

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Kaufmann

**Die prognostische Wertigkeit von Gensignaturen und  
tumorbiologischen Charakteristika bei Mammakarzinom-  
Patientinnen mit adjuvanter anthrazyklinhaltiger Chemotherapie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Florian Pobitschka  
  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2009

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Kaufmann

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Serve

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2010

## Zusammenfassung

Zahlreiche prognostische und prädiktive Multigenexpressionen sind bisher für Mammakarzinom-Patientinnen generiert worden. Die Einschätzung der individuellen Prognose ist für eine optimale Therapieentscheidung wesentlich. Die Auswahl einer spezifischen Therapie ist grundsätzlich durch die empirische Datenlage bestimmt, obwohl bereits zahlreiche prädiktive Gensignaturen existent sind. In diesem Zusammenhang wäre es hilfreich, wenn spezifische Signaturen sowohl zur Abschätzung der Prognose als auch zur Prädiktion des Therapieansprechens gleichzeitig genutzt werden könnten.

Um die prognostische und prädiktive Wertigkeit bereits publizierter Gensignaturen an einem unabhängigen, einheitlich behandelten Kollektiv zu untersuchen, wurden von 111 tiefgefrorenen Tumorproben, die an der Uniklinik Frankfurt im Rahmen des Mammakarzinom-Primäreingriffes gewonnen wurden, n=48 Proben in die Analyse eingebracht, da alle eine adjuvante anthrazyklinhaltige Chemotherapie erhalten haben, und eine ausreichende RNA-Menge vorlag, um eine Genexpressionsanalyse durchführen zu können. Für die Genexpressionsanalyse wurde der Affymetrix HgU133 Genchip (22.500 probe sets) verwendet.

Von diesen Patientinnen wurde der postoperative Krankheitsverlauf (Ereignisstatus) sowie das Profil an histopathologischen Standardparametern ermittelt. Der mediane Nachbeobachtungszeitraum betrug 37 Monate (Range 5 - 87 Monate). Bei 23 % der Patientinnen wurde nach Therapie ein Rezidiv festgestellt.

Dieses Kollektiv unterschied sich hinsichtlich des Outcome und des Profils an histopathologischen Markern nicht signifikant vom Gesamtkollektiv.

Zur Kontrolle der Messergebnisse wurden die Genexpressionswerte für ER-, PR- und Her-2-Status mit den entsprechenden immunhistochemisch bestimmten Status verglichen. Der Genexpressionsstatus des Proliferationsmarkers Ki67 wurde mit dem immunhistochemischen ER-Status und pathohistologischen Grading korreliert.

Dabei zeigten die Genexpressionswerte bezüglich ER, PR und Her-2 im Vergleich zur immunhistochemisch bestimmten Proteinexpression eine hohe Konkordanz. Die Bestimmung des Proliferationszustands mittels Genexpression von Ki67 wies eine signifikante Korrelation mit dem ER-Status ( $p = 0,040$ , Mann-Whitney-U-Test) und dem pathohistologischen Grading auf ( $p = 0,005$ , Kruskal-Wallis-Test).

Die Tumorproben wurden entsprechend ihrer Expressionsmuster nach 4 prognostischen und 2 prädiktiven bereits publizierten Gensignaturen eingeteilt und mit Standardparametern wie histologischer Subtyp, Tumorgröße, Nodalstatus, histopathologisches Grading, sowie dem Östrogenrezeptorstatus und Her-2-Status verglichen.

Die einzelnen histopathologischen Marker und die Expressionsmuster der prognostischen und prädiktiven Gensignaturen wurden mit dem postoperativen Krankheitsverlauf der Patientinnen korreliert.

## Zusammenfassung

Der Ereignisstatus der Patientinnen korrelierte mit dem T-Stadium ( $p = 0,04$ ), dem Alter bei OP ( $p = 0,05$ ) und dem Lymphknotenstatus ( $p = 0,016$ ).

Keine der 6 verschiedenen Signaturen war in der Lage, den Ereignisstatus der Patienten ausreichend vorherzusagen.

Die hauptsächlich diskriminierenden Eigenschaften der Signaturen basieren auf dem ER-Status und zu einem gewissen Maße auf dem pathohistologischen Grading.

Beim Vergleich der Expressionsmuster der Gensignaturen untereinander zeigte sich eine Korrelation der prognostischen Amsterdam- sowie Rotterdam-Signaturen, als auch der prädiktiven Signaturen von Rody et al und Hess et al mit der Genomic Grade-Signatur, welche den Proliferationsstatus von Mammakarzinomgewebe charakterisiert.

In dieser Arbeit konnte schließlich an einem kleinen, einheitlich behandelten Patientenkollektiv gezeigt werden, dass prognostische und prädiktive Gensignaturen nicht in der Lage sind, den Krankheitsverlauf ausreichend vorherzusagen. Die wesentlichen Einflussgrößen für alle Signaturen sind der ER-Status und die Proliferation. Die Wertigkeit der jeweiligen Signaturen ist offenbar ausschließlich auf die spezifische therapeutische Situation beschränkt, für die sie identifiziert wurden.

## Summary

Many prognostic and predictive multigene signatures have been established in breast cancer patients. For treatment decision the assessment of individual prognosis is essential. The choice of specific therapy is basically driven by empirical data although several predictive gene signatures already exist. In this context it would be valuable if specific signatures could be used for the estimation of prognosis and prediction of therapy concurrently.

In order to assess the prognostic and predictive value of already published gene signatures in an independent and homogeneously treated group of breast cancer patients, n=48 of 111 frozen tumor samples, which had been obtained during primary surgery at the University Hospital Frankfurt and of which enough RNA was obtained, were analyzed. All of the patients had received anthracycline-based adjuvant chemotherapy. For the gene expression analysis the Affymetrix HgU133 Genechip (22 500 probe sets) was used.

Of these patients the follow up (event status) after surgery and the profile regarding the pathohistological standard parameters were obtained. The median follow up time was 37 months (range 5 – 87). In 23% of these patients an event after surgery was detected.

These 48 patients whose tumor samples were analyzed did not differ significantly from the 111 patients regarding the profile of histopathological markers and outcome.

In order to control the results of the gene expression analysis gene expression values for ER-, PR- and Her2-status were compared with the values assessed by means of immunohistochemistry.

The gene expression status of the proliferation marker Ki67 was correlated with ER-status as assessed by immunohistochemistry and with the histological grade.

The gene expression values of ER, PR and Her2 from microarray revealed a high concordance with protein expression assessed by means of immunohistochemistry. The determination of proliferative state of the tumors using gene expression of Ki67 showed a significant correlation with ER-status ( $p = 0,040$ , Mann-Whitney-U-Test) and pathohistological grading ( $p = 0,005$ , Kruskal-Wallis-Test).

Tumor samples were classified according to four prognostic and two predictive previously described gene signatures and compared with standard parameters such as histologic subtype, tumor size, nodal status, pathohistological grading as well as estrogen receptor- and Her-2 status.

The respective pathohistological markers and the gene expression profiles of the prognostic and predictive gene signatures were correlated with the outcome of the patients after surgery.

The event status correlated with tumor size ( $p = 0,04$ ), age at surgery ( $p = 0,05$ ) and the lymph node status ( $p = 0,016$ ).

None of the six different signatures was able to predict event status of patients sufficiently. The main discriminatory power of the signatures was related to the ER status and to some extent to pathohistological grading.

## Summary

The comparison of the expression profiles of the respective gene signatures with one another, showed a correlation of the prognostic Amsterdam- and Rotterdam-signatures as well as the predictive Hess- and Rody-signatures with the expression profile of the genomic grade signature by Sotiriou, which characterizes the proliferative state of breast cancer tissue.

Concluding, this work has shown that in a small cohort of uniformly treated patients prognostic and predictive gene signatures are incapable to predict disease outcome unambiguously. The main driving forces of all signatures are the ER-status and proliferation. The value of the individual signatures may be restricted to the specific setting from which they were derived.

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>TABELLE 2.1 CHARAKTERISTIKA DES GESAMTKOLLEKTIVS.....</b>	<b>31</b>
<b>TABELLE 2.2: HORMONREZEPTORSTATUS UND ANTIHORMONELLE THERAPIE .....</b>	<b>32</b>
<b>TABELLE 2.3: VERABREICHTE MEDIKATION IM RAHMEN DER ANTIHORMONELLEN THERAPIE.....</b>	<b>32</b>
<b>TABELLE 2.4: ADJUVANT VERABREICHTE POLYCHEMOTHERAPIEREGIMES .....</b>	<b>32</b>
<b>TABELLE 3.1: VERGLEICH DER EREIGNISRATEN IN ABHÄNGIGKEIT VERSCHIEDENER ERMITTELT ER TUMOR- UND PATIENTINNENCHARAKTERISTIKA.....</b>	<b>35</b>
<b>TABELLE 3.2 VERGLEICH GESAMTKOLLEKTIV MIT KOLLEKTIV GENEXPRESSIONSANALYSE .....</b>	<b>37</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>ABBILDUNG 3-1 ÖSTROGEN-REZEPTOR .....</b>	<b>39</b>
<b>ABBILDUNG 3-2 PROGESTERON-REZEPTOR .....</b>	<b>39</b>
<b>ABBILDUNG 3-3 HER2-REZEPTOR .....</b>	<b>40</b>
<b>ABBILDUNG 3-4 KORRELATION DES KI67-EXPRESSIONSSTATUS MIT DEM HISTOLOGISCHEN GRAD UND DEM ÖSTROGENREZEPTORSTATUS.....</b>	<b>41</b>
<b>ABBILDUNG 3-5 INTRINSISCHE SIGNATUR UND HISTOPATHOLOGISCHE PARAMETER SORTIERT NACH EREIGNIS.....</b>	<b>43</b>
<b>ABBILDUNG 3-6 PROGNOTISCHE SIGNATUREN UND HISTOPATHOLOGISCHE PARAMETER SORTIERT NACH EREIGNIS.....</b>	<b>45</b>
<b>ABBILDUNG 3-7 PRÄDIKTIVE SIGNATUREN FÜR NEOADJUVANTE CHEMOTHERAPIE SORTIERT NACH EREIGNIS .....</b>	<b>46</b>
<b>ABBILDUNG 3-8 GENOMIC GRADE SIGNATUR VON SOTIRIOU.....</b>	<b>47</b>
<b>ABBILDUNG 3-9 PROGNOTISCHE SIGNATUREN UND HISTOPATHOLOGISCHE PARAMETER SORTIERT NACH ‘GENOMIC GRADE’-SIGNATUR.....</b>	<b>49</b>
<b>ABBILDUNG 3-10 PRÄDIKTIVE SIGNATUREN SORTIERT NACH ‘GENOMIC GRADE’- SIGNATUR.....</b>	<b>50</b>



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Thema der Doktorarbeit .....	1
1.2	Mammakarzinom - Epidemiologie und Klassifizierung.....	2
1.3	<b>Klinische Relevanz prognostischer und prädiktiver Parameter für die adjuvante Therapieentscheidung</b> .....	<b>3</b>
1.3.1	Lokale Tumorkontrolle .....	3
1.3.2	Auswahl der medikamentösen Therapie .....	4
1.3.3	Risikoeinteilung am Beispiel der St Gallerer Konsensus-Kriterien .....	6
1.3.4	Exaktere prädiktive und prognostische Marker sind notwendig .....	8
1.3.5	Biomarker zur Tumorzellproliferation, Differenzierung und Invasivität.....	8
1.4	<b>Durch cDNA-Genexpressionsanalyse ermittelte Marker</b> .....	<b>12</b>
1.4.1	Darstellung der Methode der Chip-basierten Genexpressionsanalyse .....	12
1.4.1.1	<b>Definition eines Microarray</b> .....	12
1.4.1.2	<b>Microchips zum Nachweis von Nukleinsäuren</b> .....	12
1.4.1.3	<b>RNA als Probenmaterial</b> .....	13
1.4.1.4	<b>Herkunft der cDNA-Sequenzen des cDNA-Chips</b> .....	14
1.4.1.5	<b>Versuchsablauf einer Genexpressionsanalyse</b> .....	14
1.4.1.5.1	Solide Phase .....	14
1.4.1.5.2	Herstellung und Farbmarkierung des Probenmaterials.....	14
1.4.1.5.3	Hybridisieren und Waschen.....	15
1.4.1.5.4	Signaldetektion und -verarbeitung .....	15
1.4.1.6	<b>Minimierung falsch positiver Signale mit Oligonukleotid-Genexpressionsplattformen</b> ..	16
1.4.1.7	<b>Datenanalyse</b> .....	17
1.4.2	Neue molekular-morphologische Einteilungen von Brustkrebs durch Genexpressionsmuster .....	18
1.4.3	Prognostische Gensignaturen.....	19
1.4.3.1	<b>Die ‚Amsterdam‘-Prognosesignatur</b> .....	19
1.4.3.2	<b>Die ‚Rotterdam‘-Prognosesignatur</b> .....	22
1.4.3.3	<b>Die ‚Genomic-Grade‘-Prognosesignatur</b> .....	23
1.4.4	Prädiktive Gensignaturen.....	26
1.4.4.1	<b>Die prädiktive Hess-Signatur</b> .....	26
1.4.4.2	<b>Die prädiktive Rody-Signatur</b> .....	27
1.5	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>30</b>
2.1	Herkunft der Tumorgewebeproben.....	30
2.2	Herkunft der Patientinnendaten .....	30
2.3	Charakteristika des ausgewählten Patientinnenkollektivs .....	31
2.4	<b>Durchführung einer Genexpressionsanalyse mit Tumorproben des beschriebenen Patientinnenkollektivs</b> .....	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>RESULTATE</b> .....	<b>35</b>
3.1	Ereignisrate in Abhängigkeit von ‚klassischen Markern‘ .....	35
3.2	<b>Resultate der Genexpressionsanalyse</b> .....	<b>37</b>
3.2.1	Vergleich klassischer Marker mit durch Genexpressionsanalyse ermittelten Markern .....	38
3.2.2	Korrelation verschiedener Markersignaturen mit dem klinischen Krankheitsverlauf.....	43

3.2.3	Korrelation verschiedener Gensignaturen mit der ‚Genomic Grade‘ – Signatur .....	48
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>51</b>
4.1	Korrelation ‚klassischer‘ Marker mit dem Outcome .....	51
4.2	Diskussion der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse.....	52

# **1 Einleitung**

## **1.1 Thema der Doktorarbeit**

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses klassischer histopathologischer Marker auf die Expressionsmuster bekannter prognostischer und prädiktiver Gensignaturen in einem homogen behandelten Kollektiv von Mammakarzinom-Patientinnen. Insbesondere wurde hierbei der Einfluss der grundlegenden tumorzellbiologischen Phänomene Zellproliferation und Hormonempfindlichkeit auf die Expressionsmuster der entsprechenden Gensignaturen untersucht.

In dieser Studie wurde hierzu Primärtumorgewebe von 111 Patientinnen mit erhöhtem Rezidivrisiko, die alle eine adjuvante anthracyclinhaltige Chemotherapie erhalten hatten, mittels Genexpressionsanalyse analysiert. Das Tumorgewebe war im Rahmen der primären Operation aus dem Primärtumor entnommen worden und in Flüssigstickstoff schockgefroren worden.

Die Ermittlung der Tumorexpressionsdaten erfolgte auf Affymetrix-Chips und eine Clusteranalyse der Tumoren wurde durch Anwendung der beschriebenen prognostischen und prädiktiven Markergene durchgeführt. Die resultierenden Subkollektive wurden zum einen mit den entsprechenden histopathologischen Daten, zum anderen mit krankheitsfreiem Überleben korreliert.

Bei dieser Analyse ging es im Wesentlichen um zwei Fragestellungen:

1. Haben die entsprechenden Signaturen, die in differenten Kollektiven und z.T. mittels unterschiedlicher Chipplattformen identifiziert wurden, in einer einheitlich behandelten Patientenkohorte eine prognostische Relevanz ?
2. Besteht eine Korrelation zwischen den Gensignaturen und den klassischen biologischen und pathohistologischen Routineparametern, wie z.B. ER-/Her-2-Status, histologischem Subtyp, Tumorgröße, Nodalstatus oder pathohistologischem Grading ?

Ergäben sich entsprechende Korrelationen bei diesen Signaturen, die im Rahmen differenter Zielsetzungen etabliert wurden (Einschätzung des Rückfallrisikos (Prognose) bzw. Prädiktion des Ansprechens auf eine spezifische Therapie), so wäre dies ein Hinweis dafür, dass diese Signaturen für Brustkrebs grundlegende zellbiologische Funktionsmuster widerspiegeln, die mit klassischen histopathologischen Markern korrelieren und sich in differenten Patientinnenkollektiven und in unterschiedlicher Fragestellung nachweisen lassen.

Eine Korrelation trotz unterschiedlicher Patientinnenkollektive und unterschiedlicher experimenteller Bedingungen könnte solch einen Zusammenhang sogar bestärken.

## 1.2 Mammakarzinom - Epidemiologie und Klassifizierung

Das Mammakarzinom ist mit geschätzten 57 000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland (Schätzung des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland) die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau in Deutschland (*GEKID 2008*), und mit 1,2 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr weltweit nach den Schätzungen der IARC (International Association on Research of Cancer) auch die häufigste Krebserkrankung der Frauen weltweit (*Ferlay et al 2002*).

Die Inzidenz ist abhängig vom Alter und ist somit in verschiedenen Altersklassen unterschiedlich. Die höchste Inzidenz liegt in der Altersklasse 60-64 jähriger Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren und damit um 6 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter für Krebs insgesamt.

Rund ein Viertel der Mammakarzinome kommen bei prämenopausalen Frauen vor, die restlichen drei Viertel bei postmenopausalen Frauen. 40% der Brustkrebsfälle treten vor dem 60. Lebensjahr auf (*Kaufmann, Rody 2009*).

Das mittlere Risiko für eine Frau in Deutschland bis zum 75. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken liegt zwischen 9% und 10 %. Das bedeutet, dass jede 10. bis 11. Frau in Deutschland während ihres Lebens an Brustkrebs erkranken wird (*Giersiepen et al 2005*).

Das Mammakarzinom ist die häufigste Todesursache in Deutschland für Frauen zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr. Es ist für etwa 27% aller Krebstodesfälle verantwortlich (*Giersiepen et al 2005*).

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Brustkrebspatientinnen betragen derzeit über alle Stadien betrachtet ca. 81 % (*GEKID 2008*).

Das invasive Mammakarzinom wird nach seiner histologischen Erscheinungsform in verschiedene Typen eingeteilt.

Der häufigste Typ mit ca. 80 % der invasiven Mammakarzinome sind die duktal-invasiven Karzinome. Diese gehen von dem Epithel der Milchgänge aus.

Auf den lobulär invasiven Typ, der von den Brustläppchen ausgeht, fallen ca. 10 % der invasiven Karzinome.

Ca 5 % der invasiven Karzinome machen Sonderformen aus, wie z.B. das tubuläre, muzinöse, szirrhöse oder medulläre Mammakarzinom. Diese Sonderformen weisen eine etwas bessere Prognose auf.

Eine Sonderform mit sehr schlechter Prognose ist das inflammatorische Mammakarzinom. Dieses ist allerdings kein gesonderter histologischer Typ, sondern beschreibt eine bestimmte Art der Ausbreitung innerhalb von subepidermalen Lymphgefäßen (*Ford et al 1999*).

### **1.3 Klinische Relevanz prognostischer und prädiktiver Parameter für die adjuvante Therapieentscheidung**

Die kurative (adjuvante) Therapie des Mammakarzinoms stützt sich auf die Operation mit dem Ziel der in-sano Resektion, die Strahlentherapie und unterschiedliche medikamentöse Therapien.

Bei allen 111 Patientinnen des untersuchten Kollektivs wurde bei fehlendem Hinweis auf eine Fernmetastasierung ein kurativer Therapieansatz besprochen.

#### **1.3.1 Lokale Tumorkontrolle**

Strahlentherapie und Operation dienen der ‚lokalen Tumorkontrolle‘. Das Ziel ist die vollständige Entfernung allen feststellbaren Tumorgewebes aus der Brust und den regionären Lymphknoten.

Die operative Therapie erfolgt bei kurativer Therapiestrategie immer. Es wird lediglich über die technische Art und Weise der Durchführung entschieden, die sich im Wesentlichen an der Größe des Tumors und der lokalen Ausbreitung orientiert.

Grundsätzlich muss zwischen ablativen Verfahren, wie z.B. die modifiziert radikale Mastektomie nach Patey (*Patey 1948*); (*Patey 1967*) oder der brusterhaltende Therapie (BET) unterschieden werden.

Die BET besteht aus brusterhaltender Operation und nachfolgender Bestrahlung der Restbrust und der Axilla. Die brusterhaltende Therapie ist unter Ausschluss von Kontraindikationen und bei zu erwartendem annehmbarem kosmetischem Ergebnis die operative Standardtherapie des Mammakarzinoms (*Veronesi et al 1995*); (*Newman, Kuerer 2005*).

Kontraindikationen für eine BET sind:

- diffus ausgedehnte Kalzifikationen vom ‚malignen Typ‘
- ausgedehntes assoziiertes intraduktales Karzinom > 4-5 cm
- Multizentrität (Definition nach Faverly et al 1994)
- Inkomplette Tumorentfernung auch nach Nachresektion
- Inflammatorisches Mammakarzinom
- Fehlende technische Möglichkeit zur postoperativen Strahlentherapie der Restbrust nach BET oder Ablehnung der Nachbestrahlung durch die Patientin
- Ablehnung einer BET durch die Patientin und Wunsch nach einer Mastektomie

(*Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau; DKG 2004*)

In diesen Fällen ist eine modifiziert radikale Mastektomie nach Patey die operative Therapie der Wahl.

### 1.3.2 Auswahl der medikamentösen Therapie

Die medikamentöse Therapie hat nach einer In-Sano-Resektion das Ziel, im Körper okkulte Mikrometastasen zu zerstören oder in ihrem Wachstum einzudämmen, um die Entwicklung von Rezidiven und Fernmetastasen zu verhindern oder hinauszuzögern. Die medikamentöse Therapie kann der Operation vorgeschaltet sein (neoadjuvante Therapie) oder nach der Operation erfolgen (adjuvante Therapie).

Im Gegensatz zur operativen Therapie ist die Entscheidung über die Verabreichung einer adjuvanten medikamentösen Therapie wesentlich komplexer. Als Entscheidungsgrundlage dienen prognostische und prädiktive Marker. Zur Auswahl des Therapieregimes aufgrund von prädiktiven und prognostischen Markern existieren Richtlinien und Empfehlungen von Fachgesellschaften und Konsensus-Konferenzen wie z.B. die Empfehlungen der Konsensuskonferenz St Gallen von 2007, die NIH-Empfehlungen oder der Nottingham-Prognose-Index (*Galea et al 1992*). Diese werden regelmäßig den aktuellen Erkenntnissen zu prognostischen und prädiktiven Markern angepasst (*Goldhirsch et al 2007*), (*D'Eredita et al 2005*).

Ein prognostischer Marker ist eine Eigenschaft von Tumorgewebe oder Patientin, die bei ausbleibender (neo)adjuvanter Therapie eine Aussage über den postoperativen natürlichen Verlauf im Hinblick auf postoperatives krankheitsfreies Überleben bzw. Gesamtüberleben macht. Ein prognostischer Marker beschreibt also das Risiko, mit dem postoperativ lokale Tumorrezidive bzw. Fernmetastasen auftreten (*Gianfrocca et al 2004*).

Ein prädiktiver Marker hingegen beschreibt den zu erwartenden Wirkungserfolg einer bestimmten (neo)adjuvanten Therapie im Bezug darauf, inwieweit nach erfolgter Operation das Auftreten von lokoregionären Rezidiven bzw. Fernmetastasen durch eben diese Therapie unterbunden oder hinausgezögert wird (*Gianfrocca et al 2004*).

