

**Aus dem Pathologischen Institut  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Vorstand: Professor Dr. med. Th. Kirchner**

**Basaler und myoepithelialer Phänotyp des  
Mammakarzinoms als Prognosefaktor in der palliativen  
Situation**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von**

**Patrick Mainka  
aus  
Gräfelfing  
2010**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Diebold**

**Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Iris Bittmann**

**Priv. Doz. Dr. Darius Dian**

**Mitbetreuung durch promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. D. Mayr**

**Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR**

**Tag der mündlichen Prüfung: 14. 01. 2010**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>S. 1</b>
1.1. Epidemiologie.....	S. 1
1.2. Das metastasierte Mammakarzinom Krankheitsverlauf und Prognosefaktoren.....	S. 1
1.3. Mikroskopische Anatomie und Immunhistochemie der Brustdrüse.....	S. 3
1.4. Basale / myoepitheliale Differenzierung von Mammakarzinomen als Prognosefaktor.....	S. 5
<b>2. Zielsetzung und Fragestellung.....</b>	<b>S. 9</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>S.10</b>
3.1. Patientenkollektiv.....	S.10
3.2. Immunhistochemische Untersuchung.....	S.12
3.3. Auswertung und Auswertungskriterien.....	S.14
3.4. Statistische Auswertung.....	S.14
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>S.15</b>
4.1. Repräsentativität der Stichprobe.....	S.15
4.2. Charakteristika der Patientinnen.....	S.16
4.3. Pathomorphologie der Primärtumoren.....	S.16
4.4. Krankheitsverlauf.....	S.17
4.5. Metachrone kontralaterale Mammakarzinome, Lokalrezidive und Zweitmalignome.....	S.17
4.6. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung.....	S.18
4.6.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Mammakarzinome mit Anti- Zytokeratin 5/6.....	S.18
4.6.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Mammakarzinome mit Anti- Zytokeratin 14.....	S.20
4.6.3. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Mammakarzinome mit Anti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA).....	S.22
4.6.4. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Mammakarzinome mit Anti-p63.....	S.24
4.6.5. Beziehungen zwischen CK5/6, CK14, $\alpha$ -SMA und p63.....	S.26
4.7. Bildung von Subgruppen durch verschiedene Kombinationen der Marker für basale /myoepitheliale Differenzierung.....	S.28
4.8. Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse für Hormonrezeptoren: Östrogenrezeptor- $\alpha$ und Progesteronrezeptor- $\alpha$ .....	S.31
4.9. Klinische Parameter und Pathomorphologie der Primärtumoren in Abhängigkeit von den Phänotypen.....	S.32

4.9.1. Alter der Patientinnen bei Fernmetastase nach Phänotypen.....	S.32
4.9.2. Tumorlokalisation nach Phänotypen.....	S.32
4.9.3. Histopathologische Klassifikation nach Phänotypen.....	S.33
4.9.4. TumorgroÙe nach Phänotypen.....	S.34
4.9.5. Nodalstatus nach Phänotypen.....	S.35
4.9.6. Histopathologisches Tumorgading nach Phänotypen.....	S.36
4.9.7. Hormonrezeptorstatus nach Phänotypen.....	S.37
4.9.8. HER-2/ <i>neu</i> Status nach Phänotypen.....	S.38
4.9.9. Dauer des metastasenfreien Intervalls nach Phänotypen.....	S.39
4.10. Überlebensanalyse.....	S.40
4.10.1. Univariate Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier für etablierte Prognosefaktoren.....	S.40
4.10.2. Univariate Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier nach Phänotypen	S.47
4.10.3. Multivariate Überlebensanalyse mit der Cox Regressionsanalyse.....	S.51
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>S.52</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>S.65</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>S.67</b>
<b>8. Verzeichnis der Abkürzungen.....</b>	<b>S.74</b>
<b>9. Danksagungen.....</b>	<b>S.75</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>S.76</b>
<b>11. Anhang.....</b>	<b>S.78</b>

## 1. Einleitung

### 1. Einleitung

#### 1.1. Epidemiologie

Brustkrebs ist in der Bundesrepublik Deutschland und weltweit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. In der BRD erkranken pro Jahr etwa 55.000 Frauen neu an Brustkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren und somit sind die betroffenen Frauen 7 Jahre jünger, als das mittlere Alter bei Malignomerkrankungen erwarten lässt. Die Inzidenz steigt seit 1970 stetig an, scheint jedoch seit 1997 wieder rückläufig zu sein. Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Mammakarzinome beträgt 79% (Krebs In Deutschland 2006). Laut Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes verstarben in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2003 17.173 Frauen an Brustkrebs. Brustkrebs ist die häufigste Ursache für Krebssterbefälle bei Frauen (Robert Koch Institut 2005), wobei eine Fernmetastasierung die Haupttodesursache ist.

#### 1.2. Das metastasierte Mammakarzinom: Krankheitsverlauf und Prognosefaktoren

Der Prozeß der Metastasierung (und damit das Schicksal der Erkrankung) vollzieht sich bereits vor der Primärtherapie des Tumors. Liegen Metastasen vor, ist mit einer dauerhaften Heilung nicht mehr zu rechnen, denn ab jetzt ist von einer disseminierten Multiorganerkrankung auszugehen, in der lokale Therapiemaßnahmen allenfalls zur Linderung einer akuten Symptomatik eingesetzt werden können. Nur eine systemische Therapie kann nun effektiv sein (Kaufmann et al. 2007). Der Krankheitsverlauf ist dabei außerordentlich heterogen. Die berichteten Überlebensraten liegen im Bereich von wenigen Wochen bis zu mehreren Jahren (Cha et al. 1999) nach dem Auftreten der ersten Metastasen, wobei die mittlere Überlebensdauer 18 bis 24 Monate beträgt (Lück 2006). Das Mammakarzinom metastasiert lymphogen in die regionalen Lymphknoten, und hämatogen vor allem in das Skelett (44-71%), die Lunge (49-77%), die Leber (46-65%), die Pleura (23-65%) und das Gehirn (6-22%) (Bässler 1997).

Als klinische Faktoren, welche mit einem erhöhten Risiko für eine kürzere Überlebenswahrscheinlichkeit einhergehen, gelten das Patientenalter von älter als 50 Jahren (Clark et al. 1987; Chang et al. 2003), der Allgemeinzustand der Patientin (Lück 2006), ein kurzes krankheitsfreies Intervall von weniger als 24 Monate (Clark et

## 1. Einleitung

al. 1987; Chang et al. 2003; Vogel et al. 1992), außerdem multiple sowie viszerale Metastasen (Jimeno et al. 2004; Chang et al 2003). Auch biologische Eigenschaften des Primärtumors können zur Abschätzung der Prognose herangezogen werden. Bei großen sowie schlecht differenzierten Primärtumoren (Jimeno et al. 2004) werden kürzere Überlebenszeiten nach eingetretener Fernmetastasierung beschrieben. Metastasen in den regionalen Lymphknoten (positiver Lymphknotenstatus) bei der Primärtherapie sind auch nach systemischer Metastasierung ein Indikator für eine schlechtere Prognose (Clark et al 1987; Koenders et al. 1992). Negativer Östrogenrezeptorstatus (Vogel et al.1992; Koenders et al. 1992) und Progesteronrezeptorstatus (Chang et al. 2003) weisen auf einen ungünstigeren Krankheitsverlauf hin und sind Prädiktoren für die Unwirksamkeit einer endokrinen Therapie (Paone et al. 1981).

