren bis zur Erholung der LEVF.

6.6.3. Pertuzumab

In der multizentrischen, placebokontrollierten, doppel-blinden Phase III CLEOPATRA-Studie bewies Pertuzumab 420 mg in dreiwöchentlicher Kombination mit Trastuzumab 6 mg/kg KG und Docetaxel 75-100 mg/m² über mindestens 6 Zyklen bei metastasiertem HER2-positivem Mammakarzinom seine Überlegenheit gegenüber der herkömmlichen Therapie mit Trastuzumab und Docetaxel. Das progressionsfreie Überleben konnte nach einem Follow-up von 50 Monaten von 12 auf 19 Monate ($p < 0,0001$), das Gesamtüberleben von 41 auf 57 Monate ($p = 0,0002$) erhöht werden [25]. Pertuzumab ist zugelassen in Kombination mit Docetaxel und Trastuzumab beim metastasierten oder lokal rezidierten, inoperablen Mammakarzinom, wenn die Patientin noch keine Chemotherapie oder anti-HER2-Therapie im metastasierten Zustand bekommen hat. Trastuzumab und Pertuzumab werden alle drei Wochen in einer Dosierung von 6 mg/kg KG und 420 mg (Erstgabe 8 mg/kg KG und 840 mg) verabreicht, zusätzlich soll eine Chemotherapie mit Docetaxel 75-100 mg/m² alle drei Wochen erfolgen.

6.6.4. Trastuzumab-DM1 (T-DM1)

In der Phase-III-Zulassungsstudie EMILIA wurden 991 Patientinnen mit HER2-positivem metastasiertem Mammakarzinom randomisiert, die gegen die metastasierte Erkrankung bereits mit Trastuzumab und einem Taxan vorbehandelt waren. Die Patientinnen enthielten entweder T-DM1 oder Capecitabin in Kombination mit Lapatinib.

Im T-DM1-Arm wurde eine Verlängerung des medianen progressionsfreien Intervalls um 3,2 Mo-

nate von 6,4 auf 9,6 Monate ($HR = 0,650$, $p < 0,0001$) sowie eine Verlängerung des Gesamtüberlebens auf 30,9 Monate vs. 25,1 Monate ($HR = 0,68$; $p < 0,001$) beobachtet (26). Zu den Nebenwirkungen zählten Thrombozytopenien Grad 3/4 (12,9 % vs. 0,2 %) und erhöhte Leberenzyme (AST 4,3 % vs. 0,8 %), am häufigsten traten unter TDM-1 Übelkeit und Fatigue (39 % und 35 %) auf. Die Zulassung beschränkt sich auf die Zweitlinientherapie, wenn unter Trastuzumab und einer taxanhaltigen Chemotherapie ein Progress aufgetreten ist.

6.7. Klinische Probleme bei HER2-Positivität

■ Zerebrale Metastasierung

Patientinnen mit HER2-positivem metastasiertem Mammakarzinom entwickeln heutzutage in 30-40 % der Fälle Hirnmetastasen. Als Grund ist die verbesserte viszerale Kontrolle durch anti-HER2 gerichtete Therapien und ein dadurch ermöglichtes längeres Überleben zu nennen, so dass die Hirnmetastasierung als Zeichen der fortgeschrittenen Erkrankung erlebt werden kann [27-29]. Ein Screening auf Hirnmetastasen bei asymptomatischen Frauen wird jedoch nicht empfohlen. Auch von einer prophylaktischen Bestrahlung wird aktuell noch kein Gebrauch gemacht. Das Auftreten von Hirnmetastasen in weit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium ist möglicherweise auch durch die fehlende Passage der Antikörper durch die Blut-Hirn-Schranke bedingt. Wegen der geringeren Molekülgröße soll Lapatinib im Gegensatz zu anderen Brustkrebs-Medikamenten die Blut-Hirn-Schranke besser passieren und könnte daher auch bei Patientinnen mit Hirnmetastasen wirken. Die Therapie der Hirnmetastasierung besteht in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand der Patientin und dem Ausmaß der Metastasierung, in der Operation, Bestrahlung und/oder systemischen Therapie sowie Best Supportive Care. Das mediane Überleben nach Auftreten von Hirnmetastasen ist mit sechs Monaten kurz, kann durch die Gabe von Trastuzumab verlängert werden [30]. Der Einsatz von T-DM1 in dieser speziellen Erkrankungssituation scheint vielversprechend.

■ Diskordanz Primärtumor/Metastase/im Blut zirkulierende Tumorzelle – Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und tumor-initiiierende Zellen

Die Diskordanz des Rezeptor- Status zwischen Primärtumor, Metastasen und im Blut zirkulierender Tumorzellen kann erheblich sein. Nach Verlassen des Primärtumors können Tumorzellen im Blut und in Metastasen in bis zu 40 % ihre Rezeptor-Expression verändern. So können z.B. auch Patientinnen mit Hormon-Rezeptor-positivem, HER2- negativem Primärtumor im Verlauf einer Metastasierung durch zunehmende Entdifferenzierung über das EMT-Programm die Hormonrezeptoren verlieren und sogar mehrere Proteine der HER-Familie exprimieren. So wurden in zirkulierenden Tumorzellen EGFR, HER2, pPI3-Kinase und pAkt-Expressionen auch schon bei frühen Mammakarzinomen nachgewiesen.

Aus diesem Grunde sollte versucht werden, Metastasen – falls irgendwie möglich – bioptisch zu sichern und den Rezeptor- Status (ER/PgR, HER2, Ki67) erneut zu bestimmen. Die NCCN-Guidelines empfehlen die histologische Nachtestung vor allem bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor (www.nccn.com.) Derzeit wird in Studien (DETECT III/IV) versucht, die Rezeptor-Expression der zirkulierenden Tumorzellen in der metastasierten Situation zu evaluieren und danach die weitere Therapie auszurichten.

6.8. Literatur

- 1a. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985;230: 1132-38.
- 1b. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
2. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, et al. A hierarchical network of inter-receptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*. 1996;16(120):5276-87.
3. Hudis CA. Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
4. Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol*. 1992;10:1044-108.
5. Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1990;8(1):103-12.
6. Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Fountzilias G, Murray S. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist*. 2008;13(6):620-30.
7. Harris CA, Ward RL, Dobbins TA, Drew AK, Pearson S. The efficacy of HER2-targeted agents in metastatic breast cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2011;22(6): 1308-17.
8. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*. 2007;7:153.
9. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*. 2009;14(4):320-68.
10. Bender LM, Nahta R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:3906-12.
11. Carney WP, Leitzel K, Ali S, Neumann R, Lipton A. HER-2/neu diagnostics in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9(3):207.
12. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-world performance of HER2 testing- National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(11):852-4.
13. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
14. Ali SM, Carney WP, Esteva FJ, Fornier M, Harris L, Kostler WJ, et al. Serum HER-2/neu and relative resistance to trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Cancer*. 2008;113(6):1294-301.
15. Lennon S, Barton C, Banken L, Gianni L, Marty M, Baselga J, et al. Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(10):1685-93.
16. Cooley S, Burns LJ, Repka T, Miller JS. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular

- cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol.* 1999;27(10):1533-41.
17. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Hegg R, et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol.* 2013;24(9):2278-84.
18. Mittendorf EA, Clifton GT, Holmes JP, Clive KS, Patil R, Benavides LC, et al. Clinical trial results of the HER2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer.* 2012;118(10):2594-602.
19. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(16):3676-85.
20. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet.* 2012;379(9816):633-40.
21. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):25-32.
22. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;369(9555):29-36.
23. Kramar A, Bachelot T, Madrange N, Pierga JY, Kerbrat P, Espie M, et al. Trastuzumab duration effects within patient prognostic subgroups in the PHARE trial. *Ann Oncol.* 2014.
24. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344:783-92.
25. Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(2):109-19.
26. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;367(19):1783-91.
27. Gabos Z, Sinha R, Hanson J, Chauhan N, Hugh J, Mackey JR, et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(36):5658-63.
28. Bendell JC, Domchek SM, Burstein HJ, Harris L, Younger J, Kuter I, et al. Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer.* 2003;97(12):2972-7.
29. Fromm S, Bartsch R, Rudas M, de Vries A, Wenzel C, Steger GG, et al. Factors influencing the time to development of brain metastases in breast cancer. *Breast.* 2008;17(5):512-6.
30. Witzel I, Kantelhardt EJ, Milde-Langosch K, Ihnen M, Zeitz J, Harbeck N, et al. Management of patients with brain metastases receiving trastuzumab treatment for metastatic breast cancer. *Onkologie.* 2011;34(6):304-8.

**Disseminierte und zirkulierende Tumorzellen,
zirkulierende DNA und
RNA im Blut – Biomarker
beim Mammakarzinom?**

7. Disseminierte und zirkulierende Tumorzellen, zirkulierende DNA und RNA im Blut – Biomarker beim Mammakarzinom?

7.1. Hintergrund

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom kommt es bereits früh im Krankheitsverlauf zu einer hämatogenen Streuung von Tumorzellen. Eine solche in der Metastasierungskaskade frühe Tumorzell dissemination kann mit Hilfe sensitiver Nachweisverfahren im Blut und Knochenmark erfasst werden. Der immunzytochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark (DTC) ist bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom vielfach als ein unabhängiger Prognosefaktor beschrieben worden [1,2]. Disseminierte Tumorzellen lassen sich auch im Blut nachweisen und werden dort als zirkulierende Tumorzellen (CTC) bezeichnet. Weiterhin können zellfreie DNA (cfDNA), mRNA und Mikro-RNA (miR), die vom Tumor freigesetzt werden und mit der Tumorprogression assoziiert sein können, im Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom detektiert werden [3,4].

Nachweis und Charakterisierung der Zellen, die zu einer Disseminierung in der Lage sind, erlauben potenziell die Identifikation der für eine Metastasierung relevanten Tumorzellen. Diese Ansätze sind somit von großer klinischer Relevanz.

7.2. Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

7.2.1. Methodische Aspekte des Nachweises

Das Auftreten einer Fernmetastasierung ist die Haupttodesursache bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Bereits 1889 beschrieb Paget einen Zusammenhang von Mammakarzinomerkran kungen und Knochenmetastasen [5]. 1936 wurde der Nachweis von metastatischen Zellen im Knochenmark (KM) beschrieben [6]. Ein entscheidender Fortschritt war die Entwicklung immunzytochemischer Nachweisverfahren für die Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen (DTC) [7, 8]. Darüber hinaus sind hochsensitive molekulare

Verfahren, hauptsächlich zum Nachweis epithelzellspezifischer mRNA über RT (Reverse Transkriptase)-PCR (Polymerasekettenreaktion) etabliert worden. Die Spezifität dieser Verfahren, vor allem für die Detektion singularer Ereignisse sowie die Zuordnung gemessener Signale mit bestimmter Intensität zur Zellzahl können jedoch nicht immer zuverlässig gewährleistet werden. Mit immunzytologischen Analysen kann die Zielzelle hingegen hinsichtlich der Expressionsstärke, ihrer Größe und Form, Zellkern-Zytoplasma-Relation sowie der zellulären Lokalisation der Immunreaktion evaluiert werden [9].

Für den klinisch relevanten Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark ist die Entnahme von mindestens je 5 bis 10 ml Knochenmark aus beiden Beckenkämmen notwendig. Die in der Mehrzahl der Studien erfolgte beiderseitige Entnahme scheint die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen [2,10,11]. Grundsätzlich ist eine Entnahme vor dem Beginn operativer Manipulationen (Stanzbiopsie oder Exzision) empfohlen, obwohl es keine systematischen Untersuchungen zu einer Änderung des Nachweises durch solche Manipulationen gibt. In einer Metaanalyse, nicht jedoch in allen Einzelstudien konnte eine Korrelation des Nachweises von DTC im KM mit Tumorgöße, Differenzierungsgrad, axillärer Lymphknotenmetastasierung, negativen Steroidrezeptoren sowie jüngerem Alter gezeigt werden [2]. Darüber hinaus wurde eine Korrelation mit tumorbiologischen Faktoren wie HER2-, p53-Expression sowie hoher Proliferation beschrieben [12].

7.2.2. Prognostische Relevanz zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

Zum Zeitpunkt der Primärdiagnose weisen ca. 30-40 % aller Mammakarzinompatientinnen DTC im KM auf. Mehrere unizentrische Studien konnten zeigen, dass der Nachweis von DTC im KM zum Zeitpunkt der Operation sowohl für das rezidivfreie als auch für das Gesamtüberleben ein unabhängiger Prognosefaktor beim Mammakarzinom ist. Dies wurde in der "Pooled Analysis" mit insge-

samt 4.703 Patientinnen und einer Nachbeobachtungszeit von 10 Jahren bestätigt [2].

7.2.3. Prognostische Relevanz nach Abschluss der adjuvanten Therapie

Nach Abschluss der Primäroperation und adjuvanten Therapie können bei ca. 15 % aller Mammakarzinompatientinnen weiterhin DTC detektiert werden. Die *European Pooled Analysis* bestätigte, dass persistierende Tumorzellen im KM ebenfalls auf ein erhöhtes Metastasierungsrisiko hinweisen. Somit kann der Tumorzellnachweis im KM als Erfolgskontrolle einer Therapie in der adjuvanten Situation angesehen werden [13-17].

Bislang war es auf Grund der unterschiedlichen Nachweisverfahren nur bedingt möglich, den Knochenmarksstatus in klinischen Studien zu implementieren. Mittlerweile wurde jedoch von der Kommission Tumorzell dissemination der deutschen Gesellschaft für Senologie ein Konsensus zum Nachweis von DTC im KM erarbeitet. Als "Goldstandard" gelten derzeit die Dichtegradientenzentrifugation des Knochenmarksaspirats sowie die anschließende Anfertigung von Zytospins aus der mononukleären Zellfraktion. Die Detektion erfolgt mit Hilfe von Anti-Zytokeratin-Antikörpern und der APAAP-Färbetechnik (Abb. 7.1). Dieser Konsensus ist die Hauptvoraussetzung für die Durchführung von Multicenter-Studien [11].



Abb. 7.1: Automatische Auswertung der APAAP-Immunfärbung mit Hilfe des ACIS (*Automated Cellular Imaging System*, obere Abbildung). Untere Abbildung: Zirkulierende Tumorzelle (rot: Zytokeratin-positiv, blau: Gegenfärbung des Zellkerns mit Hämalaun)

Schlussfolgerung

Der präoperative DTC-Nachweis in Knochenmarksaspiraten besitzt prognostische Relevanz für das Gesamtüberleben sowie das krankheits- und rezidivfreie Überleben von Patientinnen mit primärem, nicht metastasiertem Mammakarzinom. Die Tumorzellpersistenz im Knochenmark kann Be-

Autor/Referenz	Jahr	Technik	Patientenzahl	Detektionsrate	Prognostische Relevanz
Harbeck [18]	1994	ICC	100	38 %	DFS, OS
Diel [1]	1996	ICC	727	43 %	DFS, OS
Mansi[19]	1999	ICC	350	25 %	DFS, OS
Gebauer [20]	2001	ICC	393	42 %	DFS, OS
Cote [21]	1991	ICC	49	37 %	DFS
Braun [22]	2000	ICC	552	36 %	DDFS, OS
Gerber[23]	2001	ICC	484	31 %	DFS, OS
Braun[24]	2001	ICC	150	29 %	DDFS, OS
Vannucchi[25]	1998	RT-PCR	33	48 %	DFS
Bidard [26]	2008	ICC	621	15 %	DMFS, OS

Tab. 7.1: Beispiele für Arbeiten zum prognostischen Wert des Nachweises von Tumorzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom. **DFS:** disease-free survival; **DDFS:** distant disease-free survival; **ICC:** immunocytochemistry; **IHC:** immunohistochemistry; **OS:** overall survival; **RT-PCR:** reverse-transcriptase polymerase chain reaction).

deutung für eine sekundäre adjuvante Therapie der Patientinnen erlangen.