Das Risikoprofil aufgrund prognostischer Marker bestimmt, ob eine medikamentöse Therapie erfolgen sollte. Die prädiktiven Marker bestimmen, welche Medikamente wirken und daher zum Einsatz kommen können. Dabei werden immer die Nebenwirkungen, die mit der Therapie verbunden sind, gegen den Therapienutzen abgewogen.

Die medikamentöse Therapie umfasst die antihormonelle Therapie mit Antiöstrogenen, Aromataseinhibitoren oder GNRH-Analoga, die Polychemotherapie und die Therapie mit dem therapeutischen Antikörper Trastuzumab (*Kaufmann, Rody 2009*).

Die antihormonelle Therapie wird im Falle eines immunhistochemisch bestimmten positiven Hormonrezeptorstatus des Brustkrebsgewebes verabreicht, da nur für hormonsensibles Gewebe ein Vorteil der antihormonellen Therapie erwiesen ist (*EBCTCG 1998*), (*EBCTCG 2005*). Der Hormonrezeptorstatus fungiert also hier also als prädiktiver Marker. So war auch bei Patientinnen dieses Studienkollektivs im Falle eines positiven Hormonrezeptorstatus eine antihormonelle Therapie indiziert worden. Die verabreichten antihormonellen Therapien sind in **Tabelle 2.3** aufgeführt.

Der immunhistochemisch bestimmte Her2-neu-Status ist die Zielstruktur des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab und fungiert für diese Therapie als prädiktiver Marker. Für alle Patientinnen mit Her2-neu-positiv getestetem Tumorgewebe wird Trastuzumab als adjuvante Therapiemaßnahme empfohlen (*Goldhirsch et al 2007*). Den Patientinnen dieses Studienkollektivs wurde diese Therapie allerdings nicht verabreicht, da sie im Zeitraum der Therapie der Patientinnen noch nicht verfügbar war, bzw. nur bei metastasiertem Brustkrebs zum Einsatz kam.

Für die Polychemotherapie werden verschiedene Therapieregimes angewandt. Die dabei verwendeten Substanzen sind alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid, der Folsäureantagonist Methotrexat, der DNA-Synthese-Hemmer Fluoruracil. Die Dreierkombination dieser Substanzen wird als ‚CMF-Regime‘ bezeichnet.

Weiterhin kommen die Anthrazykline Doxorubicin oder Epirubicin zum Einsatz. Dies sind DNA-Topoisomerase II alpha – Inhibitoren. Neben den zytostatikatypischen Nebenwirkungen wirken die Anthrazykline zusätzlich kardiotoxisch.

Allerdings zeigte eine Metaanalyse der EBCTCG aus dem Jahr 2005, die sich auf einen Nachbeobachtungszeitraum von 15 Jahren stützte, dass über alle Brustkrebspatientinnen hinweg anthrazyklinhaltige Polychemotherapieregimes der alleinigen CMF-Gabe immer überlegen sind. Daher ist heute die Gabe von Anthrazyklinen in der Polychemotherapie nach Ausschluss von Kontraindikationen Standard in der zytostatischen Brustkrebsbehandlung (*EBCTCG 2005*).

Die Patientinnen dieser Studie erhielten eine adjuvante medikamentöse Therapie, die eine Polychemotherapie mit Anthrazyklinen einschloss. Die verabreichten anthrazyklinhaltigen Chemotherapieregimes sind in **Tabelle 2.4** aufgeführt.

Eine weitere verwendete Substanzgruppe sind die Taxane, mit den Wirkstoffen Paclitaxel oder Docetaxel.

Da die Chemotherapie erhebliche Nebenwirkungen mit sich bringt und in Ermangelung präziser prädiktiver Marker, beruht die Entscheidung über die Gabe einer Chemotherapie auf einer Kosten-Nutzen-Abwägung unter Berücksichtigung des Risikoprofils einer Patientin und der zur Verfügung stehenden alternativen Therapiemaßnahmen.

### 1.3.3 Risikoeinteilung am Beispiel der St Gallerer Konsensus-Kriterien

Die Konsensus-Konferenz von St Gallen aus dem Jahr 2007 teilt die Patientinnen anhand von prognostischen Markern in drei Risikogruppen ein: Patientinnen mit geringem Risiko, intermediärem Risiko und hohem Risiko.

Demnach bekommen Patientinnen mit niedrigem Risiko keine Chemotherapie.

Diese Patientinnen sind bei Operation über 35 Jahre alt, weisen keine befallenen Lymphknoten auf, der Tumor misst weniger als zwei Zentimeter Durchmesser, das Tumorgewebe weist einen histologischen Grad von 1 auf, ist hormonsensibel und Her2-negativ. Eine weitere Abwägung der prognostischen Marker entscheidet innerhalb der Gruppe mit geringem Risiko, ob eine antihormonelle Therapie zum Einsatz kommt.

Im Gegensatz dazu bekommen die Patientinnen mit hohem Risiko immer eine Polychemotherapie. Ob zusätzlich eine antihormonelle Therapie oder Trastuzumab-Therapie besprochen wird, entscheidet sich am Status der entsprechenden prädiktiven Marker Hormonrezeptorstatus bzw. Her2-Status.

Die Patientinnen mit intermediärem Risiko erhalten in jedem Falle eine adjuvante Therapie. Die Entscheidung über die Gabe und die Art der Chemotherapie richtet sich nach dem Status der prädiktiven Marker. Manche Patientinnen der intermediären Risikogruppe bekommen auch alle drei möglichen Therapien verordnet, Chemotherapie, antihormonelle Therapie und Trastuzumab-Therapie (*Goldhirsch et al 2007*).

Der für die Risikoeinteilung signifikanteste prognostische Faktor ist der Nodalstatus. Ein positiver Nodalstatus bedingt automatisch die Zuteilung zur Gruppe mit intermediärem oder hohem Risiko (*Goldhirsch et al 2007*) und rechtfertigt bereits das Applizieren einer adjuvanten Therapie (*Gianfrocca et al 2004*).

Für nodalnegative Patientinnen ist die Tumorgroße der wichtigste Prognosefaktor bei der Entscheidung für oder gegen adjuvante Therapiemaßnahmen (*Gianfrocca et al 2004*). Die Konsensus—Konferenz von St Gallen 2007 empfiehlt für nodalnegative Patientinnen mit einem Tumordurchmesser > 2 cm generell eine adjuvante Therapie (*Goldhirsch et al 2007*).

Ein weiterer wichtiger prognostischer Faktor ist der mikroskopisch ermittelte histologische Grad des Tumorgewebes. Die weltweit gebräuchlichste Einteilung des histologischen Grades ist die Einteilung nach Scarff-Bloom-Richardson (*Bloom, Richardson 1957*); (*Gianfrocca et al 2004*).

Um zur Gruppe mit niedrigem Risiko zugeteilt zu werden, muss der Tumor einer Patientin einen histologischen Grad von 1 aufweisen. Ein histologischer Grad von 2 oder 3 bedingt die Zuordnung von mindestens intermediärem Risiko.

Ferner werden Patientinnen unter 35 Jahren der Gruppe mit mindestens intermediärem Risiko zugeordnet. Ihnen wird in jedem Fall eine adjuvante Therapie empfohlen (*Goldhirsch et al 2007*).



Neben seiner Funktion als prädiktiver Marker für die Verabreichung von Trastuzumab ist ein positiver Her2-Status ein unabhängiger negativer Prognosefaktor (*Hideko et al 2001*) und führt in der St Gallener Klassifikation von 2007 zur Einteilung in die Gruppe mit intermediärem oder hohem Risiko (*Goldhirsch et al 2007*).

Der Hormonrezeptorstatus ist neben seiner Funktion als prädiktiver Marker für antihormonelle Therapie ebenfalls ein unabhängiger Prognosefaktor.

Bei hormonrezeptor-negativer Erkrankung werden die betroffenen Patientinnen in die Gruppe mit intermediärem oder hohem Risiko eingeteilt und erhalten in Ermangelung der Wirksamkeit einer antihormonellen Therapie eine Chemotherapie (*Goldhirsch et al 2007*).

Die Patientinnen dieser Studie erhielten alle eine anthrazyklinhaltige adjuvante Chemotherapie in Kombination mit einer antihormonellen Therapie im Falle von hormonrezeptor-positiven Tumoren. Zum Zeitpunkt der Operation und des Beginns der adjuvanten Therapie galten noch andere Kriterien für die Auswahl der Patientinnen zur Chemotherapie als die oben aufgeführten Konsensus Kriterien von 2007. Patientinnen, die wie in diesem Fall eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie erhielten, wurde ein vergleichsweise höheres Risiko attestiert oder sie wurden im Rahmen vergleichender Studien behandelt.

### **1.3.4 Exaktere prädiktive und prognostische Marker sind notwendig**

Die oben beschriebene momentan gebräuchliche Bestimmung der Therapie anhand von prognostischen und prädiktiven Markern lässt bestimmte Fragestellungen noch ungeklärt.

Viele Forscher gehen beispielsweise davon aus, dass sich unter den Patientinnen, die Chemotherapie erhalten, eine Gruppe befindet, die besonders von der anthrazyklinhaltigen Chemotherapie profitiert, während die restlichen Patientinnen keinen Zusatznutzen von den Anthrazyklinen im Vergleich zu beispielsweise dem CMF-Regime erhalten. Wären die Anthrazyklin-Profiteure anhand eines prädiktiven Markers identifizierbar, könnte diesen die entsprechende Therapie verabreicht werden. Denen aber, die keinen Zusatznutzen davontrügen, könnten die zusätzlichen Risiken der Anthrazyklone erspart bleiben (*Andre, Pustztai 2006*), (*Andre et al 2006*), (*Cardoso et al 2004*), (*Paik et al 2006*)

Entsprechende Marker, die als positive prädiktive Marker für Anthrazyklone Gegenstand der Forschung und wissenschaftlichen Debatte sind, sind zum Beispiel der Her2-Status (*Gennari et al 2008*) oder ein positiver Topoisomerase II alpha-Status (*Pritchard et al 2008*).

In der Gruppe der Patientinnen mit intermediärem Risiko, speziell bei den Patientinnen, die aufgrund Hormonsensibilität eine adjuvante antihormonelle Therapie erhalten, wird vermutet, dass mit genaueren prognostischen Markern, sich Patientinnen identifizieren ließen, bei denen auf eine Chemotherapie verzichtet werden könnte. Diesen könnten so die erheblichen mit Chemotherapie verbundenen Nebenwirkungen erspart bleiben (*Chang et al 2005*), (*Cleator et al 2004*), (*Paik et al 2006*)

, (*Van de Vijver et al 2002*), (*Van't Veer et al 2002*), (*Van't Veer et al 2005*), (*Wang et al 2005*).

Der Bedarf für Tumormarker, die eine noch exaktere prognostische bzw. prädiktive Aussagekraft besitzen ist also gegeben.

Um neue prädiktive und exaktere prognostische Marker zu erhalten, wird die Tumorbilogie von Brustkrebsgewebe untersucht, um Biomarker zu identifizieren, die eine klinisch relevante Aussage über das Verhalten einer Brustkrebserkrankung im Hinblick auf Prognose und Ansprechen auf Therapie zulassen.

### **1.3.5 Biomarker zur Tumorzellproliferation, Differenzierung und Invasivität**

Das invasive Wachstum eines Tumors ist das entscheidende Merkmal für dessen Malignität. Die Bereitschaft der Tumorzellen Gewebearrrieren zu durchbrechen, sich in fremder Umgebung einzunisten und sich dort zu vermehren, das invasive Wachstum, und die Geschwindigkeit, mit der sich die Tumorzellen vermehren, die Zellproliferationsrate, bestimmen die Ausbreitung und somit wesentlich die Prognose der Tumorerkrankung.

Solche tumorbiologischen Marker werden mit bestimmten Laborverfahren erhoben, z.B. mit der Mikroskopie, der Immunhistochemie, oder der Polymerasekettenreaktion. Biomarker, die durch Genexpressionsanalyse mit modernen DNA- oder RNA-Genexpressionschips ermittelt worden sind werden in Kapitel 1.4 beschrieben.

Es gibt verschiedene Messtechniken, die die proliferative Kapazität des Tumorgewebes zu bestimmen versuchen. Dies sind unter anderem: die histologische Bestimmung der Mitoserate, die Messung des ‚Thymidin-Labeling Index‘ mittels Radiographie, die Messung der S-Phasenfraktion der Tumorzellen per Durchflusszytometer und der Nachweis des Ki-67-Antigens mit dem dafür spezifischen Antikörper Mib1 (Colozza et al 2005).

De Azambuja et al 2007 kamen in einer Zusammenschau von 46 Studien mit insgesamt 12155 Patientinnen zu dem Ergebnis, dass Ki-67-Positivität bei allen Patientinnen, auch bei nodalnegativen, mit einem signifikant höheren Rezidivrisiko und einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben vergesellschaftet ist. Nodalnegative Patientinnen mit positivem Ki-67-Status bilden demnach eine Untergruppe mit höherem Risiko. (De Azambuja et al 2007)

Einige Studien sehen die, mit ‚klassischen‘ Methoden bestimmte, hohe Proliferationsrate auch als positiv prädiktiven Marker für Chemotherapie an (Arriola et al 2006); (Campiglio et al 2003); (Petit et al 2004); (Prisack et al 2005); (Remvikos et al 1989); Bottini et al 1996; (Collechi et al 1998).

Die Zellproliferation und die Entdifferenzierung von Brusttumorzellen sind funktionell eng vergesellschaftet. Der klassische etablierte Marker für die Differenzierung von Tumorzellen ist der mikroskopisch bestimmte histologische Grad (Sotiriou et al 2006), (Ignatidis et al 2008) .

Manche Studien sehen einen hohen histologischen Grad auch als prädiktiven Marker für den Erfolg einer Chemotherapie an (von Minkwitz et al 2005); (Aas et al 2003); (Petit et al 2004); (Prisack et al 2005).

Allerdings wird die Anwendung des histologischen Grads als prädiktiver und prognostischer Faktor auch kritisch betrachtet. Zum einen berichten Studien über eine hohe Varianz in der Zuordnung gleicher Gewebeproben zu den histologischen Gradeinteilungen durch verschiedene Pathologen von 50 – 85% (Paik et al 2004); (Hopton et al 1989); (Robbins et al 1995), obwohl einheitliche Vorgehensweisen zur Ermittlung des histologischen Grades existieren und angewendet werden (Elston, Ellis 1991).

Zum anderen ist die Zuordnung zum histologischen Grad 2 prognostisch nicht relevant und hilft daher bei der Risikoabschätzung und Therapieauswahl nicht weiter. Der Anteil der Tumore, die zum Grad 2 zugeordnet werden, beträgt bis zu 60 %. Daher ist der histologische Grad nur eingeschränkt zur Entscheidung über eine (neo)adjuvante Therapie heranzuziehen.

Aus diesem Grund erarbeiteten Sotiriou et al eine Gensignatur, die zum Ziel hatte, den histologischen Grad genauer zu erfassen und insbesondere die Gruppe der histologischen Grad 2 Tumore in prognostisch relevante Subgruppen zu unterteilen (siehe Kapitel 1.4.3.3.).

Eine hohe Proliferationsrate korreliert mit einem positiven Her2-Status und einem negativen Östrogenrezeptorstatus (*Ruiz et al 2006*).

Die beiden Hormonrezeptoren Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) sind intrazelluläre, nukleäre nicht membranständige Rezeptoren. Sie fungieren als Transkriptionsfaktoren und sind an der Genregulation von Genen, die den Zellzyklus und das Zellwachstum regulieren, maßgeblich beteiligt (*Olefsky 2001*).

Die Rolle des Östrogenrezeptorstatus als prädiktiver Marker für antihormonelle Therapie und die großen Therapierfolge durch die Blockade dieses Rezeptors demonstrieren die grundlegende Bedeutung hormonabhängiger Genregulation bei Brustkrebs.

Einige Studien sehen einen negativen Östrogenrezeptorstatus (*Arriola et al 2006*), (*Bonadonna et al 1990*), (*Prisack et al 2005*) bzw. einen negativen Progesteronrezeptorstatus (*Campiglio et al 2003*), (*Prisack et al 2005*) als positiv prädiktiven Wert auch für anthrazyklinhaltige Chemotherapie an.

Ebenfalls an der der hormonabhängigen Genregulation und somit letztlich an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist der Her2/neu-Rezeptor. Dieser ist ein Genprodukt des Protoonkogens c-erbB-2, das sich auf dem langen Arm des Chromosoms 17 befindet. Er ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches als Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinasetyp fungiert und zur Rezeptorfamilie der Erb-Rezeptoren gehört (*Olayioye et al 2000*).

Der Her2-Status wird zunächst immunhistochemisch quantitativ anhand der Farbintensität der angefärbten Zellmembranen des histologischen Präparats durch Einordnung in die Gruppen 0, +1, +2, und +3 bestimmt. Nur die Präparate, die in die Gruppe +3 eingeteilt werden, sind im Sinne der Überexpression Her2-neu-positiv (*Ross et al 2004*); (*Dendukuri et al 2007*). Zur Sicherheit werden +2 getestete Präparate mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) überprüft. Diese Methode ist der Goldstandard in der Her2-Status-Bestimmung (*Jorgensen et al 2007*).

Seine Bedeutung bei der Regulation der Zellproliferation macht man sich bei der therapeutischen Blockade des Rezeptors mit dem gegen ihn gerichteten Antikörper Trastuzumab zu Nutze.

Gennari et al veröffentlichten Anfang 2008 in einer Studie, dass eine adjuvante anthrazyklinhaltige Polychemotherapie nur bei Patientinnen mit positivem Her2neu-Status einen Vorteil im Hinblick auf krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben verglichen mit einem Polychemotherapie regime ohne Anthrazykline hatte.

Sie identifizierten den Her2neu-Status somit als positiven prädiktiven Marker für die Wirkung von Anthrazyklinen (*Gennari et al 2008*).

Die Faktoren Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) und Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) sind Parameter zur Bestimmung der invasiven Potenz eines Mammakarzinoms. Sie

haben prognostische und prädiktive Relevanz. Die beiden Faktoren werden immunhistochemisch am entnommenen Tumorgewebe bestimmt. Nodalnegative Patientinnen mit niedriger Expression von uPA und PAI-1 weisen ein Fünf-Jahres-krankheitsfreies-Überleben von über 90 % auf, während nodalnegative Patientinnen mit höheren Expressionswerten für diese Invasionsfaktoren ein höheres Rückfallrisiko aufweisen. Daher können uPA und PAI-1 bei nodalnegativen Patientinnen als zusätzliches Kriterium verwendet werden, um zu entscheiden, ob eine adjuvante Therapie beschränkt werden soll (*Jänicke et al 2001*); (*Harbeck et al 1999*); (*Harbeck et al 2002*).

Auch konnte für uPA und PAI-1 gezeigt werden, dass nodalnegative Patientinnen wie auch nodalpositive Patientinnen mit hohen uPA-Leveln und PAI-1-Spiegeln stärker von einer Chemotherapie profitieren als Patientinnen mit niedrigen uPA- und PAI-1-Spiegeln. Diese Marker haben also auch prädiktiven Wert für eine Chemotherapie (*Harbeck et al 2002b*).

Die Erforschung der Tumorbiologie liefert also Informationen, die unmittelbare Konsequenz für die medikamentöse Therapie des Mammakarzinoms haben können.

Bei allen Krebsarten liegen der malignen Entartung der Zellen Störungen der das Zellwachstum regulierenden zellulären Kontrollmechanismen zugrunde. Die genauen zellulären Mechanismen insbesondere beim Brustkrebs sind bis heute noch nicht eindeutig identifiziert.

Eine kontrolliert ablaufende Zellproliferation sowie die kontrollierte und koordinierte Differenzierung von Zellen in einem Gewebeverband sind die Voraussetzung für die Integrität und biologische und funktionelle Stabilität eines Organs.

Gehen diese Abläufe nicht mehr koordiniert von statten, so kommt es zu einem unkontrollierten Wachstum und einer unkoordinierten Differenzierung von Zellen in einem Gewebeverband, was vermutlich die Ursache für das Entstehen von malignem Wachstum ist.

Die Erforschung dieses ‚Außer-Kontrolle-Gerats‘ von Zellproliferation und Zelldifferenzierung hat die Entdeckung von direkten therapeutischen Angriffsmöglichkeiten auf die Tumorbiologie zum Ziel (targeted therapy), sowie das Einteilen von Brustkrebs in verschiedene Krankheitsentitäten oder Krankheitsstadien aufgrund von Unterschieden in den zellbiologischen Prozessen der Tumorzellen. Solchen unterschiedlichen Brustkrebsentitäten kann möglicherweise mit unterschiedlichen Therapiestrategien begegnet werden.

Seit einigen Jahren wird versucht mit Hilfe der Methode der Chip-basierten Genexpressionsanalyse den Phänotyp von Brustkrebsgeweben exakter als mit den oben beschriebenen ‚klassischen‘ Methoden zu bestimmen und so zu aussagekräftigeren prognostischen und prädiktiven Gensignaturen zu kommen, als den gegenwärtig verwendeten oben beschriebenen prädiktiven und prognostischen ‚klassischen‘ Markern.

## 1.4 Durch cDNA-Genexpressionsanalyse ermittelte Marker

### 1.4.1 Darstellung der Methode der Chip-basierten Genexpressionsanalyse

#### 1.4.1.1 Definition eines Microarray

Ein Microarray ist eine molekularbiologische Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Biomolekülen und Geweben in einer zu untersuchenden Probe (*Chaudhuri 2005*). Gleichbedeutend sind auch die Bezeichnungen ‚Chip‘ oder ‚Genexpressionsplattform‘.

Er funktioniert nach dem Sandwich-Prinzip, wobei ein bekannter definierter und spezifischer Bindungspartner auf einer soliden Phase, z.B. Glas oder Nylon fixiert wird. Die auf der soliden Phase fixierten Bindungspartner (Targets) werden mit der zu untersuchenden Probe (Probe) beschickt, die Probenstrukturen binden alsdann spezifisch an die Targets. Nach Durchführung von Waschvorgängen, die dem Entfernen des Probenmaterials, das nicht an die Targets gebunden hat, dienen, bleibt das spezifisch über die Targets gebundene Probenmaterial auf der festen Phase haften.

Das Probenmaterial ist zuvor mit einer signalgebenden Einheit markiert worden oder muss derart manipuliert worden sein, dass es nach Aufbringen auf die feste Phase mit einer signalgebenden Einheit markiert werden kann.

Über ein die Signale auswertendes System wird das an die Targets gebundene Probenmaterial qualitativ und, da die Targets im Überfluss auf der festen Phase als Bindungspartner zur Verfügung stehen, auch quantitativ erfasst.

Die Interpretation der detektierten Signale lässt dann eventuell eine biologische Aussage zu

(*Morcelin et al 2005*); (*Cekan et al 2004*); ;(*Paik et al 2006*)

;

(*Gruvberger-Saal et al 2006*); (*Chaudhuri 2005*); (*Reis-Filho et al 2006*); (*White CA, Salamonsen LA 2005*).

#### 1.4.1.2 Microchips zum Nachweis von Nukleinsäuren

Diese Studie beschäftigt sich mit der Ermittlung von Genexpressionsmustern unter Verwendung von cDNA- und Oligonukleotidmicrochips. Diese ermitteln quantitativ die in einer Probe enthaltene messenger RNA (mRNA).

Da die mRNA nach Splicing an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums in Polypeptidketten translatiert wird, die nach Assemblierung letztlich als Biomoleküle den Phänotyp einer Zelle konstituieren, sollte das mRNA-Transkriptionsmuster dem Genexpressionsmuster in Proteine entsprechen und somit das biologische Verhalten der Zellen, aus denen die mRNA stammt, nahezu exakt widerspiegeln.

Der cDNA- oder Oligonukleotid-Chip detektiert die mRNA aus einer zu untersuchenden Probe durch komplementäre Hybridisierung der Nukleotidsequenzen aus der Probe mit Nukleotidsequenzen auf dem Chip. Der Chip ermittelt so das Genexpressionsmuster untersuchter Zellen und somit deren biologisches Verhalten, ihren Phänotyp.