Die Überexpression des Protoonkogens *HER-2/neu* (*HER-2/neu* positiv) ist beim Mammakarzinom in frühen Tumorstadien mit Überleben und Prognose assoziiert (Paik et al. 1990; Andrulis et al. 1998). Der prognostische Wert in der metastasierten Situation hängt davon ab, ob die Patientinnen eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne des *HER-2/neu* Rezeptors (Trastuzumab) erhalten. Ist dies nicht der Fall, hat die Überexpression des Protoonkogens *HER-2/neu* keinen unabhängigen prognostischen Wert (Niskanen et al. 1997). Die Gabe von Trastuzumab in der palliativen Situation verbessert die Prognose der Patientinnen mit Überexpression allerdings derart (Slamon et al. 2001), dass *HER-2/neu* -Positivität heutzutage als prognostisch günstiger Faktor zu werten ist (Ferretti et al. 2007).

Die Prognoseabschätzung kann dafür verwendet werden, um den Betroffenen Informationen über den wahrscheinlichen Ausgang ihrer Erkrankung zu geben. Für die behandelnden Ärzte dienen Prognosefaktoren als Anhaltspunkte, um therapeutische Entscheidungen risikoadaptiert zu treffen (Heinemann et al. 2005). So ist bei mittlerem und hohem Risikoprofil (negativer Hormonrezeptorstatus, kurzes metastasenfreies Intervall, rasche Tumorprogression und symptomatische Erkrankung), neben chirurgischen und strahlentherapeutischen Maßnahmen vor allem die Gabe einer zytotoxischen Chemotherapie indiziert. Allerdings sind die Möglichkeiten die Wirksamkeit einer zytotoxischen Chemotherapie vorherzusagen begrenzt. Darum sind Untersuchungen von großem Interesse, welche Mammatumoren vom basalen / myoepithelialem Phänotyp eine besondere

## 1. Einleitung

Chemosensitivität (Rodriguez-Pinilla et al. 2006; Rouzier et al. 2005; Hannemann et al. 2006; Diallo Danebrock et al. 2007) oder Chemoresistenz (Banerjee et al. 2006) in der adjuvanten oder neoadjuvanten Situation zusprechen. Basales oder myoepitheliales Immunprofil könnte ein nützlicher prädiktiver Faktor in der palliativen Situation sein, dies ist aber bisher in der Literatur nicht belegt. Zwei Untersuchungen zeigen zwar ein kürzeres Überleben nach erster Metastase bei Tumoren mit basalem Immunprofil (Fulford et al. 2007; Luck et al. 2008), doch ist in diesen Veröffentlichungen nicht ersichtlich, welche der Patientinnen eine palliative Zytostatikatherapie erhalten hatten.

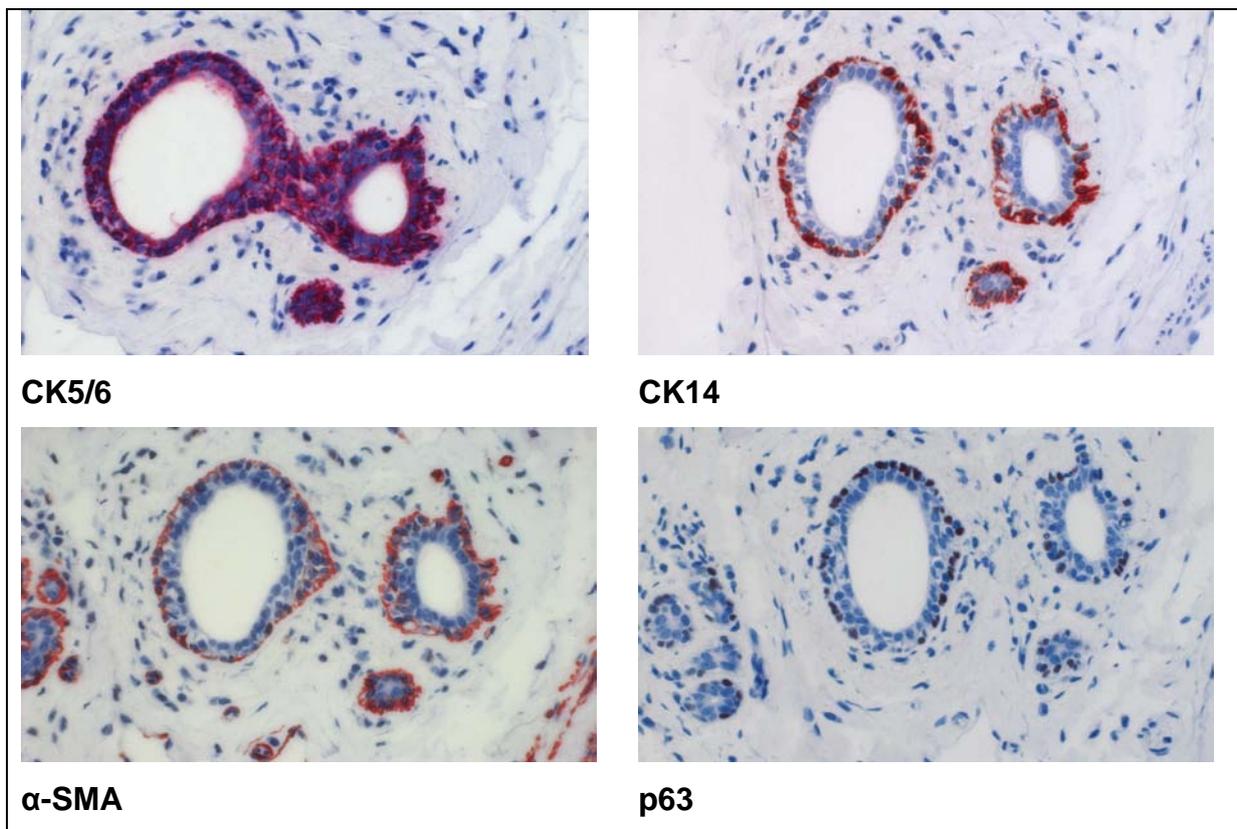
### **1.3. Mikroskopische Anatomie und Immunhistochemie der Brustdrüse**

Der Drüsenkörper der Mamma besteht aus epithelialen Drüsenstrukturen, welche von einer Basalmembran umgeben und in Binde- und Fettgewebe eingebettet sind. Schätzungsweise 20 Drüsenlappen münden mit eigenem Ausführungsgang an der Mamille. Ein Drüsenlappen wiederum teilt sich in ein ausgedehntes Gangsystem mit Drüsenläppchen am proximalen Ende auf. (Thor et al. 2004) Diese proximale terminale duktulolobuläre Einheit (TDLU) ist eine dynamische Struktur, in der sich unter Hormoneinfluss nicht nur in der Schwangerschaft, sondern auch während dem Menstruationszyklus deutliche Umbauvorgänge abspielen (Thor et al. 2004). In oberflächlicher Lage der Gänge, dem luminalen Epithel, lassen sich immunhistochemisch zylinderepitheltypische Zytokeratine (CK8, CK18, CK19), Hormonrezeptoren sowie fokale myoepitheliale/ basale Zytokeratine (CK5, CK14) nachweisen (Bässler 1997). Zwischen Drüsenepithel und Basalmembran befindet sich eine flache Schicht spindelförmiger oder kubischer myoepithelialer Zellen, welche die luminalen Zellen korbartig umgibt und einzelnen luminalen Zellen den Kontakt mit der Basalmembran gestatten. Immunhistochemisch sind die myoepithelialen Zellen positiv für die basalen Zytokeratine CK5, CK14 und CK17 sowie für  $\alpha$ -SMA, p63, CD10, Calponin, S-100 und andere. Außerdem sind sie negativ für die luminalen Zytokeratine CK8, CK18 und CK19 sowie für Östrogen- und Progesteronrezeptor (Rakha et al. 2006). Luminale sowie myoepitheliale Kompartimente differenzieren sich mutmaßlich aus einer gemeinsamen Stammzelle, welche sich räumlich entweder im luminalen Kompartiment aufhält (Pechoux et al. 1999) oder in der basalen/ parabasalen wie in der luminalen Zelllage nachzuweisen ist (Bánkfalvi et al. 2004). Böcker et al. (2002, 2003) und Birnbaum et al. (2004)

## 1. Einleitung

postulieren eine CK5/6(+) CK8/18(-)  $\alpha$ -SMA(-) Zelle als potentielle Stammzelle, Clark et al. (2004) sehen die CK8/18 Negativität als einen durch Formalinfixierung verursachten Artefakt. In vitro Studien weisen darauf hin, dass die vermutete Stammzelle neben Oberflächenmerkmalen wie CD44<sup>+</sup> und CD22<sup>-</sup> unter anderem die Zytokeratine 5,6 und 14 exprimiert (Stingl et al. 2006; Villadsen et al. 2007), die meisten Autoren stimmen in der Tatsache überein dass die Progenitorzelle CK5 positiv und CK8/18 negativ ist (Polyak et al. 2007).