7.3. Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut

Im Gegensatz zum Nachweis von DTC im Knochenmark gibt es für die Detektion von CTC im Blut bisher noch kein Konsensusprotokoll, das sowohl validierte Antikörper und Nachweisverfahren als auch Kriterien zur Begutachtung der Morphologie und Ergebnisse der Immunfärbungen nach automatischer Auswertung einbezieht. Mit der jüngsten Entwicklung neuer Anreicherungs- und Detektionsverfahren stehen jedoch Techniken zur Verfügung, die einen validen Nachweis von CTC ermöglichen.

7.3.1. Methodische Aspekte

Eine entscheidende Anforderung an ein System zum Nachweis von CTC ist die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen in einem klinischen Multicenter-Setting, das auch den Versand von Proben und die Bestimmung in mehreren Zentren beinhaltet. Ein wichtiger Fortschritt konnte mit der Entwicklung eines Systems (CellSearch®) zur standardisierten und weitgehend automatisierten Anreicherung mit immunzytochemischem Nachweis von CTC sowie zur automatischen Imageanalyse erzielt werden [27,28].

Dieses System wird derzeit in mehreren Zentren in Deutschland im Rahmen von klinischen Studien – u.a. in Ringversuchen – eingesetzt, deren erste Ergebnisse bereits publiziert worden sind [29-32]. CellSearch® ist derzeit von der FDA als einziges Testverfahren zum Nachweis von CTC bei metastasierten Mammakarzinompatientinnen z.B. im Rahmen des Therapiemonitorings zugelassen. Im Nachfolgenden wird die Bedeutung von CTC in der klinischen Anwendung zusammengefasst.

PCR-basierte Techniken haben sich als die am häufigsten verwendeten Alternative zum immunzytochemischen Nachweis von DTC und CTC etabliert. Ein grundsätzlicher Vorteil könnte in der höheren Sensitivität und der Fähigkeit zur Charakterisierung der Zellen liegen. Nachteil ist die fehlende Möglichkeit, Zellen morphologisch zu beurteilen. Die meisten Arbeitsgruppen haben RT-PCR-Assays verwendet, um RNA-Marker zu detektieren, wie Cytokeratin 19 und 20 und Mamma-

globin. Ein standardisierter RT-PCR-basierter Test ist der AdnaTest®, der MUC1/HER2/EpCAM-positive Zellen detektiert [30,33,34].

7.3.2. Bedeutung des Nachweises von CTC in der metastasierten Situation

7.3.2.1. CTC als prognostischer Faktor

In der palliativen Therapiesituation ist die Identifikation von metastasierten Patientinnen mit ungünstiger Prognose hinsichtlich der weiteren Therapiewahl von klinischer Relevanz. Cristofanilli et al. beschrieben im Rahmen einer prospektiven Studie, dass der Nachweis von mindestens 5 Tumorzellen in 7,5 ml Blut mit einem signifikant kürzeren Überleben bei metastasierten Patientinnen assoziiert ist [27]. Dies konnte mittlerweile durch eine Vielzahl von Studien bestätigt werden. Die prognostische Relevanz unter Verwendung von CellSearch® und des *cut-off levels* von 5 CTC/7,5 ml Blut gilt somit als gesichert [35].

7.3.2.2. CTC im Rahmen des Therapiemonitorings

Das frühe Erkennen einer Progression unter Therapie ist eine weitere relevante Fragestellung. Hier konnten ebenfalls Cristofanilli und Mitarbeiter zeigen, dass die Tumorzellpersistenz unter laufender *first-line*-Therapie mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist [27]. In der amerikanischen Studie SWOG (*Southwest Oncology Group*) S0500 ist untersucht worden, ob ein frühzeitiger Therapiewechsel bei Tumorzellpersistenz (≥ 5 Tumorzellen) im Vergleich zum Therapiewechsel erst bei bildgebend sichtbarem Progress mit einem Überlebensvorteil assoziiert ist. Für die untersuchte Fragestellung war die Studie negativ, hat jedoch den prognostischen Wert der CTC-Untersuchung bestätigt.

Eine Testung in Einzelfällen (z.B. bei schlechter Verträglichkeit einer Therapie) mit einem standardisierten Verfahren wird von den Empfehlungen der *AGO Kommission Mamma* als mögliche Option bewertet, wenn andere Alternativen des Therapiemonitorings und der Risikoabschätzung in der individuellen Situation weniger verlässlich sind (z.B. Bildgebung, Tumormarker).

7.3.2.3. CTC zur Optimierung der Therapie durch Identifikation von Targets für therapeutische Ansätze

Falls eine Metastasierung auftritt, wird – auch von der *AGO Mamma* – die Re-Evaluierung therapie-relevanter Marker wie z.B. HER2, ER und PgR empfohlen. Da ein Teil der zirkulierenden Tumorzellen den Phänotyp der Metastasen widerspiegeln könnte, bietet sich die Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen für eine Therapieoptimierung an. So konnten Meng et al. bei metastasierten Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor HER2-positive CTC nachweisen. Diese Patientinnen wurden mit Trastuzumab (Herceptin®) behandelt und zeigten hierauf eine Tumoremision [36]. Die Datenlage für die prognostische und prädiktive Relevanz des Nachweises von HER2 auf CTC wird insgesamt allerdings noch nicht als gesichert bewertet [37]. Hierfür sind weitere Studien notwendig. Eine methodische Studie zur Expression von HER2 auf CTC (☞ Abb. 7.2), die von der DETECT-Studiengruppe der *AG Tumorzell dissemination der Deutschen Gesellschaft für*

Senologie durchgeführt wurde, ist bereits abgeschlossen [30,34,38] und eine klinische Studie zum Einsatz einer Therapie mit Lapatinib bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor und HER2-positiven CTC hat bereits begonnen (DETECT 3). Somit ist die Indikationsstellung für den Einsatz einer zielgerichteten Therapie gegen HER2 auf Basis des HER2-Status zirkulierender Tumorzellen bisher noch nicht als klinischer Standard anzusehen.

7.4. Bedeutung des Nachweises von CTC in der adjuvanten Situation

Prognosefaktoren im Stadium der nicht metastasierten Primärerkrankung sollen beispielsweise Patientinnen identifizieren, die von einer Chemotherapie profitieren. Einzelne Studien konnten eine prognostische Relevanz des Nachweises von CTC bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zeigen [31,39,40]; allerdings gibt es keine Bestätigung, dass aus diesen vorläufigen Ergebnissen therapeutische Konsequenzen zum Vorteil für

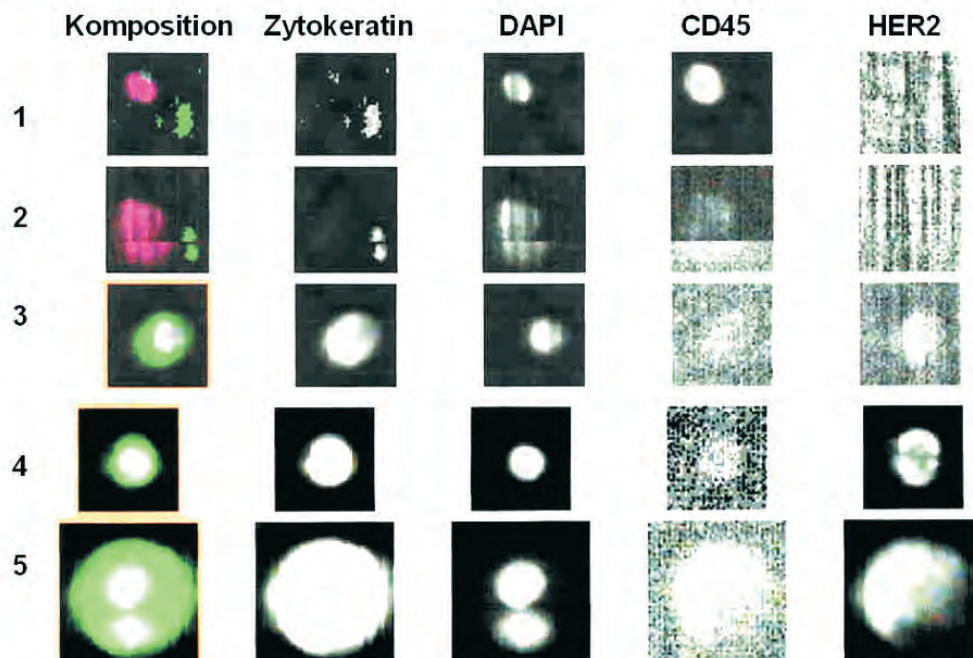


Abb. 7.2: Bildergalerie nach automatischer Imageanalyse mit Hilfe des CellSearch®-Systems. Zytokeratin-/DAPI-positive, CD45-negative Zellen repräsentieren zirkulierende Tumorzellen (CTC, **3-5**). Zytokeratin-negative, DAPI-/CD45-positive Zellen stellen Leukozyten dar (**1**). Starke HER2-Überexpression in CTC (**4, 5**) und HER2-negative CTC (**3**).

die Patientinnen gezogen werden können. Diese Fragestellung wird unter anderem gegenwärtig in der SUCCESS-C-Studie untersucht.

Autor/Referenz	Jahr	Patientenzahl	Positivitätsrate	Prognostische Relevanz
Cristofanilli [27]	2004	177	49 %	PFS, OS
Hayes [41]	2006	177	54 %	PFS, OS
Dawood [42]	2008	185	61 %	OS
Müller [38]	2011	253	50 %	OS

Tab. 7.2: Beispiele für Studien zum Nachweis von CTC im Blut von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter Verwendung des CellSearch®-Systems. **OS:** overall survival; **PFS:** progression free survival.

Schlussfolgerung

Die jüngst vorgestellten Studien sprechen für eine klinische Relevanz des Nachweises von CTC im Blut – vor allem in der metastasierten Situation.

7.5. Zirkulierende DNA und RNA im Blut

Durch apoptotische und nekrotische Tumorzellen kann Nukleinsäure in die Blutzirkulation gelangen, und Veränderungen in der Konzentration von zirkulierender Tumor-DNA, mRNA oder bestimmter Mikro-RNAs sind mit der Tumoralast und der Tumorprogression assoziiert worden. Gegenwärtig wird intensiv untersucht, ob der Nachweis dieser im Serum oder Plasma von Mammakarzinompatientinnen zirkulierenden Nukleinsäuren für das Tumorscreening, für die Abschätzung der Prognose der Patientinnen sowie für ein Therapiemonitoring zum Einsatz gelangen kann [3].

7.5.1. Methoden zum Nachweis

Obwohl Tumorpatienten signifikant erhöhte Konzentrationen an zirkulierender zellfreier DNA als gesunde Probanden aufweisen, kann der Tumorzellsprung nur über tumorzellenspezifische genetische Aberrationen oder epigenetische Alte-

rationen aufgedeckt werden. Häufig werden z.B. Untersuchungen auf das Vorliegen von LOH (*loss of heterozygosity*) über PCR-basierte Methoden vorgenommen. Geringe Mutationsfrequenzen in bestimmten Genen sowie Verdünnungseffekte durch Wildtyp-DNA aus gesunden Zellen erschweren hingegen die Etablierung spezifischer Assays. Durch Tumorzellen freigesetzte mRNA zeichnet sich überraschenderweise durch eine hohe Stabilität aus, die wahrscheinlich auf ihre Verpackung in Exosomen und einen dadurch bestehenden Schutz vor Degradation zurückzuführen ist. Der Nachweis dieser mRNAs wird heute weitestgehend über Mikroarray-Technologien oder quantitative RT-PCR geführt. Auch für die Detektion deregulierter Konzentrationen bestimmter Mikro-RNAs gelangen gegenwärtig Expressions-Mikroarrays zum Einsatz, mit deren Hilfe mehr als 900 dieser kleinen RNAs identifiziert werden können. Ein großes Problem bei der Quantifizierung dieser RNAs besteht jedoch im Fehlen einer endogenen Mikro-RNA-Kontrolle zur Normalisierung der Mikro-RNA-Konzentration [3].

7.5.2. Datenlage

Erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden Nukleinsäuren (cfDNA, mRNA und miRs) sind in Mammakarzinompatientinnen mit einem schlechteren klinischen Verlauf der Erkrankung assoziiert und könnten zukünftig in der nicht metastasierten und auch in der metastasierten Situation als Biomarker für die Diagnostik oder als Prognosemarker Bedeutung erlangen [3,43,44]. Wie weiterhin gezeigt werden konnte, erwies sich ein in cfDNA detektierter DNA-Verlust in der Region 13q31-33 als Indikator für eine lymphatische Tumorzellausbreitung [3]. Shaw et al. beschrieben erhöhte Frequenzen an CNV (*copy number variations*) und LOH in cfDNA von Mammakarzinompatientinnen gegenüber cfDNA aus gesunden Probanden [45]. Darüber hinaus gelang der Nachweis von HER2-Genamplifikationen an cfDNA aus Mammakarzinompatientinnen im klinischen Verlauf ohne nachweisbare Erkrankung [46]. Die in cfDNA von Mammakarzinompatientinnen detektierte Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen könnte sich als prädiktiver und prognostischer Biomarker erweisen [47].

Schlussfolgerung

Die publizierten Ergebnisse erster klinischer Studien belegen, dass erhöhte Konzentrationen zirkulierender zellfreier Nukleinsäuren im Serum oder Plasma von Mammakarzinompatientinnen vorhanden sind. Eine potenzielle Anwendung als Biomarker für das Tumorscreening, für eine Prognoseabschätzung sowie für das Therapiemonitoring ist Gegenstand intensiver klinischer Forschung.

7.6. Literatur

1. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: Prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1652-1658.
2. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne M, Coombes RC, Schlimok G, Diel I, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer E, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K: International pooled analysis of prognostic significance of bone marrow micrometastasis in patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:793-802.
3. Schwarzenbach H, Müller V, Milde-Langosch K, Steinbach B, Pantel K: Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. *Mol Biosyst* 2011;7:2848-2854.
4. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-437.
5. Paget S: Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;1:571.
6. Rohr K, Hegglin R: Tumorzellen im Sternalpunktat. *Deutsch Arch Klin Med* 1936;179:61-79.
7. Sloane JP, Ormerod MG, Neville AM: Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases. *Cancer Res* 1980;40:3079-3082.
8. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G: Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994;3:165-173.
9. Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K: Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 2008;14:5013-5021.
10. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Naume B: Detection of isolated tumor cells in BM from breast-cancer patients: Significance of anterior and posterior iliac crest aspirations and the number of mononuclear cells analyzed. *Cytotherapy* 2003;5:40-45.
11. Fehm T, Braun S, Müller V, Janni W, Marth C, Pantel K, Schindlbeck C, Solomayer E: A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 2006;107:885-892.
12. Fehm T, Becker S, Pergola-Becker G, Kramer B, Gruber I, Sotlar K, Kurek R, Wallwiener D, Solomayer E: Influence of tumor biological factors on tumor cell dissemination in primary breast cancer. *Anticancer Res* 2004;24:4211-4216.
13. Slade MJ, Singh A, Smith BM, Tripuraneni G, Hall E, Peckitt C, Fox S, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC: Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: Results at 4 years. *Int J Cancer* 2005;114:94-100.
14. Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K: The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005;103:884-891.
15. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B: Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10:5342-5348.
16. Janni W, Wiedswang G, Borgen E, Braun S, Rack B, Schindlbeck C, Sommer H, Pantel K, Heinrigs M, Nesland J, Scholz C, Friese K, Jeschke U, Naume B: Persistence of isolated tumor cells (ITC) in bone marrow (BM) of breast cancer patients predicts increased risk for relapse—results of pooled European data. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94, Supplement 1:Abstract 1016.
17. Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Juckstock J, Borgen E, Rack B, Braun S, Sommer H, Solomayer E, Pantel K, Nesland J, Friese K, Naume B: Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse—a European pooled analysis. *Clin Cancer Res* 2011;17:2967-2976.
18. Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W: Tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: Results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 1994;69:566-571.
19. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC: Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: A long-term follow-up study. *Lancet* 1999;354:197-202.
20. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jäger W: Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: Clinical outcome du-