Die besondere Eigenschaft des Mikroarrays ist, dass auf ihn sehr viele Targetnukleotidsequenzen aufgebracht werden können, so dass, im Vergleich zu anderen Technologien, in einer Probe sehr viele verschiedene Strukturen gleichzeitig qualitativ und quantitativ erfasst werden können.

So ist ein Ort (Spot) auf dem Microarray, auf den spezifische gleiche Sequenzen aufgedruckt werden, ca. 100 bis 300 Mikrometer groß (*Cekan et al 2004*), so dass auf einem Chip bis zu

50 000 Gensequenzen qualitativ und quantitativ an einer Probe untersucht werden können ; (*Cekan et al 2004*).

Zum Vergleich umfasst das gesamte menschliche Genom nach Schätzungen ca. 20 000 bis 25 000 verschiedene Gene (*International Human Genome Sequencing Consortium 2004*).

#### **1.4.1.3 RNA als Probenmaterial**

Der wichtigste limitierende Faktor für die Untersuchung von biologischem Material per Microchip ist die Menge an stabiler in ihm enthaltener RNA.

Durch erhöhte Sensitivität der Microchips und verbesserte Methoden der RNA-Amplifizierung hat es in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte dahingehend gegeben, dass immer kleinere Mengen an RNA schon eine Genexpressionsanalyse zulassen. So waren bis vor wenigen Jahren noch RNA-Mengen zwischen 50 und 200 µg für eine Genexpressionsanalyse notwendig (*Duggan et al 1999*).

Durch ausgefeilte Methoden der PCR-basierten RNA-Amplifizierung können mittlerweile RNA-Mengen von ca. 200 ng ausreichen um Genexpression repräsentierende RNA aus der Proben-RNA zu erhalten (*Petadilis et al 2003*).

Trotz nur geringer benötigter Mengen an RNA ist die Möglichkeit zur Genexpressionsanalyse aus archivierten Tumorgewebeproben limitiert.

Die meisten operativ entnommenen Gewebeproben werden mit klassischen histologischen Methoden konserviert. Diese sind die Entwässerung, Formalinfixierung und Paraffinisierung der Gewebestücke.

Zum einen wird RNA während der Lagerung in paraffinisierten Gewebelöcken stark fragmentiert (*Cronin et al 2004*).

Zum anderen erfährt die Gewebe-RNA durch die Formalinfixierung eine leichte chemische Veränderung, die es den in der PCR-Amplifikation notwendigen Primern erschwert, an die RNA zu binden, so dass die RNA-Polymerase keine RNA-Synthese durchführen kann (*Masuda et al 1999*).

Für die Genexpressionsanalyse via Mikroarray ist frisches oder gefrorenes Gewebe am besten geeignet. Bei frischem Tumorgewebe besteht natürlich das Problem, dass keine klinischen Daten zur Verfügung stehen. Diese Methode findet daher vor allem bei prospektiven Studien, speziell im

neoadjuvanten Setting ihre Anwendung. Für retrospektive Studien wie in dieser Studie eignen sich gefrorene, archivierte Gewebeprobe am besten.

So wurden auch in dieser Studie in Stickstoff gefrorene Gewebeprobe verwendet.

#### **1.4.1.4 Herkunft der cDNA-Sequenzen des cDNA-Chips**

Die Target-DNA-Sequenzen stammen von DNA-Klonen, die mit PCR (Polymerase Kettenreaktion) vervielfältigt und anschließend aufgereinigt werden.

Solche Chips werden von Firmen hergestellt oder können vom Forscher selbst erstellt werden (*Morcelin et al 2005*).

Im Falle von humanen Genen, ist es seit der kompletten Sequenzierung des humanen Genoms (*Venter et al 2001*) möglich, aus speziellen Gendatenbanken die Target-Gene auszusuchen (*Chaudhuri 2005*).

#### **1.4.1.5 Versuchsablauf einer Genexpressionsanalyse**

##### **1.4.1.5.1 Solide Phase**

Das Trägermaterial der soliden Phase ist meistens ein Glas-Chip. Dieser Glaschip wird maschinell mit den cDNA-Sequenzen der zuvor ausgewählten Gene bedruckt.

Im Falle des cDNA-Chips werden diese Gene immer in einfacher Ausführung auf den Chip aufgedruckt. Jedes zu untersuchende Gen wird auf dem Chip auf ein bestimmtes punktförmiges Areal aufgedruckt (*Morcelin et al 2005*); (*Cekan et al 2004*).

##### **1.4.1.5.2 Herstellung und Farbmarkierung des Probenmaterials**

Die RNA wird also aus dem Probenmaterial mit einschlägigen Verfahren extrahiert. Sie wird alsdann mit dem Enzym ‚reverse Transkriptase‘ in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) übersetzt und zwar unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Cytosin-Nukleotiden. Zur Fluoreszenzmarkierung der experimentellen Probe wird meist Cy3-dCTP eingesetzt, welches ein rotes fluoreszierendes Farbsignal emittiert. Für die Fluoreszenzmarkierung der cDNA der Kontrollprobe, die auf analoge Weise aus der RNA der Kontrollprobe hergestellt wird, wird Cy5-dCTP verwendet, welches ein grünes fluoreszierendes Farbsignal emittiert. Falls notwendig wird die so gewonnene cDNA mittels PCR amplifiziert, natürlich ebenfalls unter der Verwendung der genannten markierten Cytosin-Nukleotide.

Das Ergebnis sind nun also zwei bestimmte sich entsprechende Mengen an fluoreszenzmarkierter DNA, die der RNA aus der experimentellen Probe bzw. der Kontrollprobe komplementär sind.

Nun werden diese beiden DNA-Mengen miteinander vermischt. Es resultiert daraus eine Probe, die aus fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben besteht, die, zum einen die RNA der experimentellen Probe



repräsentieren, sowie zum anderen die RNA der Kontrollprobe repräsentieren (*Morcelin et al 2005*); (*Cekan et al 2004*).

Alternativ kann anstatt cDNA auch markierte oder markierungsfähige RNA zur Hybridisierung auf der Genexpressionsplattform genutzt werden.

Auch hier wird die zu untersuchende RNA aus dem Probenmaterial isoliert und aufgereinigt. Mit reverser Transkriptase wird cDNA hergestellt. Aus dieser wird allerdings wieder komplementäre RNA synthetisiert. Diese nun zur ursprünglichen Proben-RNA gegenläufige RNA wird aus biotinylierten Nukleotiden synthetisiert. Nach Hybridisierung und Waschvorgang wird dann erst die fluoreszierende Einheit über Avidin oder Streptavidin an die hybridisierten cRNA-Moleküle gekoppelt (*Morcelin et al 2005*); (*Cekan et al 2004*).

#### **1.4.1.5.3 Hybridisieren und Waschen**

Die vermischte Probe wird nun in definierten Mengen zur Hybridisierung mit der auf der soliden Phase gebundenen definierten cDNA auf den Chip aufpipetiert. Die komplementären DNA-Stränge aus Probe und solider Phase hybridisieren miteinander. Nicht komplementäre Stränge bilden keine Hybridisierung aus (*Morcelin et al 2005*); (*Cekan et al 2004*); ;(*Paik et al 2006*)

; (*Gruvberger-Saal et al 2006*); (*Chaudhuri 2005*); (*Reis-Filho et al 2006*); (*White CA, Salamonsen LA 2005*).

Anschließend wird der Chip gewaschen, so dass nur die fluoreszenzmarkierte cDNA auf dem Chip verbleibt, die auf dem Chip einen komplementären Bindungspartner gefunden hat. (*Morcelin et al 2005*); (*Cekan et al 2004*); ; (*Paik et al 2006*)

; (*Gruvberger-Saal et al 2006*); (*Chaudhuri 2005*); (*Reis-Filho et al 2006*); (*White CA, Salamonsen LA 2005*)

#### **1.4.1.5.4 Signaldetektion und –verarbeitung**

Durch ein geeignetes optisches System werden die nun von den fluoreszierenden Cytosin-Nukleotiden emittierten Signale erfasst. Die Intensität der Fluoreszenz der jeweiligen Farbe ist der Anzahl an hybridisierenden cDNA-Sequenzen auf dem Chip direkt proportional (*Chaudhuri 2005*).

Das vermischte Probenmaterial muss kompetitiv an die DNA-Sequenzen auf dem Chip binden. Waren die einem bestimmten Gen auf dem Chip komplementären RNA-Transkripte aus der experimentellen Probe und aus der Kontrollprobe in den jeweiligen Proben in gleicher Menge exprimiert und in gleicher Menge vorhanden, so binden die daraus synthetisierten fluoreszenzmarkierten komplementären cDNA-Stränge in gleichem Maße an die auf dem Chip aufgedruckten Gensequenzen. Ist ein bestimmtes Gen in der experimentellen Probe stärker exprimiert als in der Kontrollprobe so geht die resultierende Farbe eher in Richtung rot. Ist ein Gen in der experimentellen Probe weniger

exprimiert als in der Kontrollprobe, so tendiert die resultierende Farbe in Richtung grün, bzw. wenn in der einen Proben ein Gen gar nicht exprimiert wurde, dafür aber in der anderen, so resultiert nur rot oder umgekehrt nur grün.

Die Intensität der Fluoreszenz wird quantitativ erfasst, so dass ein genaues Verhältnis der Expression eines Genes zwischen den verglichenen Proben ermittelt werden kann.

Das Ergebnis eines Ein-Chip-Microarrays wird immer als Quotient aus Farbtintensität der experimentellen Probe und der Kontrollprobe geliefert (*Morcelin et al 2005*); (*White CA, Salamonsen LA 2005*).

#### **1.4.1.6 Minimierung falsch positiver Signale mit Oligonukleotid-Genexpressionsplattformen**

Im Unterschied zum einfachen cDNA-Chip sind beim Oligonukleotid-Chip keine vollständigen Gensequenzen auf den Chip aufgebracht, sondern nur bestimmte für das gesuchte Gen repräsentative Oligonukleotidsequenzen. Diese können aus DNA oder RNA bestehen. Für jedes Gen werden 16 verschiedene Oligonukleotidsequenzen, die aber alle für das gleiche Gen spezifisch sind auf die Genexpressionsplattform aufgedruckt. Die Oligonukleotidsequenzen umfassen 25 bis 80 Basen je nach Chip.

Der Vorteil dieser Aufteilung ist die Minimierung von falsch positiven Signalen durch unspezifische Bindung und unspezifische Signale, da ein positives Signal für das gleiche Gen über 16 verschiedene Stellen verifiziert wird. Der Wahrscheinlichkeit nach müssten sich die verschiedenen Gentranskripte des gleichen Gens gleichmäßig auf die 16 verschiedenen für sie als spezifische Bindungspartner in Frage kommenden Hybridisierungspartnerstrukturen verteilen. Wenn also an einem der 16 Oligonukleotidsequenz-Punkte ein stärkeres Signal vorkommt als an den übrigen für das gleiche Gen spezifischen, so kann man davon ausgehen, dass es sich dabei um ein falsch positives Signal handelt.

Ein weiterer Mechanismus ist eingebaut, um falsch positive Signale auszuschließen.

Ein Oligonukleotidpaar besteht aus einem spezifischen genrepräsentativen Oligonukleotid und einem Oligonukleotid, das sich in einer Base von dem spezifischen, genrepräsentativen unterscheidet.

Dasjenige Oligonukleotid mit der ‚richtigen‘ Basensequenz nennt man ‚Total Match‘, dasjenige mit der veränderten Basensequenz nennt man ‚Mismatch‘.

Die Mismatch-Oligonukleotide dienen als intrinsische Kontrolle, die unspezifische Bindungspartner entlarven. Wenn nämlich Nukleotide aus einer Probe unspezifisch an die Oligonukleotidsequenz gebunden haben, die für kein Gen spezifisch sind, sich aber nur leicht von dem spezifischen Oligonukleotid unterscheiden, so ist anzunehmen, dass auch am spezifischen Oligonukleotid solche unspezifischen Bindungspartner haften, die zu einem falsch positiven Signal führen. Daher wird die Signalintensität des unspezifischen Oligonukleotids von der des spezifischen Oligonukleotids abgezogen. So erhält der Untersucher einen von auf unspezifische Bindung zurückzuführenden falsch positiven Signalen bereinigten Messwert.

Diese Ergebnisbereinigung hat eine höhere Sensitivität des gesamten Arrays zur Folge. Dies führt vor allem dazu, dass weniger Proben-RNA benötigt wird, um aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen (*Morcelin et al 2005*); (*Cekan et al 2004*).

#### **1.4.1.7 Datenanalyse**

Um eine verwertbare Aussage aus der Genexpressionsanalyse herauszubekommen, müssen die Daten einer sogenannten Normalisation unterzogen werden. Das bedeutet, die Messergebnisse werden, mit Hilfe von computergestützten Statistikprogrammen aufgearbeitet

(*Morcelin et al 2005*); (*Cekan et al 2004*);(*Paik et al 2006*)

;(Gruvberger-Saal et al 2006); (*Chaudhuri 2005*); (*Reis-Filho et al 2006*); (*White CA, Salamonsen LA 2005*).

### 1.4.2 Neue molekular-morphologische Einteilungen von Brustkrebs durch Genexpressionsmuster

In einer Genexpressionsstudie mit 65 Tumorgewebeproben von 42 Brustkrebspatientinnen untersuchten Perou et al (*Perou et al 2000*) diese Gewebeproben mit Hilfe einer 8 102 Target-Gene tragenden cDNA-Genexpressionsplattform auf brustkrebstypische probenübergreifende Genexpressionsmuster. Die Gewebeproben stammten aus frisch resezierten Primärtumoren oder Lymphknotenmetastasen, die vor Gabe einer adjuvanten Therapie entnommen wurden, sodass das bei Operation entnommene Tumorgewebe unbeeinträchtigt von medikamentöser Therapie war.

Die extrahierte RNA aus den Gewebeproben wurde mit RNA aus 11 Zellkulturlinien verglichen.

Perou et al identifizierten eine Gruppe von 427 Genen, anhand von deren Expressionsmuster sich die Gewebeproben in vier Gruppen einteilen ließen, in denen die Expressionsmuster der 427 Gene jeweils relativ homogen waren und die die Gruppen voneinander abgrenzten. Die Autoren bezeichneten diese Gensignatur als ‚intrinsic Gene Set‘.

Diese so eingeteilten Gruppen korrelierten stark mit dem immunhistochemisch bestimmten Östrogenrezeptorstatus (ER-Status). Die Autoren benannten diese Gruppen entsprechend der funktionellen Zugehörigkeit der Gene innerhalb der ‚intrinsic‘ Gensignatur, deren Aktivität für die jeweilige Gruppe typisch war.

So konnten die ER-negativen Tumore in drei Subgruppen eingeteilt werden, eine **ErbB2-overexpressing‘ Gruppe**, eine sogenannte **‚basal-like‘ Subgruppe**, deren Genexpressionsmuster Ähnlichkeiten mit dem von basalen epithelialen Zellen aufwies, sowie einer sog. **‚normal-like‘ Subgruppe**, deren Genexpressionsmuster dem von Zellen aus normalem, nicht entartetem Brustgewebe glich.

Die ER-positiven Tumore zeigten ein Genexpressionsmuster, das dem von luminalen epithelialen Zellen glich. Diese Expressionsmuster wurden daher als **‚luminal-like‘** bezeichnet.

In einer auf der Studie von Perou et al aufbauenden Studie untersuchten Sorlie et al (*Sorlie et al 2001*) mit Hilfe der gleichen 8 102 Target-Gene tragenden Chip-Plattform Gewebeproben eines etwas größeren Patientinnenkollektivs, nämlich 85 Gewebeproben.

Es handelte sich um tiefgefrorene Gewebeproben. Um zur Analyse zugelassen zu werden, mussten sie mindestens einen Tumorzellgehalt von 50 % aufweisen.

Die zuvor durch Perou et al vorgenommenen Einteilungen ließen sich in diesem Experiment reproduzieren. Die Expressionsmuster der intrinsic Gensignatur ergaben eine weitere Unterteilung der ER-positiven ‚luminalen‘ Tumore in die Subgruppen **Luminal A**, **Luminal B** und **Luminal C**.

Die Tumore, die das Genexpressionsmuster ‚Luminal A‘ aufwiesen, zeichneten sich durch eine stärkere Expression der Gene aus, die den ER-positiven Rezeptorstatus kennzeichnen als dies der Fall bei den Gruppen ‚Luminal B‘ und ‚Luminal C‘ der Fall war (*Sorlie et al 2001*).

Die Subgruppen Luminal B und Luminal C zeichneten sich ihrerseits dadurch aus, dass sie eine Gengruppe bislang unbekannter Funktion exprimierten, die auch bei den ER-negativen ‚basal-like‘ und ‚ErbB2-overexpressing‘ stark exprimiert wurde.

Bei 49 der 85 Gewebeproben wurde die Einteilung entsprechend der ‚intrinsischen‘ Gensignatur mit dem Krankheitsverlauf der jeweiligen Patientin korreliert.

Diese 49 Patientinnen wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose ein Tumorstadium von T3 oder T4 auf, bzw. hatten einen positiven Nodalstatus von N2. Alle hatten eine neoadjuvante anthrazyklinhaltige Chemotherapie erhalten und für den Fall, dass ihre Tumore hormonrezeptorpositiv getestet worden waren, eine adjuvante antihormonelle Behandlung mit Tamoxifen.

Der mediane Nachbeobachtungszeitraum lag bei 5,5 Jahren.

Aufgrund der erfolgten Therapie konnte die prognostische nicht von der für die jeweils verabreichte Therapie prädiktiven Aussagekraft abgegrenzt werden.

Die Patientinnen mit Tumoren der Gruppe der ER-positiven ‚Luminal A‘ Tumoren wiesen das beste krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben der einzelnen Gruppen auf, sie hatten somit auch eine bessere Prognose als die Patientinnen mit den ER-positiven Luminal B – bzw. Luminal C – Tumoren.

Die schlechtesten Werte bezüglich krankheitsfreiem Überleben und Gesamtüberleben erzielten die Patientinnen mit den ER-negativen ‚Basal-like‘-Tumoren. Das zweitschlechteste Ergebnis erzielten die Patientinnen mit ErbB2-like-Tumoren. Luminal B und Luminal C unterschieden sich nicht wesentlich hinsichtlich der Prognose der dazugehörigen Patientinnen. Am zweitbesten schnitten die Patientinnen mit Tumoren der ‚normal-like‘-Gruppe ab.

### **1.4.3 Prognostische Gensignaturen**

#### **1.4.3.1 Die ‚Amsterdam‘-Prognosesignatur**

Van't Veer et al (*Van't Veer et al 2002*) ermittelten an tiefgefrorenen Gewebeproben von 98 Patientinnen mit Hilfe eines 25 000 Target-Gene tragenden ‚Hu 25K‘ cDNA-Mikroarrays der Firma Agilent eine Signatur von 70 Genen, die mit dem 5-Jahres-krankheitsfreien Überleben von 78 dieser Patientinnen korreliert wurde.

Die 78 Patientinnen, von denen die Gewebeproben stammten, waren in den Jahren 1983-1996 operiert worden, hatten einen negativen Nodalstatus, ein Tumorstadium von T1 oder T2 und waren zum Zeitpunkt der Diagnose unter 55 Jahre alt.

Die zur Genexpressionsanalyse ausgewählten Tumorgewebeproben mussten mindestens einen Tumorzellanteil von 50 % aufweisen.

Bis auf 5 Patientinnen hatten die Patientinnen keine adjuvante Therapie erhalten. Daher eignete sich dieses Kollektiv zur Bestimmung eines prognostischen Markers, da der natürliche Krankheitsverlauf nach Operation nahezu ohne Beeinflussung einer adjuvanten Therapie nachvollzogen werden konnte.

Der Nachbeobachtungszeitraum betrug bei den Patientinnen ohne Krankheitsrückfall (n = 44) nach Operation mindestens fünf Jahre, der durchschnittliche Nachbeobachtungszeitraum 8,7 Jahre.

Die Patientinnen mit Krankheitsrückfall (n = 34) hatten innerhalb von 5 Jahren eine Metastase oder Rezidiv erlitten, die mittlere Zeit bis zum Krankheitsrückfall betrug 2,5 Jahre.

Die 70 Gene umfassende prognostische Signatur konnte diejenigen Patientinnen mit Krankheitsrückfall mit einer Sensitivität von 91 % nachweisen, die Spezifität der ‚Poor-Prognosis-Signature‘ lag bei 72 %. Wären die Patientinnen in dieser Studie aufgrund dieser Signatur für eine adjuvante Therapie ausgesucht worden, so hätten knapp 30 % der für eine adjuvante Therapie ausgewählten Patientinnen eine solche Therapie nicht benötigt. In diesem Punkt sahen Van't Veer et al die von ihnen ermittelte Signatur den zum Zeitpunkt der Untersuchung gültigen NIH- und St Gallen-Kriterien als überlegen an. Diese hatten, auf das Studienkollektiv angewandt, eine ähnliche Sensitivität, aber eine geringere Spezifität. Nach der St Gallen-Klassifikation wären 70 % der Patientinnen ohne Krankheitsrückfall adjuvant behandelt worden, nach den NIH-Empfehlungen 91 %.

Das Genexpressionsmuster der 70 prognostisch relevanten Gene korrelierte zudem mit dem ER-Status und der lymphozytären Infiltration der Tumorgewebe, nicht aber beispielsweise mit dem histologischen Grad oder der Gefäßinvasion.

Diese prognostische 70-Gene-Signatur wird in der Literatur auch häufig als ‚Amsterdam-Signatur‘ bezeichnet, da die Arbeiten am ‚The Netherlands Cancer Institute‘ in Amsterdam erfolgten.

Van de Vijver et al (*Van de Vijver et al 2002*) veröffentlichten Ende 2002 eine Validierungsstudie der ‚Amsterdam-Signatur‘, die am gleichen Institut erarbeitet worden war.

Die analysierten 295 Tumorgewebeproben mussten wie in der vorhergehenden Studie mindestens einen Tumorzellgehalt von 50 % aufweisen, sie waren in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und stammten von Operationen aus den Jahren 1984 -1995.

Die Proben stammten von T1 bzw. T2 –Tumoren und die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Operation unter 52 Jahre alt. Im Unterschied zur Studie von Van't Veer et al waren in diesem Patientinnenkollektiv auch 151 nodalpositive Patientinnen enthalten, also Patientinnen mit höherem Rückfallrisiko. Auch Gewebeproben von 144 nodalnegativen Patientinnen wurden analysiert. In diesen 144 Gewebeproben waren Gewebeproben von 61 Patientinnen aus der Van't Veer-Studie enthalten und wurden noch einmal mitanalysiert.

Ein weiterer Unterschied zur vorhergehenden Studie war, dass knapp die Hälfte der Patientinnen eine adjuvante Therapie erhalten hatte. Die prognostische Aussagekraft der Amsterdam-Signatur war in dieser Studie daher teilweise von adjuvanter Therapie überlagert.

Die Genexpressionsplattform und laborexperimentelle Verfahrensweise waren identisch mit der bei van't Veer et al.

Die Amsterdam-Signatur konnte auch an diesem Kollektiv die Patientinnen in Gruppen mit unterschiedlichen Genexpressionsmustern einteilen.

Van de Vijver et al korrelierten diese mit dem 5- bzw. 10 Jahres- krankheitsfreien Überleben, sowie dem 5- oder 10 Jahres-Gesamtüberleben.

So erlebten 50,6 % der Patientinnen aus der Gruppe mit schlechter Prognose ein zehnjähriges krankheitsfreies Intervall und 54,6 % überlebten zehn postoperative Jahre, während 85,2 % der Patientinnen aus der Gruppe mit guter Prognose zehn Jahre krankheitsfrei überlebten bzw. 94,5 % zehn Jahre an sich überlebten.