### Darstellung basaler / myoepithelialer Immunreaktivität in einem extralobulären terminalen Duktus



**Abbildung 1** : Immunhistochemische Färbung eines extralobulären terminalen Duktus der Brustdrüse in aufeinander folgenden Schnittstufen. 400 fache Vergrößerung. **Links oben** CK5/6 Immunreaktivität in luminalen und myoepithelialen Zellen. **Rechts oben** CK14 Immunreaktivität in der äußeren, myoepithelialen Zelllage. **Links unten**  $\alpha$ -SMA Immunreaktivität in der äußeren, myoepithelialen Zelllage, außerdem an kleinen Blutgefäßen. **Rechts unten** p63 Immunreaktivität in der äußeren, myoepithelialen Zelllage.

## 1. Einleitung

### 1.4. Basale / myoepitheliale Differenzierung von Mammakarzinomen als Prognosefaktor

Die prognostische Bedeutung einer basalen / myoepithelialen Differenzierung von Mammakarzinomen ist seit 20 Jahren Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Bis jetzt gibt es kein Übereinkommen über eine einheitliche Terminologie. „Basal“, „basal-like“, „basaloid“, „basal phenotype“, „myoepithelial“ werden als Bezeichnungen in der Literatur genannt und weisen eine Gemeinsamkeit auf: die Tumoren zeichnen sich durch die Expression basaler Zytokeratine aus. Der Terminus „basal“ impliziert zwar eine Histopathogenese von den basalen bzw. myoepithelialen Zellen der *ductuli lactiferi* und *tubuloalveoli*, doch sind die basalen Zytokeratine in der Brustdrüse keineswegs spezifisch für die basalen Zellen (Otterbach et al. 2000). Der Begriff basales Zytokeratin geht auf die Arbeiten von Moll et al. zurück, der bestimmte hochmolekulare Zytokeratine in den basalen Zellen mehrschichtiger Epithelien, vor allem Plattenepithelien beschrieb (Moll et al. 1983). Dabei handelt es sich unter anderem um die Zytokeratine CK 5, CK6, CK14 und CK17, deren Expression in der Brustdrüse nur in einem Teil der basalen bzw. myoepithelialen Zellen stattfindet und auch nicht auf diese beschränkt ist (Gusterson et al. 2005). Mit myoepithelialen Mammakarzinomen werden von Rakha et al. (2006) Mammakarzinome bezeichnet die sich, unabhängig von der histopathologischen Klassifikation, durch die Expression von für myoepitheliale Zellen spezifischen Marker auszeichnen. Zur Detektion myoepithelialer Zellen der Mamma eignen sich unter anderem  $\alpha$ -SMA, Myosin, Calponin, CD10 und p63, wobei p63 die höchste Sensitivität und Spezifität für myoepitheliale Zellen besitzt (Moriya et al. 2006).

Die ersten Hinweise auf die prognostische Bedeutung basaler Zytokeratine stammen aus dem Jahr 1987 (Dairkee 1987). Die Untersucher berichten davon, dass bei primären Mammakarzinomen, in denen immunhistochemisch basale Zytokeratine dargestellt werden können, öfter Rezidiv und Tod auftreten. 1998 veröffentlichten Malzahn et al. eine Arbeit über den Zusammenhang zwischen der Expression der Zytokeratine 4,14 und/oder 17 und dem krankheitsfreien Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OAS). In der Gruppe der nodalpositiven Karzinome weisen diese Tumoren ein signifikant kürzeres DFS auf.

Durch Genexpressionsanalysen unter Verwendung von cDNA-Microarrays wurde eine molekulare Klassifikation der Mammakarzinome etabliert, mit welcher

## 1. Einleitung

Vorhersagen über die Überlebenswahrscheinlichkeit der Erkrankten getroffen werden können (Perou et al. 2000; Sorlie et al. 2001). Unterschieden werden darin zwei luminaire Typen (A und B), ein HER-2/*neu* überexprimierender Typ, ein basaler Subtyp und Tumoren die ein ähnliches Profil wie normale Brustzellen aufweisen. Untersucht wurden die Tumoren von Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Brustkrebs (T3 oder T4 oder N2) die eine neoadjuvante Chemotherapie mit Doxorubicin erhalten hatten. Der HER-2/*neu* überexprimierende und der basale Subtyp zeigen sich dabei als Subgruppen mit der schlechtesten Prognose. Tumoren vom basalen Subtyp zeigen Expression der RNA für die Zytokeratine 5 und 17, wobei diese Expression nicht spezifisch für den basalen Subtyp ist, sondern auch bei anderen Subtypen beobachtet wird. Alle Patientinnen mit Tumoren vom basalen Subtyp verstarben innerhalb von vier Jahren. Die Ergebnisse weiterer Arbeiten unterstützen die prognostisch ungünstigen Eigenschaften des basalen Subtyps der Genexpressionsprofile (Sotiriou et al. 2003; Calca et al. 2007). Einen immunhistochemischen Surrogatmarker für den basalen Subtyp der Genexpressionsprofile beschreibt Nielsen (Nielsen et al. 2004). Er findet die beste Sensitivität (100%) und Spezifität (76%) für den basalen Subtyp, wenn die Tumoren positiv für CK5/6 und / oder EGFR (HER1) und negativ für ER sowie HER2 sind. Der basale Subtyp zeigt dabei signifikant kürzeres Überleben nur in der Gruppe der nodalpositiven Patientinnen auf. Van de Rijn et al. (2002) untersuchte primäre Mammakarzinome mit monoklonalen Antikörpern gegen CK5/6 und 17, wobei sich basale Zytokeratine als unabhängige Prognosefaktoren in der Gruppe der nodalnegativen Tumoren darstellen. Jones et al. (2004) untersuchten invasiv duktales Karzinome (nicht näher spezifiziert) von histologischem Grad 3 mit Anti-CK14 und mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) und bestätigt dabei CK14 nicht als Prognosefaktor, erkennt aber mittels CGH innerhalb der CK14 positiven Tumoren eine Untergruppe mit ungünstiger Überlebenswahrscheinlichkeit, was die Vermutung nahe legt, dass es sich bei den Mammakarzinomen vom basalen Subtyp um eine prognostisch heterogene Gruppe handelt. Potemski (Potemski et al. 2006) benützte CK5/6 und/ oder CK17 als Marker für die basale Differenzierung und kommt zum Schluss, dass die schlechte Prognose der basalen Mammakarzinome von negativem Hormonrezeptorstatus und der Expression von Cyclin E abhängig ist. Ähnlich hat bei Jumppanen et al. (2007) der basale Subtyp (CK5/6/14) bei Östrogenrezeptor negativen Tumoren keine Beziehung zum Patientenüberleben. In