- ring long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2001;19:3669-3674.
21. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP: Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991;9:1749-1756.
22. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage i, ii, or iii breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342:525-533.
23. Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K: Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001;19:960-971.
24. Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kentenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F: Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2001;19:1468-1475.
25. Vannucchi AM, Bosi A, Glinz S, Pacini P, Linari S, Saccardi R, Alterini R, Rigacci L, Guidi S, Lombardini L, Longo G, Mariani MP, Rossi-Ferrini P: Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by rt-pcr for cytokeratin-19 mrna. *Br J Haematol* 1998;103:610-617.
26. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Diezras V, Mathiot C, Mignot L, Thiery JP, Sastre-Garau X, Pierga JY: Prognosis of women with stage iv breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 2008;19:496-500.
27. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-791.
28. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the cellsearch system. *Clin Cancer Res* 2007;13:920-928.
29. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M, Roller M, Huober J, Fehm T, Schrader I, Hilfrich J, Holms F, Tesch H, Eidtmann H, Untch M, von Minckwitz G, Pantel K: Detection and her2 expression of circulating tumor cells: Prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant geparquattro trial. *Clin Cancer Res* 2010;16:2634-2645.
30. Fehm T, Müller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, Lattrich K, Löhberg C, Solomayer E, Rack B, Riethdorf S, Klein C, Schindlbeck C, Brocker K, Kasimir-Bauer S, Wallwiener D, Pantel K: Her2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: A prospective, multicenter trial. *Breast Can Res Treat* 2010;124:403-412.
31. Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, Friedl TW, Lorenz R, Tesch H, Fasching PA, *et al*: Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014;106.
32. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, Kimmig R, Kasimir-Bauer S: Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by rt-pcr and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res* 2009;11:R59.
33. Ignatiadis M, Riethdorf S, Bidard FC, Vaucher I, Khazour M, Rothé F, Metallo J, Rouas G, Payne RE, Coombes R, Teufel I, Andergassen U, Apostolaki S, Politaki E, Mavroudis D, Bessi S, Pestrin M, Di Leo A, Campion M, Reinholz M, Perez E, Piccart M, Borgen E, Naume B, Jimenez J, Aura C, Zorzino L, Cassatella M, Sandri M, Mostert B, Sleijfer S, Kraan J, Janni W, Fehm T, Rack B, Terstappen L, Repollet M, Pierga JY, Miller C, Sotiriou C, Michiels S, Pantel K: International study on inter-reader variability for circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014;16:R43.
34. Aktas B, Müller V, Tewes M, Zeitz J, Kasimir-Bauer S, Lohberg CR, Rack B, Schneeweiss A, Fehm T: Comparison of estrogen and progesterone receptor status of circulating tumor cells and the primary tumor in metastatic breast cancer patients. *Gyn Oncology* 2011;122:356-60.
35. Bidard, F-C, Peeters, DJ, Fehm, T, Nolé, F, Gisbert-Criado, R, Mavroudis, D, Grisanti, S, Generali, D, Garcia-Saenz, JA, Stebbing, J, *et al*: Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* 2014; Published Online March 11.
36. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J: Her-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9393-9398.
37. Müller V, Alix-Panabieres C, Pantel K: Insights into minimal residual disease in cancer patients: Implications for anti-cancer therapies. *Eur J Cancer* 2010;46:1189-1197.
38. Müller V, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching P, Solomayer E, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Zeitz J, Pantel

K, Fehm T, Detect Study Group T: Prospective evaluation of serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and carbonic anhydrase ix in correlation to circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011;13:R71.

39. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jorke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Hoffken K: Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008;26:1208-1215.

40. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, de Cremoux P, Salmon R, Vincent-Salomon A, Marty M: Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase ii randomized trial. *Clin Cancer Res* 2008;14:7004-7010.

41. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW: Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006;12:4218-4224.

42. Dawood S, Broglio K, Valero V, Reuben J, Handy B, Islam R, Jackson S, Hortobagyi GN, Fritsche H, Cristofanilli M: Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: From prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer* 2008;113:2422-2430.

43. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H: Circulating micrornas as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R90.

44. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K: Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:145-56.

45. Shaw JA, Page K, Blighe K, Hava N, Guttery D, Ward B, Brown J, Ruangpratheep C, Stebbing J, Payne R, Palmieri C, Cleator S, Walker RA, Coombes RC: Genomic analysis of circulating cell free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res* 2011;22:220-231.

46. Page K, Hava N, Ward B, Brown J, Guttery DS, Ruangpratheep C, Blighe K, Sharma A, Walker RA, Coombes RC, Shaw JA: Detection of her2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2011;104:1342-1348.

47. Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Burki N, Diesch C, Bitzer J, Zheng H, Schmid S, Zhong XY: Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One* 2011;6:e16080.

Korrekturabzug

Copyright 2015

UNI-MED Verlag AG

28323 Bremen

Tumorbiologische Diagnostik und Testverfahren beim Mammakarzinom – Praktische Anwendung und Studien

8. Tumorbiologische Diagnostik und Testverfahren beim Mammakarzinom – Praktische Anwendung und Studien

8.1. Stellenwert tumorbiologischer Testverfahren in der Klinik

Der Stellenwert von tumorbiologischen Testverfahren bei der Therapie des Mammakarzinoms hat sich in den letzten Jahren grundlegend geändert. Während noch vor wenigen Jahren die Ausdehnung des Tumors, beschrieben als Tumorgroße und Nodalstatus, als wichtigster Prognosefaktor galt und maßgeblich die Therapie bestimmte, ist zunehmend die essentielle Bedeutung der Tumorbiologie für den weiteren Verlauf der Erkrankung, sowie die Notwendigkeit für und das Ansprechen auf verschiedene Systemtherapien in den Vordergrund gerückt. Damit haben auch verschiedene moderne tumorbiologische Testverfahren an Bedeutung gewonnen, und finden zunehmend Einsatz in der klinischen Routine.

8.2. Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms

Grundlage für die Beurteilung der Tumorbiologie bilden die sogenannten intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms, die durch RNA-Expressionsprofile definiert sind. Dabei definierten Perou et al. erstmals folgenden Subtypen: Luminale Mammakarzinome, die sich durch einen positiven Östrogenrezeptor-(ER)-und/oder Progesteronrezeptor-(PgR)-Status auszeichnen, stellen die größte Subgruppe dar. In Abhängigkeit der Tumorzellproliferation werden Luminal A Karzinome (mit geringer Proliferation) und Luminal B Karzinome (mit hoher Proliferation) unterschieden. Darüber hinaus werden basale (engl. *basal-like*) Mammakarzinome, die in der Mehrzahl den klinisch definierten tripel-negativen Mammakarzinomen entsprechen und HER2-positive (HER2-like) Mammakarzinome mit HER2-Amplifikation und/oder Überexpression unterschieden [1]. Auch wenn es derzeit keine allgemein akzeptierte Übertragung dieser auf Genexpressionsprofilen basierenden Subgruppen in die klinisch- bzw. immunhistochemisch-definierten Untergruppen gibt, werden letztere häufig im klinischen Alltag stellvertretend

zur Therapiestratifikation herangezogen. Dabei bilden die Mammakarzinomsubtypen eine der wichtigsten Grundlagen sowohl für die Einschätzung der Prognose der Erkrankung als auch für die Auswahl der optimalen Systemtherapie. Die Auswahl zielgerichteter Therapieansätze, d.h. endokrine Therapien und HER2-zielgerichtete Ansätze werden dabei in Abhängigkeit vom entsprechenden Mammakarzinomsubtyp appliziert und auch die Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie wird in der Regel in deren Abhängigkeit getroffen; dabei gilt insbesondere die Differenzierung von Luminal A-Mammakarzinomen (i.d.R. ohne Indikation zur Chemotherapie) und Luminal B Mammakarzinomen (i.d.R. mit Indikation zur Chemotherapie) als besonders klinisch relevant.

Generell kommt der Differenzierung von Patientinnen mit Indikation zur Chemotherapie und Patientinnen ohne Indikation zur Chemotherapie insbesondere bei Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom ein besonderer Stellenwert zu. Wenn klinische Parameter alleine keine ausreichende Entscheidungsgrundlage für die Indikation zur Chemotherapie bieten, können zusätzlich molekulare Tests herangezogen werden. Derzeit sind verschiedene molekulare Tests kommerziell erhältlich, die v.a. in der Gruppe der nodal-negativen, Hormonrezeptor-positiven Patientinnen die Einschätzung der Prognose und Notwendigkeit einer adjuvanten Chemotherapie weiter verbessern können (Tab. 3.2).

Am häufigsten werden dabei in Deutschland der 21-Gen-Recurrence Score® (Oncotype DX®) und die 8-Gensignatur (EndoPredict®) eingesetzt. Darüber hinaus steht die PAM50-Signatur zur Definition der o.g. intrinsischen Subtypen als Stratifikator zur Verfügung. Beide Tests basieren auf quantitativen PCR-Analysen und können auf formalinfixiertem Gewebe durchgeführt werden, was im klinischen Alltag einen logistischen Vorteil darstellt. Bei der EndoPredict®-Signatur werden in Ergänzung zur Tumorbiologie noch der Tumordurchmesser und -nodalstatus erfasst und zum EP-

clin zusammengefasst. Die derzeit publizierten, allerdings ausschließlich retrospektiven Daten belegen eine gute prognostische Relevanz der molekularen Tests sodass eine Anwendung sinnvoll sein kann, wenn etablierte klinische Parameter keine sichere Aussage für/wider eine Chemotherapie erlauben (AGO “+”-Empfehlung). Es ist jedoch wichtig zu erkennen, dass:

- a) die prospektive Validierung der prädiktiven Anwendung (d. h. der Vorhersage der Notwendigkeit einer Chemotherapie) aktuell noch aussteht und erst anhand der Ergebnisse der Studien Mindact (für MammaPrint®) und TailorX bzw. RxPONDER (für Oncotype DX®) ausgewertet werden kann
- b) der systematische Vergleich der Testsysteme hinsichtlich ihrer prädiktiven Aussagekraft mit dem Ziel der Definition der optimalen Testsystems zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht erfolgt ist.

8.3. uPA/PAI-1

Als mögliche Alternative zu den o.g. Genexpressionsanalysen können auch die tumorassoziierten Proteolysefaktoren, d.h. der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) für die Entscheidung bezüglich einer adjuvanten Chemotherapie herangezogen werden. uPA/PAI-1 wurde prospektiv in einer klinischen Therapiestudie in Bezug auf seine prognostische und prädiktive Bedeutung validiert und verfügt daher über eine gute Evidenzlage. Die 10-Jahres Nachbeobachtungsergebnisse der Chemo N0 Studie zeigen, dass uPA/PAI-1 beim nodal-negativen Mammakarzinom eine Niedrigrisikogruppe (uPA und PAI-1 niedrig) definieren kann, die aufgrund ihrer guten Prognose von einer adjuvanten Chemotherapie kaum profitieren würden. Bei Hochrisiko-Patientinnen (uPA und/oder PAI-1 hoch) kann eine adjuvante Chemotherapie das Rezidivrisiko um etwa 40 % reduzieren [2]. Daher kann uPA/PAI-1 als Entscheidungskriterium beim nodal-negativen Mammakarzinom mit unklarer Indikation für eine Chemotherapie auch außerhalb von Studien herangezogen werden. Allerdings ist der Test ausschließlich mittels standardisierter ELISAs im Tumorfrischgewebe (FEMTELLE®) validiert, was den Einsatz in der klinischen Praxis

häufig limitiert. Auch hier kann eine Aussage zum Vergleich der prädiktiven Aussagekraft von uPA/PAI-1 und der o.g. Genexpressionsanalysen zum aktuellen Zeitpunkt nicht getroffen werden.

8.4. Zirkulierende Tumorzellen

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom kommt es bereits früh im Krankheitsverlauf zu einer hämatogenen Streuung von Tumorzellen. Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und zirkulierenden Tumorzellen im Blut beim frühen Mammakarzinom ist mit einem verkürzten rezidivfreien und Gesamtüberleben assoziiert [3-8]. Allerdings gibt es keine Bestätigung, dass aus diesen Ergebnissen therapeutische Konsequenzen zum Vorteil für die Patientinnen gezogen werden können. Derzeit sollte folglich die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen beim primären Mammakarzinom außerhalb von Studien aufgrund der noch jungen Datenlage und der fraglichen klinischen Konsequenz nur in begründeten Einzelfällen wie dem Mangel anderer konklusiver Therapieentscheidungsgrundlagen eingesetzt werden.

Auch in der metastasierten Situation konnte die prognostische Relevanz von zirkulierenden Tumorzellen unter Verwendung des CellSearch® Systems durch eine Vielzahl von Studien bestätigt werden [9;10]. Eine Testung auf zirkulierende Tumorzellen mit dem CellSearch® System wird gegenwärtig von den Empfehlungen der AGO Kommission Mamma als mögliche Option für die Prognoseabschätzung mit der Empfehlung “+” bewertet, beispielsweise für eine Risikoabschätzung vor dem Hintergrund einer Entscheidung über die Aggressivität einer Therapie in der metastasierten Situation.

Auch die erneute Blutentnahme 3-5 Wochen nach Therapiebeginn wies eine prognostische Relevanz auf, und könnte damit eine frühzeitigere Information liefern als die bildgebende Diagnostik [11]. Auf Grundlage dieser Daten wurde in der amerikanischen Studie SWOG S0500 überprüft, ob ein frühzeitiger Therapiewechsel bei Tumorzellpersistenz (≥5 Tumorzellen) dem Therapiewechsel erst bei bildgebend sichtbarem Progress überlegen ist. Allerdings zeigte sich weder im progressionsfreien noch im Gesamtüberleben der beiden Behandlungsarme ein Unterschied. Der frühe Wechsel ei-

ner Therapie brachte keinen Vorteil für die Patientinnen [12]. Aufgrund dieser Studienergebnisse rät die AGO Kommission Mamma von einer Therapieentscheidung basierend allein auf der Dynamik von CTC ab. In begründeten Einzelfällen (z.B. Unverträglichkeit der Therapie) können jedoch CTC Messungen dazu dienen, schon frühzeitig unwirksame Therapien zu beenden und Alternativkonzepte anzubieten.

Weitere Therapiekonzepte, die auf der Phänotypisierung zirkulierender Tumorzellen beruhen, werden in aktuell laufenden Studien untersucht (DETECT, TREAT CTC).

8.5. Hereditäres Mammakarzinom

In den vergangenen Jahren hat die Bedeutung von BRCA1/BRCA2 als therapeutische Zielstruktur zunehmend an Bedeutung gewonnen. Auch wenn BRCA1 und 2 weiterhin eine hohe Bedeutung als Risikofaktoren für die Entstehung eines Mamma- und Ovarialkarzinoms innehaben, werden Mutationen dieser Gene zunehmend als Therapiestratifikatoren wahrgenommen. Einerseits wird zunehmend offensichtlich, dass die Prognose und auch das Chemotherapieansprechen von beispielsweise triple-negativen Mammakarzinomen Unterschiede aufweist in Abhängigkeit des BRCA-Mutationsstatus. Insbesondere wird der Einsatz platinhaltiger Chemotherapien hier aktuell diskutiert. Andererseits ist mit der Entwicklung von PARP-Inhibitoren ein neues Therapiekonzept in das klinisch-wissenschaftliche Interesse geraten.

Der Wirkmechanismus basiert auf der zweifachen Hemmung der zellulären DANN-Reparatur, die einerseits durch genomische/somatische Mutation des BRCA-Gens und andererseits iatrogen durch die medikamentöse Hemmung des kompensatorischen PARP-Systems erfolgt. Da beim hereditären Mammakarzinom ist das BRCA-System durch Mutation defekt ist, müssen die Zellen vermehrt auf das noch funktionierende PARP-System zurückgreifen. Wird jedoch dieses System (z.B. iatrogen durch einen PARP-Inhibitor) gehemmt, so ist dies für die Zelle letal (Konzept der synthetischen Letalität). Somit scheint die defekte DNA-Reparatur BRCA-assoziiertes Mammakarzinome einerseits auslösend für die Tumorgenese

zu sein, andererseits auch die therapeutische Achillessehne der Tumoren darzustellen.