Die Zuteilung zur ‚Poor-Prognosis‘-Gruppe, bzw. zur ‚Good-Prognosis‘-Gruppe gemäß der Amsterdam-Signatur war am Studienkollektiv sowohl hinsichtlich der Übertherapie, d.h. der Gabe von adjuvanter Therapie an Patientinnen, die diese im Rückblick nicht benötigten, als auch hinsichtlich Untertherapie, d.h. der Nicht-Gabe adjuvanter Therapie an, Patientinnen, die trotz vermeintlich guter Prognose ein Rezidiv oder Fernmetastasen erlitten, sensitiver und spezifischer als die zum Zeitpunkt der Untersuchung gültigen Einteilungen der NIH bzw. der Konsensus Konferenz St Gallen von 2001.

Die Amsterdam-Signatur korrelierte mit dem Alter bei OP ( $p < 0,001$ ), der Tumorgröße ( $p < 0,012$ ), im Gegensatz zur ursprünglichen Studie von van't Veer et al mit dem histologischen Grad ( $p < 0,001$ ), und auch sehr stark mit Östrogenrezeptorstatus ( $p < 0,001$ ).

Interessanterweise korrelierte die Amsterdam-Prognose-Signatur nicht mit dem Lymphknotenstatus ( $p < 0,6$ ), welcher bislang als der stärkste einzelne unabhängige prognostische klassische Marker gilt (siehe Kapitel 1.3.3).

Die Autoren begründeten dieses Phänomen mit der These, die Amsterdam-Prognose-Signatur beschreibe eine den Tumorzellen schon früh in der Tumorentwicklung innewohnende Fähigkeit, Fernmetastasen auszubilden. Der Lymphknotenstatus sei hingegen eine Funktion der lokalen Ausbreitung des Tumors und des Stadiums, in dem er diagnostiziert und operiert werde und beschreibe weniger die Tumorbiologie. Diese sei aber letztlich nach erfolgreicher Operation maßgeblich für das Sähen von Metastasen.

Eine Genexpressionsplattform, auf den diese Gensignatur als Target aufgedruckt ist, ist kommerziell unter dem Namen ‚Mammaprint‘ von der Firma ‚Agendia Laboratories‘ erhältlich. Dieser Chip wurde im Juni 2007 von der US-amerikanischen Behörde ‚Food and Drug Administration (FDA)‘ als Diagnostikum für den US-amerikanischen Markt zugelassen.

### 1.4.3.2 Die ‚Rotterdam‘-Prognosesignatur

2005 veröffentlichten Wang et al (*Wang et al 2005*) eine Studie, in der die Autoren ebenfalls eine prognostische Gensignatur ermittelt hatten. Diese Gensignatur wird in der Literatur als ‚Rotterdam-Signatur‘ bezeichnet.

Dazu wurden in Stickstoff gefrorene Tumorproben von 286 Patientinnen einer Genexpressionsanalyse unterzogen, die in den Jahren 1980 bis 1995 operativ aus dem Primärtumor entnommen worden waren. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mit Hilfe eines Affymetrix Human U133A Gene Chip mit 22 000 Target-Strukturen. Die ausgewählten Gewebeprobe mussten ein Gehalt von mindestens 70 % Tumorzellen aufweisen.

Die Proben wurden in ein ‚Training Set‘ mit 115 Proben und ein ‚Validation Set‘ mit 171 Proben aufgeteilt. Anhand der Proben des Training Sets wurde die Gensignatur erarbeitet, am unabhängigen ‚Validation Set‘ wurde deren prognostische Aussagekraft untersucht.

Bei den ausgewählten Patientinnen handelte es sich ausschließlich um nodalnegative Patientinnen, die keine adjuvante medikamentöse Therapie erhalten hatten. Die prognostische Aussagekraft der ermittelten Signatur ließ sich also mit dem ‚natürlichen‘ Krankheitsverlauf, unbeeinträchtigt von adjuvanter Therapie korrelieren.

Das mittlere Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation lag bei 54 Jahren (Spektrum: 26- 83 Jahre). Die Patientinnen waren hälftig prä- bzw. postmenopausal, ca. 75 % der Tumoren waren immunhistochemisch ER-positiv getestet, der histologische Grad verteilte sich wie folgt: G1 = 2 %, G2 = 15 %, G3 = 52 %, unbekannt = 31 %. Fast alle Tumore befanden sich im Stadium T1 oder T2.

33 % der Patientinnen erlitten innerhalb von 5 Jahren Fernmetastasen, 67 % blieben innerhalb von 5 Jahren krankheitsfrei. Der Nachbeobachtungszeitraum der Patientinnen ohne Metastasenbefall lag im Mittel bei 8,4 Jahren.

Die am Training Set ermittelte prognostische Gensignatur umfasste 76 Gene. Da bei der Genexpressionsanalyse zunächst der ER-Status der größte Einflussfaktor auf die ermittelten Genexpressionsmuster war, teilten die Autoren die Tumoren in ER-positive und ER-negative auf und suchten separat in beiden Gruppen nach Genen, die mit dem postoperativen Krankheitsverlauf korrelierten. Aus der Gruppe der ER-positiven Tumore wählten sie 60 entsprechende Gene aus, aus der Gruppe der ER-negativen Tumore wählten sie 16 Gene aus. Die beiden Gengruppen fügten sie zu einer 76-Gen-Prognosesignatur zusammen.

Diese Prognosesignatur wandten sie dann auf alle Patientinnen des ‚Validation Sets‘ an, unabhängig von deren immunhistochemischen ER-Status.

Die Patientinnen des Validation Sets, die innerhalb von fünf postoperativen Jahren Fernmetastasen erlitten, identifizierte die 76-Gen-Prognosesignatur mit einer Sensitivität von 93 % und einer Spezifität von 48 %.

Die verglichenen, zum Zeitpunkt der Studie gültigen Einteilungskriterien der NIH und der Konsensus-Konferenz von St Gallen aus 2003, wiesen bezüglich des Auftretens von Fernmetastasen eine



Sensitivität von 95 % auf. Die Spezifität war der 76-Gen-Prognosesignatur aber mit 10% (St Gallen) und 11% (NIH-Kriterien) unterlegen.

Nach den zum Zeitpunkt der Studie gültigen St Galler Kriterien und NIH-Kriterien wären ca. 90 % der Patientinnen ohne Metastasenbefall innerhalb von fünf Jahren nach Operation mit einer adjuvanten Therapie behandelt worden. Unter Anwendung der Rotterdam-Signatur wären dies nur 52 % der Patientinnen gewesen. Eine Übertherapie wäre also durch Anwendung der Prognosesignatur erheblich geringer ausgefallen.

Die ermittelte 76-Gen-Prognosesignatur hatte in allen gebildeten Subgruppen prognostische Relevanz, unter Patientinnen mit ER-negativen Tumoren, sowie auch unter Patientinnen mit ER-positiven Tumoren.

Von den einzelnen erhobenen prognostischen Markern war außer der Prognosesignatur lediglich der histologische Grad mit dem postoperativen Krankheitsverlauf assoziiert.

#### **1.4.3.3 Die ‚Genomic-Grade‘-Prognosesignatur**

2006 veröffentlichten Sotiriou et al eine Studie, in der sie versuchten, ein Genexpressionsmuster zu ermitteln, das mit dem histologischen Grad korreliert.

Dies taten sie, um bei Tumoren mit dem bislang nicht prognostisch aussagekräftigen histologischen Grad 2 einen prognostisch relevanten Marker für die zellbiologischen Phänomene zu finden, die der histologische Grad widerspiegelt, nämlich Zelldifferenzierung und Zellproliferation (siehe Kapitel 1.3.5).

Sotiriou et al verwendeten 64 Tumorgewebeproben von ausschließlich ER-positiven Tumoren als ‚Training Set‘ zur Identifikation von Genen, die mit histologischem Grad 1 bzw. histologischem Grad 3 korrelierten. Dieses Training Set beinhaltete Tumorproben von entweder Grad 1- oder Grad 3 Tumoren.

Die verwendeten Gewebeproben stammten von tiefgefrorenen Tumorproben. Zur Genexpressionsanalyse wurde ein Affymetrix U133A Genechip verwendet.

Zunächst wurden 242 mit dem histologischen Grad assoziierte Gene ermittelt. Diese Auswahl wurde noch einmal auf die 97 am signifikantesten assoziierten Gene reduziert.

Das Expressionsmuster dieser Gene konnte signifikant zwischen Grad 1-Tumoren und Grad 3-Tumoren unterscheiden. Diese Gene waren funktionell mit Zellzykluskontrolle und Proliferation assoziiert.

Diese Signatur aus 97 Genen wurde nun an einem ‚Validation Set‘ auf ihre Fähigkeit zu Diskriminierung von Grad 1-, Grad 2- und Grad 3-Tumoren hin untersucht.

Hierzu führten Sotiriou et al mit der gleichen Chip-Plattform eine Genexpressionsanalyse an weiteren 115 tiefgefrorenen Tumorgewebeproben durch. Die Patientinnen, von denen diese Gewebeproben

stammten, waren wie die Patientinnen des Training Sets alle nodalnegativ und ihre Tumore waren ER-positiv getestet worden. Im Gegensatz zum Training Set wiesen aber 37 % der Tumore, von denen die Proben stammten, einen histologischen Grad von 2 auf.

Ansonsten gab es keine wesentlichen Unterschiede zwischen Training und Validation Set hinsichtlich der Tumor- bzw. Patientinnenmerkmale.

Die Tumorproben mit histologischem Grad 1 wurden mit einer Sensitivität von 91 % durch die Genomic Grade Signatur erkannt und die Grad 3 –Tumoren mit einer Sensitivität von 86 %.

Die Grad 2- Tumore ließen sich entsprechend der Genomic Grade-Signatur entweder der Gruppe der Grad 1-Tumore oder der Grad 3- Tumore zuordnen, oder das Expressionsmuster der Genomic Grade – Signatur ließ sich in Teilen dem Expressionsmuster der Grad 1-Tumore und auch der Grad 3-Tumore zuordnen. Ein einheitliches klar abgrenzbares Expressionsmuster für die Grad 2-Tumore ergab sich nicht. Die Autoren schlossen daraus, dass die Gruppe der Grad 2-Tumoren im Sinne der Genomic Grade Signatur gar keine eigenständige Gruppe hinsichtlich des Entdifferenzierungsgrades des Gewebes ist, sondern sich meistens entweder den Grad 1 bzw. den Grad 3 –Tumoren zuordnen lässt. Die Genomic Grade-Signatur sei dafür eine empfindlichere Messmethode als die histologische Begutachtung unter dem Mikroskop.

Um ihre These noch weiter zu untermauern, analysierten die Autoren in der Literatur veröffentlichte Genexpressionsdaten auf Gemeinsamkeiten mit der von ihnen ermittelten Genomic Grade-Signatur. Die Proben des experimentellen Validation Sets sowie die aus der Literatur entnommenen Daten ergaben damit zusammen eine Probenmenge von 597 Gewebeproben mit zur Analyse verfügbaren Expressionsdaten.

Die Tumor- und Patientinneneigenschaften dieser aus der Literatur entnommenen Validationsdaten wichen von denen des Training Sets ab. So beinhalteten diese Datengruppen Daten von nodalpositiven als auch -negativen Patientinnen, und von ER-positiven, sowie auch ER-negativen Tumoren. 36% der Gewebeproben, von denen diese Daten stammten, wiesen einen histologischen Grad von 2 auf, während die Genomic Grade Signatur nur an Gewebeproben erarbeitet worden war, die entweder Grad 1 oder Grad 3 aufwiesen.

Da diese Expressionsdaten mit anderen Chip-Plattformen und anhand anderer Fragestellungen erarbeitet worden waren, kamen in diesen nicht alle Gene der von Sotiriou et al ermittelten 97 Gene der Genomic Grade-Signatur vor.

Allerdings gab es in jeder der untersuchten Genexpressionsdatengruppen Schnittmengen mit den Genen der Genomic Grade Signatur.

Diese jeweils gemeinsamen Gene wurden nun verwendet, um die jeweiligen Tumorproben entsprechend dieser Schnittmengen-Gene zu ordnen, und zu sehen, ob diese Ordnung die Proben hinsichtlich des histologischen Grades aufteilen konnte.

Bei den aus der Literatur stammenden Genexpressionsdaten handelte es sich um Daten der Studien von Van't Veer et al, also der Studie der prognostischen Amsterdam-Signatur (*Van't Veer et al 2002*) der Studie der prognostischen Rotterdam-Signatur (*Wang et al 2005*), sowie der Studien Paik et al 2004 (*Paik et al 2004*) und Sotiriou et al 2003 (*Sotiriou et al 2003*).

Selbst mit diesen Auszügen aus der Genomic Grade Signatur ließen sich die Proben der Validation Sets aus der Literatur hinsichtlich des histologischen Grades unterteilen; es ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie am experimentellen Validation Set.

Als nächstes untersuchten Sotiriou et al, ob die Genomic Grade-Signatur auch mit dem Krankheitsverlauf der Patientinnen der Validation Sets korrelierte.

Die prognostische Auswertung war dahingehend beeinträchtigt, dass ca. die Hälfte der Patientinnen der Validation Sets eine adjuvante medikamentöse Therapie erhalten hatten und somit der Krankheitsverlauf nicht unbeeinträchtigt von adjuvanter Therapie nachvollzogen werden konnte.

Der mittlere Nachbeobachtungszeitraum bei den Patientinnen des Validation Sets betrug ca. 6 Jahre. Es wurde dabei in ca. 40 % der Fälle ein Krankheitsrückfall protokolliert.

Der mikroskopisch festgestellte histologische Grad, der ER-Status, der Lymphknotenstatus und die Tumorgröße errangen in der Gesamtanalyse prognostische Relevanz.

Die größte prognostische Relevanz hatte der Expressionsstatus der Genomic Grade – Signatur. Nach der Genomic Grade – Signatur wurde die Gruppen Genomic Grade 1 und Genomic Grade 3 unterschieden. Anhand dieser Zwei-Gruppen-Einteilung konnten insbesondere die Tumore mit mikroskopisch bestimmtem histologischem Grad 2 zu den prognostisch distinkten Gruppen Genomic Grade 1 bzw. Genomic Grade 3 zugeteilt werden. Die Studie hatte damit ihr Ziel erreicht, für die prognostisch nicht informativen Grad 2-Tumore eine prognostisch relevante Zuordnung zu ermitteln.

Die Genomic Grade Signatur war zudem mit dem ER-Status vergesellschaftet. ER-negative Tumore waren mit dem prognostisch ungünstigeren Genomic Grade 3 assoziiert. Unter den ER-positiven Tumoren war hingegen die Zugehörigkeit zu Genomic Grade 1 bzw. Genomic Grade 3 nicht signifikant unterschiedlich verteilt.

In der multivarianten Analyse zeigte sich, dass in Zusammenschau mit dem Genomic Grade-Status der ER-Status keine zusätzlich prognostisch relevante Information erbrachte. Der ER-Status hatte somit zwar Einfluss auf das Genexpressionsmuster der Genomic Grade-Signatur, was auf zellbiologische Zusammenhänge schließen lässt. Die prognostische Relevanz des ER-Status wurde hingegen durch den Genomic Grade Status bestimmt.

#### **1.4.4 Prädiktive Gensignaturen**

Prädiktive Gensignaturen stellen eine Auswahl von Genen dar, mithilfe von deren Expressionsmuster sich das Ansprechen von Patienten auf eine bestimmte Therapie vorhersagen lässt.

Studien, die prognostische Expressionsmuster zu finden versuchen, benötigen einen langen Nachbeobachtungszeitraum ihrer Patienten, um definitive Aussagen über das Outcome der Patienten zu erhalten. Studien, die Expressionsmuster finden wollen, die mit der Wirkung einer bestimmten Therapie korrelieren, bedienen sich gerne des neoadjuvanten Settings. Das bedeutet, sie lesen die Wirkung einer vor Operation verabreichten Therapie an der unmittelbaren Wirkung derselben auf den Primärtumor ab. Dies hat den Vorteil einer relativ kurzen Studiendauer, nämlich der Dauer der zu untersuchenden Therapie. Weiterhin lässt sich eine unmittelbare Wirkung der Therapie beobachten, während bei der Erfassung des Outcomes von Patienten nach einer Therapie nicht klar prognostische und prädiktive Faktoren voneinander abgegrenzt werden können (*Sachelairie et al 2006*). Allerdings ist die Frage, ob sich im neoadjuvanten Setting gewonnen Informationen auch auf adjuvante Therapien anwenden lassen.

##### **1.4.4.1 Die prädiktive Hess-Signatur**

Hess et al versuchten in einer 2006 veröffentlichten Studie eine prädiktive Gensignatur für eine neoadjuvant verabreichte Chemotherapie zu ermitteln. Das verabreichte Therapieregime bestand aus dem Taxan Paclitaxel, sowie der Dreierkombination aus Fluoruracil, dem Anthrazyklin Doxorubicin und Cyclophosphamid (*Hess et al 2006*).

Hierzu wurden vor Beginn der neoadjuvanten Therapie 133 Tumorgewebeproben mittels Feinnadelaspiration aus dem Primärtumor oder aus Lymphknotenmetastasen gewonnen. Der Tumorgewebeanteil der gewonnen Proben betrug im Mittel 80 %. Zur Konservierung der darin enthaltenen RNA wurden diese in RNAlater-Lösung verbracht und später bei -80° C tiefgefroren. Nach RNA-Extraktion wurden die aus den Proben gewonnene RNA mittels eines Affymetrix Chips U133A mit 22 283 Targetstrukturen auf dem cDNA-Chip auf ihr Genexpressionsmuster analysiert.

Die Proben wurden aufgeteilt in ein Training Set mit 82 Tumorproben. Das dabei ermittelte Genexpressionsmuster wurde dann an 51 Gewebeproben validiert.

Das Training und Validation Set wiesen hinsichtlich der Tumoreigenschaften und Patientinneneigenschaften keine wesentlichen Unterschiede auf.

Das mittlere Alter bei Diagnose lag bei 51 Jahren, bei einem Spektrum von 28-79 Jahren.

Es handelte sich um Patientinnen mit erhöhtem bis hohem Risiko. 52 % der Patientinnen wiesen einen ER-positiven Tumor auf, 25 % der Tumore waren Her2-positiv, 70 % der Patientinnen waren nodalpositiv, 37 % der Patientinnen hatten einen Tumor im Stadium T3 oder T4. Die Tumoren von

zwei Patientinnen wiesen einen histologischen Grad von 1 auf, von 35 % der Patientinnen einen histologischen Grad 2 und 46 % wiesen einen histologischen Grad von 3 auf.

Nach Entnahme der Feinnadelaspirate erhielten alle Patientinnen für 24 Wochen das oben genannte Chemotherapieschema. Die Veränderung des Tumors unter Therapie wurde mit Ultraschall überwacht. Zu diesem Zweck wurden vor Beginn der Therapie unter radiologischer Kontrolle metallische Markierungen in den Primärtumor eingebracht.

Nach abgeschlossener neoadjuvanter Chemotherapie wurden alle Patientinnen in-sano operiert.

Um eine prädiktive Gensignatur für die erfolgte Chemotherapie zu erhalten, wurden die Genexpressionsdaten mit dem Endpunkt ‚pathological complete Response‘ (pCR) korreliert. Dies bedeutet, dass sich bei der operativen Entfernung des Tumorgewebes aus der Brust und der Axilla nach abgeschlossener neoadjuvanter Chemotherapie kein Tumorgewebe mehr im Exzidat durch den Pathologen feststellen ließ.

26 % der Patientinnen im Training Set wie auch der Patientinnen im Validation Set erreichten durch die neoadjuvante Chemotherapie eine vom Pathologen festgestellte komplette Remission des Tumorgewebes.

Es ergab sich eine Gensignatur bestehend aus 30 Genen, die mit pCR korrelierten.

Diese prädiktive Gensignatur wurde mit den Expressionsdaten der 51 Gewebeproben des Validation Sets validiert.

An diesen Proben erreichte der 30 Gen-Prädiktor eine Sensitivität für pCR von 92 % und eine Spezifität von 71 %. Der positive prädiktive Wert lag bei 52 %.

Da die pCR-Rate im Gesamtkollektiv bei 26 % lag, so hatte eine Patientin im Rückblick eine Wahrscheinlichkeit von ca. 25 % eine pCR unter Chemotherapie zu erreichen. Würde diese vorher mit der 30 Gene-Signatur positiv getestet, so betrüge ihre Chance ca. 50 % eine pCR zu erreichen. Die Chance bei positivem prädiktivem Marker pCR zu erreichen wäre also doppelt so hoch wie ohne diesen Markerbefund.

#### **1.4.4.2 Die prädiktive Rody-Signatur**

Rody et al veröffentlichten 2005 auf dem internationalen Brustkrebskongress in San Antonio eine weitere 90 Gene umfassende Gensignatur, die sich als prädiktiv für eine neoadjuvant verabreichte Chemotherapie bestehend aus dem Taxan Docetaxel, dem Anthrazyklin Doxorubicin und Cyclophosphamid (TAC) erwiesen hatte (*Rody et al 2005*).

Dafür wurde die RNA von 70 vor Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie per Stanzbiopsie entnommenen Tumorgewebeproben mittels eines Affymetrix HG-U133A Chips mit 22 500 Target-Genen auf ihr Genexpressionsmuster hin analysiert. Die 70 Gewebeproben wiesen alle einen Tumorzellgehalt von mindestens 80 % auf.

Die gesamten Expressionsdaten waren stark durch den Hormonrezeptorstatus geprägt. Die Konkordanz der Genexpressionsdaten mit den entsprechenden immunhistochemisch erhobenen Parametern betrug über 90 %.

Die Proben wurden in ein Training Set aus 50 Gewebeproben und in ein Validation Set von 20 Gewebeproben aufgeteilt.

Die Genexpressionsdaten des Training Sets wurden mit der pathologischen kompletten Remission korreliert, die acht Patientinnen des Training Sets (16%) nach abgeschlossener Chemotherapie erreichten.

So wurde eine aus 90 Genen bestehende Gensignatur ermittelt, die in ihren Genexpressionsmustern auch mit den Therapieergebnissen ‚stable disease‘, d.h. keine Massenveränderung des Tumors unter Therapie, als auch mit ‚progressive disease‘, d.h. fortschreitendes Tumorwachstum unter Chemotherapie, korrelierte. Diese ermittelten 90 Gene waren funktionell zur Zellzykluskontrolle sowie zur Signaltransduktion (Cell Signaling) zuzuordnen. Der Hormonrezeptorstatus hatte keinen Einfluss auf die Ausprägung dieser Gensignatur. Bei den Proben der Patientinnen mit pathologisch kompletter Remission zeigte sich in der Genexpressionsanalyse neben der 90-Gene-Signatur auch eine Überexpression des Her2-neu-Gens.

Die prädiktive 90-Gene-Signatur konnte auch am Validation Set die entsprechenden Therapieergebnisse vorhersagen. Es ließen sich demnach Patientinnen identifizieren, die am besten von dem angewandten Therapieregime profitierten, als auch die, die gar nicht von ihm profitierten. Sie könnte also bei Patientinnen mit entsprechendem Risiko, für die mehrere Chemotherapieregimes zur Auswahl stehen, verwendet werden, um ein TAC-Regime auszuwählen oder gegebenenfalls auszuschließen.

## **1.5 Zusammenfassung**

Prognostische und prädiktive Marker bestimmen die Therapiestrategie der adjuvanten bzw. neoadjuvanten Therapie bei Brustkrebs. Insbesondere die Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie und die Zusammensetzung des optimalen Chemotherapieregimes sind noch ungeklärte Fragen in der Brustkrebstherapie.

Trotz in verschiedenen Studien ermittelter prädiktiver und prognostischer Gensignaturen spricht die St Galler Konsensus-Konferenz von 2007 noch keine Empfehlung für die Anwendung von Markersignaturen aus, sondern empfiehlt die Risikoeinteilung und Therapieauswahl anhand von ‚klassischen‘ histopathologischen Markern (*Goldhirsch et al 2007*).