## 1. Einleitung

einer koreanischen Studie (Kim et al. 2006) kann die schlechte Prognose des basalen Subtyps nicht bestätigt werden, Karzinome mit Expression von CK5 oder 14 und fehlender Expression von HR und HER-2/*neu* unterscheiden sich in den Überlebensraten nicht von anderen Tumoren, außer den HER-2/*neu* überexprimierenden Karzinomen, welche in dieser Studie das kürzeste Überleben aufweisen. In der Untersuchung mit der bisher größten Fallzahl (Rakha et al. 2006) wird zwischen Tumoren mit überwiegend negativer (basal characteristics, basaloid) und überwiegend positiver (dominant basal) Zytokeratinexpression (CK5/6 und / oder CK14) unterschieden. Basale Karzinome insgesamt gelten als unabhängiger Prognosefaktor für verkürztes OAS und DFS, wobei sich dominanter und basaloider Phänotyp nicht voneinander unterscheiden. Rakha untersucht auch das Überleben bei Tumoren mit myoepitheliale Immunprofil ( $\alpha$ -SMA und / oder p63 positiv), diese zeigen in der univariaten aber nicht in der multivariaten Analyse ein kürzeres OAS. Laakso et al. (2006) untersuchten Hochrisikopatientinnen ( $\leq 8$ LK oder  $\geq 5$ LK + ER neg.) nach adjuvanter Chemotherapie. Zwischen CK5/6/14-positiven und negativen Fällen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des DFS. Wurde wie bei Rakha die Quantität der Zytokeratinexpression berücksichtigt (basal vs. basoluminal) haben basoluminale Tumoren (5-69% positiv) ein signifikant kürzeres DFS im Vergleich mit basalen Tumoren (70-100% positiv). Tischkowitz (Tischkowitz et al. 2007) untersucht das Gesamtüberleben von CK5/6 und / oder EGFR positiven Mammakarzinomen und beobachtet ein signifikant kürzeres OAS bei diesen Tumoren. Der Effekt auf das OAS zeigt sich 10 Jahre nach Erstdiagnose noch deutlicher als nach nur drei Jahren. Fulford et al. (2007) können keinen Unterschied im Gesamtüberleben zwischen CK14 positiven und CK14 negativen duktalem Karzinomen (nicht näher spezifiziert) von histologischem Grad 3 entdecken, das Langzeitüberleben ist für CK14 positive Tumoren sogar günstiger. Allerdings beschreiben Fulford et al. in der univariaten Analyse CK14 positive Tumoren mit signifikant kürzerem Überleben ab erster Fernmetastase verglichen mit CK 14 negativen Tumoren. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse der Arbeit von Luck et al. (2008) unterstützt. Darin zeigt sich der basale Phänotyp (CK5/6 und / oder 14 positiv) in der multivariaten Analyse unter Berücksichtigung des Gradings, des Östrogenrezeptorstatus, des Metastasenortes und der Zeitdauer des metastasenfreen Intervalls als unabhängiger Prognosefaktor für kürzeres Überleben in der metastasierten Situation.

## 1. Einleitung

Ob der basale Subtyp nun einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt, gilt als noch nicht abschließend geklärt. Über die prognostische Bedeutung des basalen Subtyps bei palliativ chemotherapierten Patientinnen existieren bis Anfang 2008 keine Veröffentlichungen.

## 2. Zielsetzung und Fragestellung

### **2. Zielsetzung und Fragestellung**

Es soll die Häufigkeit basaler (CK5/6 und CK14) und myoepithelialer (-SMA und p63) Immunreaktivität der Primärtumoren von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom bestimmt werden. Zur Verfügung steht dafür ein grosses Kollektiv palliativ chemotherapierter Patientinnen. Anhand von Literaturdaten werden Untergruppen (Phänotypen) gebildet. Es soll die Frage beantwortet werden ob eine Korrelation zwischen diesen Phänotypen und bekannten Prognosefaktoren für die Überlebenszeit nach erster Metastase des Mammakarzinoms besteht. Erlaubt es die Ermittlung basaler oder myoepithelialer Immunreaktivität prognostische Aussagen über die Überlebenszeit nach erster Metastase zu treffen? Besteht ein additiver Informationsgewinn zu bereits bekannten Prognosefaktoren oder lässt sich die, anhand von Literaturdaten vermutete, ungünstige Prognose des basalen und myoepithelialen Phänotyps durch den Einfluss bereits bekannter Einflussfaktoren (Hormonrezeptorstatus, Typing, Grading, Tumorgröße, Lymphknotenstatus, HER-2/*neu* – Status, Patientenalter und Dauer des metasasenfreien Intervalls) erklären?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Patientenkollektiv

Zwischen Januar 1991 und Juni 2005 erhielten 478 Patientinnen an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München Großhadern eine systemische Chemotherapie zur palliativen Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms.

Um in die vorliegende Studie aufgenommen zu werden mussten folgende Bedingungen erfüllt sein:

- 1.) Material des Primärtumors war im Pathologischen Institut der LMU München archiviert. Dies war der Fall, wenn die Primärtherapie des Mammakarzinoms ebenfalls an der Frauenklinik Großhadern stattgefunden hatte.
- 2.) Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme noch nicht mit zytostatischer Chemotherapie behandelt worden.
- 3.) Die Tumoren waren histologisch nicht als Tumoren der Mamma mit myoepithelialer Differenzierung oder Teildifferenzierung wie Myoepitheliome, pleomorphe Adenome, adenoid-zystische Karzinome, low grade adenosquamöse Karzinome und Adenomyoepitheliome klassifiziert worden.
- 4.) Die Patientinnen erhielten nach Diagnose des metastasierten Mammakarzinoms keine Chemotherapie zur Behandlung eines Zweitmalignoms.

Die Gewebeproben entstammten Biopsien, Tumorenukleationen und Mastektomien der Jahre 1987 bis 2004. Fälle vor 1987 konnten nicht untersucht werden, da die Gewebelöcke nicht mehr archiviert waren. Von 244 Fällen stand Material für die immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung. Das Material war primär formalinfixiert und in Paraffin eingebettet (n=225), oder für die Schnellschnittuntersuchung primär schockgefroren und anschließend formalinfixiert und in Paraffin eingebettet (n=19) worden. Gewebeproben bis 1992 waren in 10% neutral gepufferter Formalinlösung fixiert worden, ab 1993 in 4% neutral gepufferter Formalinlösung.

Von 14 Patientinnen waren Gewebeproben von beiden Tumoren bei bilateralem, synchronem Mammakarzinom vorhanden, in diesen Fällen wurden beide Tumoren untersucht. Der Tumor mit der höchsten UICC Kategorie ging in die Auswertung ein. Die klinisch-pathologischen Daten (Klassifikation, Grading, Tumordurchmesser, pT-Kategorie, Nodalstatus) der Tumoren bei Erstdiagnose entstammten den Befundberichten des pathologischen Instituts. Histologische Klassifikation und TN Klassifikation nach WHO, (in Tavassoli et al. 2003). Die histopathologische

### 3. Material und Methoden

Klassifikation der Tumoren war bei allen Fällen bekannt. Für acht Fälle, in denen kein Tumorgrading erfasst war, wurde dieses nach den Kriterien des Gradings von *Elston* u. *Ellis* (Elston C W, Ellis I O 1991) nachträglich bestimmt. Der Tumordurchmesser war in 74 Fällen nicht dokumentiert, das pT Stadium war 14 mal unbekannt und mit pTX angegeben und 20 mal mit pT4 ohne weitere Unterteilung. In 29 Fällen war der Nodalstatus (axilläre Lymphknoten) zur Zeit der Erstdiagnose unbekannt. Bei 175 von 182 nodalpositiven Fällen war die Anzahl der befallenen Lymphknoten erfasst.

Von der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig Maximilians Universität München Standort Großhadern stammten Angaben zu Geburtsdatum, Datum der Erstdiagnose des Mammakarzinoms (Datum des ersten histopathologischen Befundes der Diagnose Mammakarzinom), Datum der ersten Metastase (Datum der ersten klinischen oder radiologischen Evidenz der Fernmetastasierung), Datum der letzten Datenerhebung und Todesdatum. Davon wurden das Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose und erster Metastase, die Dauer des metastasenfremen Intervalls und die Überlebenszeit nach Auftreten der ersten Metastase berechnet. Weiterhin waren Angaben zu kontralateralen Mammakarzinomen (synchrone und metachrone), Lokalrezidiven und Zweitmalignomen vorhanden.