8.6. Aktuelle Studien mit tumorbiologischem Schwerpunkt

■ Das ADAPT-Studienprogramm – Sensitivitätstestung und Therapiestratifikation in Mammakarzinomsubgruppen

Das Grundkonzept der Studie besteht darin,

- (a) die Therapie eines Mammakarzinoms im kurativen Stadium nicht nur anhand der Rückfallwahrscheinlichkeit) der Erkrankung festzulegen, sondern auch die Ansprechwahrscheinlichkeit (sog. Prädiktion) zu beachten und
- (b) durch den Einsatz zielgerichteter Substanzen/optimaler Chemotherapeutika eine geringere Therapieintensität erreichen zu können.

Die ADAPT-Studie ist als Umbrella-Studie konzipiert, d.h. sie umfasst ein grundlegendes Studienkonzept, welches in Abhängigkeit des molekularen Subtyps (s.u.) mit unterschiedlichen Systemtherapie "bestückt" wird. Dabei kann jede Patientin, bei der gemäß aktuell gültiger Leitlinien eine Indikation zur neoadjuvanten Chemotherapie besteht, eingeschlossen werden. Das betrifft somit die triple-negativen als auch die HER2-positiven Karzinome (im letzteren Fall sowohl Hormonrezeptor-positiv als auch -negativ). Außerdem können Hormonrezeptor-positive Mammakarzinome bei bestehender Chemotherapie-Indikation (z.B. G3, G2 in Kombination mit >cT2, Ki67>15 %) in die Studie eingeschlossen werden.

► "HR+/HER2"-Stratum

Ziel dieses Stratums ist die Identifikation von Patientinnen, die eine derart hohe Ansprechwahrscheinlichkeit auf endokrine Therapie zeigen, dass eine zusätzliche Chemotherapie nicht identifiziert ist. Vorstudien legen nahe, dass dies durch wiederholte Messungen des Proliferationsmarkers KI67 gelingen kann,

Zunächst erfolgt eine Risikostratifikation (Prognose) basierend auf den klassischen klinisch-pathologischen Parametern sowie der KI67-Expression und dem Recurrence Score® (Oncotype DX®). Im Anschluss an die Registrierung erhält die Patientin eine antiendokrine Therapie mit Tamoxifen (prämenopausal) bzw. Aromatasehemmer (postmenopausal) für 3 Wochen. Anschlie-

ßend folgt je nach Wunsch der Patientin eine Stanzbiopsie oder die primäre Operation.

Zu Bestimmung der endokrinen Sensitivität wird die KI67-Expression nach der dreiwöchigen endokrinen Therapie erneut bestimmt. Ein Abfall von KI67 unter endokriner Therapie gibt Aufschluss über die endokrine Empfindlichkeit des Tumors (Prädiktion).

Es ergeben sich drei mögliche Szenarien (Abb. 8.1):

- Niedriger RS + niedrige klinisch-pathologische Parameter → keine Chemotherapie
- Mittlerer RS und KI67-Abfall → Verzicht auf Chemotherapie (hier wird Chemotherapie erspart!)
- Hoher RS, cN2-3 → Chemotherapie nach dem dosisdichten Therapiekonzept mit 4x Paclitaxel q2w, 4x EC q2w versus 8x nab-Paclitaxel q1w, 4x EC q2w. Bei Patienten, die primär cN2-3 sind, kann auf die 3-wöchige antiendokrine Therapie verzichtet und direkt die Chemotherapie begonnen werden.

Es wird davon ausgegangen, dass mit dem ADAPT HR+/HER2- Konzept einem signifikanten Anteil an Patientinnen die Chemotherapie erspart werden kann.

► "HR+/HER2+"-Stratum

Bei Patientinnen, die an einem sowohl HER2-positiven als auch Hormonrezeptor positiven Tumor erkrankt ist, stellt sich die Frage inwiefern die neuen HER2-zielgerichteten Therapien kombiniert mit einer antiendokrinen Therapie in Zukunft das bisher gültige Konzept einer Chemotherapie bei HER2-neu-Positivität ersetzen kann. Dafür werden 3 Therapiearme miteinander verglichen und die Raten des Ansprechens i.S. der pCR analysiert. Es erfolgt nach zentraler Bestätigung des Rezeptorstatus die Behandlung in einem der drei Arme (Abb. 8.2):

1. TDM-1
2. TDM-1 + antiendokrine Therapie oder
3. Herceptin + antiendokrine Therapie

Bei Trastuzumab Emtansine (TDM-1) ist der monoklonale Antikörper Trastuzumab an das zytotoxische Agent Mertansine (DM-1) gekoppelt. Trastuzumab singular verhindert durch die Bindung an den HER2-Rezeptor die Zellproliferation wohingegen TDM-1 als Komplex von der Tumorzelle aufgenommen wird, intrazellulär seinen zytotoxischen Anteil freisetzt und so die Apoptose induziert. Die o.g. Therapiekonzepte werden 3-wöchentlich über 12 Wochen verabreicht. Anschließend folgt die Operation. Als anschließende The-

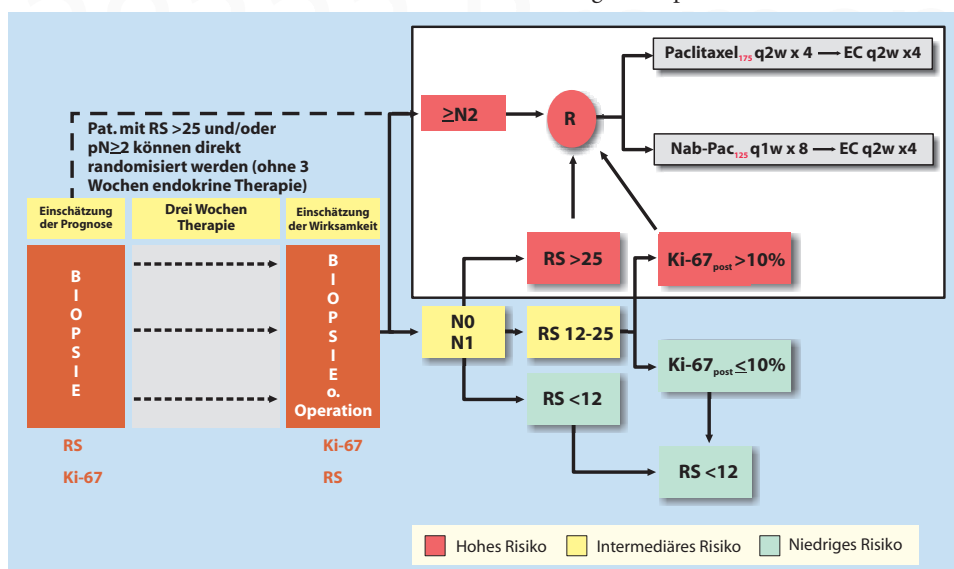


Abb. 8.1: Design der ADAPT-Studie: HR+/HER2-.

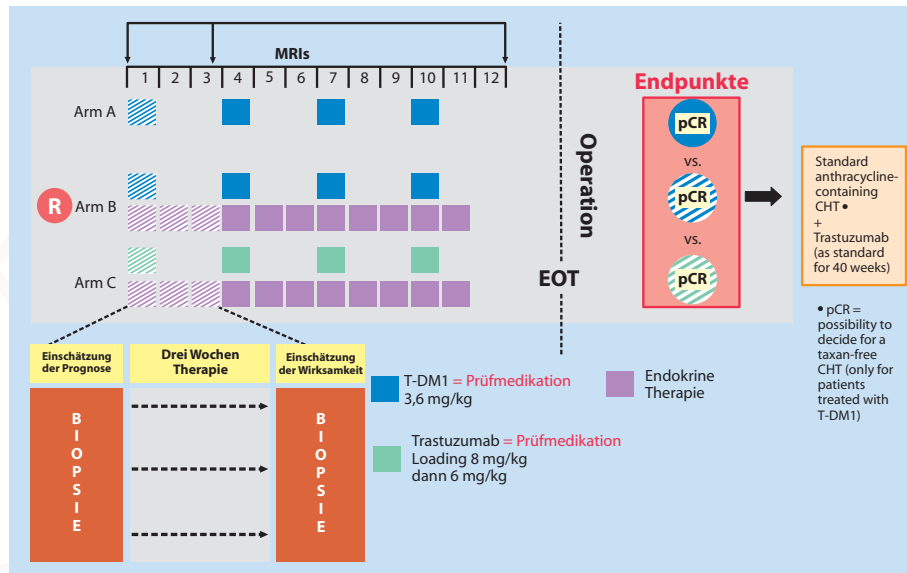


Abb. 8.2: Design der ADAPT-Studie: HR+/HER2+.

rapie wird eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie empfohlen.

► "HR-/HER2-"-Stratum

In Bezug auf das tripelnegative Mammakarzinom stellt sich die Frage nach der optimalen Chemotherapie und hier insbesondere dem Stellenwert platinhaltiger Kombinationstherapien:

Die Patientinnen erhalten über 12 Wochen Chemotherapie mit Paclitaxel +/- Carboplatin oder Gemcitabin (Abb. 8.3). Nach dem ersten Zyklus erfolgt eine Biopsie zur Analyse des Ansprechens. Nach den 12 Wochen schließt sich die Operation sowie die Standardtherapie mit EC an. Die Ergebnisse der Stanzbiopsie werden mit der Rate der pCRs verglichen, um Parameter identifizieren, die mit Substanz-spezifischer Sensitivität/Resistenz einhergehen, so dass in Zukunft optimalerweise bereits nach einem Zyklus auf ein (biochemisches) Nicht-Ansprechen reagiert werden kann.

► "HR-/HER2+ "-Stratum

Gerade bei Hormonrezeptor-negativen Tumoren ist die Sensitivität des Tumors gegenüber der HER2-gerichteten Therapie prognosebestimmend. Ähnlich wie bei dem TNBC ist eine pCR nach neoadjuvanter Therapie mit einer exzellenten Prognose assoziiert. Wir wissen jedoch auch, dass die Ansprechrate auf eine reine HER2-zielgerichtete Therapie (sog. duale Blockade) der-

art hoch sein kann, dass auf eine Chemotherapie ggf. verzichtet werden kann.

Dieses Konzept wird im HR-/HER2+-Arm verfolgt: In diesem Arm der Studie wird die schon mehrfach als effektiv erwiesene duale Blockade mit Trastuzumab und Pertuzumab mit und ohne begleitenden Taxan eingesetzt und die Rate der pCR nach 12 Wochen verglichen. Darüber hinaus erfolgt 3 Wochen nach Therapiebeginn eine Stanzbiopsie zur Evaluation des Ki67-basierten Ansprechens (Entwicklung von prädiktiven Faktoren) sowie von Apoptose und Proliferationsgenen. Diese Ergebnisse werden anschließend mit der Rate der pCR verglichen, um konsekutiv Rückschlüsse auf die Tumoransprechen zu ziehen. Es schließt sich zur Vervollständigung die Therapie mit EC gefolgt von Trastuzumab bzw. EC gefolgt von Taxol plus Trastuzumab an.

Dieser Arm ist zurzeit noch nicht zur Rekrutierung geöffnet.

Durchgeführt wird die Studie unter Schirmherrschaft der Westdeutschen Studiengruppe (WSG) unter Leitung von Prof. Dr. med. Ulrike Nitz (Bethesda Mönchengladbach) und Prof. Dr. Nadia Harbeck (LM-Universität München).

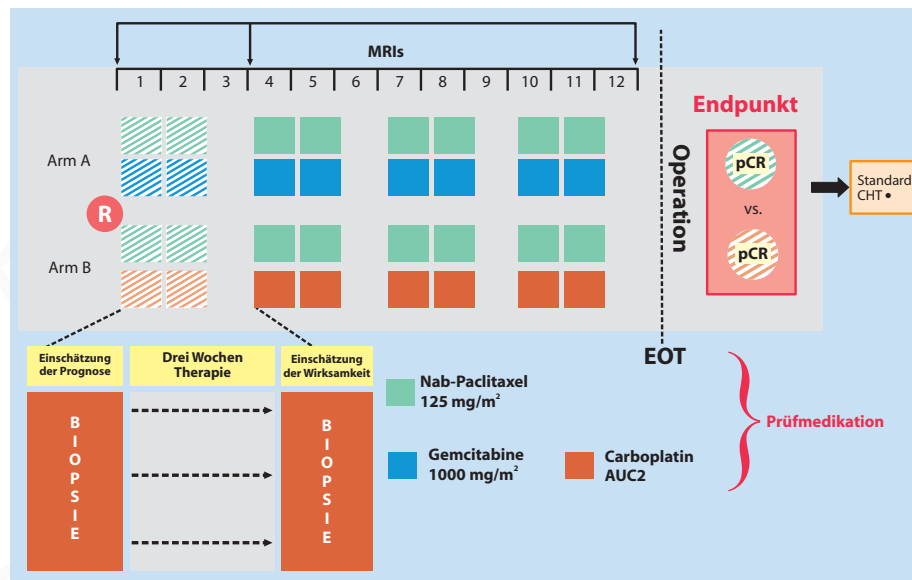


Abb. 8.3: Design der ADAPT-Studie: HR-/HER2-.

■ Olympia: BRCA als therapeutischer Angriffspunkt

Mit dem zunehmenden Verständnis von BRCA als indirekte therapeutische Zielstruktur durch den Einsatz von PARP-Inhibitoren sind Studienkonzepte entwickelt worden, die diese Substanzgruppe verwenden. Als Indikationsgruppe für den Einsatz von PARP-Inhibitoren werden Patientinnen mit BRCA-defizienten Tumoren sowie Patientinnen mit triple-negativen Tumoren gesehen. Hintergrund des Einsatzes von PARP-Inhibitoren bei Patientinnen mit TNBC ist die (molekular-)biologische Ähnlichkeit zwischen sporadischen triple-negativen Tumoren und hereditären Tumoren die oft auch als BRCAness bezeichnet wird. Hierzu gehören Studien zum Einsatz von Veliparib (NCT02032277) oder Olaparib (Neo-Olympia) in der neoadjuvanten Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms sowie auch der Einsatz des PARP-Inhibitors BMN-673 bei Patientinnen mit metastasierten BRCA-defizienten Tumoren (NCT01945775).

■ TREAT CTC: Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) zu Risikostratifizierung und Therapiemonitoring beim frühen Mammakarzinom

Der Nachweis von CTCs im peripheren Blut bei Patientinnen mit frühem Mammakarzinom ist mit einer ungünstigeren Prognose behaftet. Basierend

auf diesen Daten werden persistierende CTCs nach Abschluss einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie in der TREAT CTC-Studie herangezogen, um Patientinnen mit einem erhöhten Rezidivrisiko zu identifizieren. Diese Patientinnen könnten von einer zusätzlichen Systemtherapie profitieren.

Trastuzumab ist als hocheffektive Substanz beim HER2-positiven Mammakarzinom zugelassen. Neuere Daten unterstützen allerdings die Hypothese, dass der therapeutische Effekt der anti-HER2-zielgerichteten Therapie auf immunvermittelten Mechanismen beruht. Trastuzumab konnte durch antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cell cytotoxicity* (ADCC)) oder andere immunologische Mechanismen zirkulierende Tumorzellen eliminieren. Darüberhinaus konnten in präklinischen Modellen gezeigt werden, dass die hohe Effektivität von Trastuzumab in der adjuvanten Therapiesituation durch eine Beseitigung von Krebsstammzellen vermittelt wird, die unabhängig von der HER2-Amplifikation dieser Zellen ist [13]. Auch in ersten klinischen Studien wurde unabhängig vom HER2-Status des Primärtumors bzw. der CTCs durch eine Therapie mit Trastuzumab die Elimination von CTCs beobachtet. Patientinnen, bei denen nach Ende der Therapie keine CTCs mehr nachweisbar waren, zeigten ein verbessertes rezidivfreies Überleben [14;15].