In dieser Studie war die Frage, ob die an unterschiedlichen Patientinnenkollektiven und mit Hilfe teilweise unterschiedlicher Genexpressionsplattformen ermittelten Gensignaturen sich an einem

anderen Patientinnenkollektiv und mit Hilfe einer einzigen Genexpressionsplattform reproduzieren ließen, ob sich deren prognostische bzw. prädiktive Aussagekraft auch an diesem neuen Patientinnenkollektiv bewahrheiten würde und ob diese über die mit ‚klassischen‘ Markern erzielte Aussagekraft hinausgehen würde.

Weiterhin sollte festgestellt werden, wie die grundlegenden tumorzellbiologischen Phänomene bei Brustkrebs, nämlich die Tumorzellproliferation und der Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone auf die Tumorzellen, diese Gensignaturen beeinflussen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Herkunft der Tumorgewebeproben**

Es wurden Gewebeproben von 111 Patientinnen entnommen, die in der Zeit von November 1997 bis einschließlich Juni 2003 in der Frauenklinik der Universitätsklinik Frankfurt am Main wegen Brustkrebs an der Brust operiert worden waren. Die entnommenen Gewebeproben wurden über flüssigem Stickstoff tiefgefroren in der Universitätsklinik Frankfurt gelagert.

Zum Zeitpunkt der Operation wiesen die Patientinnen keine Metastasen auf.

Alle Patientinnen bekamen eine adjuvante anthrazyklinhaltige Chemotherapie verabreicht.

Zum Zeitpunkt der Entnahme des Tumorgewebes war das Tumorgewebe unbeeinträchtigt durch medikamentöse Brustkrebstherapie, die Patientinnen bekamen diese erst nach Probenentnahme verabreicht.

Die Tabellen 2-2, 2-3 und 2-4 informieren über die Ausgestaltung der adjuvanten medikamentösen Therapie.

Alle Patientinnen waren über die Verwendung ihres Tumorgewebes zu Forschungszwecken informiert worden. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main gebilligt.

Der mediane Nachbeobachtungszeitraum nach Operation lag bei 21 Monaten (Spektrum: 5 bis 87 Monate).

### **2.2 Herkunft der Patientinnendaten**

Die ermittelten Patientinnendaten stammen aus folgenden Quellen:

Die bis Ende des Jahres 2002 behandelten Patientinnen entstammen aus der Klinikdatenbank namens ‚Feather‘ und die ab dem Jahr 2003 behandelten Patientinnen stammen aus der Klinikdatenbank ‚Orbis‘ des Universitätsklinikums Frankfurt am Main.

Sofern die Patientinnen nicht oder nur zum Teil in der Brustklinik der Frauenklinik der Universitätsklinik Frankfurt am Main nachbetreut wurden, wurden per Serienbrief die behandelnden Hausärzte und/oder Gynäkologen angeschrieben, um über den Verlauf der Brustkrebserkrankung der betreffenden Patientinnen Auskunft zu erhalten. Dabei wurde nach der letzten Vorstellung der Patientin beim behandelnden Arzt, nach der Compliance der Patientinnen hinsichtlich der adjuvanten



Therapie und nach eventueller Progression der Brustkrebserkrankung, speziell nach dem Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen gefragt.

Im Handarchiv der Brustklinik befinden sich die Akten der Brustkrebspatientinnen, die innerhalb von zwei vergangenen Jahren in der Frauenklinik vorstellig geworden sind. Hier wurden die aktuellsten Informationen aus der Nachsorge der Brustkrebspatientinnen recherchiert.

Im Kellerarchiv der Brustklinik befinden sich die Patientinnenakten von Brustkrebspatientinnen deren Vorstellung in der Frauenklinik länger als zwei Jahre zurückliegt.

Falls weder die Recherche im Haus noch die Auskunft der behandelnden niedergelassenen Ärzte aktuelle Informationen bezüglich des Verlaufs der Brustkrebserkrankungen erbrachten, wurden die Patientinnen nach Möglichkeit per Telefon direkt kontaktiert und zu ihrem Krankheitsverlauf nach der Operation des Primärtumors befragt.

## 2.3 Charakteristika des ausgewählten Patientinnenkollektivs

**Tabelle 2.1 Charakteristika des Gesamtkollektivs**

<b>Gesamtkollektiv</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozentualer Anteil</b>		<b>Anzahl</b>	<b>Prozentualer Anteil</b>
<b>Gesamtzahl Kollektiv</b>	111				
<b>Alter bei OP</b>			<b>Grading</b>		
Range	27-74 Jahre		G1	3	2,7%
Median	50 Jahre		G2	47	42,3%
< 49 Jahre	51	45,9%	G3	61	55%
> 49 Jahre	60	54,1%	<b>HR-Status</b>		
<b>Nodalstatus</b>			ER-pos	72	64,9%
Nodalpositiv	65	58,6%	ER-neg	38	34,2%
N1	59	90,8% der N+	PR-pos	52	46,8%
N2	4	6,2% der N+	PR-neg	55	49,5%
N3	2	3,1% der N+	HR-pos	75	67,6%
Nodalnegativ	46	41,4%	HR-neg	35	31,5%
<b>Tumorgröße</b>			<b>Her2neu-Status</b>		
T1	50	45%	Angabe	91	82%
T2	48	43,2%	Her2 neu positiv	30	33%
T3	10	9%	Her2 neu negativ	61	67%
T4	3	2,7%	Keine Angabe	20	18%
<b>Carcinoma in situ-Status</b>			<b>Lymphangiosis Carcinomatosa-Status</b>		
Angabe	50	45%	Angabe	50	45%
Ja	30	60% derer mit Angabe	Ja	10	20% derer mit Angabe
Nein	20	40% derer mit Angabe	Nein	40	80% derer mit Angabe
Keine Angabe	61	55%	Keine Angabe	61	55%

**Tabelle 2.2: Hormonrezeptorstatus und antihormonelle Therapie**

	Hormonrezeptor-positive Patientinnen	Hormonrezeptor-positive Patientinnen mit geplanter antihormoneller Therapie	Patientinnen mit geplanter antihormoneller Therapie und negativem Hormonrezeptorstatus
<b>Anzahl</b>	75	72	1
<b>Anteil am Gesamtkollektiv</b>	67,6%	64,8%	0,9%

**Tabelle 2.3: Verabreichte Medikation im Rahmen der antihormonellen Therapie**

	Antihormonelle Therapie wurde empfohlen	Tamoxifen	LHRH-Analoga	Aromataseinhibitoren
<b>Anzahl</b>	73	60	7	6
<b>Anteil derer mit empfohlener anti-hormoneller Therapie</b>	100%	82,2%	9,6%	8,2%
<b>Anteil am Gesamtkollektiv</b>	66%	54%	6,3%	5,4%

(LHRH = luteinisierendes Hormon Releasing Hormon)

**Tabelle 2.4: Adjuvant verabreichte Polychemotherapieregimes**

Chemotherapieregime	Anzahl der Patientinnen	Prozent
<b>EC</b>	14	12,6%
<b>AC</b>	43	38,7%
<b>FEC</b>	28	25,2%
<b>ACT</b>	11	9,9%
<b>EC + CMF</b>	13	11,7%
<b>ECT</b>	2	1,8%

(E = Epirubicin, A = Doxorubicin, C = Cyclophosphamid, F = Fluoruracil, T = Taxan,, M = Methotrexat)

## 2.4 Durchführung einer Genexpressionsanalyse mit Tumorproben des beschriebenen Patientinnenkollektivs

Die bei Operation entnommenen Gewebeproben des Primärtumors des oben beschriebenen Patientinnenkollektivs wurden einer Genexpressionsanalyse unterzogen.

Die Gewebeproben wurden nach deren Gewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konserviert. Aus diesen Proben wurde zum Zwecke der Genexpressionsanalyse RNA extrahiert und diese zur Analyse auf einen Affymetrix-Chip, Typ Affymetrix HgU133A, aufgebracht.

Es wurden letztlich nur solche Gewebeproben verwendet, die einen Tumorzellgehalt von mindestens 80 % aufwiesen.

Von 48 Gewebeproben konnte ausreichend RNA für die Genexpressionsanalyse gewonnen werden.

Die RNA aus den Tumorgewebeproben wurde mit Hilfe der RNeasy Reagenzien von Qiagen extrahiert.

Die Qualitätskontrollanalyse der so extrahierten RNA wurde mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 durch Kapillar-Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Die photometrische Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des Geräts NanoDrop ND-1000.

Die Genexpressionsanalyse selbst erfolgte mit Hilfe der Affymetrix Human Genome U133A GeneChip-Plattform mit 22 283 Targetstrukturen entsprechend dem Protokoll des Herstellers, wie beschrieben in (*Rody et al 2007a*) und (*Rody et al 2007b*).

Die Hybridisierungsintensität wurde automatisch ermittelt und mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software prozessiert.

Für jedes Gen errechnete sich der Expressionswert durch die mittlere Abweichung der Signalintensität (Perfect match-mismatch) zwischen den jeweiligen Probenpaaren durch allgemeine Skalierung bis zu einer Target-Intensität von 500.

Scans wurden ausgeschlossen, wenn der Skalierungsfaktor größer als 2 war oder wenn der 'chip surface scan' Kratzer, Verunreinigungen oder Gradienten aufwies, die die Datenqualität beeinträchtigten. (Refiner, GeneData AG, Basel, Schweiz).

Als nächstes wurden die Daten mit Hilfe des 'Cluster Treeview Software Package SPSS 15.0' (SPSS Inc. Chicago, USA) und dem 'R-Statistical Software Package' ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) analysiert.

Die Gen-Chip Expressionswerte wurden durch LOG<sub>2</sub>-Transformation und Zentrierung der Datenbereiche um die Medianwerte angepasst.

Vor der Cluster-Analyse wurde noch einmal für jedes Gen eine Medianausrichtung vorgenommen.

Für die Rezeptorstatusbestimmung der Biomarker Östrogenrezeptorstatus, Progesteronrezeptorstatus, Her2-Status und Ki67-Status als Proliferationsmarker mit dem cDNA-Microarray wurden die folgenden Affymetrix-Probensets verwendet:

- das Affymetrix-Probe Set 205225\_at, das das Östrogen Rezeptor Gen (ESR1-Gen) darstellt, für die Bestimmung des Östrogenrezeptors (ER),
- das Probe Set 208305\_at zur Bestimmung der Progesteronrezeptor-Expression,
- das Probe Set 216836\_s\_at zur Bestimmung der Her2-Rezeptor-Expression
- und das Probe Set 212020-212023\_s\_at zur Bestimmung der Ki67-Expression als Marker für die Zellproliferationsrate.

Die Affymetrix-Proben-Sets für die Gensignaturen von Wang et al (*Wang et al 2005*), Sotiriou et al (*Sotiriou et al 2006*), Hess et al (*Hess et al 2006*) und Rody et al (*Rody et al 2005*) wurden aus den entsprechenden Veröffentlichungen ermittelt.

Die Gensignaturen von Sorlie et al (*Sorlie et al 2001*) und van't Veer et al (*Van't Veer et al 2002*) konnten mit Affymetrix Proben Sets mit Hilfe der Verwendung der Unigene- Erläuterung und der ‚Genomic Sequence‘ Information abgebildet werden.

Alle ermittelten P-Werte waren zweiseitig, und nur Werte mit einem P-Wert von unter 0,05 wurden als signifikante Werte angesehen.

Proben mit fehlenden Messwerten wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test wurde zur Beschreibung der Assoziation zwischen der Ki67-Genexpression und dem ER-Status und der Kruskal Willis–H-Test zur Beschreibung der Assoziation der Ki67-Expression mit dem histologischen Grad angewandt.

Für kategorische Variablen wurde der ‚Chi Square-Test‘ oder der ‚Fisher’s Exact Test‘ verwendet.

Die krankheitsfreien Intervalle wurden ab dem Zeitpunkt der Operation bis zum krankheitsbedingten Tod oder zum ersten radiologisch oder klinisch gesicherten Auftreten eines Lokalrezidivs oder einer Fernmetastase berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme ‚SPSS 15.0‘ (SPSS Inc., Chicago, IL) und dem ‚R Statistical Software Package‘ ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

### 3 Resultate

#### 3.1 Ereignisrate in Abhängigkeit von ‚klassischen Markern‘

Im Folgenden wird das Gesamtkollektiv mit dem Kollektiv derer verglichen, bei denen ein Ereignis festgestellt wurde. Die Angaben beziehen sich auf das Gesamtkollektiv von 111 Patientinnen. Es handelt sich hierbei um eine retrospektive Analyse. Ein möglicher systematischer Fehler ist eine besser dokumentierte Nachbetreuung nach Operation von Patientinnen mit erhöhtem Risiko.

**Tabelle 3.1: Vergleich der Ereignisraten in Abhängigkeit verschiedener ermittelter Tumor- und Patientinnencharakteristika**

	Kollektiv gesamt		Kein Ereignis		Ereignis	
Gesamt	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
		111	100 %	91	82%	20
Nachbeobachtungszeitraum	Median	Range	Median	Range	Median	Range
	21 Monate	5 – 87 Monate	21 Monate	5 – 87 Monate	19,5 Monate	5 – 70 Monate
Alter bei OP	Median	Range	Median	Range	Median	Range
	50	27-74	51	34-74	47,5	27-69
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
< 49 Jahre	51	46 %	38	74,5%	13	25,5%
> 49 Jahre	60	54 %	53	88,3%	7	11%
Grading						
G1	3	2,7 %	3	100%	0	0%
G2	47	42,3 %	37	78,7%	10	21,3%
G3	61	55 %	50	82%	10	16,4%
Nodalstatus						
Nodalpositiv	65	58,6 %	47	72,3%	17	26,2%
Nodalnegativ	46 (41%)	41,4 %	43	93,5%	3	6,5%
N1	59	53,1 %	41	69,5%	16	27,1%
N2	4	3,6 %	3	75%	1	25%
N3	2	1,8 %	2	100%	0	0%
Tumorgröße						
T1	50	45 %	43	86%	3	6%
T2	48	43,2 %	38	79,2%	10	20,8%
T3	10	9 %	5	50%	5	50%
T4	3	2,7 %	1	33,3%	2	66,7%
HR-Status						
ER-pos	72	64,9 %	58	80,6%	14	19,4%
ER-neg	38	34,2 %	33	86,8%	6	15,8%
PR-pos	52	46,8 %	47	90,4%	7	13,5%
PR-neg	55	49,5 %	43	78,2%	12	21,8%

	Kollektiv gesamt		Kein Ereignis		Ereignis	
HR-pos	75	67,6 %	66	88%	14	18,7%
HR-neg	35	31,5 %	26	74,3%	6	17,1%
<b>Her2neu-Status</b>						
Angabe	91	82 %	78	85,7%	11	<b>12,1%</b>
Her2 neu positiv	30 (33%)	27 %	24	80% *	4	13,3%*
Her2 neu negativ	61 (67%)	55 %	54	88,5%*	7	11,5%*

\* Anteil der Patientinnen, bei denen der Her2-neu-Status erhoben wurde.

Bei insgesamt 20 Patientinnen (18% des Kollektivs) trat ein Ereignis auf. Das bedeutete, entweder es trat ein radiologisch gesichertes Lokalrezidiv oder eine radiologisch gesicherte Fernmetastase auf.

Der mediane Nachbeobachtungszeitraum bis zum Auftreten eines Ereignisses betrug 19,5 Monate.

Beim Vergleich des Kollektivs mit Ereignis mit dem Kollektiv ohne Ereignis waren die fortgeschrittene Tumorgroße (T-Stadium) ( $p = 0,04$ ), Alter unter 50 Jahren ( $p = 0,05$ ) und positiver Lymphknotenstatus ( $p = 0,016$ ) statistisch signifikant positiv mit dem Auftritt eines Ereignisses korreliert.

Beim histologischen Grad war auffällig, dass bei den Patientinnen, deren Tumor ein Grading von 1 aufwies, kein Ereignis registriert wurde. Ereignisse wurden lediglich bei den Patientinnen registriert, die ein Grading von 2 bzw. 3 aufwiesen. Wegen der relativ kleinen Patientinnenzahl, insbesondere der geringen Anzahl an Patientinnen mit G1-Grading erlangte diese Beziehung keine statistische Signifikanz.

Bei den anderen gemessenen Parametern, dem immunhistochemisch bestimmten Östrogenrezeptorstatus, Progesteronrezeptorstatus und Her2-neu-Status ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit dem Auftreten eines Ereignisses.

Bei den oben beschriebenen Beobachtungen wurde der unterschiedliche Nachbeobachtungszeitraum nicht mitberücksichtigt.

### 3.2 Resultate der Genexpressionsanalyse

In **Tabelle 3.2** sind die Eigenschaften des Gesamtkollektivs von 111 Patientinnen den Eigenschaften des Kollektivs der 48 Patientinnen gegenübergestellt, von deren Proben genug RNA für die Genexpressionsanalyse vorhanden war.

**Tabelle 3.2 Vergleich Gesamtkollektiv mit Kollektiv Genexpressionsanalyse**

Nachbeobachtungs- zeitraum	Kollektiv Genexpressionsanalyse		Gesamtkollektiv	
	Median	Range	Median	Range
	37 Monate	5 – 87 Monate	21 Monate	5-87 Monate
	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Patientinnen</b>	48		111	
<b>Ereignisstatus</b>				
Kein Ereignis	37	77,1 %	91	82 %
Ereignis	11	22,9 %	20	18 %
<b>Grading</b>				
G1	1	2,1 %	3	2,7 %
G2	18	37,5 %	47	42,3 %
G3	29	60,4 %	61	55 %
<b>Nodalstatus</b>				
Nodalpositiv	29	60,4 %	65	58,6%
Nodalnegativ	19	39,6 %	46	41,4%
<b>HR-Status</b>				
ER-pos	31	64,6 %	72	64,9 %
ER-neg	17	35,4 %	38	34,2 %
PR-pos	21	43,8 %	52	46,8 %
PR-neg	27	56,3 %	55	49,5 %
<b>Her2neu-Status</b>				
Angabe	40	83,3 %	91	82 %
Her2 neu positiv	14	29,2 % (35 %)	30 (33%)	27 %
Her2 neu negativ	27	54,2 % (65 %)	61 (67%)	55 %
Keine Angabe	8	16,7 %	20	18 %

Zwischen Gesamtkollektiv und den Patientinnen mit deren Proben eine erfolgreiche Genexpressionsanalyse durchgeführt wurde, bestehen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der oben aufgeführten Merkmale.

### **3.2.1 Vergleich klassischer Marker mit durch Genexpressionsanalyse ermittelten Markern**

Um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zu validieren, wurden die mittels des Affymetrix-Chips gemessenen ER-Status und PR-Status mit den immunhistochemisch ermittelten Status der entsprechenden Gewebeproben verglichen.

Die mit dem Affymetrix-Chip ermittelten relativen Expressionswerte (MAS5) für den Östrogenrezeptorstatus (ER), den Progesteronrezeptorstatus (PR) und den Her2-Status lassen sich in den entsprechenden Abbildungen an der Y-Achse ablesen. Die korrespondierenden immunhistochemisch ermittelten Werte sind als farbige Kreuze angegeben, ein rotes Kreuz für einen positiven Status, ein blaues Kreuz für einen negativen Status.

Wie die Abbildungen **Abbildung 3-1** und **Abbildung 3-2** zeigen, können mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse für den ER-Status sowie für den PR-Status ‚Cut-Off-Level‘ definiert werden, die die Zuordnung zum jeweils negativen oder positiven Status bestimmen. Diese Cut-Off-Levels liegen für den ER-Status bei 1000 und für den PR-Status bei 50.

Für den ER-Status ergab sich demnach beim Vergleich mit dem immunhistochemisch bestimmten ER-Status für die Genexpressionsdaten eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 94,1 %.

Beim Vergleich der immunhistochemisch bestimmten Daten zum PR-Status mit den Resultaten der Genexpressionsanalyse ergab sich eine Sensitivität von 81,0 % und eine Spezifität von 74,1 %.



Abbildung 3-1 Östrogen-Rezeptor

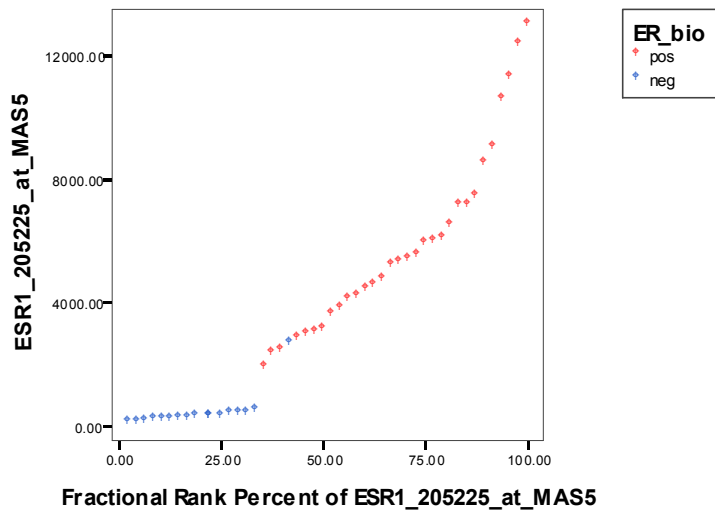
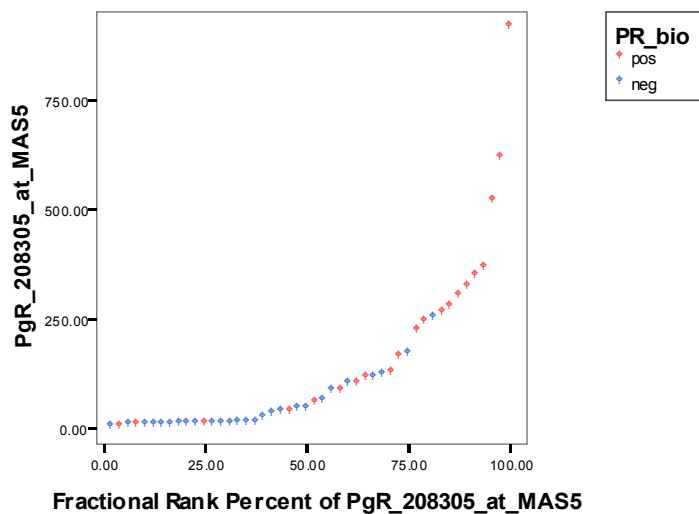


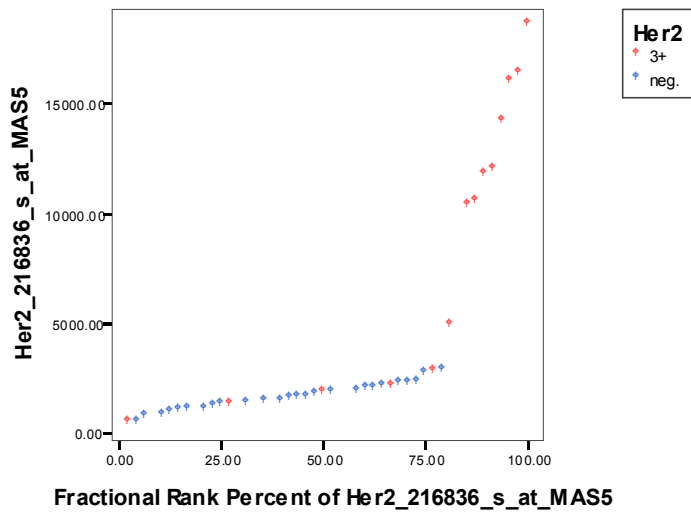
Abbildung 3-2 Progesteron-Rezeptor



In entsprechender Art und Weise wurden die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und der immunhistochemischen Bestimmungen für den Her-2neu-Status korreliert, siehe **Abbildung 3-3**

Hierbei ergab sich ein Cut-Off-Level der Genexpressionsdaten für die Einteilung in Her-2-neu-positiv bzw. -negativ von 4500. Dabei bestimmten die Genexpressionsdaten den immunhistochemischen Her2-Status mit einer Sensitivität von 64,3 % und einer Spezifität von 100%.