Die Angaben zum HER-2/*neu* Status stammten aus einem institutsinternen Register. In 139 Fällen war der HER-2/*neu* Status mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und 104 mal immunhistochemisch bestimmt worden. Positiver HER-2/*neu* Status war dabei definiert als schwache oder hohe Amplifikation des HER-2/*neu* Gens oder als ein Score 3+ im immunhistochemischen Hercep Test ® (starke Anfärbung der kompletten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen) gemäß den Kriterien von Pauletti et al. (2001).

### 3. Material und Methoden

#### **3.2. Immunhistochemische Untersuchung**

Alle Fälle wurden immunhistochemisch nach Standardmethoden (Boenisch 2003) auf glattmuskuläres Aktin ( $\alpha$ -SMA), Zytokeratin 5/6 (CK5/6), Zytokeratin 14 (CK14) und p63 untersucht.

Der Status von Östrogenrezeptor- $\alpha$  (ER) und des Progesteronrezeptor- $\alpha$  (PR) wurde immunhistochemisch ermittelt, dabei wurden 209-mal aktuell angefertigte Schnitte und 45-mal Archivschnitte beurteilt.

Zur Qualitätskontrolle dienten für die Untersuchung von  $\alpha$ -SMA, CK5/6, CK14 und p63 interne Positivkontrollen in den epithelialen Zellen von Milchgängen und Drüsenläppchen, für die Untersuchung von ER und PR interne Positivkontrollen und externe Positivkontrollen in Gestalt von ER bzw. PR positiven Mammakarzinomen. Negativkontrollen, bei denen das gesamte Färbeprotokoll ohne spezifischen Primärantikörper durchgeführt worden wäre, lagen nicht vor.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden von den Paraffinblöcken mit dem Schlittenmikrotom (Jung HN40 Fa. *Leica*) ca. 2 $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt und auf mit Sialin beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Demaskierung der durch die Formalinfixierung verlorengegangenen Immunreaktivität (pretreatment) wurde im Mikrowellenherd bei 600 W vorgenommen. Die eigentliche immunhistochemische Färbung erledigte vollautomatisch der i6000TM Autostainer der Fa. *Biogenex*. Die Anfertigung der immunhistochemischen Schnitte wurde von den technischen Assistentinnen des immunhistochemischen Labors des pathologischen Instituts der LMU München Standort Innenstadt durchgeführt. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der verwendeten Methoden. Die Laborprotokolle sowie eine Auflistung der verwendeten Materialien finden sich im Anhang (11.1.)

### 3. Material und Methoden

**Tabelle 1: Verwendete Antikörper und immunhistochemische Methoden**

Verwendeter Primärantikörper	Inkubationszeit des Primärantikörpers	Verdünnung des Primärantikörpers	Vorbehandlung (Preatreatment)	Brückenantikörper
<b>α-Smooth muscle actin</b> (α-SMA) Anti human muscle actin Fa. <i>Dako</i> (Klon HHF35) Monoklonal IgG1	60 min Raumtemperatur	1:200	keines	LSAB
<b>Zytokeratin 14</b> (CK14) Anti Cytokeratin 14 Fa. <i>Serotec</i> (Klon LL02) Monoklonal Maus IgG3	60 min Raumtemperatur	1:150	30 min Mikrowelle in TRS 6	Polymerkonjugatmethode
<b>Zytokeratin 5/6</b> (CK5/6) Anti Cytokeratin 5&6 Fa. <i>Zymed</i> (Klon D5/16B4) Monoklonal Maus IgG1	60 min Raumtemperatur	1:150	30 min Mikrowelle in Protex II	APAAP
<b>p63</b> Anti p63 Fa. <i>Biocare</i> (Klon BC4A4) Monoklonal Maus IgG2a	60 min Raumtemperatur	1:120	30 min Mikrowelle in TRS 6	LSAB
<b>Östrogenrezeptor-α</b> (ER) Anti Östrogenrezeptor-α Fa. <i>Novocastra</i> (Klon 6F11) Monoklonal Maus IgG1	60 min Raumtemperatur	1:80	30 min Mikrowelle in TUF	LSAB
<b>Progesteronrezeptor-α</b> (PR) Anti Progesteronrezeptor-α Fa. <i>Novocastra</i> (Klon 1A6) Monoklonal Maus IgG1	60 min Raumtemperatur	1:100	30 min Mikrowelle in TUF	LSAB

**TRS 6** = target retrieval solution Fa. *Dako* Citratpuffer ph 6 # S2369

**Protex II** = Pro Taqs II Antigen-Enhancer Fa. *Biocyc* TRIS/HCl Puffer ph 9,5

#401602192

**TUF**= target unmasking fluid Fa. *PanPath* # Z00R.0000

**Polymerkonjugat** = Polymerkonjugat Methode Envision™ mit Anti Maus IgG Sekundärantikörper, horseradish peroxidase und Rückgrat aus inertem Dextranmolekül # K4001

**APAAP** = Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Methode , APAAP-REAL Link und APAAP-Real Immunkomplex Fa. *Dako* # K50000

**LSAB** = Labelled Strept-Avidin-Biotin Methode ; LSAB Link und LSAB Komplex Fa. *Dako* # K0674

### 3. Material und Methoden

#### **3.3. Auswertung und Auswertungskriterien**

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch am Laborlux 12 (Firma *Leica*).

Zum Nachweis ob die Antikörperbindung erfolgreich war (Positivkontrolle), erfolgte die Begutachtung der internen Kontrolle in Gestalt der myoepithelialen Zellen miterfasster *ductuli lactiferi* und *tubuloalveoli*.

Die Tumorzellen im Präparat wurden systematisch auf Färbereaktionen untersucht, der Bereich intensivster Färbereaktion in der Übersichtsvergrößerung aufgesucht und bei 400 facher Vergrößerung der Anteil an Tumorzellen mit positiver Färbereaktion semiquantitativ abgeschätzt.

Die Auswertung von SMA, CK5/6, CK14 und p63 erfolgte semiquantitativ in 10er Schritten. Als positiv galt für SMA, CK5/6 und CK14 zytoplasmatische, für p63, ER und PR nukleäre Färbereaktion in mindestens zehn Prozent der Tumorzellen, unabhängig von der Farbeintensität

#### **3.4. Statistische Auswertung**

Alle Daten wurden mittels SPSS Software Version 15.0 dokumentiert und ausgewertet. Um Verblindung zu erreichen wurden die Überlebensdaten erst nach kompletter Auswertung hinzugefügt. Mittelwerte wurden mit dem t-Test verglichen. Korrelationen zwischen Variablen wurden mit Kreuztabellen, das Signifikanzniveau mit dem Chi<sup>2</sup>-Test ermittelt. Zur univariaten Analyse zensierter Überlebensdaten diente das Kaplan-Meier (1958) Verfahren, der Gruppenvergleich geschah mit dem Log Rang Test. Die multivariate Ereignisdatenanalyse wurde mit der Methode von Cox (1972) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde jeweils  $p < 0,05$  gewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4. Ergebnisse

#### 4.1. Repräsentativität der Stichprobe

Um zu überprüfen ob die Auswahl der untersuchten Fälle als repräsentativ für die Gruppe aller zwischen 1991 und 2004 mit Chemotherapie behandelten Patientinnen gelten konnte, wurden die TNM Kategorien der Gesamtgruppe und der Gruppe der Patientinnen von denen Material des Primärtumors vor chemotherapeutischer Behandlung zur Verfügung stand verglichen. Der Vergleich beschränkte sich auf die TNM Kategorien. Für die histopathologische Klassifikation und das Grading waren in der Gesamtgruppe die Daten zu unvollständig. Auffällig ist der vergleichsweise hohe Anteil der primär metastasierten, der lokal weit fortgeschrittenen, der Nodal positiven Fälle und der Erkrankungen mit extensivem Lymphknotenbefall (N3) in der Untersuchungsgruppe. Chi<sup>2</sup>-Test für pT, pN+, N3 und M1 jeweils  $p < 0,05$ .