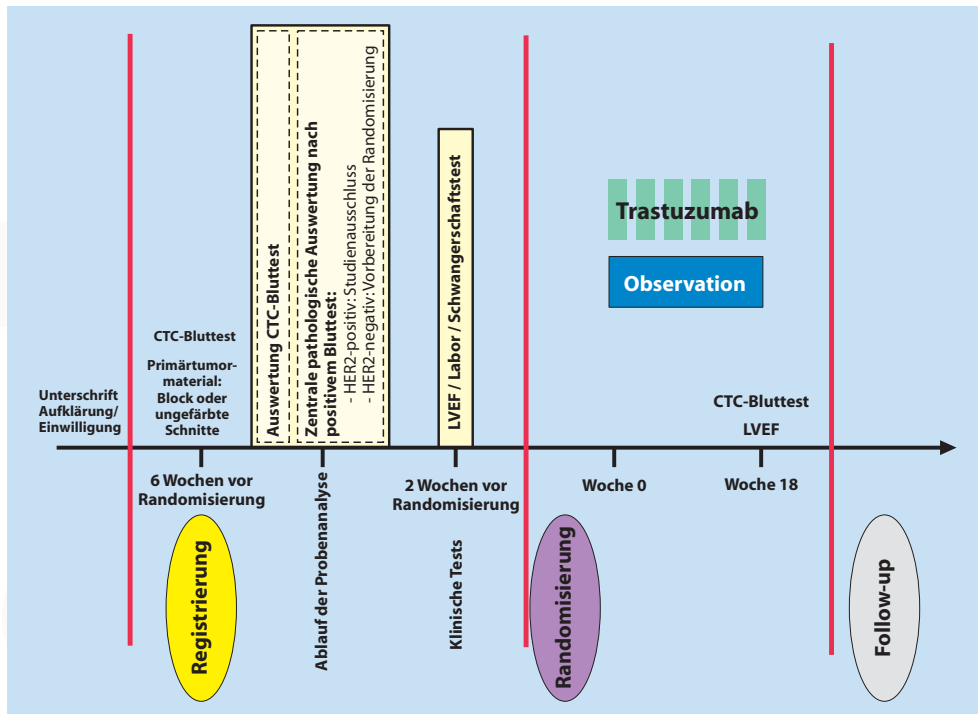


Abb. 8.4: Studiendesign der TREAT CTC-Studie.

Basierend auf diesen Daten wurde TREAT CTC (NCT01548677) als eine europäische randomisierte Phase-II-Studie unter der Sponsorschenschaft der EORTC und der Schirmherrschaft der BIG initiiert. In Deutschland wird die Studie durch die SUCCESS-Studiengruppe durchgeführt. Sie soll die Effektivität von Trastuzumab bei der Elimination von persistierenden CTCs nach (neo-)adjuvanter Chemotherapie und Operation beim HER2-negativen frühen Mammakarzinom untersuchen. Eingeschlossene Patienten werden randomisiert zu entweder 6 Zyklen Trastuzumab oder Beobachtung. Primäre Messgröße ist die Entwicklung der CTC-Zahl, gemessen als Baseline sowie nach Abschluss der Trastuzumabtherapie nach 18 Wochen. Klinische Endpunkte werden ebenfalls als sekundäre Endpunkte evaluiert. Es sollen an europaweit 100 Zentren geschätzte 2175 Patienten gescreent werden, um 174 Studienteilnehmer randomisieren zu können.

Adäquat operativ entferntes (R0), nicht rezidiertes, nicht fernmetastasiertes, HER2-negatives primäres invasives Adenokarzinom der Mamma mit Zustand nach:

- adjuvanter Chemotherapie bei pN+, oder
- neoadjuvanter Chemotherapie mit non-pCR

Nachweis von > 1 CTC in 15 ml peripherem Blut

- Tumoren aller Größen und aller Gradings erlaubt
- Frühere Bisphosphonattherapie möglich, muss jedoch pausiert werden
- Screening-Window 3 Wochen bis 24 nach Operation bei neoadjuvanter Therapie bzw. letztem Zyklus der adjuvanter Chemotherapie

Tab. 8.1: Einschlusskriterien der TREAT CTC-Studie.

Basierend auf der prognostischen Relevanz von CTCs beim Mammakarzinom ist TREAT CTC die erste randomisierte Multicenter-Studie, die den Nachweis von CTCs zur Entscheidungsfindung bei der Therapie des frühen Mammakarzinoms nutzt. Die Ergebnisse dieser Studie werden dazu

beitragen, den klinischen Nutzen von CTCs in diesem Setting zu evaluieren.

■ **Detect-Studie: Individualisierte Systemtherapie basierend auf dem Phänotyp zirkulierender Tumorzellen beim metastasierten Mammakarzinom**

Die prognostische Relevanz zirkulierender Tumorzellen konnte durch mehrere Studien belegt werden. Zudem wird im Falle einer Metastasierung die Re-Evaluierung therapierelevanter Marker empfohlen, z.B. HER2, ER, und PgR empfohlen. Da die zirkulierenden Tumorzellen den Phänotyp der Zellen mit dem Potential der hämatogenen Disseminierung widerspiegeln, kann möglicherweise durch die Charakterisierung von CTC eine Therapieoptimierung erfolgen.

Im Rahmen der DETECT-Studien soll die Wirksamkeit von auf den HER2-Status der zirkulierenden Tumorzellen abgestimmten Therapieansätzen beim HER2-negativen metastasierten Brustkrebs evaluiert werden. Fehm et al. konnten zeigen, dass bei Patientinnen mit HER2-negativem metastasierten Mammakarzinom in ca. 30 % der Fälle HER2-positive zirkulierende Tumorzellen nachweisbar sind [16]. Diese Patientinnen könnten von einer zusätzlichen anti-HER2-zielgerichteten Therapie profitieren. Daher werden in der DETECT III Studie Patientinnen mit dem Nachweis von HER2-positiven CTCs bei HER2-negativer Tumorerkrankung zwischen der geplanten Standard-

therapie und der Standardtherapie kombiniert mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib randomisiert. Als mögliche Standardtherapien sind eine Reihe von Chemotherapien und endokrinen Therapieansätzen je nach Ermessen des Prüfarztes und Vorthherapie der Patientinnen möglich. Neben der Effektivität von Lapatinib zur Elimination zirkulierender Tumorzellen wird die Wertigkeit zirkulierender Tumorzellen als frühzeitiger Marker für das Therapieansprechen geprüft.

Als weiterer Teilbereich des DETECT Studienkonzeptes ist die DETECT IV-Studie für Patientinnen mit dem Nachweis von HER2-negativen zirkulierenden Tumorzellen geöffnet. Die DETECT IVa Studie untersucht als nationale, multizentrische, einarmige Phase II Studie die Effektivität von Everolimus in Kombination mit einer endokrinen Therapie bei postmenopausalen Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem, HER2-negativem metastasiertem Mammakarzinom und HER2-negativen CTCs. Die Patientinnen erhalten den mTOR-Inhibitor Everolimus in Kombination mit einer vom Prüfarzt gewählten endokrinen Therapie (Tamoxifen, Exemestan, Letrozol oder Anastrozol) (DETECT IVa). Ein weiterer geplanter Behandlungsarm sieht vor, Patientinnen mit entweder Hormonrezeptor-negativem metastasiertem Karzinom oder Hormonrezeptor-positiven MBC und Indikation zur Chemotherapie mit Eribulin zu behandeln (DETECT IV b). Durch die begleitenden Forschungsprojekte wird darüber hinaus

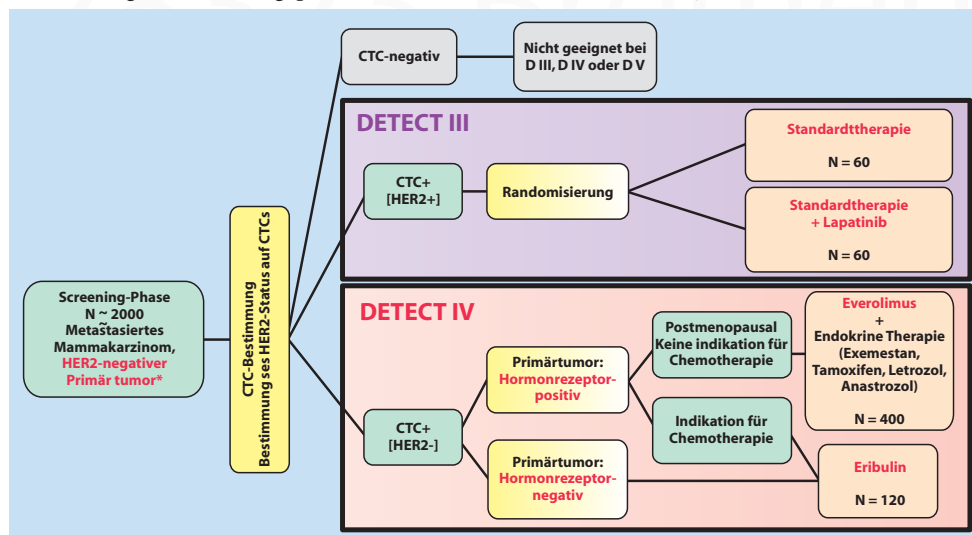


Abb. 8.5: Studiendesign der DETECT-Studie.

versucht, neue Therapiemöglichkeiten auf der Grundlage moderner CTC-Technologien zu entwickeln. Dieses umfassende Studienkonzept ermöglicht die umfassende Evaluation von zirkulierenden Tumorzellen zur Therapieoptimierung bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom.

Durchgeführt wird die Studie von der DETECT Studiengruppe (Sponsor: Prof. Janni, Universität Ulm, Principal Investigator: Prof. Fehm, Düsseldorf).

8.7. Literatur

- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797):747-752.
- Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M et al. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2013; 49(8):1825-1835.
- Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Anderson AE, Xiao L et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol* 2012; 13(7):688-695.
- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J ClinOncol* 2008; 26(8):1208-1215.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(8):793-802.
- Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestevedt M, Fehm T, Juckstock J et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse—a European pooled analysis. *Clin Cancer Res* 2011; 17(9):2967-2976.
- Janni W, Rack B, Terstappen LW, Pierga JY, Fehm T, Hall CS et al. A pooled analysis of the prognostic relevance of circulating tumor cells in early breast cancer. *Cancer Research* 73[24 Suppl]. 2013.
- Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(5):dju066.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(8):781-791.
- Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2014; 15(4):406-414.
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14 Pt 1):4218-4224.
- Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G et al. Circulating Tumor Cells and Response to Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: SWOG S0500. *J ClinOncol* 2014;JCO.
- Ithimakin S, Day KC, Malik F, Zen Q, Dawsey SJ, Bersano-Begey TF et al. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer Res* 2013; 73(5):1635-1646.
- Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24):8185-8194.
- Georgoulas V, Bozionellou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19m RNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol* 2012; 23(7): 1744-1750.
- Fehm T, Muller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124(2):403-412.

Application of Next Generation Sequen- cing to Breast Cancer

9. Application of Next Generation Sequencing to Breast Cancer

9.1. Introduction

The management of breast cancer requires a multi-disciplinary approach. Although the primary treatment for early breast cancer is surgery, radiotherapy, chemotherapy, hormone treatment and anti-HER2 therapies have been shown to improve survival in selected patients. It remains challenging to choose appropriate treatments for an individual patient as the “one size fits for all” model results in over-treatment for some patients and disease recurrence in others. To guide treatment choice, the majority of breast oncologists continue to rely on the major clinical-pathological features which have been proven to be prognostic in breast cancer, including tumor size, grade, Ki67, ER and HER2 status; axillary lymph node status and patient age and fitness. These factors have been included in decision making tools such as Adjuvant! Online and PREDICT. Although these tools have been useful in informing patient and clinicians of the benefits and risks of adjuvant systemic treatment, they do not predict whether further systemic treatment(s) is definitely necessary for a particular patient.

More than a decade ago, the advent of gene expression profiling using microarray techniques allowed researchers to venture into the heterogeneous nature of breast cancer. Perou and co-workers (Perou et al., 2000) used two dimensional hierarchical clustering to identify gene markers whose expression values defined the breast cancer subtypes luminal, basal-like, normal-like and ERBB2-like. The luminal subtype was further subdivided into three subtypes including A and B (Sorlie et al., 2001), where luminal A has a lower proliferation marker Ki67 relative to luminal B (Smid et al., 2008). These subtypes differed in their clinical outcome (Rouzier et al., 2005), their preferential site of relapse (Parker et al., 2009) and their response to chemotherapy (Prat and Perou, 2011). For practical purposes, the initial gene list was later condensed to facilitate analysis and translated to address formalin-fixed-paraffin-embedded tissue (Parker et al., 2009). The subtypes were recently deconstructed and refined to reveal novel subtypes like claudin-low breast cancer (Stephens et al., 2009).

However, analyzing only the transcriptome – the RNA molecules that are transcribed from DNA – has several methodological limitations. The rapidly increasing power of genome-analysis technologies like next generation sequencing (NGS) as described in this chapter give insight not only in the transcriptome but also in DNA mutations, including sequence changes which create non-synonymous protein changes. Furthermore, NGS provides information structural changes (e.g. translocations), altering the order and frequency of which DNA segments occur in the genome, on copy-number variants (e.g. amplifications or deletions) and epigenetic changes, which regulate gene transcription rates without changing the nucleotide sequence. Using these powerful and rapidly evolving genomic technologies, we are gaining deeper insight into the heterogeneity of breast cancer. This will lead to a more accurate prognostication of breast cancer and also facilitate the development of more personalized therapeutic approaches targeting specific deregulated cellular alterations and pathways.

9.2. The technology platform

DNA sequencing technology was established by Sanger’s and Gilbert’s groups using the chain termination method in the late 1970s (Maxam and Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977) and later used for human genome project (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). The human genome is composed of roughly 3 billion nucleotides of DNA and over 20,000 protein-coding mRNA transcripts. Using Sanger-based chain-terminating dideoxynucleotide sequencing, assembly of the first human genome sequence took over 10 years, over one billion dollars, and over 20 laboratories in 2000. Today, we can sequence a human genome – healthy or tumor – in less than one week, in one lab, for less than ten thousand dollars. This decrease of 4.2 orders of magnitude (16,350-fold decrease) over the past decade (Wetterstrand, 2013) is the result of a revolutionary new sequencing platform, namely “next generation sequencing” (NGS).

■ Sanger sequencing

Sanger sequencing is the first-generation sequencing technology (Hutchison, 2007). Extracted DNA is input, purified and amplified using an *in vivo* technique such as cloning. A reverse strand synthesis is performed using a mixture of primers, polymerases, deoxy-nucleotides (dNTPs) and di-deoxy-nucleotides (ddNTPs). Synthesis of a complementary DNA strand starts in the presence of dNTPs and randomly terminated once a ddNTP is added. The resulting oligonucleotides are separated by size using polyacrylamide gel electrophoresis, and conjugated with fluorophores. The DNA sequence is determined in a single reaction using four different fluorophores labelled to the different terminators (ddATP, ddCTP, ddTTP, or ddGTP). The original slab gel electrophoresis has been subsequently replaced by capillary gel electrophoresis, which is faster and has better resolution and higher separation rate of fragments. The use of replaceable linear polymer solutions also results in the ability to reuse the capillaries in multiple electrophoretic runs and thus increase sequencing efficiency. The high throughput capillary array electrophoresis enables many samples to be analysed in parallel. Furthermore, low input DNA amounts are now possible as a result of the use of more sensitive detection systems as well as the use of heat-stable DNA polymerase *Thermus aquaticus* (Taq polymerase) which allows increased rounds of primer extensions.