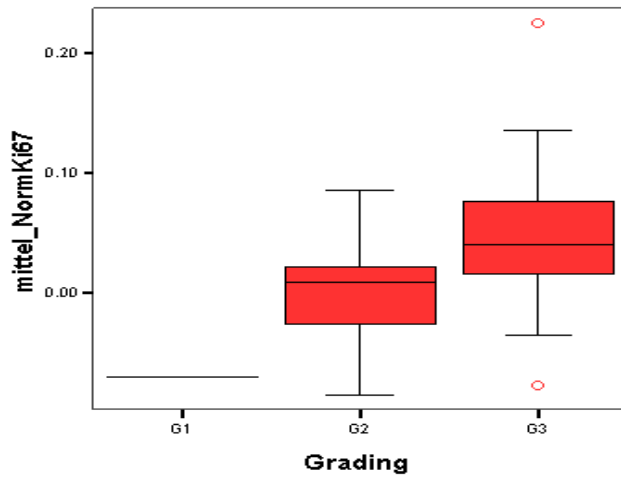
Abbildung 3-3 HER2-Rezeptor



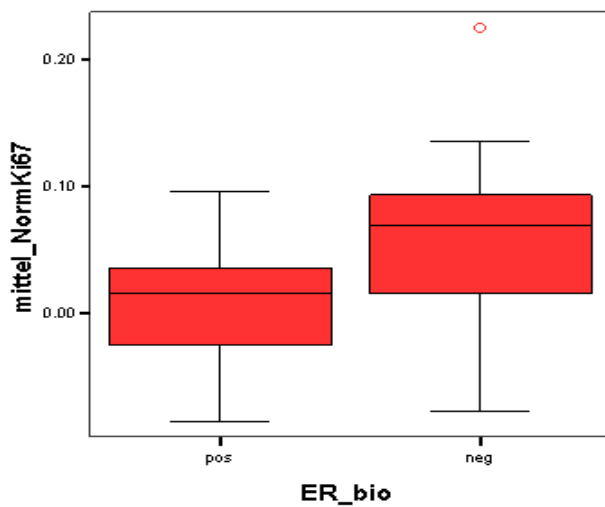
Weiterhin wurde der Proliferationsstatus der mittels Genexpressionsanalyse untersuchten Gewebeproben analysiert. Zur Beurteilung wurde eine Gensignatur verwendet, die den Ki67-Status widerspiegelt.

Die aufgrund dieser Analyse getroffene Einteilung wurde mit dem histopathologischen Grad und dem Östrogenrezeptorstatus (ER-Status) korreliert.

**Abbildung 3-4 Korrelation des Ki67-Expressionsstatus mit dem histologischen Grad und dem Östrogenrezeptorstatus**



**A**



**B**

**Korrelation des Ki67-Expressionsstatus mit dem histologischen Grad und dem Östrogenrezeptorstatus**

Der Proliferationsstatus des Tumors wurde mit Hilfe des Affymetrix-Expressionswerts des Ki67- Proliferationsmarkers ermittelt. Der Vergleich des Genexpressionslevels des Ki67-Gens mit dem histologischen Grad und dem ER-Status ist mit sogenannten Box Plots dargestellt.

Wie aus **Abbildung 3-4** ersichtlich korrelierte der mittels Genexpressionsanalyse bestimmte Ki67-Status eindeutig mit dem histopathologischen Grading ( $P=0.005$ , Kruskal-Wallis Test). Darüber hinaus ergab sich eine inverse Korrelation des Ki67-Status mit dem immunhistochemisch bestimmten ER-Status. Ein negativer ER-Status war demnach mit höherer proliferativer Aktivität des Tumorgewebes assoziiert ( $P=0.040$ , Mann-Whitney U-test).

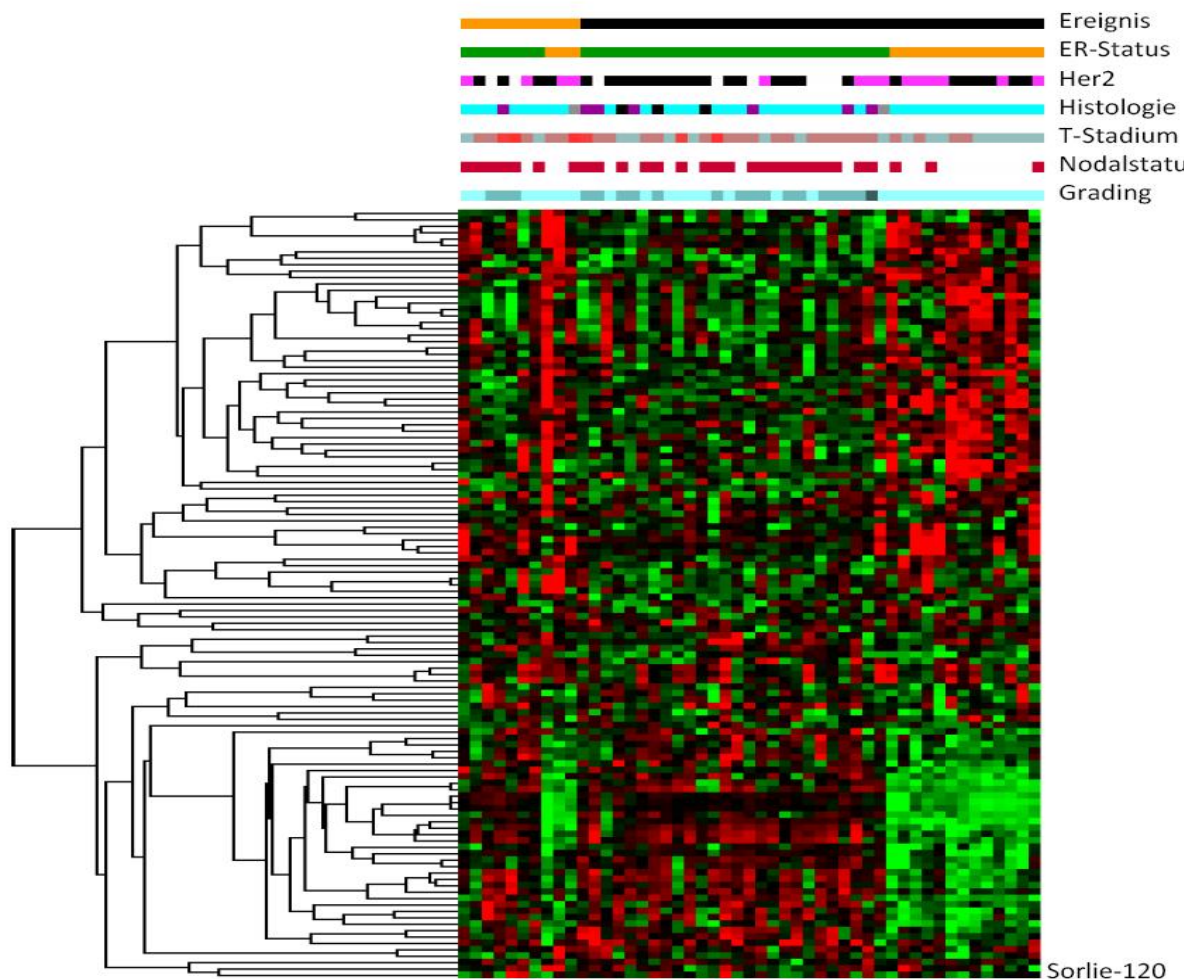
### 3.2.2 Korrelation verschiedener Markersignaturen mit dem klinischen Krankheitsverlauf

Die mittels des Affymetrix-Chips gewonnenen Daten wurden mehreren kontrollierten Analysen unterzogen (sog. supervised clustering), mit deren Hilfe verschiedene in der Literatur beschriebene Gensignaturen abgebildet wurden.

Zunächst wurde der Expressionsstatus der ‚intrinsischen Signatur‘ von Sorlie et al (*Sorlie et al 2001*) (siehe Kapitel 1.4.2) analysiert und auf Korrelation mit den beobachteten Ereignissen und den ‚klassischen‘ Markern ER-Status, Her2-Status, histologischer Grad, T-Stadium, Nodalstatus und histologischer Typ überprüft (siehe ).

**Abbildung 3-5 intrinsische Signatur und histopathologische Parameter sortiert nach Ereignis**

Signaturen für "intrinsische Subtypen" des Mammakarzinoms:



Analyse der Expression der Marker der ‚intrinsischen Subtyp Signatur‘ von Sorlie et al (*Sorlie et al 2001*). Die Tumorproben wurden gemäß ihrem Outcome (Ereignis Vs kein Ereignis) und nach dem Östrogenrezeptorstatus sortiert. Das Expressionsmuster der 120 Gene der intrinsischen Signatur, der ER-Status, der Her2-Status, sowie der histologische Typ, der histologische Grad, das T-Stadium und der Nodalstatus werden in farbigen Blöcken über der Genexpressionsmatrix dargestellt.

Wie von der Autoren beschrieben (*Sorlie et al 2001*) fand sich auch in dem Kollektiv dieser Studie eine starke Korrelation des Expressionsstatus der intrinsischen Gensignatur mit dem immunhistochemisch bestimmten Östrogenrezeptorstatus.

Eine, wenn auch weniger stark ausgeprägte, Korrelation findet sich auch zwischen dem Nodalstatus sowie dem histologischen Grading und dem Genexpressionsmuster der ‚intrinsischen‘ Gensignatur von Sorlie et al.

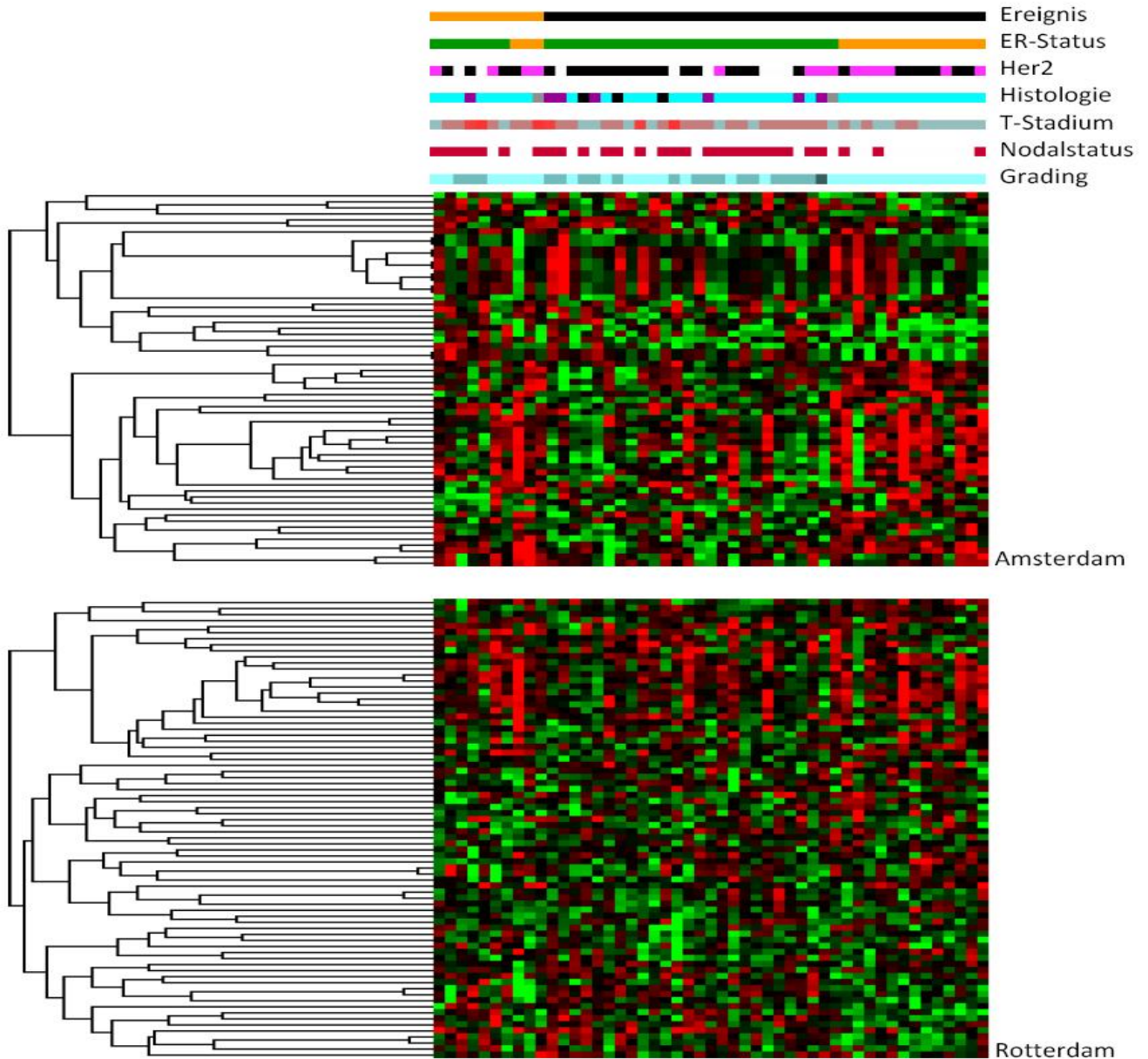
Es zeigte sich hingegen keine Korrelation des Expressionsstatus der intrinsischen Gensignatur mit dem Ereignisstatus der Patientinnen.

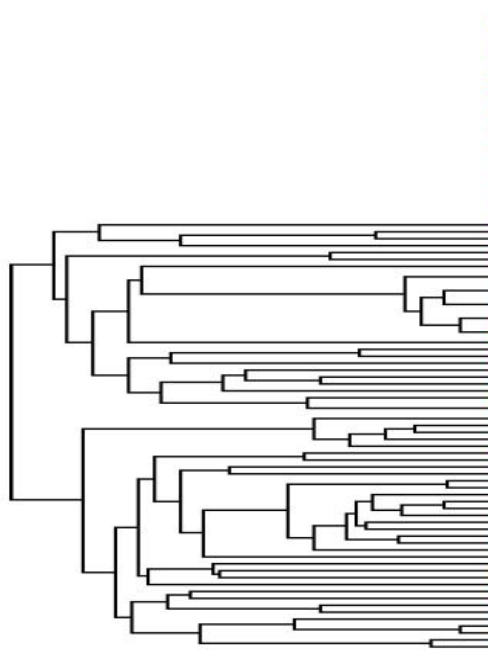
Als nächstes wurden die prognostischen Signaturen von van't Veer et al (Amsterdam-Signatur) und von Wang et al (Rotterdam-Signatur) (siehe Kapitel 1.4.3) auf ihren Expressionsstatus unter den Proben des Studienkollektivs untersucht.

Wie aus **Abbildung 3-6** ersichtlich ist, war deren Expressionsstatus nicht mit dem Ereignisstatus der Proben assoziiert. Eine Korrelation ergab sich aber mit dem ER-Status und dem Expressionsstatus beider prognostischer Signaturen. Diesen Zusammenhang hatten die Autoren auch schon in ihrer jeweiligen Studie beschrieben (siehe Kapitel 1.4.3).

**Abbildung 3-6 Prognostische Signaturen und histopathologische Parameter sortiert nach Ereignis**

"Prognostische" Signaturen:

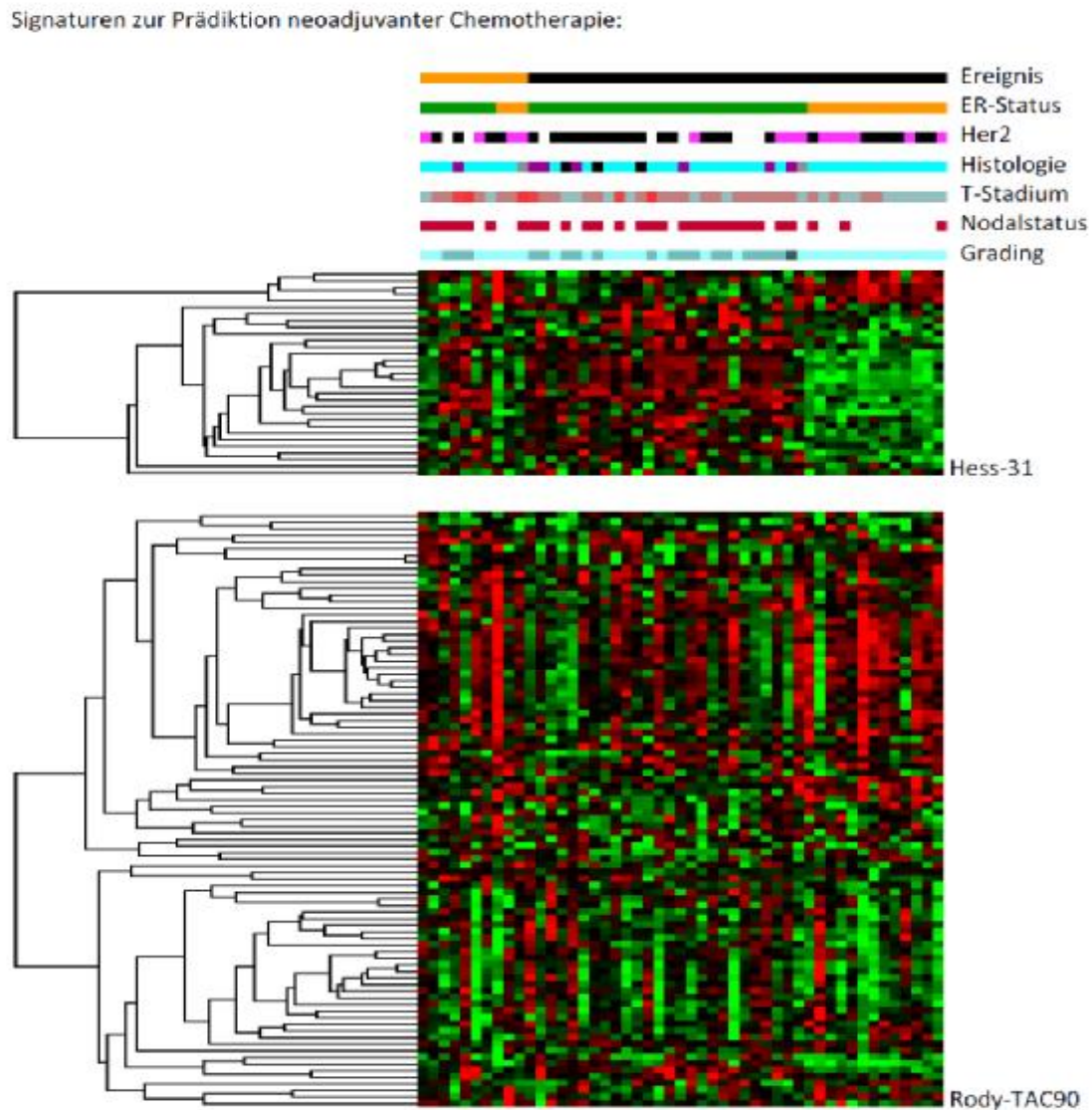


**Abbildung 3-6** stellt die Expression der Gene der prognostischen Amsterdam-Signatur (*Van't Veer et al 2002*) und der prognostischen Rotterdam-Signatur (*Wang et al 2005*) dar. Die Proben sind wie in  gemäß dem Ereignisstatus und dem ER-Status sortiert.

Eine ähnliche Korrelation ergab sich mit den prädiktiven Signaturen von Hess et al und Rody et al (siehe Kapitel 1.4.4). Diese Signaturen wurden im neoadjuvanten Setting mit dem Ziel erarbeitet, prädiktive Aussagen für die Wirkung einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie zu treffen. Da die Patientinnen dieser Studie alle anthrazyklinhaltige Chemotherapie erhalten hatten, wäre eine Korrelation mit dem Outcome der Patientinnen nach Chemotherapie denkbar.

Allerdings ergab sich keine Korrelation mit dem Ereignisstatus, wohl aber eine Korrelation mit dem ER-Status, wenn auch etwas weniger ausgeprägt als bei den oben genannten prognostischen Signaturen, siehe **Abbildung 3-7**.

**Abbildung 3-7 Prädiktive Signaturen für neoadjuvante Chemotherapie sortiert nach Ereignis**



### Kontrollierte Analyse von Gensignaturen in der Patientenkohorte

Expressionsmuster der Gene der prädiktiven Signaturen von Hess et al (*Hess et al 2006*) und Rody et al (*Rody et al 2005*).

Ein aktuelles Konzept zum Verständnis der Tumorbiologie und deren Bedeutung für Prognose und Therapie sieht die proliferative Aktivität eines Tumors als maßgeblich an. Entsprechend beschäftigen sich viele aktuelle Studien mit der Bestimmung der proliferativen Aktivität und deren klinischer Relevanz (siehe Kapitel 1.3.5). In diesem Sinne sind Proliferationsmarker wichtige Bausteine mehrerer prognostischer und prädiktiver Gensignaturen (*Sotiriou et al 2006*).

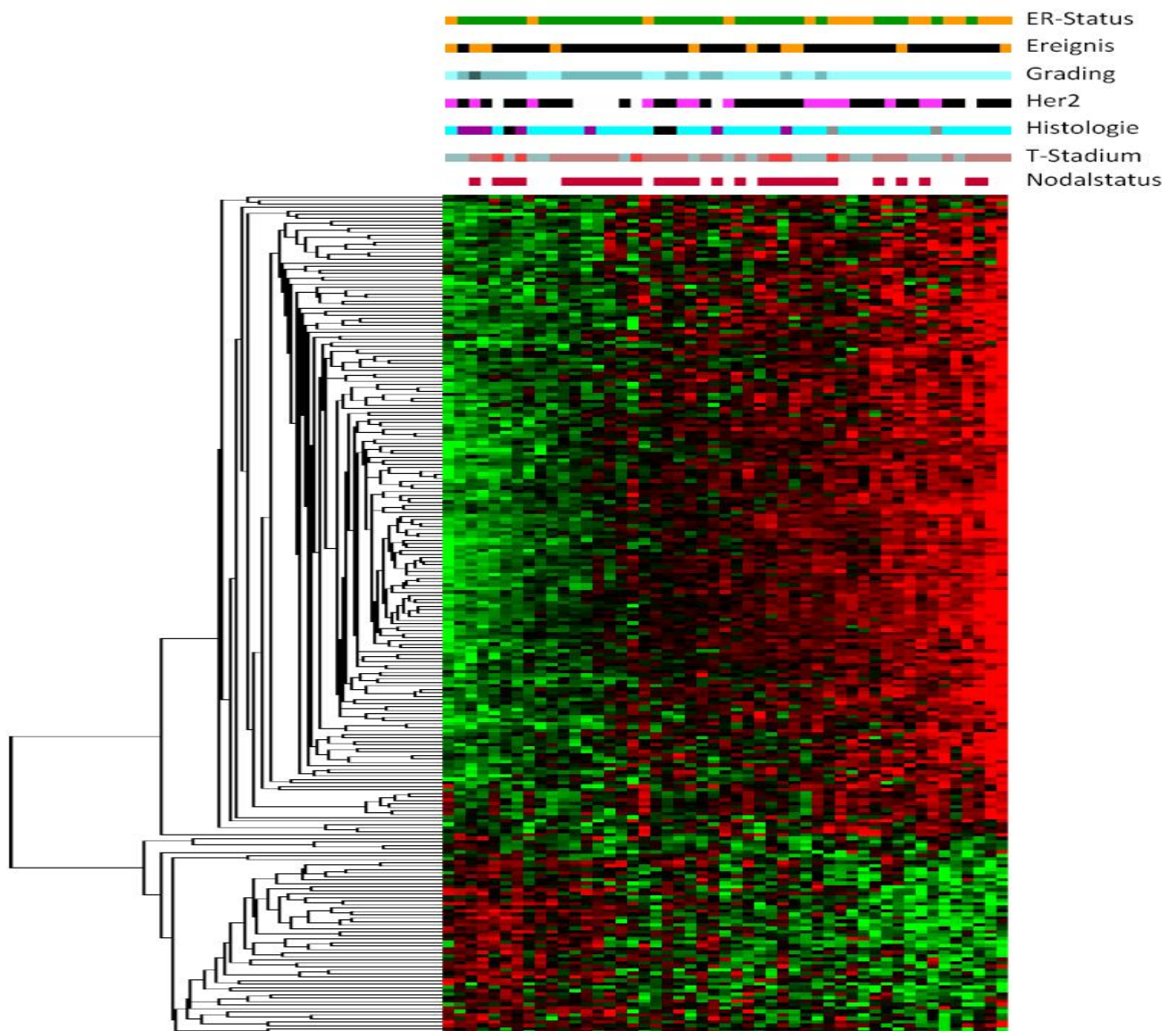
Neben immunhistochemischen Markern oder Gensignaturen ist der histopathologische Grad ein Gradmesser für die proliferative Aktivität eines Tumors. Wie oben beschrieben korreliert der



histologische Grad auch in dieser Studie mit dem per Genexpressionsanalyse bestimmten Ki67-Proliferationsmarker. Daher wurde anhand der Affymetrix-Daten der Expressionsstatus der ‚Genomic Grade‘-Signatur von Sotiriou et al (siehe Kapitel 1.4.3) der Gewebeprobe des Kollektivs dieser Studie ermittelt. **Abbildung 3-8** stellt die Proben entsprechend ihres Expressionsstatus der ‚Genomic Grade‘-Signatur sortiert dar.