**Tabelle: TNM Klassifikation im Vergleich zwischen allen Patientinnen die zwischen 1991 und 2004 eine Chemotherapie erhalten hatten und der Stichprobe von Patientinnen deren Primärtumor ab 1987 im pathologischen Institut untersucht worden waren, und die so in die Studie aufgenommen werden konnten**

	Gesamtgruppe n=478	Untersuchungsgruppe n=244
pTX (pT unbekannt)	n=35 (7,4%)	n=14 (5,7%)
pT0	n=2 (0,4%)	n=0
pTis	n=2 (0,4%)	n=0
pT1	n=115 (24,3%)	n=42 (17,2%)
davon pT1a	n=15 (3,2%)	n=2 (0,8%)
pT1b	n=17 (3,6%)	n=6 (2,5%)
pT1c	n=83 (17,4%)	n=34 (13,9%)
pT2	n=201 (42,4%)	n=99 (40,6%)
pT3	n=44 (9,3%)	n=32 (13,1%)
pT4	n=79 (16,7%)	n=57 (23,4%)
davon pT4a	n=6 (1,3%)	n=1 (0,4%)
pT4b	n=27 (5,6%)	n=20 (8,2%)
pT4c	n=9 (1,9%)	n=9 (3,7%)
pT4d	n=8 (1,7%)	n=7 (2,9%)
pT4 (unklassifiziert)	n=29 (6,1%)	n=20 (8,2%)
Nodalpositiv (axilläre LK)	n=316 (66,1%)	n=182 (74,6%)
davon >10LK	n=91 (22,4%)	n=64 (30,5%)
LK Status unbekannt	n=52 (10,9%)	n=29 (11,9%)
primär metastasiert (M1)	n= 130 (27,2%)	n=101 (41,4%)

## 4. Ergebnisse

### 4.2. Charakteristika des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv bestand aus 243 Frauen und einem Mann (Patientinnen genannt). Das mittlere Alter bei Erstdiagnose der Brustkrebserkrankung lag bei 53,5 Jahren, Spannweite 25,1 - 80,4 Jahre.

### 4.3. Pathomorphologie der Primärtumoren

Die Karzinome traten 113 mal (46,3%) links, 104 mal (42,6%) rechts und 26 mal (10,7%) beidseits (synchron) auf. Einmal war die Seite unbekannt (0,4%). Die histologische Klassifikation ergab 220 (90,2%) invasiv duktales Karzinom NOS (not otherwise specified), 21 invasiv lobuläre Karzinome (8,6%), 2 invasiv duktal und lobulär gemischte Karzinome (0,8%) und ein gemischt duktal-muzinöses Karzinom (0,4%). Die Tumorgöße lag zwischen 0,1 cm und 23 cm (Mittelwert 4,3 cm), nach pT Stadium gruppiert waren das 42 mal pT1 (17,2%), 99 mal pT2 (40,6%), 32 mal pT3 (13,1%) und 57 mal pT4 (23,4%). 14 mal (5,7%) konnte das pT Stadium nicht bestimmt werden. Die Tumorerkrankung hatte sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 182 mal (74,6%) auf die regionalen Lymphknoten ausgedehnt (Nodal positiv), 33 mal (13,5%) waren die regionalen Lymphknoten nicht betroffen (Nodal negativ) und 29 mal (11,9%) war der Lymphknotenstatus unbekannt geblieben. Innerhalb der primär metastasierten Erkrankungen waren 97,3% der Fälle Nodal positiv und innerhalb der Fälle mit Metastasen nach krankheitsfreiem Intervall 78,0%. Von den 182 Nodal positiven Fällen war die Anzahl der betroffenen Lymphknoten in 175 Fällen bekannt und lag 58 mal (33,2%) zwischen 1 und 3, 53 mal (30,3%) zwischen 4 und 9, sowie 64 mal (36,6%) über 10. 101 mal (41,4%) waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Fernmetastasen aufgetreten. Das histologische Grading war 3 mal (1,2%) Grad 1, 104 mal (42,2%) Grad 2 und 137 mal (56,1%) Grad 3. Die Angaben zum HER-2/*neu* Status stammten aus einem institutsinternen Register und waren immunhistochemisch sowie mittels Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung ermittelt worden. In einem Fall war der HER-2/*neu* Status mangels Material nicht mehr zu ermitteln gewesen. 64 Fälle (26,2%) waren als HER-2/*neu* positiv klassifiziert worden.

## 4. Ergebnisse

### 4.4. Krankheitsverlauf

Der Krankheitsverlauf konnte bei 220 Patientinnen bis zum Tod verfolgt werden. 9 Patientinnen schieden vor dem Ende der Beobachtungszeit aus, waren also „lost to follow up“. Die Dauer der Beobachtungszeit lag zwischen 5 Tagen und 151,9 Monaten. Am Ende der Beobachtungszeit (letzte Datenerhebung 1.7.2007) lebten noch 15 Patientinnen. Die mediane Überlebenszeit für die Gesamtgruppe betrug 23,8 Monate (20,3-27,3 95% Konfidenzintervall).

Das metastasenfremde Intervall nach der Erstdiagnose währte 23 mal (9,4%) weniger 12 Monate, 64 mal (26,2%) 12 bis 36 Monate, 33 mal (13,5%) 36 bis 60 Monaten und 23 mal (9,4%) mehr als 60 Monate. 101 Patientinnen (41,4%) hatten bereits bei der Erstdiagnose Fernmetastasen. Das mittlere Alter bei der ersten Fernmetastase betrug 55,3 Jahre (27,7 -81,4 Jahre).

### 4.5. Metachrone kontralaterale Mammakarzinome, Lokalrezidive und Zweitmalignome

Bei 20 Patientinnen (4,2%) entstand im Zeitverlauf ein zweiter Primärtumor in der kontralateralen Brust (metachrones Mammakarzinom, Abstand zur Erstdiagnose der kontralaterale Brust mehr als 2 Monate). 7 davon (35,0%) traten vor der ersten Fernmetastase, 3 (15,0%) synchron mit der Fernmetastase und 13 (50,0%) nach der ersten Fernmetastase auf. Lokalrezidive waren 61 mal (12,8%) beobachtet worden. Diese traten 18 mal (29,5%) vor der ersten Fernmetastase, 23 mal (37,7%) synchron mit der Fernmetastase und 20 mal (32,8%) nach der ersten Fernmetastase auf. Frühere Malignome waren bei 9 Patientinnen (3,7%) bekannt, im Verlauf traten 7 mal (2,9%) Zweitkarzinome auf.