■ Next generation sequencing

NGS platforms generate sequences similar to those from Sanger sequencing but differ in the amounts of sequences. The operator prepares a DNA library from the sample of interest (DNA or cDNA from

RNA), the library of DNA molecules is placed in the NGS instrument and the instrument outputs computer files that are converted into sequence reads (A/C/G/T). However, unlike Sanger sequencing, a single one-week run of an NGS instrument can generate 3 billion sequence reads comprising 600 billion nucleotides (see Figure 9.1). There have been several NGS platforms from different vendors including pyrosequencing (Roche 454), sequencing-by-synthesis (Illumina), sequencing-by-ligation (Life Technologies SOLiD) and sequencing-by-monitoring-pH (Life Technologies Ion Torrent PGM and Proton), which are summarized in Table 9.1.

Pyrosequencing is used by Roche 454 instruments. Pyrosequencing utilizes pyrophosphate release upon incorporation of a nucleotide into a growing DNA strand, which is detected by a coupled enzymatic reaction involving ATP sulphurylase (Metzker, 2010). When a correct dNTP is added, pyrophosphate is generated, resulting in ATP sulphurylase converting adenosine 5'-phosphosulphate (APS) to ATP and enabling luciferase to react with its substrate to produce visible light which is measured by a detector. During automated pyrosequencing, DNA is sheared into different fragments and an adaptor is ligated to each fragment. The fragments are attached to beads which are contained in emulsion droplets containing PCR reagents. The DNA fragments are amplified within the droplets, which are then transferred to wells containing the pyrosequencing enzymes and the emitted light is measured by the detector. This method can read a sequence of 400-500 base pair and is useful for *de novo* sequencing of previously uncharacterized genomes. However, Roche announced that they will no longer support the 454 instruments.

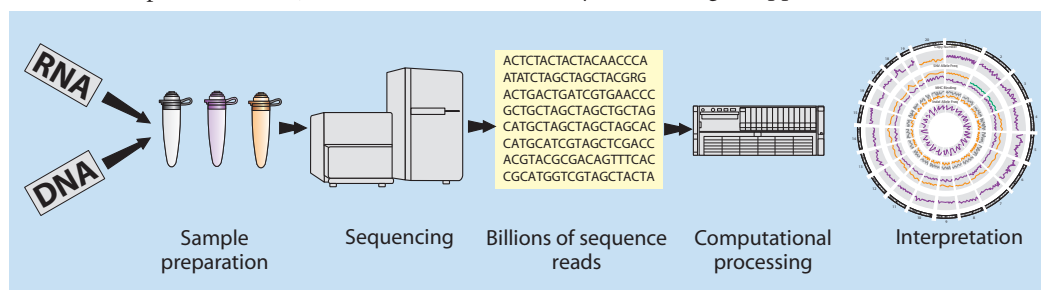


Figure 9.1: NGS sequencing. DNA and RNA samples are prepared for sequencing, including amplification and adaptor ligation. NGS sequencing generates billions of sequence reads. These reads are computationally processed, comparing tumor reads to a reference genome, followed by interpretation.



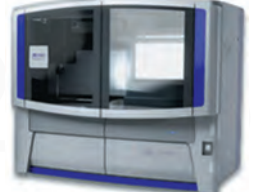



	Style of sequencing	Average read length	Number of reads	Time for a run	
Illumina HiSeq 2500	Sequencing-by-synthesis	300 nt (150 nt x 150 nt)	2.8 billion	8 days	
Illumina MiSeq	Sequencing-by-synthesis	600 nt (300 nt x 300 nt)	15 million	24 hours	
Life Tech SOLiD 5500	Sequencing-by-ligation	110 nt (75 nt x 35 nt)	1.5 billion	7 days	
Life Tech Ion Torrent	Sequencing-by-pH	400 nt	5 million	2 hours	
Roche 454 GSL FLX+	Pyrosequencing	700 nt	1 million	23 hours	
PacBio RS II	DNA polymerase imaging	8,000 nt	40 thousand reads per cell	2 hours	

Table 9.1: Six popular next-generation sequencing instruments. The style of sequencing, the average read length, the number of reads and the time for a run are listed. Each instrument can be run in multiple configurations impacting run time and read length.

Sequencing-by-synthesis is used in instruments from Illumina Inc, the current market leader. The Illumina HiSeq 2500 instrument can sequence a genome in 10 days and the Illumina MiSeq bench-top instrument. The platforms use a reversible terminator chemistry to perform sequencing by synthesis, similar to that of Sanger sequencing (Metzker, 2010). It requires a library preparation where the sample will be sheared and fragmented into 50-600 base pairs. The fragments will then undergo a process of end repair and “A” tailing before adapter ligation in both ends. Molecular barcodes can be added to individual samples for increased multiplexing. The next step is cluster generation. To achieve that, the double-stranded DNA library is converted into single-stranded DNAs using sodium hydroxide before it is pumped through the channels of a flow cell. The single-stranded DNA fragments then bind randomly to the inside surface of the flow cell, which contain oligonucleotides complementary to adapter ends of the sequencing library. The single-stranded DNA library molecules hybridize to these oligonucleotides before the polymerases and the nucleotides initiate a reverse strand synthesis from the hybridized part. In a process known as bridge amplification, the new strand bends over and attached to another oligonucleotide complementary to the adapter sequence of the free end of the strand. The double strand molecules are then denatured to leave single-stranded template anchored to the surface. This process of solid-phase amplification is repeated many times to generate clusters of 1000 identical copies of each template molecule in close proximity. The completed amplification results in several millions of clusters generated in each channel of the flow cell.

A sequencing cycle begins by adding four labelled reversible terminators, primers and DNA polymerases. After incorporation of each fluorescence-labelled nucleotide, the reaction is stopped by the terminator. The free nucleotides and polymerases are washed away. The fluorescence dye is then excited by using two different lasers (red for A and C; green for G and T) with appropriate filters to identify the base. The fluorescence dye is then enzymatically cleaved to allow the incorporation of the next nucleotide. The sequence cycle is repeated, one base at a time, to determine the bases of a fragment.

The HiSeq sequences each molecule up to 150 nucleotides from each end (the 5' and 3' ends), resulting in a 150 nt x 150 nt paired-end sequence read for each input molecule. One HiSeq run can generate up to 3 billion sequence reads comprising 600 billion nucleotides. The Illumina MiSeq instrument generates less data but faster, with reads up to 300 nt x 300 nt.

Sequencing-by-ligation is used by instruments from Life Technologies. Similar to 454 platform, DNA fragments are ligated to adaptors and immobilized onto beads contained within the emulsified droplets before PCR reaction (Metzker, 2010). In the SOLiD sequencing chemistry, the beads are covalently linked to a glass slide following amplification and primers are added and annealed to the ends of the DNA fragments. A mixture of short oligonucleotides and DNA ligase are added so that each oligonucleotide ends with a different pair of bases. Ligation occurs when the probe contains complementary dinucleotides: unmatched probes do not ligate and are washed off. Each probe is labeled with a fluorescence dye. Since the probe needs more than two bases to pair correctly, there is a high degree of accuracy with this method. However, the read length is shorter than 454 method (~ 50 base length) and thus most useful for re-sequencing rather than *de novo* genome assembly.

Sequencing-by-monitoring-pH is used by the Life Technologies Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) and Proton System desktop sequencers, integrating semiconductor technology that sensitively detects pH changes (Metzker, 2010). Library preparation is similar to that in the SOLiD platform, resulting in amplified molecules attached to beads in individual oil micelles, which are deposited in a chamber whose lower surface is a semiconductor design to detect positive charges. During DNA replication, individual nucleotides are flooded into the chamber and incorporated into the growing DNA strand. Incorporation releases a hydrogen ion and a pyrophosphate; the semiconductor chip detects the positively charged hydrogen release.

Third-generation sequencing instruments are designed to increase read lengths, increase accuracy, decrease costs, increase speed, or simplify workflows. The Helicos HeliScope was able to sequence single molecules without prior library or amplifi-

cation (Metzker, 2010). However, company filed for bankruptcy in 2013. The Pacific Biosciences RS II instrument sequences single molecules in real time (SMRT sequencing) using a DNA polymerase that is affixed in a small volume. As replication takes place, fluorescently labeled nucleotides are incorporated by the polymerase into the growing DNA strand and imaged by optics. While the stochastic error rate is relatively high, the resulting sequence reads have a median length of over 8,000 nt, enabling easier computational assembly of genome. Other vendors, such as Oxford Nanopore Technologies, have announced plans to sell miniaturized sequencing instrument the size of a USB stick. The device detects charges as DNA molecules are pulled through nanopores in a graphene sheet, enabling long sequences reads and high throughput.

■ NGS applications

NGS instruments generate sequence reads from input libraries, which can be derived from DNA or RNA. NGS can be used to sequence genomic DNA from both fresh frozen (FF) and formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) tissues. The entire genome can be sequenced (whole genome sequencing); known exons can be isolated and sequenced (“exome-seq”), saving costs and time; and “targeted re-sequencing” amplifies genes of interest, such as onco-relevant gene panels, followed by NGS sequencing. With the DNA reads, one can determine the genome of a patient (the “germline” non-mutated genome) and, by comparing the patient tumor to the patient germline genome, one can identify tumor-specific somatic mutations, including point mutations, insertions and deletions, copy number amplifications, and structural re-arrangements.

Libraries from RNA can also be sequenced (“RNA-Seq”). The number of NGS sequence reads from a RNA-derived library is proportional to the abundance of the transcript in the original sample. The RNA-Seq derived gene expression values have a higher fidelity, improved accuracy and high dynamic range relative to earlier high throughput gene expression profiling platforms. The resultant NGS reads also enable exon-specific expression quantification. Use of FF tissues is straightforward; several labs, including ours, have demonstrated that FFPE-derived RNA can also be sequenced (REF). As they contain the sequence, RNA-Seq sequence

reads enable more than expression profiling. One can, for example, determine patient HLA type and HLA expression (Boegel et al., 2013), allele specific expression (Babak et al., 2010), the presence of viruses (Tang et al., 2013) and RNA editing (Li et al., 2009).

■ Bioinformatics analysis

The technology revolution in generating NGS data has been accompanied by an equally impressive bioinformatics revolution for the processing, analysis and interpretation of output data. Automated computational workflows now reliably turn the huge volumes of raw NGS data into large but manageable files containing nucleotide sequences. Novel algorithms, such as BWA (Li, 2009), Bowtie (Langmead, 2010) and STAR (Dobin et al., 2013), rapidly compare the short nucleotide sequence to a reference human genome. We note, however, that the somatic mutations determined by multiple algorithms to identify mutations, such as Mutect (Cibulskis et al., 2013) and (Larson et al., 2012), have a surprisingly small congruence; the algorithms continue to be optimized. Finally, the tools to interpret the relevance and impact of identified mutations and gene expression profiles, either from retrospective cohort studies or from an individualized, single patient needing clinical guidance, are helpful but juvenile. We expect the interpretation tools will be rapidly improved, from both academic and industrial groups, as our ability to integrate clinical, molecular and pharmaceutical knowledge increases.

9.3. Genomic landscape of breast tumors

Several studies have applied the genomic techniques outlined above and found an impressively complex and heterogeneous landscape of breast cancer with forward-looking clinical implications.

Early analyses using a paired-end sequencing strategy identified somatic rearrangements in 24 breast cancer genomes and these rearrangements showed a remarkably high diversity (Stephens et al., 2009). Most observed rearrangements in this study were intrachromosomal; tandem duplications were the most common subclass, suggesting the presence of a defect in DNA maintenance. Interestingly, breast carcinomas with many tandem duplications are usually estrogen receptor (ER) ne-

gative and classified by expression profiles as basal-like. On the contrary, ER positive luminal tumors displayed few tandem duplications and somatic rearrangements.

Building on these results, Ellis and co-workers performed a comprehensive whole-genome analysis of ER positive breast tumors treated with the aromatase inhibitor letrozole (Ellis et al., 2012). They used NGS to investigate 77 pre-treatment tumor biopsies accrued from patients in two studies of neoadjuvant aromatase inhibitor therapy. 46 tumors underwent whole-genome sequencing and 31 cases underwent exome sequencing. This was followed by analysis for somatic alterations and their association with aromatase inhibitor response. Changes in cell proliferation as measured by Ki-67 (gene MKI-67) expression are associated with response of ER positive breast carcinomas treated with neoadjuvant endocrine therapy (Ellis et al., 2008). Thus, based on post-treatment Ki-67 values, Ellis and co-workers were able to classify 29 of the examined tumors as aromatase-inhibitor resistant and the remainder of the tumors as aromatase inhibitor sensitive. They examined recurrent mutations in 310 tumors and identified 18 significantly mutated genes, with PIK3CA mutations most frequent. However, PIK3CA mutations were associated with neither clinical nor Ki-67 response, limiting their clinical significance. They found MAP3K1 mutations were associated with luminal A status, low-grade histology and low proliferation rates while TP53 mutations were associated with the opposite pattern and rarely found in luminal A tumors. They applied pathway analysis to contrast the signaling perturbations in aromatase inhibitor resistant and sensitive breast carcinomas and found that mutations in MAP2K4, a MAP3K1 substrate, produced similar perturbations as MAP3K1 loss. GATA3 mutations did not influence baseline Ki-67 levels but were enriched in samples exhibiting greater percentage Ki-67 decreases, indicating that GATA3 mutation status might be a predictive marker for aromatase inhibitor response. However, most recurrent mutations were relatively infrequent documenting an extreme genomic heterogeneity.

Using high-throughput RNA sequencing (RNA-seq), Shah and co-workers examined 104 triple-negative breast cancer (TNBC) patients which, by definition, do not express ER, progesterone recep-

tor (PgR) or HER2 (Shah et al., 2012). First, they found that only a minority (36 %) of mutations were expressed. Not surprisingly, the basal subtype of TNBC displayed more variation in their clonal frequencies than non-basal TNBC, with TP53, PIK3CA and PTEN somatic mutations clonally dominant compared to other genes. Interestingly, approximately 20 % TNBC contained of potentially “clinically actionable” somatic aberrations, including BRAF mutations, EGFR amplifications and ERBB2 and ERBB3 mutations. Taken together, this work shows that the TNBC subclass is striking heterogeneous and highlights the importance of individual tumor clonal genotypes.

In an attempt to integrate breast cancer subgroups with their respective molecular drivers, Curtis and co-workers performed a comprehensive analysis of copy number variations and gene expression in a discovery and validation set of 997 and 995 primary breast tumors, respectively (Curtis et al., 2012). They could show that acquired somatic copy number aberrations (CNAs) correlated to expression changes ~40 % of genes. Unsupervised analysis of paired DNA–RNA profiles revealed novel subgroups with distinct clinical outcomes providing a novel molecular classification of the breast carcinomas, derived from the impact of somatic CNAs on the transcriptome. Impressively, the authors could link their integrated genomic/transcriptomic results with long-term clinical outcome. When examining CNA-expression associations in *cis* (a DNA copy number variation at a locus has an impact on its own gene expression) to identify putative driver genes, Curtis et al. could, for instance, strengthen the evidence for MAP2K4 as a tumor suppressor in breast cancer. When looking at genomic variants acting in *trans* (a DNA copy number variation at a locus is associated with gene expression at other sites in the genome), they could, for example, highlight known driver modules, including MYC.

By joining clustering of copy number and gene expression data, Curtis and co-workers identified 10 integrative clusters typified by copy number aberrations which split several groups into subtypes with distinct clinical outcome. For instance, one cluster was termed “CNA-devoid” subgroup because of an essentially flat copy number landscape. While the cluster includes tumors with different intrinsic subtypes, including both ER-positive and

ER-negative cases, the novel cluster had a good outcome. Further, the tumors in this cluster exhibited an extensive lymphocytic infiltration, indicating an immunological response which has been effectively associated with prognosis in early breast cancer (Schmidt et al., 2008). This integrative analysis and joint clustering of CNAs and gene expression profiles demonstrate how gene copy number aberrations affect gene expression in breast cancer and reveal novel tumor subgroups with distinct long-term clinical outcome, suggesting a path to develop more robust patient biomarker classifiers.