### Abbildung 3-8 Genomic Grade Signatur von Sotiriou

„Genomic Grade“-Signatur nach Sotiriou et al. 2006:



### Analyse der Brustkrebsproben entsprechend des ‚Genomic Grade Index (GGI)‘

Die „Genomic Grade“ Gen-Signatur bestehend aus 242 Genen wurde an den vorliegenden 48 Gewebeprobe auf ihr Expressionsmuster hin untersucht. Entsprechend ihrem Expressionsstatus wurden die Proben neu sortiert (von links nach rechts). Die Balken über der Expressionsmatrix zeigen die Verteilung der ‚klassischen‘ klinischen und histopathologischen Marker nach der **neuen** Sortierung.

Auch bei dieser Signatur ergibt sich kein Zusammenhang zwischen dem Expressionsstatus und dem Ereignisstatus im Patientinnenkollektiv.

Allerdings ließ sich eine Korrelation mit dem histopathologischen Grad und dem per Immunhistochemie bestimmten ER-Status erkennen. Mit hoher proliferativer Aktivität entsprechend der ‚Genomic Grade‘- Signatur korrelierten ER-negative Proben.

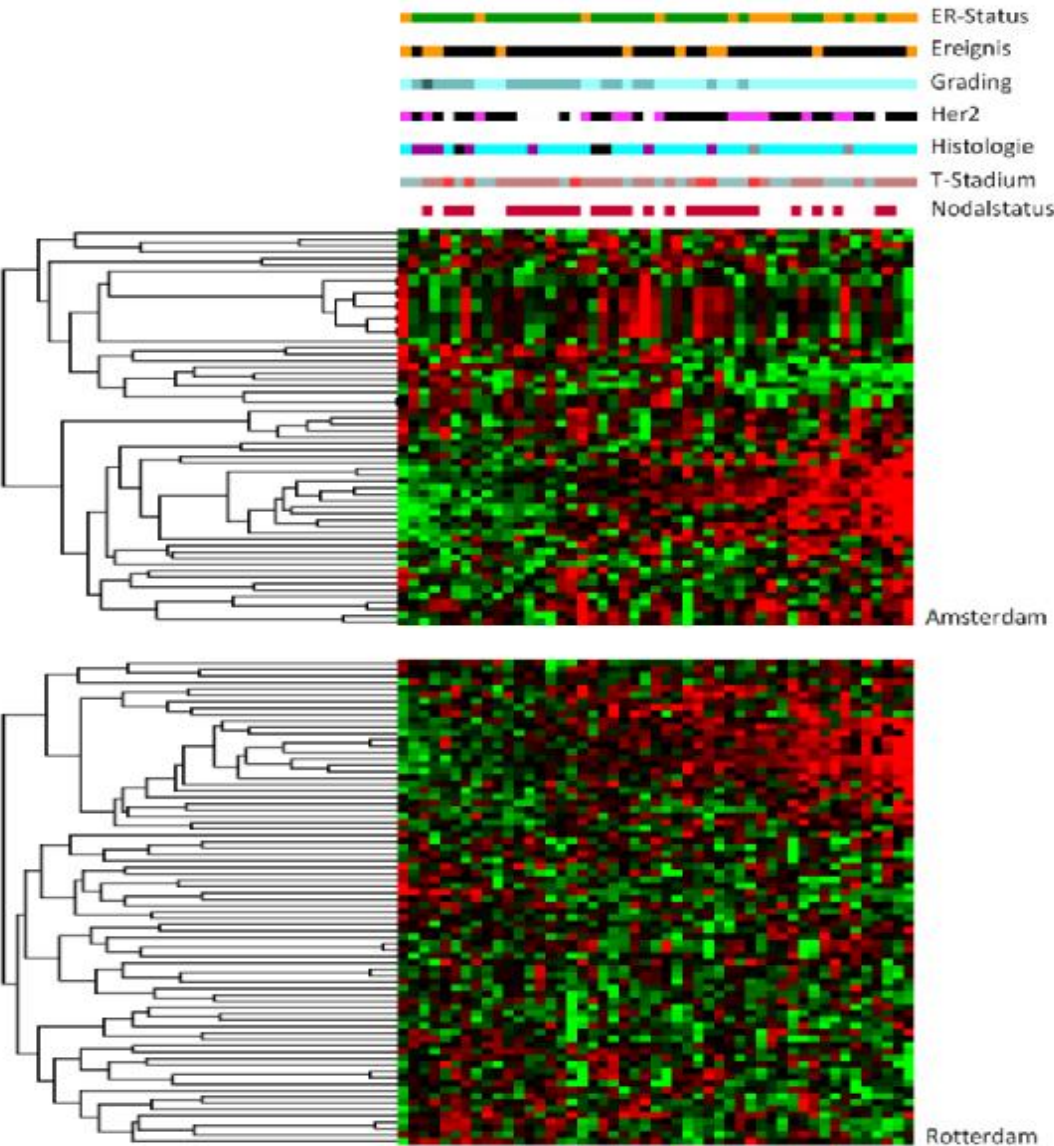
### **3.2.3 Korrelation verschiedener Gensignaturen mit der ‚Genomic Grade‘ – Signatur**

Die Sortierung der Proben entsprechend dem Expressionsmuster der ‚Genomic Grade‘-Signatur wurde nun beibehalten und es wurde analysiert inwieweit die Expressionsmuster der zuvor untersuchten prognostischen und prädiktiven Gensignaturen mit dieser korrelierten.

**Abbildung 3-9** zeigt die entsprechend sortierten Proben und das jeweilige Expressionsmuster der prognostischen und prädiktiven Signaturen.

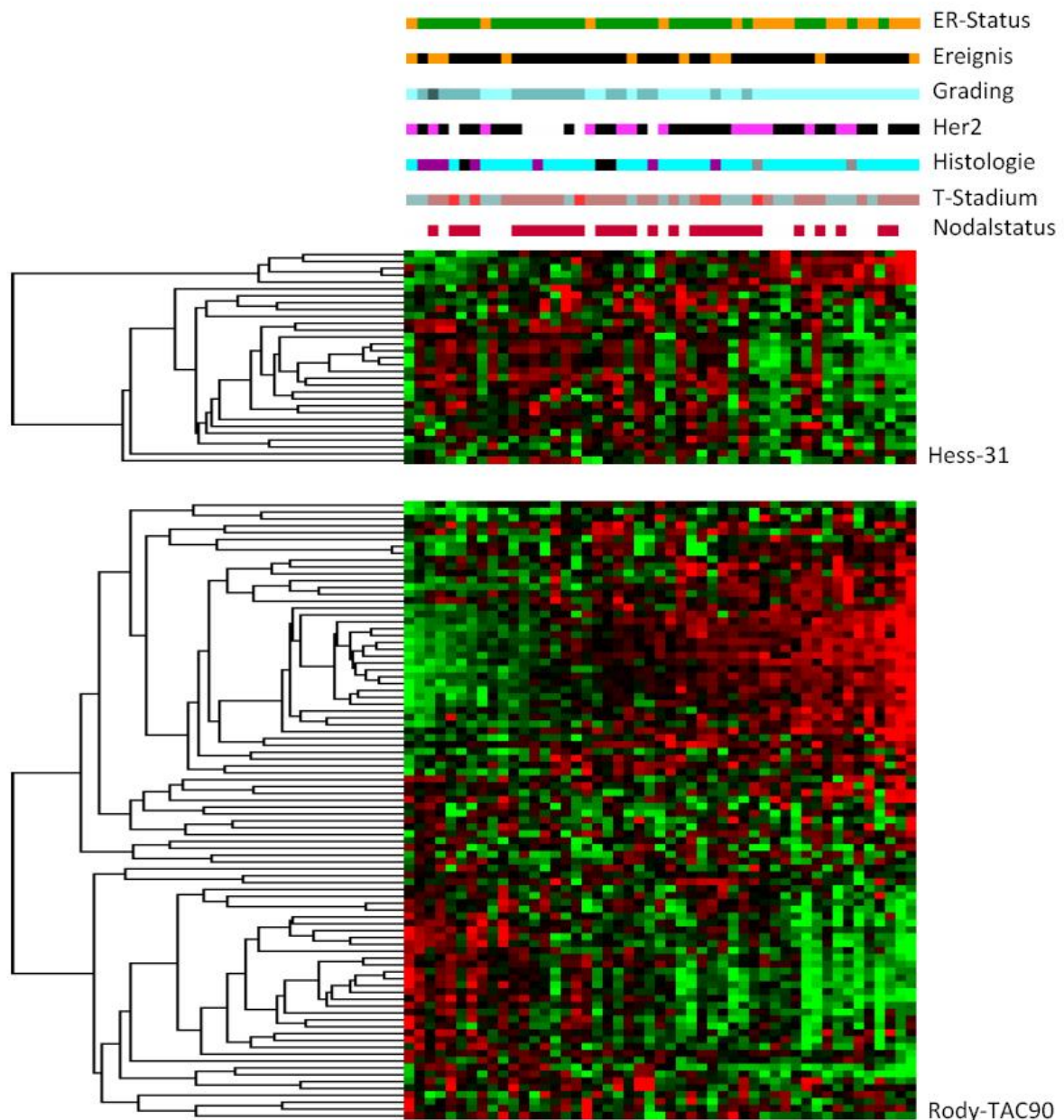
Abbildung 3-9 Prognostische Signaturen und histopathologische Parameter sortiert nach 'Genomic Grade'-Signatur

"Prognosis"-Signaturen bei Sortierung nach "Genomic Grade":



### Abbildung 3-10 Prädiktive Signaturen sortiert nach ‚Genomic Grade‘- Signatur

Signaturen zur Prädiktion des Ansprechens auf neoadjuvante Chemotherapie bei Sortierung nach "Genomic Grade":



#### Bedeutung der Proliferationsrate für ausgewählte prognostische und prädiktive Signaturen

Die Tumorproben wurden von links nach rechts entsprechend dem Expressionsstatus der Gene der „Genomic Grade“ Gensignatur sortiert. Entsprechend dieser Sortierung ergibt sich die Anordnung der Gewebeproben mit den Expressionsmustern der prognostischen und prädiktiven Gensignaturen aus **Abbildung 3-6** und **Abbildung 3-7**. Entsprechend zeigt sich die Abhängigkeit der jeweiligen Gensignatur von der Proliferationsrate, die sich ergebende Sortierung der klinischen und histopathologischen Parameter ist über den Expressionsmatrix angezeigt.

Neben den schon aus **Abbildung 3-8** ersichtlichen Zusammenhängen zwischen der „Genomic Grade“ Signatur und dem Östrogenrezeptorstatus, dem histologischen Grad und dem histologischen Typ ergeben sich offensichtliche Zusammenhänge der Proliferationsrate mit beiden prognostischen **Abbildung 3-9** und beiden prädiktiven Signaturen **Abbildung 3-10**. Diese sind erkennbar durch

gleiche Überexpression (rot) bzw. gleiche Minderexpression (grün) mehrerer Gene bei mehreren Proben.

Vor allem die Gensignatur von Rody et al erlaubt die Einteilung der zuvor nach der Genomic Grade Signatur sortierten Proben in drei ähnlich große Gruppen mit homogen strukturiertem Expressionsmuster. Diese Verteilung ist vor allem am linken und rechten Rand der Expressionsmatrix in **Abbildung 3-10** erkennbar.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Korrelation ‚klassischer‘ Marker mit dem Outcome**

Die Ergebnisse der Korrelation der ‚klassischen‘ Marker mit dem Outcome der Patientinnen, *siehe Kapitel 3.1*, sind vor dem Hintergrund des relativ kleinen Patientinnenkollektivs und den kurzen und unterschiedlich langen Nachbeobachtungszeiträumen der Patientinnen nach Operation zu sehen.

Die Tumorgröße und das Alter bei Operation allerdings zeigen auch an diesem Kollektiv ihre Eigenschaft als wichtige prognostische Faktoren.

Auch der Nodalstatus und das histologische Grading bestätigen zum Teil als Trend das Wissen um deren prognostische Eigenschaften bei Brustkrebs, auch wenn die Ergebnisse nicht statistisch relevant sind. Diese Beobachtungen unterstreichen, dass das untersuchte Studienkollektiv für Brustkrebspatientinnen repräsentativ ist.

Bei den übrigen erhobenen Markern, dem ER-Status, dem PR-Status und dem Her2-neu-Status ergeben sich keine statistisch relevanten Ergebnisse im Hinblick auf die prognostische Aussagekraft dieser Marker.

Beim ER-Status und beim Her2-neu-Status könnte neben der geringen Fallzahl ein Grund für diese Beobachtung sein, dass sich eventuell zwei entgegengesetzte Phänomene überlagern. Zum einen sind ein positiver Her2-neu Status bzw. ein negativer ER-Status ungünstige Prognosefaktoren, zum anderen gelten sie als prädiktive Faktoren für den Erfolg einer Chemotherapie. Der positive Her-2-neu-Status gilt sogar insbesondere als positiver prädiktiver Marker für die Wirkung der Anthrazykline (*Gennari et al 2008*); den Zytostatika, die alle Patientinnen des Studienkollektivs verabreicht bekamen. Hier könnte es also sein, dass sich die in diesem Fall entgegengesetzten prädiktiven und prognostischen Eigenschaften der Marker überlagern und sich daher keine eindeutige Korrelation dieser Marker mit dem Outcome der Patientinnen ergibt.

Während die Ergebnisse für die Tumorgröße und das Alter bei Operation die Erkenntnisse aus der Literatur bestätigen, ergeben sich bezüglich der anderen erhobenen Marker keine statistisch relevanten Resultate, die die Erkenntnisse aus der Literatur zu diesen Markern widerlegen würden.

Diese Beobachtungen lassen auf die Plausibilität der erhobenen Marker und auf die Repräsentativität des Studienkollektivs schließen.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse**

Die Ergebnisse der durchgeführten Genexpressionsanalyse zeigten eine weitgehende Übereinstimmung mit den immunhistochemisch erhobenen Daten zu ER-Status, PR-Status, und Her2-Status. Ebenfalls zeigte sich eine Korrelation des mittels Genexpressionsanalyse erhobenen Ki67-Proliferationsmarkers mit dem histologischen Grad und dem negativen ER-Status, eine Assoziation, die schon in der Literatur erwähnt wurde (*Ruiz et al 2006*), (*Sotiriou et al 2006*), (*Ignatidis et al 2008*). Die Gensignaturen ermöglichten ferner die Einteilung des Patientinnenkollektivs in distinkte Subgruppen aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der einzelnen Signaturen.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit den Status der klassischen Marker, sowie die Gruppierung der Tumorproben anhand differenter Genexpressionsmuster der untersuchten Gensignaturen unterstreichen die Plausibilität der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse als auch die der Daten zu den klassischen Biomarkern.

Zudem zeigt sich, dass sich die untersuchten Gensignaturen auch an den Gewebeproben eines unterschiedlichen Patientenkollektivs unter der Verwendung einer unterschiedlichen Genexpressionsplattform und unterschiedlicher Färbemethoden reproduzieren lassen.

Eine Korrelation der Expressionsdaten der untersuchten prognostischen und prädiktiven Gensignaturen mit dem Krankheitsverlauf der Patientinnen ergab sich nicht.

Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen.

Zum einen stand bei vielen Patientinnen dieser Studie nur ein relativ kurzer Nachbeobachtungszeitraum zur Verfügung (Medianer Nachbeobachtungszeitraum: 37 +/- 5,29 Monate, CI 95%, Standardabweichung: 18,7 Monate, Range: 5 – 87 Monate). Eventuell ergäben sich bei längerer zur Verfügung stehender Nachbeobachtung neue Zusammenhänge hinsichtlich des Outcomes aufgrund spät auftretender Rezidive oder Metastasen.

Weiterhin wurden die hier untersuchten Gensignaturen an im Vergleich zum Kollektiv dieser Studie unterschiedlich zusammengesetzten Patientinnenkollektiven erarbeitet, sodass sich die daran gewonnenen Zusammenhänge eventuell nicht oder nur eingeschränkt auf dieses Studienkollektiv übertragen lassen. Allerdings wurden für die prognostischen Signaturen (Rotterdam und Amsterdam) bereits erfolgreiche Validierungsstudien an unterschiedlichen Kollektiven durchgeführt (siehe Kapitel 1.4.3).

Auch unterschieden sich die Patientinnen der Kollektive, an denen die untersuchten Gensignaturen ihre prognostische und prädiktive Aussagekraft gezeigt hatten, von den Patientinnen dieser Studie

hinsichtlich der verabreichten Therapie. So hatten die Patientinnen der Studien von Hess et al und Rody et al zusätzlich zu den Anthrazyklinen noch ein Taxan bekommen, die Studienpatientinnen von Sotiriou et al (Genomic Grade), Van de Vijver et al (Amsterdam) waren uneinheitlich adjuvant behandelt worden, bzw. hatten keine adjuvante Therapie bekommen. Die Patientinnen der Studie von Wang et al (Rotterdam) hatten keine adjuvante Therapie erhalten.

Im Gegensatz dazu waren die Patientinnen dieser Studie alle einheitlich mit anthrazyklinhaltiger Chemotherapie behandelt worden

Ein weiterer systematischer Fehler ist, dass hinsichtlich der prädiktiven Gensignaturen verschiedene Therapiesettings miteinander verglichen wurden. Die untersuchten prädiktiven Gensignaturen von Hess et al (*Hess et al 2006*) und Rody et al (*Rody et al 2005*) wurden an Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen ermittelt, die eine neoadjuvante Chemotherapie verabreicht bekommen hatten.

Die prädiktive Aussagekraft wurde dabei anhand des Endpunktes der Wirkung der Chemotherapie auf den präoperativen Primärtumor im Sinne des Erreichens einer pathohistologischen Komplettremission ermittelt.

In dieser Studie hingegen war der Endpunkt der Studie krankheitsfreies Überleben nach vollständigem Entfernen des Primärtumors und somit die Wirkung der adjuvanten Chemotherapie auf die Entwicklung von okkulten Mikrometastasen in der Restbrust bzw. im gesamten Körper.

Dass es möglicherweise Unterschiede zwischen der Wirkung einer Chemotherapie auf den Primärtumor und der Wirkung der Chemotherapie auf die okkulten Mikrometastasen, die für die Rezidivbildung und Metastasierung ursächlich sind, gibt, zeigt eine Studie von Liedtke et al aus 2008 an 1118 Brustkrebspatienten. Dort stellte sich heraus, dass Patientinnen mit sogenanntem ‚triple-negativen‘ Brustkrebs (ER-negativ, PR-negativ und Her2-negativ) im Vergleich höhere pCR-Raten erreichten. Allerdings hatten Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs ein höheres Risiko, Rezidive bzw. Metastasen zu entwickeln. Dies galt allerdings nur für die Patientinnen, die keine pCR unter der neoadjuvanten Chemotherapie erreicht hatten (*Liedtke et al 2008*).

Weiterhin nimmt im adjuvanten Setting im Falle von Patientinnen mit hormonsensiblen Tumoren auch die antihormonelle Dauertherapie Einfluss auf die Tumorzellen. Im neoadjuvanten Setting ist die antihormonelle Therapie dem Beobachtungszeitraum nachgelagert, sodass der Endpunkt einer neoadjuvanten Markerstudie von den Auswirkungen der antihormonellen Therapie unbeeinträchtigt ist.

Es ergeben sich also viele Möglichkeiten für Varianz.

Trotz dieser Einschränkungen konnte beim Vergleich der untersuchten Gensignaturen und der ‚klassischen‘ histopathologischen Parameter eine starke Korrelation der untersuchten Gensignaturen mit dem immunhistochemisch ermittelten ER-Status und dem histologischen Grad gezeigt werden.

Beim Vergleich der Expressionsmuster der an den Gewebeproben untersuchten Gensignaturen zeigte sich eine eindruckliche Abhängigkeit der Expressionsmuster der prognostischen und prädiktiven Gensignaturen vom ER-Status sowie von Proliferationsmarkern.

Diese beobachtete Assoziation von verschiedenen Gensignaturen mit dem Östrogenrezeptorstatus (ER-Status) und der proliferativen Aktivität der Tumorzellen unterstützt die auch schon von anderen Gruppen gemachten Beobachtungen, dass ER-Status und die Tumorzellproliferation mächtige Einflussgrößen für die Genregulation in Brustkrebszellen darstellen (*Gruvberger et al 2001*) und (*Eindor et al 2005*).

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob die neuen anspruchsvollen Methoden der Genexpressionsanalyse tatsächlich einen Mehrgewinn an klinisch relevanter Information zusätzlich zu den ‚klassischen‘ Biomarkern erbringen.

Insbesondere dann, wenn sich herausstellen sollte, dass die betreffenden Gensignaturen im Grunde die gleichen zellbiologischen Phänomene, die schon im Wesentlichen durch den ER-Status und die Proliferationsmarker beschrieben werden, lediglich aus einem anderen methodischen Blickwinkel beschreiben.

In diesem Fall könnten die benannten prognostischen und prädiktiven Gensignaturen einfach durch eine Zusammenschau der klassischen Biomarker ersetzt werden, die deren Expressionsmuster im Wesentlichen bestimmen.

Umgekehrt könnte eine Gensignatur mehrere klassische Marker ersetzen, wenn sie die biologischen Phänomene Hormonempfindlichkeit und Proliferation exakter als die klassischen Marker beschreibt, und sich eine präzisere prognostische bzw. prädiktive Aussagekraft herausstellt.

Allerdings muss die Korrelation des Expressionsmusters einer Gensignatur mit der Ausprägung eines klassischen Markers wie des ER-Status oder eines Proliferationsmarkers nicht bedeuten, dass Gensignatur und klassischer Marker tatsächlich das gleiche zellbiologische Phänomen beschreiben.

In diesem Zusammenhang ist eine Ende 2007 veröffentlichte Studie von Puztai et al hervorzuheben (*Puztai et al 2007*). In dieser Studie konnte anhand von Her2-neu-positiven Tumoren gezeigt werden, dass der Her-2-Status nicht der wichtigste prädiktive Faktor für den Erfolg einer Trastuzumab-Therapie war, obwohl der Her2-Rezeptor doch eigentlich das Therapietarget für Trastuzumab ist.

Andere Marker waren in Vergleich zu Her2 von höherem prädiktivem Wert. Diese Gene wurden allerdings Her2-abhängig exprimiert.

Zwar ist ein immunhistochemisch bestimmter positiver Her2-Status ein sensibler prädiktiver Marker für die Wirkung von Trastuzumab, und der Her2-Rezeptor bildet das Therapietarget für diesen therapeutischen Antikörper, allerdings gibt es demnach Gene, deren Expressionsstatus spezifischer für den letztlich entscheidenden zellbiologischen Wirkmechanismus von Trastuzumab ist.