## 4. Ergebnisse

### 4.6. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung

#### 4.6.1. Ergebnisse der immunhistochemische Untersuchung der Mammakarzinome mit Anti- Zytokeratin 5/6

Die Auswertung der Untersuchung mit Anti-CK5/6 war in 100% der Fälle möglich. Die Positivkontrolle zeigte sich regelmäßig als zytoplasmatische Färbereaktion in den myoepithelialen, aber nicht selten auch in den luminalen Zellen von *ductuli lactiferi* und *tubuloalveoli*. Das Ausmass der Färbung war oft heterogen, negative und positive Areale wechselten einander ab. 244 Primärtumoren gingen in die Auswertung ein. Die Tabelle zeigt (vom Intensitätsgrad unabhängig) den semiquantitativ geschätzten Anteil von Tumorzellen mit zytoplasmatischer Färbereaktion für CK5/6:

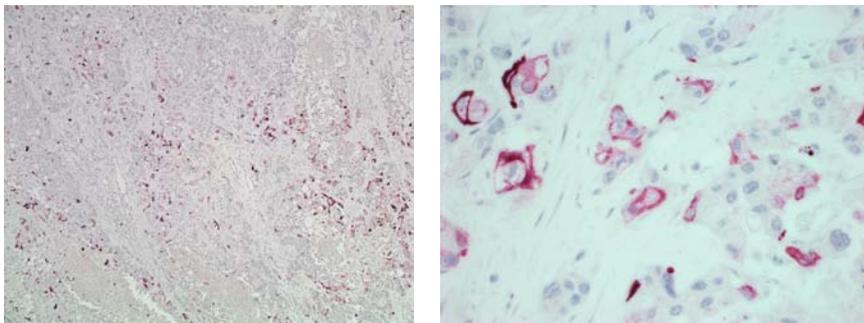
**Tabelle 3: Prozentuale Anteile der CK5/6 positiven Tumorzellen, absolute und relative Anzahl der untersuchten Mammakarzinome**

positive Färbereaktion für CK5/6 in Prozent der Tumorzellen	Anzahl der Fälle	
keine Färbereaktion	149 (61,1%)	negativ 175 (71,8%)
Weniger 10% der Tumorzellen	26 (10,7%)	
10% der Tumorzellen	7 (2,9%)	überwiegend negativ 36 (14,8%)
20% der Tumorzellen	10 (4,1%)	
30% der Tumorzellen	9 (3,7%)	
40% der Tumorzellen	1 (0,4%)	
50% der Tumorzellen	9 (3,7%)	
60% der Tumorzellen	1 (0,4%)	überwiegend positiv 33 (13,5%)
70% der Tumorzellen	2 (0,8%)	
80% der Tumorzellen	10 (4,1%)	
90% der Tumorzellen	0 (0%)	
100% der Tumorzellen	20 (8,2%)	
	244 (100%)	positive Fälle 69 (28,3%)

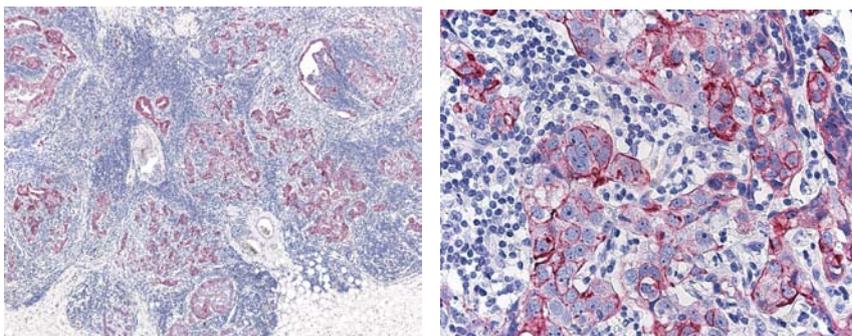
#### 4. Ergebnisse

Als positiv gewertet wurde, wenn mindestens 10% der Tumorzellen in einem Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung eine positive Färbereaktion aufwiesen. Dabei ergab sich für CK 5/6 eine Rate von 69/244 (28,3%) positiver Gewebeproben. Es wiesen 36/69 (52,2%) der Proben eine überwiegend negative (10%-50%) und 33/69 (47,8%) der Proben eine überwiegend positive (60-100%) Färbereaktion auf.

#### **Bildbeispiele für die immunhistochemische Färbung mit Anti-CK5/6**



**Abbildung 2/ Fall141** links: 50 fache Vergrößerung, rechts: 400 fache Vergrößerung, 30% der Tumorzellen mit positiver Färbereaktion (rot) für CK5/6 (überwiegend negative Färbereaktion)



**Abbildung 3/ Fall75**, links 50 fache Vergrößerung, rechts 400 fache Vergrößerung, überwiegend positive ( 80%) Färbereaktion (rot) der Tumorzellen für CK5/6

## 4. Ergebnisse

### 4.6.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Mammakarzinome mit Anti- Zytokeratin 14

Bei der Auswertung der Untersuchung mit Anti-CK14 wurde gelegentlich eine über das ganze Präparat verteilte diffuse Färbereaktion beobachtet, die als unspezifisch interpretiert wurde. Die Positivkontrolle zeigte sich regelmäßig als zytoplasmatische Färbereaktion in den myoepithelialen, aber nicht selten auch in den luminalen Zellen von *ductuli lactiferi* und *tubuloalveoli*. Das Ausmaß der Färbung war oft heterogen, negative und positive Areale wechseln einander ab. 244 Primärtumoren gingen in die Auswertung ein. Die Tabelle zeigt (vom Intensitätsgrad unabhängig) den semiquantitativ geschätzten Anteil von Tumorzellen mit zytoplasmatischer Färbereaktion für CK14:

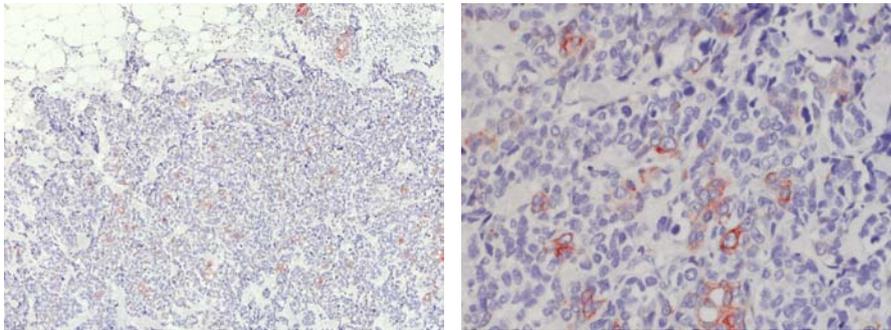
**Tabelle 4: Prozentuale Anteile der CK14 positiven Tumorzellen, absolute und relative Anzahl der untersuchten Mammakarzinome**

positive Färbereaktion für CK14 in Prozent der Tumorzellen	Anzahl der Fälle		
keine Färbereaktion	213 (87,3%)	negativ	225 (92,2%)
Weniger 10% der Tumorzellen	12 (4,9%)		
10% der Tumorzellen	1 (0,4%)	überwiegend negativ	9 (3,7%)
20% der Tumorzellen	3 (1,2%)		
30% der Tumorzellen	3 (1,2%)		
40% der Tumorzellen	0 (0%)		
50% der Tumorzellen	2 (0,8%)		
60% der Tumorzellen	0 (0%)	überwiegend positiv	10 (4,1%)
70% der Tumorzellen	1 (0,4%)		
80% der Tumorzellen	1 (0,4%)		
90% der Tumorzellen	0 (0%)		
100% der Tumorzellen	8 (3,3%)		
Gesamt	244 (100%)	positive Fälle 19 (7,8%)	

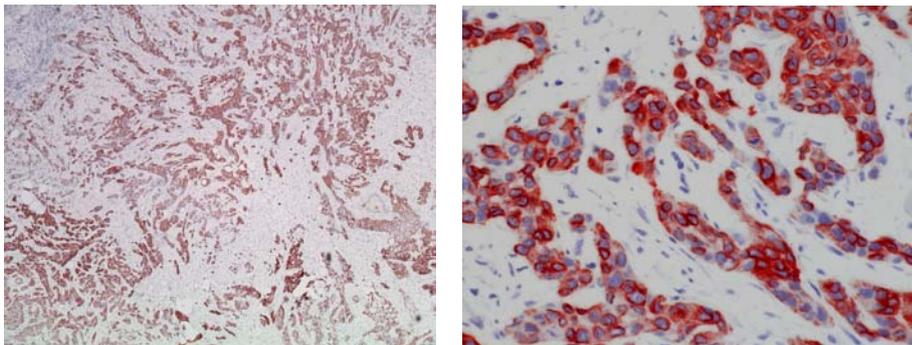
#### 4. Ergebnisse

Als positiv gewertet wurde wenn mindestens 10% der Tumorzellen in einem Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung eine positive Färbereaktion aufwiesen. Dabei ergab sich für CK14 eine Rate von 19/244 (7,8%) positiver Gewebeproben. Es wiesen 9/19 (47,4%) der Proben eine überwiegend negative (10%-50%) und 10/19 (52,6%) eine überwiegend positive (60%-100%) Färbereaktion auf.