An elaborate approach to evaluate the original intrinsic subtypes with novel genomic platforms was undertaken by The Cancer Genome Atlas network (TCGA) (Cancer Genome Atlas, 2012). In their comprehensive work, they used not only genomic DNA copy number arrays and exome sequencing, but also DNA methylation, messenger RNA arrays, microRNA sequencing and reverse-phase protein arrays to provide deeper insights in the previously defined breast cancer subtypes luminal A, luminal B, HER2-enriched (HER2E), and basal-like. While each subtype showed significant molecular heterogeneity and only 3 genes (TP53, PIK3CA and GATA3) were somatically mutated in at greater than 10 % incidence, many subtype-associated and novel mutations were identified. The overall mutation rate was lowest in luminal A subtype and highest in the basal-like and HER2E subtypes. The most commonly mutated gene in luminal A tumors was PIK3CA (45 %) while TP53 was frequently mutated in basal-like breast cancer (80 %). The HER2E subtype displayed a hybrid pattern with a high frequency of TP53 (72 %) and PIK3CA (39 %) mutations. Regardless of the subtype, TP53 and PIK3CA mutations rarely co-occurred in a single tumor. Utilizing DNA methylation arrays, the authors identified 4,283 differentially methylated genes: hypermethylation and hypomethylation were associated with luminal B and basal-like tumors, respectively.

To identify higher-order structure in breast tumors, significant clusters identified by each of the five platforms were integrated using a multiplatform unsupervised consensus clustering. This “cluster of clusters” (C-of-C) approach revealed four major C-of-C subdivisions which correlated well with previously published mRNA subtypes. This underlines that that the information content

from copy number aberrations, miRNAs and methylation was captured at the level of gene expression and protein function. Furthermore, integrated pathway analyses identified many subtype-specific mutations and copy number changes that identify potentially therapeutically actionable genomic aberrations. Impressively, considering the phenotypic heterogeneity of breast cancer outlined above, this plethora of genomic, transcriptome, proteomic and epigenetic alteration data converged phenotypically into four main breast cancer classes.

Comparing the breast tumors to other tumor types, basal-like breast carcinomas show a surprisingly strong molecular concordance with high-grade serous ovarian carcinomas, suggesting a related etiology. The concordance suggests the possibility of similar therapeutic opportunities. Platinum compounds are standard in ovarian cancer and thus could be investigated in basal-like breast cancer.

Clearly, these novel and powerful genomic techniques will give more profound insight in breast cancer heterogeneity and should pave the way for more accurate prognostication and novel therapeutic approaches, either treating “actionable mutations” with targeted therapies or, even more challenging, performing personalized vaccination strategies. However, it should be always kept in mind that despite understandable enthusiasm for any novel genomic technique, rigorous quality control, validation in independent datasets, and confirmation of independent significance to achieve a high level of evidence (Simon et al., 2009) is mandatory before any novel prognostic or predictive factors move from the bench to the bedside.

The NGS profiling data from the TCGA projects are listed on the TCGA homepage (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>). Processed data from 23 different tumor indications can be effectively mined using the University of California, Santa Cruz, Cancer Genomics Browser (<https://genome-cancer.ucsc.edu/>). As of October, 2013, there several hundred genome-wide profiles from breast tumors, including profiles of gene expression, somatic point mutations, copy number variations, DNA methylation, and protein levels. For example, Figure 9.2 shows normalized breast tumor gene expression profiles from the UCSC Cancer Genom-

ics Browse, along with the associated PAM50 breast tumor classification into luminal A, luminal B, HER2+ and basal-like subtypes. HER2 expression is observed in most tumors classified as HER2+, as expected, but also some luminal A and luminal B tumors as well. ER expression is observed almost exclusively in luminal A and B tumor. Basal-like tumors, as by definition, do not express HER2, ER or PgR. Proliferation markers, such as KI-67, distinguish luminal A from luminal B tumors. In terms of existing drug targets, EGFR and MET are over-expressed in basal-like and some HER2+ tumors whereas MEK is over-expressed in luminal B tumors.

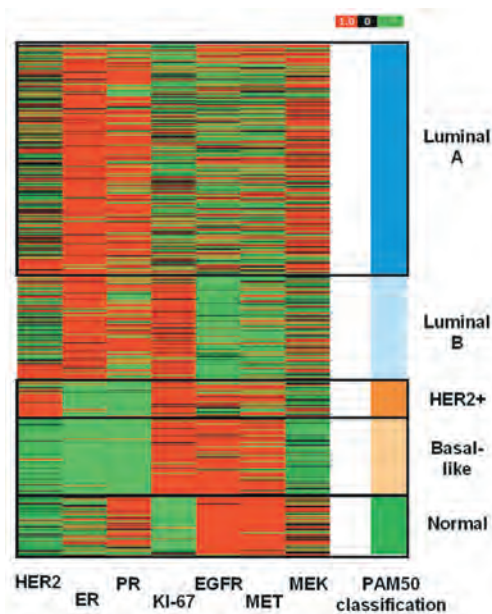


Figure 9.2: RNA-Seq gene expression data from the TCGA Breast Tumor cohort, accessed through the UCSC Cancer Genomics Browser. Gene expression values are normalized by subtracting the mean from all samples. Values greater than the mean are red; values less than the mean are green.

Finally, NGS profiling of tumors and single cells has identified that there is not only inter-tumor heterogeneity, but there is frequently significant intra-tumor heterogeneity in breast tumors. The study of triple negative breast tumors by Shah et al. (Shah et al., 2012) showed that some tumors contain significant sub-clonal populations. Furthermore, some tumors contain sub-populations that

do not include any of the dominant TP53, PTEN or PIK3CA mutations often considered founder mutations. Nik-Zainal et al. (Nik-Zainal et al., 2012) used NGS and novel algorithm to determine the evolutionary history of 21 breast tumors and found prominent subclonal diversity. While most mutations occur only in a fraction of all subclonal populations, a dominant clonal population usually exists and represents over 50 % of all tumor cells. Furthermore, Navin et al. (Navin et al., 2011) were able to use NGS to sequence single cells from a breast tumor; they found three distinct subpopulations in the primary tumor and that a metastasis was formed from a single clonal subpopulation.

9.4. Clinical use

The described applications use the genomics platforms to profile samples from large cancer cohort studies to retrospectively identify novel candidate targets, novel candidate biomarkers, or novel potential therapeutic combination regimens. Candidate biomarker targets are then investigated in pre-clinical and clinical studies and translated to clinical profiling platforms, resulting in target-focused clinical assays such as MammaPrint® and Oncotype DX® (Harris et al., 2007), which have been used to stratify patients into high, intermediate and low risk groups for therapy selection.

The NGS platform itself is also starting to find application as a clinical diagnostic tool. Using NGS profiling the genome and transcriptome of a patient adenocarcinoma, Jones et al. (Jones et al., 2010) identified non-synonymous point mutations, DNA copy number changes, and tumor over-expressed. They predicted that the tumor cells were driven by the *RET* oncogene and based on this predicted, the patient was treated with sunitinib, followed by 4 months of stable disease. When resistance occurred, the patient was treated with sorafenib and sulindac, followed by 3 months of stable disease at which point resistance occurred through MAPK and AKT pathways. Their conclusion was that the NGS profiles guided the therapeutic decision making into a non-obvious, and likely beneficial, direction.

Additional early examples of testing NGS for patient treatment include Welch et al. (Welch et al., 2011), who used whole genome and transcriptome sequencing of a patient with acute promyelocytic

leukemia. Within 7 weeks, they identified and validated a novel structural variation that resulted in an expressed bcr3 *PML-RARA* fusion gene, leading to a modification in the patient's treatment plan. Roychowdhury et al. (Roychowdhury et al., 2011) have run a pilot study exploring application of NGS profiling for therapy selection (for patients) and patient selection (for clinical trials). They were able to return therapeutically relevant results, including clinically relevant mutations (NRAS, TP53) and overexpression (CDK8) to the tumor board within four weeks. To move beyond pilot studies, teams are now defining criteria for the use of omics-based predictors in clinical trials (McShane et al., 2013).

A novel NGS application is to design individualized, patient-specific therapeutic cancer vaccines that are synthesized on-demand for each patient (Castle et al., 2012). Therapeutic anti-tumor cancer vaccines can now be synthesized rapidly, on-demand and in GMP quality (Diken et al., 2013). NGS-based profiling of the patient tumor, followed by bioinformatics analysis, results in a list of patient-specific, non-synonymous, expressed and immunogenic mutations; these antigens are used as a blueprint for the synthesis of the patient-specific individualized vaccines against cancer (IVACs). The concept will be clinically tested with triple negative breast tumor patients in the MERIT clinical trial starting in 2014 (<http://merit-consortium.eu/>).

The concept of a "liquid biopsy" incorporating an NGS profile is being investigated by many groups. This concept involves examining molecular species in patient blood, such as profiling single circulating tumor cells (CTCs) (Heitzer et al., 2013), tracking mutations in CTCs and cell free DNA (cfDNA) (Dawson et al., 2013), and profiling T cell TCR sequences (clinical trial NCT01306188). Recent studies have shown that sequencing of plasma DNA can be used to monitor early treatment response and emergence of drug resistance (Murtaza et al., 2013) and, as a liquid biopsy is minimally invasive, it enables longitudinal patient profiling. For example, a patient with ER-positive and HER2-positive breast cancer was treated with tamoxifen and trastuzumab. Longitudinal liquid biopsy profiling showed that the tumor developed a truncating mutation in MED1 (mediator complex subunit 1), an ER co-activator involved in ta-

moxifen resistance following treatment. The patient was then treated with lapatinib in combination with capecitabine. Longitudinal liquid biopsy profiling showed that this led to a splicing mutation in gene GAS6 (an AXL ligand), which causes lapatinib resistance (Murtaza et al., 2013). Successful implementation will allow us to monitor evolution of the patient tumor, including undetected metastases, and immune system throughout treatment and incorporate the results into clinical decision making to modify and optimize patient treatment.

Conclusion

The next generation sequencing platform has been available for 5 years and has already enabled us to better understand the genomic and transcriptomic processes and heterogeneity associated with breast cancer. The platform has enabled us to identify genes and mutations that distinguish phenotypically different subgroups that have different therapeutic sensitivities. Multiple biomarkers have been translated to clinically approved assays. Many novel targets have been identified and are currently in drug development projects and trials.

NGS is starting to be used in clinical settings. Whole genome, exome, and targeted resequencing pilot projects have demonstrated the workflows, that the timelines are clinically acceptable, and that the results can impact therapeutic decision making. Clinical trials are starting that use a patient-specific NGS mutanome profile to design and manufacture a custom drug product for the individual patient. Finally, NGS is being used as a longitudinal diagnostic assay.

The technology platform continues to evolve rapidly, including the lab processes, the data processing and the data interpretation. We look forward to more and improved translational and clinical applications.

Main points

- Next generation sequencing is a new technology platform that enables rapid determination of patient tumor genomes and transcriptomes
- The profiling of hundreds of breast tumors has identified known and novel recurrent mutations, several of which are now in drug and biomarker development projects.
- RNA expression recapitulates and refines breast tumor subtypes established using DNA and IHC assays. HER2+ tumors express ERBB2 (HER2); luminal A and B tumors express ESR1 (ER); and basal-like/triple negative tumors lack expression of ESR1, ERBB2 and PgR. Luminal A and B tumors can be distinguished by proliferative markers such as MKI67 (Ki-67) and FOXM1. Basal-like and HER2+ tumors are more likely to contain TP53 mutations whereas luminal A tumors are more likely to contain PIK3CA mutations.
- Novel “liquid-biopsy” patient blood profiling is enabling less invasive and longitudinal testing.
- Tumor mutation and expression profiles are enabling individualized immunotherapeutics designed and manufactured for single patients.

9.5. References

- Babak, T., Garrett-Engle, P., Armour, C.D., Raymond, C.K., Keller, M.P., Chen, R., Rohl, C.A., Johnson, J.M., Attie, A.D., Fraser, H.B., *et al.* (2010). Genetic validation of whole-transcriptome sequencing for mapping expression affected by cis-regulatory variation. *BMC Genomics* 11, 473.
- Boegel, S., Lower, M., Schafer, M., Bukur, T., de Graaf, J., Boisguerin, V., Tureci, O., Diken, M., Castle, J.C., and Sahin, U. (2013). HLA typing from RNA-Seq sequence reads. *Genome Med* 4, 102.
- Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70.
- Castle, J.C., Kreiter, S., Diekmann, J., Lower, M., van de Roemer, N., de Graaf, J., Selmi, A., Diken, M., Boegel, S., Paret, C., *et al.* (2012). Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 72, 1081-1091.
- Cibulskis, K., Lawrence, M.S., Carter, S.L., Sivachenko, A., Jaffe, D., Sougnez, C., Gabriel, S., Meyerson, M., Lander, E.S., and Getz, G. (2013). Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 31, 213-219.
- Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiva, S., Yuan, Y., *et al.* (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486, 346-352.
- Dawson, S.J., Tsui, D.W., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O.M., Chin, S.F., Dunning, M.J., Gale, D., Forshew, T., Mahler-Araujo, B., *et al.* (2013). Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 368, 1199-1209.
- Diken, M., Kreiter, S., Selmi, A., Tureci, O., and Sahin, U. (2013). Antitumor vaccination with synthetic mRNA: strategies for in vitro and in vivo preclinical studies. *Methods Mol Biol* 969, 235-246.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.
- Ellis, M.J., Ding, L., Shen, D., Luo, J., Suman, V.J., Wallis, J.W., Van Tine, B.A., Hoog, J., Goiffon, R.J., Goldstein, T.C., *et al.* (2012). Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 486, 353-360.
- Ellis, M.J., Tao, Y., Luo, J., A'Hern, R., Evans, D.B., Bhatnagar, A.S., Chaudri Ross, H.A., von Kameke, A., Miller, W.R., Smith, I., *et al.* (2008). Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on post-neoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst* 100, 1380-1388.
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., Bast, R.C., Jr., and American Society of Clinical, O. (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25, 5287-5312.
- Heitzer, E., Auer, M., Gasch, C., Pichler, M., Ulz, P., Hoffmann, E.M., Lax, S., Waldispuehl-Geigl, J., Mauer- mann, O., Lackner, C., *et al.* (2013). Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res* 73, 2965-2975.
- Hutchison, C.A., 3rd (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res* 35, 6227-6237.
- Jones, S.J., Laskin, J., Li, Y.Y., Griffith, O.L., An, J., Bilenky, M., Butterfield, Y.S., Cezard, T., Chuah, E., Corbett, R., *et al.* (2010). Evolution of an adenocarcinoma in response to selection by targeted kinase inhibitors. *Genome Biol* 11, R82.

- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 11*, Unit 11 17.
- Larson, D.E., Harris, C.C., Chen, K., Koboldt, D.C., Abbott, T.E., Dooling, D.J., Ley, T.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., and Ding, L. (2012). SomaticSniper: identification of somatic point mutations in whole genome sequencing data. *Bioinformatics* 28, 311-317.
- Li, H. (2009). BWA - Burrows-Wheeler Alignment Tool (<http://maq.sourceforge.net/bwa-man.shtml>).
- Li, J.B., Levanon, E.Y., Yoon, J.K., Aach, J., Xie, B., Leproust, E., Zhang, K., Gao, Y., and Church, G.M. (2009). Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing. *Science* 324, 1210-1213.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 560-564.
- McShane, L.M., Cavenagh, M.M., Lively, T.G., Eberhard, D.A., Bigbee, W.L., Williams, P.M., Mesirov, J.P., Polley, M.Y., Kim, K.Y., Tricoli, J.V., *et al.* (2013). Criteria for the use of omics-based predictors in clinical trials. *Nature* 502, 317-320.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11, 31-46.
- Murtaza, M., Dawson, S.J., Tsui, D.W., Gale, D., Foshew, T., Piskorz, A.M., Parkinson, C., Chin, S.F., Kingsbury, Z., Wong, A.S., *et al.* (2013). Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497, 108-112.
- Navin, N., Kendall, J., Troge, J., Andrews, P., Rodgers, L., McIndoo, J., Cook, K., Stepansky, A., Levy, D., Esposito, D., *et al.* (2011). Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472, 90-94.
- Nik-Zainal, S., Van Loo, P., Wedge, D.C., Alexandrov, L.B., Greenman, C.D., Lau, K.W., Raine, K., Jones, D., Marshall, J., Ramakrishna, M., *et al.* (2012). The life history of 21 breast cancers. *Cell* 149, 994-1007.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., *et al.* (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27, 1160-1167.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5, 5-23.
- Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., *et al.* (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11, 5678-5685.
- Roychowdhury, S., Iyer, M.K., Robinson, D.R., Lonigro, R.J., Wu, Y.M., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Sam, L., Balbin, O.A., Quist, M.J., *et al.* (2011). Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. *Science translational medicine* 3, 111ra121.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schmidt, M., Bohm, D., von Torne, C., Steiner, E., Puhl, A., Pilch, H., Lehr, H.A., Hengstler, J.G., Kolbl, H., and Gehrman, M. (2008). The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 68, 5405-5413.
- Shah, S.P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., Turashvili, G., Ding, J., Tse, K., Haffari, G., *et al.* (2012). The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 486, 395-399.
- Simon, R.M., Paik, S., and Hayes, D.F. (2009). Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 101, 1446-1452.
- Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Siewewerts, A.M., Yu, J., Klijn, J.G., Foekens, J.A., and Martens, J.W. (2008). Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 68, 3108-3114.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.
- Stephens, P.J., McBride, D.J., Lin, M.L., Varela, I., Pleasance, E.D., Simpson, J.T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Mudie, L.J., *et al.* (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 462, 1005-1010.
- Tang, K.W., Alaei-Mahabadi, B., Samuelsson, T., Lindh, M., and Larsson, E. (2013). The landscape of viral expression and host gene fusion and adaptation in human cancer. *Nature communications* 4, 2513.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Welch, J.S., Westervelt, P., Ding, L., Larson, D.E., Klco, J.M., Kulkarni, S., Wallis, J., Chen, K., Payton, J.E., Fulton, R.S., *et al.* (2011). Use of whole-genome sequencing

to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA* 305, 1577-1584.

Wetterstrand, K.A. (2013). DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) Available at: www.genome.gov/sequencingcosts Accessed October, 28, 2013.

Korrekturabzug

Copyright 2015

UNI-MED Verlag AG

28323 Bremen

Korrekturabzug

Copyright 2015
UNI-MED Verlag AG
28323 Bremen

Anhang

10. Anhang

Internetseiten

- <http://www.krebsgesellschaft.de>
- <http://www.krebshilfe.de>
- <http://www.dggg.de>
- <http://www.senologie.org>
- <http://www.awmf.org>
- ▶ Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und der Deutschen Krebshilfe e.V. (DKH)
- <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/>
- ▶ Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO e.V.)
- <http://www.ago-online.de>
- <http://www.ago-online.de/de/fachbereiche/leitlinienempfehlungen/mamma/>
- ▶ European Society for medical oncology (ESMO)
- <http://www.esmo.org>
- <http://www.esmo.org/Guidelines-Practice/Clinical-Practice-Guidelines/Breast-Cancer/Primary-Breast-Cancer>
- ▶ European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA)
- <http://www.eusoma.org/Index.aspx>
- <http://www.eusoma.org/Engx/Guidelines/>
- ▶ American Society of clinical Oncology (ASCO)
- <http://www.asco.org>
- <http://www.asco.org/guidelines/breast-cancer>
- ▶ American Cancer Society (USA)
- <http://www.cancer.org>
- <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/moreinformation/breastcancerearlydetection/breast-cancer-early-detection-ac-recs>
- ▶ National Comprehensive National Center (NCCN)
- <http://www.nccn.org>
- http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp

- ▶ National Institute for Health and Care Excellence(NICE)
- <https://www.nice.org.uk>
- <https://www.nice.org.uk/guidance/CG81>
- ▶ National Cancer Institute (NCI)
- <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page5>
- ▶ CEBM Center for Evidence-Based Medicine, University of Oxford
- <http://www.cebm.net/>
- ▶ German Breast Group (GBG)
- <http://www.germanbreastgroup.de/studien/palliativ/bmbc>
(Link zu Studien mit Hirnmetastasen)

Fachgesellschaften

- Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tumorzentren (ADT)
- Arbeitsgemeinschaft für Psychoonkologie (PSO)
- Arbeitsgemeinschaft für Ultraschalldiagnostik in Gynäkologie und Geburtshilfe (ARGUS)
- Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO)
- Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO)
- Arbeitsgemeinschaft Radiologische Onkologie (ARO)
- Arbeitsgemeinschaft Supportive Maßnahmen in der Onkologie, Rehabilitation und Sozialmedizin(ASORS)
- Arbeitsgemeinschaft Prävention und integrative Medizin in der Onkologie (PRiO)
- Berufsverband der Frauenärzte e.V.
- BQS Institut für Qualität und Patientensicherheit
- Bundesverband Deutscher Pathologen e.V.
- Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie (CAO-V)
- Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM)

- Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO)
- Deutsche Gesellschaft für Palliativmedizin (DGP)
- Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP)
- Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO)
- Deutsche Gesellschaft für Rehabilitationswissenschaften (DGRW) e.V.
- Deutsche Gesellschaft für Senologie (DGS)
- Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin e.V. (DEGUM)
- Deutsche Röntgengesellschaft (DRG)
- Deutscher Verband für Physiotherapie, Zentralverband der Physiotherapeuten/Krankengymnasten (ZVK)
- Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs
- Frauenselbsthilfe nach Krebs
- Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgie (DGPRAC)
- Konferenz Onkologischer Kranken- und Kinderkrankenpflege (KOK)
- Tumorregister München (TRM)
- Women's Health Coalition e.V. (WHC)
- Selbsthilfegruppen:
 - Mamazone e.V.
 - Brustkrebs Deutschland e.V.

AGO-Empfehlungsgrade

Empfehlungsgrad	Beschreibung
++	Diese Untersuchung oder therapeutische Intervention ist für die Patientin von großem Vorteil, wird daher uneingeschränkt empfohlen und sollte durchgeführt werden.
+	Diese Untersuchung oder therapeutische Intervention ist für die Patientin von begrenztem Vorteil und kann durchgeführt werden.
+/-	Diese Untersuchung oder therapeutische Intervention hat für die Patientin keinen Vorteil gezeigt. Sie kann in individuellen Fällen durchgeführt werden. Anhand gegenwärtigen Wissens kann derzeit keine allgemeine Empfehlung ausgesprochen werden.
-	Diese Untersuchung oder therapeutische Intervention kann für die Patientin von Nachteil sein und sollte nicht durchgeführt werden.
--	Diese Untersuchung oder therapeutische Intervention ist für die Patientin von klarem Nachteil und sollte unbedingt vermieden werden.

Oxford-Empfehlungsgrade – Grades of Recommendation (GR)

Empfehlungsgrad	Beschreibung
A	consistent level 1 studies
B	consistent level 2 or 3 studies <i>or</i> extrapolations from level 1 studies
C	level 4 studies <i>or</i> extrapolations from level 2 or 3 studies
D	level 4 evidence <i>or</i> troublingly inconsistent <i>or</i> inconclusive studies of any level

Korrekturabzug

Copyright 2015

UNI-MED Verlag AG

28323 Bremen

Index

A	
ADAPT-Studien	96
ALTO-Studie	79
Amplifikation	23, 25
Angiogenese	46
Ansprechen auf Chemotherapie	35
Ansprechen auf Hormontherapie	35
Anti-HER2-Therapie	74
Antikörper	22
APAAP-Immunfärbung	85
Apoptose	46
B	
Basal-like	30
Bevacizumab	22
Biomarker	47
Biomaterial	20
BluePrint®	34
BRAF	23
BRCA1	24
BRCA2	24
BRCA-Mutation	24
C	
CellSearch®	86
cfDNA	26
Chemotherapie	
Ansprechen auf	35
Kombination	78
neoadjuvante	35
CISH	72
Claudin-Low-Subtyp	31
D	
Denosumab	22
DETECT-Studie	101
Diagnostik	
HER2-	70
molekulare	22
Pathologie	54
TNM	56, 58
tumorbiologische	94
Tumorzellen	84
DNA	19
Sequenzierung	104
zellfreie	26
zirkulierende	88
E	
EGFR	23
EGF-Rezeptor	23
ELISA	47
EndoPredict®	34, 94
ERBB-Rezeptoren	23
ER-positiv	30
Everolimus	22
Expressionsarrays	24
Expressionsprofile	64
F	
Faktoren	
prädiktive	28
prognostische	28
FFPE-Gewebe	19
FISH	72
G	
Genexpressionsprofile	30
Genomic Grade Index	34
Gensignaturen	31, 32
prädiktive	35
Grading	54
histopathologisches	58
H	
HER2	61
klinischer Stellenwert	71
Nachweismethoden	71
prädiktiver Wert	71
HER2-Amplifikation	61
HER2-Detektion	63
HER2-Diagnostik	70
HER2-Genamplifikation	72
HER2-like	30
HER2-positiv	30
Definition	73
klinische Probleme	80
HER2-Status	47
Bewertungskriterien	62
Definition	74
low level	73
HER2-Typ	54
HERA-Studie	79
Herceptin®	71, 74
Histologie	56
Hormonrezeptoren	24, 54, 58
Hormonrezeptor-Expression	59
Hormonrezeptor-Status	47
hot spots	26
I	
Invasion	45
K	
Ki-67	30, 60
L	
Lapatinib	22, 75, 79
liquid biopsies	26
Luminal A	30, 54
Luminal B	30, 54

M

Makrodissektion	25
Mammakarzinom	
adjuvante Therapie	79
Antikörper gegen	22
Biomarker	47
epigenetische Alterationen	24
HER2-Diagnostik	70
hereditäres	96
metastasiertes	79
molekulare Diagnostik	22
molekulare Subtypen	30
neoadjuvante Therapie	78
nodal-negatives	44, 50
Pathologie	54
Prognosefaktoren	46
Risikostratifizierung	45
Subtypen	54, 94
therapeutische Stratifizierung	24
TNM-Klassifikation	57
tripel-negatives	24, 54, 63
Tumorzellen	84
MammaPrint®	32
Mammographiescreening	18
Mammostrat®	34
Markerbestimmung	20
Matrix-Matelloproteinasen	46
MEK	23
Metastasierung	45
Mikrodissektion	25
MINDACT-Studie	32
molecular-apocrine-Subtyp	31
Multigentest	32
Mutationen	23
Detektion von	25
Mutationstestung	25

N

Next Generation Sequencing	26, 104
NGS	26
NNBC 3-Europe-Studie	49

O

Olaparib	24
Oncotype DX®	32, 94

P

PAI-1	46, 95
PAM50 Assay	33
Panel-Sequenzierungen	27
PARP-Inhibitoren	22, 24, 99
PCNA	60
PCR	25
real time	26
Pertuzumab	77, 80
Phänotyp	54
luminaler	58

PI3K/AKT/mTOR-Signalweg	24
PIK3CA-Gen	24
Plasminogen-Aktivatoren-System	46
Prognosefaktoren	46, 86
Proto-Onkogene	23
PR-positiv	30

R

RAS	23
RAS/RAF/MEK-Signalweg	23
Recurrence Score®	31
REMARK-Kriterien	47
Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	23
Risikostratifizierung	45
RNA	19
Expressionsanalyse	55
zirkulierende	88
RixPONDER-Studie	33

S

Sanger-Sequenzierung	25
SET-Index	35
Signalwege	23
SISH	72
Sorafenib	22

T

T-DM1	22, 77, 80
TNBC	24
TNM-Klassifikation	56
Trastuzumab	22, 71, 74, 79, 99
Trastuzumab Emtansine	77
TREAT CTC-Studie	100
Tripel-Negativität	24, 63
Tumorbiologische Tests	94
Tumorgewebe	20
Tumorzellen	
disseminierte	84
zirkulierende	86, 95

U

uPA	45, 46, 95
-----------	------------

V

Vakzinierung	78
--------------------	----

Alle Details zu unseren Büchern aktuell unter
www.uni-med.de



Diagnostik • Therapie • Forschung

UNI-MED SCIENCE - Topaktuelle Spezialthemen!



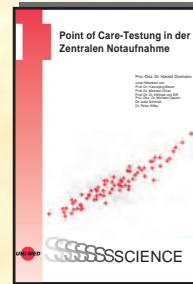
3. Auflage 2013, 192 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1415-8



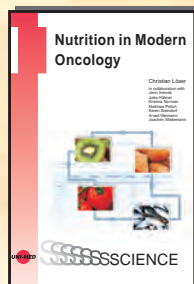
1. Auflage 2013, 96 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1376-2



1. Auflage 2013, 236 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1427-1



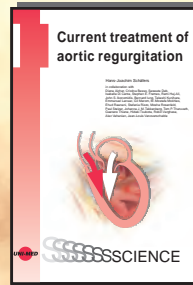
1. Auflage 2013, 92 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1368-7



1. Auflage 2013, 128 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1344-1



1. Auflage 2013, 64 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1403-5



1. Auflage 2013, 128 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1406-6



1. Auflage 2013, 96 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1402-8



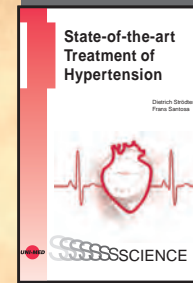
2. Auflage 2013, 216 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1408-0



1. Auflage 2013, 76 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1425-7



2. Auflage 2013, 96 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1429-5



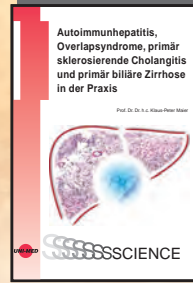
1. Auflage 2013, 288 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1413-4



2. Auflage 2013, 96 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1424-0



3. Auflage 2013, 96 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1430-1



1. Auflage 2013, 63 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1426-4



1. Auflage 2013, 128 Seiten,
 ISBN 978-3-8374-1335-9

...und ständig aktuelle Neuerscheinungen!

Aktuelle Neuerscheinungen über die gesamte klinische Medizin...

<p>Manual of High Resolution Esophageal Manometry 1. Aufl. 2014, 172 S., ISBN 978-3-8374-1398-4</p>	<p>Implantate in der Chirurgie - Update 2015 1. Aufl. 2016, 128 S., ISBN 978-3-8374-1454-7</p>	<p>Colitis ulcerosa - Morbus Crohn 4. Aufl. 2013, 160 S., ISBN 978-3-8374-1436-3</p>	<p>Präeklampsie 2. Aufl. 2014, 168 S., ISBN 978-3-8374-1446-2</p>
<p>Angewandte Diabetologie 5. Aufl. 2014, 368 S., ISBN 978-3-8374-1441-7</p>	<p>Overactive Bladder - Fragen und Antworten 2. Aufl. 2014, 140 S., ISBN 978-3-8374-1447-9</p>	<p>Thrombectomy Procedures - Mechanical, Surgical, Pharmaceutical 1. Aufl. 2014, 95 S., ISBN 978-3-8374-1444-8</p>	<p>Moderne zielgerichtete Therapien beim Mammakarzinom - Wirkprinzip und klinische Anwendung 2. Aufl. 2014, 96 S., ISBN 978-3-8374-1464-6</p>
<p>Individuelle Gesundheitsleistungen (IGeL) in der Orthopädie - Konzept für eine moderne Praxis 1. Aufl. 2014, 112 S., ISBN 978-3-8374-1456-1</p>	<p>Diagnostik und Risikoeinschätzung beim Prostatakarzinom 1. Aufl. 2014, 112 S., ISBN 978-3-8374-1448-6</p>	<p>Practical Handbook of Brachytherapy 1. Aufl. 2014, 264 S., ISBN 978-3-8374-1449-3</p>	

UNI-MED SCIENCE -

Topaktuelle Spezialthemen!

...das beste Rezept von UNI-MED!



UNI-MED Verlag AG • Kurfürstenallee 130 • D-28211 Bremen
 Telefon: 0421/2041-300 • Telefax: 0421/2041-444
 e-mail: info@uni-med.de • Internet: http://www.uni-med.de