Demnach wäre der Her2-neu-Status ein größerer übergeordneter Marker, während die genannten Her2-abhängigen Gene exaktere spezifischere Marker für den letztlich entscheidenden zellbiologischen Mechanismus sind.

Hier zeigt sich also trotz eindeutiger Korrelation des Expressionsmusters einer Gensignatur mit dem immunhistochemisch bestimmten Her2-neu-Status eine signifikantere prädiktive Aussagekraft der Gensignatur im Vergleich zum immunhistochemisch bestimmten ‚klassischen‘ Biomarker Her2-neu.

Ähnliche Phänomene könnten daher auch beim Hormonrezeptorstatus oder der Zellproliferationsrate und den in dieser Studie untersuchten Gensignaturen zu beobachten sein, zumal in Studien mit größeren Kohorten, bei denen sich leichter relevante prognostische und prädiktive Aussagen von ER-Status, Proliferationsmarkern und den hier untersuchten Gensignaturen ergeben.

Auch wenn übergeordnete Mechanismen wie die hormonelle Wirkung und die Zellproliferation die Genregulation grundlegend prägen und diese bereits mit ‚klassischen‘ Markern erfasst werden, so mag es dennoch lohnenswert sein, die mit diesen Mechanismen assoziierte Genregulation mit Hilfe der Genexpressionsanalyse zu erforschen, da eventuell maßgebliche zellbiologische Phänomene weiter distal in den Regulationskaskaden zu finden sind.

Zum einen, um die mit Hilfe der universelleren, größeren Marker umschriebenen Brustkrebsentitäten noch exakterer ihrer Biologie entsprechend aufzugliedern und so eine feingliedrigere Taxonomie mit eventuell prognostischer und prädiktiver Relevanz zu erstellen.

Zum anderen könnten relevante tumorbiologische Mechanismen identifiziert werden, die neue therapeutische Targets für zu entwickelnde Medikamente liefern.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

Die Genexpressionsanalyse der ausgesuchten tiefgefrorenen Gewebeproben lieferte eine hohe Übereinstimmung mit den histopathologischen ‚klassischen‘ Standardparametern ER-Status, PR-Status und Her2-Status. Dies zeigt dass die Genexpressionsanalyse prinzipiell valide Ergebnisse liefert. Allerdings ist die Reproduzierbarkeit der hier untersuchten Gensignaturen auf einer Genexpressionsplattform selbst in einer homogen behandelten Patientenkohorte begrenzt.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die hier untersuchten Gensignaturen teilweise mit Hilfe anderer Genexpressionsplattformen erarbeitet wurden als mit dem Affymetrix Human Genome Chip U133A, der in dieser Studie verwendet wurde.

Weiterhin könnte es sein, dass die betreffenden Gensignaturen spezifisch für die Therapieregimes und Studienbedingungen (z.B. neoadjuvantes Setting) sind, unter welchen diese auch erarbeitet wurden.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Östrogenregulation, sowie Proliferationsrate der Tumorzellen die stärksten Einflussgrößen auf die Genexpression von Brustkrebstumorzellen sind.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob nicht mit genauer Bestimmung von histopathologischen Standardparametern klinisch gleichwertige Aussagen hinsichtlich Prognose und Prädiktion getroffen werden können, wie es derzeit mit den aufwendigeren Methoden der cDNA-Genexpressions-Analyse möglich ist.

## LITERATURVERZEICHNIS

(1)	<i>(Aas et al 2003)</i>	Aas T, Geisler S, Eide GE, Haugen DF, Varhaug JE, Bassøe AM, Thorsen T, Berntsen H, Børresen-Dale AL, Akslen LA, Lønning PE.: 'Predictive value of tumour cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.', <i>Eur J Cancer</i> . 2003 Mar;39(4):438-46.
(2)	<i>(Andre et al 2006)</i>	Andre F, Mazouni C, Hortobagyi GN, Pusztai L.: 'DNA arrays as predictors of efficacy of adjuvant/neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: current data and issues on study design.', <i>Biochim Biophys Acta</i> . 2006 Dec;1766(2):197-204. Epub 2006 Aug 9.
(3)	<i>(Andre, Pusztai 2006)</i>	Andre F, Pusztai L.: 'Heterogeneity of breast cancer among patients and implications for patient selection for adjuvant chemotherapy.', <i>Pharm Res</i> . 2006 Sep;23(9):1951-8. Epub 2006 Aug 12.
(4)	<i>(Arriola et al 2006)</i>	Arriola E, Moreno A, Varela M, Serra JM, Falo C, Benito E, Escobedo AP.: 'Predictive value of HER-2 and Topoisomerase IIalpha in response to primary doxorubicin in breast cancer.', <i>Eur J Cancer</i> . 2006 Nov;42(17):2954-60. Epub 2006 Aug 28.
(5)	<i>(Bloom, Richardson 1957)</i>	BLOOM HJ, RICHARDSON WW.: 'Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.', <i>Br J Cancer</i> . 1957 Sep;11(3):359-77.
(6)	<i>(Bonadonna et al 1990)</i>	Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, Ferrari L, Luini A, Greco M, Bartoli C, Coopmans de Yoldi G, Zucali R, Rilke F, et al.: 'Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more.', <i>J Natl Cancer Inst</i> . 1990 Oct 3;82(19):1539-45.
(7)	<i>(Bottini et al 1996)</i>	Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brunelli A, Brizzi MP, Marco BD, Cirillo F, Bolsi G, Bertoli G, Alquati P, Dogliotti L (1996) Effect of neoadjuvant chemotherapy on Ki67 labelling index, c-erbB-2 expression and steroidhormone receptor status in human breast tumours. <i>Anticancer Res</i> 16: 3105– 3110
(8)	<i>(Campiglio et al 2003)</i>	Campiglio M, Somenzi G, Olgiati C, Beretta G, Balsari A, Zaffaroni N, Valagussa P, Ménard S.: 'Role of proliferation in HER2 status predicted response to doxorubicin.', <i>Int J Cancer</i> . 2003 Jul 1;105(4):568-73.

(9)	<i>(Cardoso et al 2004)</i>	Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, Paesmans M, Leroy JY, Rouas G, Sotiriou C, Renard N, Richard V, Piccart MJ, Di Leo A.: 'Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer.', <i>Int J Oncol.</i> 2004 Jan;24(1):201-9.
(10)	<i>(Cekan et al 2004)</i>	Cekan SZ.: 'Methods to find out the expression of activated genes.', <i>Reprod Biol Endocrinol.</i> 2004 Sep 23;2:68.
(11)	<i>(Chang et al 2005)</i>	Chang JC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA.: 'Genomic approaches in the management and treatment of breast cancer.' <i>Br J Cancer</i> 2005;92:618-24
(12)	<i>(Chaudhuri 2005)</i>	Chaudhuri JD.: 'Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays.', <i>Med Sci Monit.</i> 2005 Feb;11(2):RA52-62.
(13)	<i>(Cleator et al 2004)</i>	Cleator S, Ashworth A.: 'Molecular profiling of breast cancer:clinical implications.', <i>Br J Cancer</i> 2004;90:1120-4.
(14)	<i>(Colozza et al 2005)</i>	Colozza M, Sidoni A, Mosconi AM, Cavaliere A, Bisagni G, Gori S, De Angelis V, Frassoldati A, Cherubini R, Bian AR, Rodino C, Mazzocchi B, Mihailova Z, Bucciarelli E, Tonato M; Italian Oncology Group for Clinical Research.: 'HER2 overexpression as a predictive marker in a randomized trial comparing adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil with epirubicin in patients with stage I/II breast cancer: long-term results.', <i>Clin Breast Cancer.</i> 2005 Aug;6(3):253-9.
(15)	<i>(Collechi et al 1998)</i>	Collecchi P, Baldini E, Giannessi P, Naccarato AG, Passoni A, Gardin G, Roncella M, Evangelista G, Bevilacqua G, Conte PF (1998) Primary chemotherapy in locally advanced breast cancer (LABC): effects on tumour proliferative activity, bcl-2 expression and the relationship between tumour regression and biological markers. <i>Eur J Cancer</i> 34:1701- 1704
(16)	<i>(Cronin et al 2004)</i>	Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, Esteban JM, Baker JB.: 'Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay.', <i>Am J Pathol.</i> 2004 Jan;164(1):35-42.
(17)	<i>(De Azambuja et al 2007)</i>	de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M.: Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients.; <i>Br J Cancer.</i> 2007 May 21;96(10):1504-13. Epub 2007 Apr 24.

(18)	<i>(Dendukuri et al 2007)</i>	Dendukuri N, Khetani K, McIsaac M, Brophy J.: 'Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis.', CMAJ. 2007 May 8;176(10):1429-34.
(19)	<i>(Elston, Ellis 1991)</i>	Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology 1991 ; 19 : 403 – 10
(20)	<i>(Ferlay et al 2002)</i>	Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M. IARC CancerBase No. 5 - Globocan 2000, Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, International Agency for Research on Cancer Lyon2001 (Updated 2002)
(21)	<i>(D'Eredita et al 2005)</i>	D'Eredita' G, Giardina C, Martellotta M et al. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. Eur J Cancer 2001;37:591–596., Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. J Clin Oncol2005;23:2716–2725.
(22)	<i>(Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau; DKG 2004)</i>	Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau, Eine Nationale S3-Leitlinie, Version Juni 2004 ISTO Deutsche Krebsgesellschaft e.V.
(23)	<i>(Duggan et al 1999)</i>	Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM.: 'Expression profiling using cDNA microarrays.', Nat Genet. 1999 Jan;21(1 Suppl):10-4.
(24)	<i>(EBCTCG 1998)</i>	[No authors listed]: 'Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.', Lancet. 1998 May 16;351(9114):1451-67.
(25)	<i>(EBCTCG 2005)</i>	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG): 'Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.', Lancet. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.
(26)	<i>Ein-Dor et al 2005</i>	Ein-Dor L, Kela I, Getz G, Givol D, Domany E, Outcome signature genes in breast cancer: is there a unique set?, Bioinformatics. 2005 Jan 15;21(2):171-8
(27)	<i>(Ford et al 1999)</i>	Ford D, Easton DF, Stratton M et al. (1999) Genetic Heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet 62 (3): 676-689

(28)	<i>(Galea et al 1992)</i>	Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO.: 'The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer.', <i>Breast Cancer Res Treat.</i> 1992;22(3):207-19.
(29)	<i>(GEKID 2008)</i>	Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008
(30)	<i>(Gennari et al 2008)</i>	Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, Puntoni M, Colozza M, Pfeffer U, Bruzzi P.: 'HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials.', <i>J Natl Cancer Inst.</i> 2008 Jan 2;100(1):14-20
(31)	<i>(Gianfrocca et al 2004)</i>	Cianfrocca M, Goldstein LJ: 'Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer.', <i>Oncologist.</i> 2004;9(6):606-16.
(32)	<i>(Giersiepen et al 2005)</i>	Giersiepen K., Heitmann C., Janhsen K., Lange C. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25 Brustkrebs, Robert Koch-Insitut, Berlin 2005
(33)	<i>(Goldhirsch et al 2007)</i>	Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference.: 'Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007.', <i>Ann Oncol.</i> 2007 Jul;18(7):1133-44.
(34)	<i>(Gruvberger et al 2001)</i>	Gruvberger S, Ringnér M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, Fernö M, Peterson C, Meltzer PS.: 'Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns.', <i>Cancer Res.</i> 2001 Aug 15;61(16):5979-84.
(35)	<i>(Gruvberger-Saal et al 2006)</i>	Gruvberger-Saal SK, Cunliffe HE, Carr KM, Hedenfalk IA.: 'Microarrays in breast cancer research and clinical practice--the future lies ahead.', <i>Endocr Relat Cancer.</i> 2006 Dec;13(4):1017-31.
(36)	<i>(Harbeck et al 1999)</i>	Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt M.: 'Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up.', <i>Br J Cancer.</i> 1999 May;80(3-4):419-26.
(37)	<i>(Harbeck et al 2002)</i>	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.', <i>J Clin Oncol.</i> 2002 Feb 15;20(4):1000-7.

(38)	( <i>Harbeck et al 2002b</i> )	Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, 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).', <i>Cancer Res.</i> 2002 Aug 15;62(16):4617-22.
(39)	( <i>Hess et al 2006</i> )	Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejjia JA, Booser D, Theriault RL, Buzdar AU, Dempsey PJ, Rouzier R, Sneige N, Ross JS, Vidaurre T, Gómez HL, Hortobagyi GN, Puzstai L.: 'Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer.' <i>J Clin Oncol.</i> 2006 Sep 10;24(26):4236-44. Epub 2006 Aug 8.
(40)	( <i>Hideko et al 2001</i> )	Hideko Yamauchi, Vered Stearns, Daniel F. Hayes : ,When Is a Tumor Marker Ready for Prime Time? A Case Study of c-erbB-2 as a Predictive Factor in Breast Cancer ,, <i>Journal of Clinical Oncology</i> , Vol 19, Issue 8 (April), 2001: 2334-2356
(41)	( <i>Hopton et al 1989</i> )	Hopton DS, Thorogood J, Clayden AD, MacKinnon D. Observer variation in histological grading of breast cancer. <i>Eur J Surg Oncol</i> 1989 ; 15 : 21 – 3.
(42)	( <i>Ignatiadis et al 2008</i> )	Ignatiadis M, Sotiriou C.: ,Understanding the molecular basis of histologic grade.', <i>Pathobiology.</i> 2008;75(2):104-11. Epub 2008 Jun 10.
(43)	( <i>International Human Genome Sequencing Consortium 2004</i> )	International Human Genome Sequencing Consortium.: 'Finishing the euchromatic sequence of the human genome.', <i>Nature.</i> 2004 Oct 21;431(7011):931-45.
(44)	( <i>Jänicke et al 2001</i> )	Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M; German N0 Study Group.: '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.', <i>J Natl Cancer Inst.</i> 2001 Jun 20;93(12):913-20.
(45)	( <i>Jørgensen et al 2007</i> )	Jørgensen JT, Nielsen KV, Ejlersen B.: 'Pharmacodiagnosics and targeted therapies - a rational approach for individualizing medical anticancer therapy in breast cancer.', <i>Oncologist.</i> 2007 Apr;12(4):397-405.
(46)	( <i>Kaufmann, Rody 2009</i> )	Kaufmann, A. Rody: ,Brustkrebs: Mortalitätsreduktion durch Früherkennung und adjuvaante Therapie', <i>Geburtsh Frauenheilk</i> 2009; 69:218-232

(47)	<i>Liedtke et al 2008</i>	Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessey B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L.: 'Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer.', J Clin Oncol. 2008 Jul 1;26(19):3286-8; author reply 3288.
(48)	<i>(Masuda et al 1999)</i>	Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K.: 'Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples.', Nucleic Acids Res. 1999 Nov 15;27(22):4436-43.
(49)	<i>(Morcelin et al 2005)</i>	Mocellin S, Provenzano M, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Lise M.: 'DNA array-based gene profiling: from surgical specimen to the molecular portrait of cancer.', Ann Surg. 2005 Jan;241(1):16-26.
(50)	<i>(Newman, Kuerer 2005)</i>	Newman LA, Kuerer HM.: 'Advances in breast conservation therapy.', J Clin Oncol. 2005 Mar 10;23(8):1685-97
(51)	<i>(Olayioye et al 2000)</i>	Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE.: 'The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.', EMBO J. 2000 Jul 3;19(13):3159-67.
(52)	<i>(Olefsky 2001)</i>	Olefsky JM.: 'Nuclear receptor minireview series.', J Biol Chem. 2001 Oct 5;276(40):36863-4. Epub 2001 Jul 17.
(53)	<i>(Paik et al 2004)</i>	Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N.: 'A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer.', N Engl J Med. 2004 Dec 30;351(27):2817-26. Epub 2004 Dec 10.
(54)	<i>(Paik et al 2006)</i>	Paik S.: 'Methods for gene expression profiling in clinical trials of adjuvant breast cancer therapy.', Clin Cancer Res. 2006 Feb 1;12(3 Pt 2):1019s-1023s.
(55)	<i>(Patey 1948)</i>	Patey, D. H. and Dyson, W. H.: The Prognosis of Carcinoma of the Breast in Relation to the Type of Operation Performed. Brit. J. Cancer, 2:7, 1948.
(56)	<i>(Patey 1967)</i>	Patey, D. H.: A Review of 146 Cases of Carcinoma of the Breast Operated on Between 1930 and 1943. Brit. J. Cancer, 21:260, 1967.



(57)	<i>(Perou et al 2000)</i>	Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D.: 'Molecular portraits of human breast tumours.', <i>Nature</i> . 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
(58)	<i>(Petadilis et al 2003)</i>	Petalidis L, Bhattacharyya S, Morris GA, Collins VP, Freeman TC, Lyons PA.: 'Global amplification of mRNA by template-switching PCR: linearity and application to microarray analysis.', <i>Nucleic Acids Res</i> . 2003 Nov 15;31(22):e142.
(59)	<i>(Petit et al 2004)</i>	Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, Mors R, Haegelé P, Eber M, Ghnassia JP.: 'Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy.', <i>Eur J Cancer</i> . 2004 Jan;40(2):205-11.
(60)	<i>(Prisack et al 2005)</i>	Prisack HB, Karreman C, Modlich O, Audretsch W, Danae M, Rezai M, Bojar H.: 'Predictive biological markers for response of invasive breast cancer to anthracycline/cyclophosphamide-based primary (radio-) chemotherapy.', <i>Anticancer Res</i> . 2005 Nov-Dec;25(6C):4615-21.
(61)	<i>(Pritchard et al 2008)</i>	<u>Pritchard KI</u> , <u>Messersmith H</u> , <u>Elavathil L</u> , <u>Trudeau M</u> , <u>O'Malley F</u> , <u>Dhesy-Thind B</u> .: 'HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy.', <i>J Clin Oncol</i> . 2008 Feb 10;26(5):736-44.
(62)	<i>Pusztai et al 2007</i>	Pusztai L, Anderson K, Hess KR, Pharmacogenomic predictor discovery in phase II clinical trials for breast cancer, <i>Clin Cancer Res</i> . 2007 Oct 15;13(20):6080-6
(63)	<i>(Reis-Filho et al 2006)</i>	Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY.: 'The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer.', <i>J Clin Pathol</i> . 2006 Mar;59(3):225-31.
(64)	<i>(Remvikos et al 1989)</i>	Remvikos Y, Beuzeboc P, Zajdela A, Voillemot N, Magdelenat H, Pouillart P (1989) Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with the response to cytotoxic chemotherapy. <i>J Natl Cancer Inst</i> 81:1383– 1387
(65)	<i>(Robbins et al 1995)</i>	Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, Elston C.: 'Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement.', <i>Hum Pathol</i> . 1995 Aug;26(8):873-9.

(66)	<i>(Rody et al 2005)</i>	Rody A, Karn T, Munnes M, von Minckwitz G, Loibl S, Gaetje R, Solbach C, Holtrich U, Kaufmann M, Predictive gene signatures for response to neoadjuvant TAC chemotherapy from expression profiling, Breast Cancer Res Treatm 2005, Vol. 94, Suppl.1, abstract 5046
(67)	<i>(Rody et al 2007a)</i>	Rody A, Holtrich U, Gaetje R, Gehrman M, Engels K, von Minckwitz G, Loibl S, Diallo-Danebrock R, Ruckhäberle E, Metzler D, Ahr A, Solbach C, Karn T, Kaufmann M.: Poor outcome in estrogen receptor-positive breast cancers predicted by loss of plexin B1.', Clin Cancer Res. 2007 Feb 15;13(4):1115-22.
(68)	<i>(Rody et al 2007b)</i>	Rody A, Karn T, Solbach C, Gaetje R, Munnes M, Kissler S, Ruckhäberle E, Minckwitz GV, Loibl S, Holtrich U, Kaufmann M.: 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 Jun;16(3):235-40. Epub 2007 Apr 20.
(69)	<i>(Ross et al 2004)</i>	Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN.: 'Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein.', Mol Cell Proteomics. 2004 Apr;3(4):379-98. Epub 2004 Feb 3.
(70)	<i>(Ruiz et al 2006)</i>	Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G.: ; Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer.', Int J Cancer. 2006 May 1;118(9):2190-4.
(71)	<i>(Sachelairie et al 2006)</i>	Sachelairie I, Grossbard ML, Chadha M, Feldman S, Ghesani M, Blum RH.: 'Primary systemic therapy of breast cancer.', Oncologist. 2006 Jun;11(6):574-89.
(72)	<i>(Sorlie et al 2001)</i>	Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL.: 'Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.', Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
(73)	<i>(Sotiriou et al 2003)</i>	Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET.: 'Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.', Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 2;100(18):10393-8. Epub 2003 Aug 13.

(74)	<i>(Sotiriou et al 2006)</i>	Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, Nordgren H, Farmer P, Praz V, Haibe-Kains B, Desmedt C, Larsimont D, Cardoso F, Peterse H, Nuyten D, Buyse M, Van de Vijver MJ, Bergh J, Piccart M, Delorenzi M, Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis, J Natl Cancer Inst. 2006 Feb 15;98(4):262-72
(75)	<i>(Van de Vijver et al 2002)</i>	van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R.: 'A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.', N Engl J Med. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
(76)	<i>(Van't Veer et al 2002)</i>	van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH.: 'Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.', Nature. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
(77)	<i>(Van't Veer et al 2005)</i>	van't Veer LJ, Paik S, Hayes DF.: 'Gene expression profiling of breast cancer: anew tumor marker.' J Clin Oncol 2005;23:1631-5.
(78)	<i>(Venter et al 2001)</i>	Venter JC et al.: 'The sequence of the human genome.', Science. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.
(79)	<i>(Veronesi et al 1995)</i>	Veronesi U, Salvadori B, Luini A, Greco M, Saccozzi R, del Vecchio M, Mariani L, Zurrada S, Rilke F.: 'Breast conservation is a safe method in patients with small cancer of the breast. Long-term results of three randomised trials on 1,973 patients.', Eur J Cancer. 1995 Sep;31A(10):1574-9.
(80)	<i>(von Minckwitz et al 2005)</i>	von Minckwitz G, Raab G, Caputo A, Schutte M, Hilfrich J, Blohmer JU, Gerber B, Costa SD, Merkle E, Eidtmann H, Lampe D, Jackisch C, du Bois A, Kaufmann M, Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPARDUO study of the German Breast Group, J Clin Oncol. 2005 Apr 20;23(12):2676-85

(81)	<i>(Wang et al 2005)</i>	Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijer-van Gelder ME, Yu J, Jatkoe T, Berns EM, Atkins D, Foekens JA.: 'Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer.', Lancet. 2005 Feb 19-25;365(9460):671-9.
(82)	<i>(White CA, Salamonsen LA 2005)</i>	White CA, Salamonsen LA.: 'A guide to issues in microarray analysis: application to endometrial biology.', Reproduction. 2005 Jul;130(1):1-13.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel ‚**Die prognostische Wertigkeit von Gensignaturen und tumorbiologischen Charakteristika bei Mammakarzinom-Patientinnen mit adjuvanter anthrazyklinhaltiger Chemotherapie**‘ im Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Frankfurt am Main

unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Manfred Kaufmann

mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. med. Achim Rody und Herrn Dr. rer. nat. Thomas Karn

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan unter folgendem Titel veröffentlicht:

A. Rody, T. Karn, F. Pobitschka, E. Ruckhäberle, C. Solbach, A. Ahr, L. Hanker, R. Gaetje, U. Holtrich, M. Kaufmann: ‚Prognostic Value of Gene Signatures and Tumorbiological Characteristics in Breast Cancer Patients Treated with Anthracycline-containing Chemotherapy‘, Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2008; 68: 1171-1177

Frankfurt am Main, den 30.07.2009, \_\_\_\_\_

(Unterschrift)

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. h.c. Manfred Kaufmann, sowie PD Dr. med. Achim Rody und Dr. rer. nat. Thomas Karn für ihre engagierte und zuverlässige Betreuung und Unterstützung.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für Unterstützung, Rückhalt und Anteilnahme.