#### **Bildbeispiele für die immunhistochemische Färbereaktion mit Anti-CK14**



**Abbildung 4/ Fall 257**, links: 50 fache Vergrößerung, rechts: 400 fache Vergrößerung, 30% der Tumorzellen mit positiver Färbereaktion (braun) für CK14 (überwiegend negative Färbereaktion)



**Abbildung 5 Fall 278**, links:50 fache Vergrößerung, rechts:400 fache Vergrößerung, positive Färbereaktion (braun) für CK14 im überwiegenden (100%) Anteil der Tumorzellen

## 4. Ergebnisse

### 4.6.3. Ergebnisse der immunhistochemische Untersuchung der Mammakarzinome mit Anti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)

Bei der Auswertung der Untersuchung mit Anti- $\alpha$ -SMA wurde oft eine positive Reaktion in Zellkernen von Stroma und Tumor beobachtet. Die (erwartete) zytosolische Reaktivität stromaler Myofibroblasten wurde bei der Auswertung als störend empfunden. Die Positivkontrolle zeigte sich regelmäßig als zytoplasmatische Färbereaktion in den myoepithelialen Zellen von *ductuli lactiferi* und *tubuloalveoli*. 244 Primärtumoren gingen in die Auswertung ein. Die Tabelle zeigt (vom Intensitätsgrad unabhängig) den semiquantitativ geschätzten Anteil von Tumorzellen mit zytoplasmatischer Färbereaktion für  $\alpha$ -SMA:

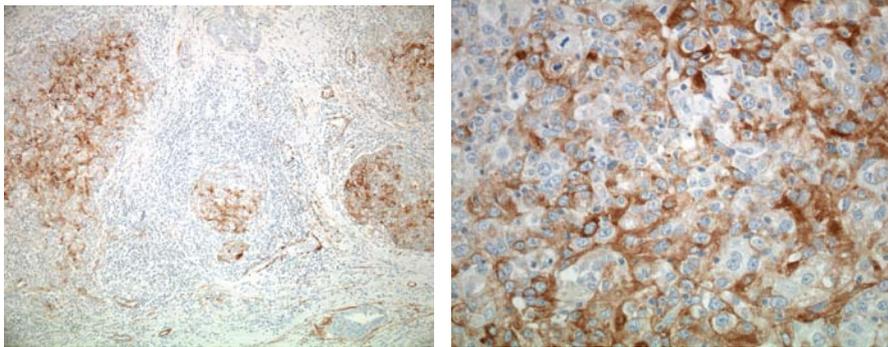
**Tabelle 5: Prozentuale Anteile der  $\alpha$ -SMA positiven Tumorzellen, absolute und relative Anzahl der untersuchten Mammakarzinome**

positive Färbereaktion für SMA in	Anzahl der Fälle mit positiver Färbereaktion		
0%	227 (93,0%)	233 (95,5%)	
Weniger 10% der Tumorzellen	6 (2,5%)		
10% der Tumorzellen	4 (1,6%)	überwiegend negativ 9 (3,7%)	
20% der Tumorzellen	2 (0,8%)		
30% der Tumorzellen	1 (0,4%)		
40% der Tumorzellen	0 (0%)		
50% der Tumorzellen	2 (0,8%)		
60% der Tumorzellen	0 (0%)	überwiegend positiv 2 (0,8%)	
70% der Tumorzellen	0 (0%)		
80% der Tumorzellen	1 (0,4%)		
90% der Tumorzellen	0 (0%)		
100% der Tumorzellen	1 (0,4%)		
Gesamt	244 (100%)	positive Fälle 11 (4,5%)	

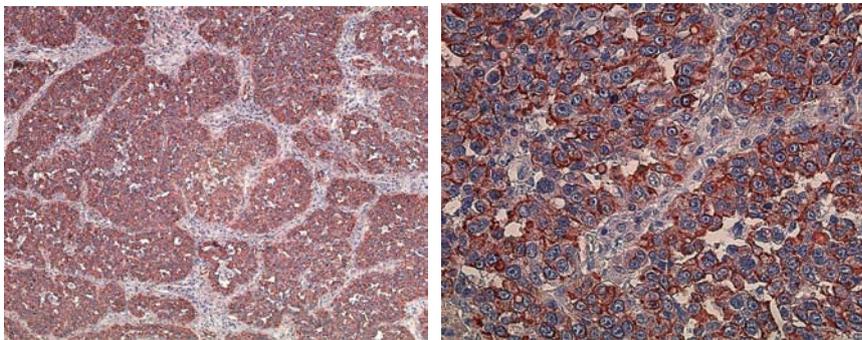
#### 4. Ergebnisse

Als positiv gewertet wurde wenn mindestens 10% der Tumorzellen in einem Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung eine positive Färbereaktion aufwiesen. Dabei ergab sich für  $\alpha$ -SMA eine Rate von 11/244 (4,5%) positiver Gewebeproben. Es wiesen 9/11 (81,8%) der Proben eine überwiegend negative (10%-50%) und 2/11 (18,2%) eine überwiegend positive (60%-100%) Färbereaktion auf.

#### **Bildbeispiele für die immunhistochemische Färbung für $\alpha$ -SMA**



**Abbildung 6/ Fall 101**, links: 100 fache Vergrößerung, rechts: 400 fache Vergrößerung 30% der Tumorzellen mit positiver Färbereaktion (braun) für  $\alpha$ -SMA (überwiegend negative Färbereaktion)



**Abbildung 7/ Fall 230**, links: 100 fache Vergrößerung, rechts 400 fache Vergrößerung, überwiegend positive (80%) Färbereaktion (braun) für  $\alpha$ -SMA

## 4. Ergebnisse

### 4.6.4. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Mammakarzinome mit Anti-p63

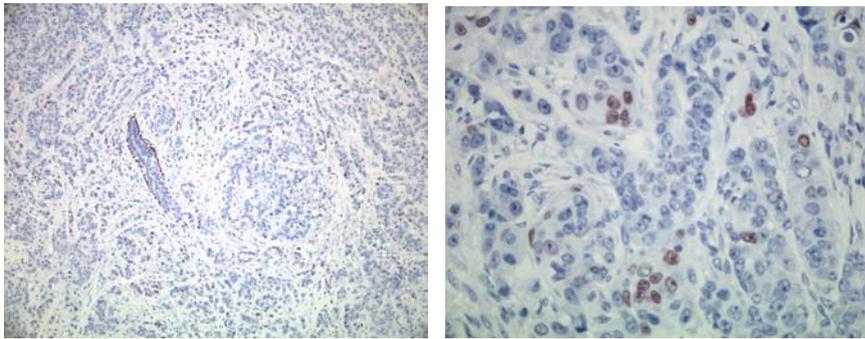
Die Positivkontrolle zeigte sich regelmäßig als nukleäre Färbereaktion in den myoepithelialen Zellen von *ductuli lactiferi* und *tubuloalveoli*. 244 Primärtumoren gingen in die Auswertung ein. Bei der Untersuchung mit Anti-p63 war die nukleäre Reaktion in Tumorzellen spärlich und fleckförmig über das Präparat verteilt. Gelegentlich wurde eine schwache zytoplasmatische Färbereaktion in Tumorzellen beobachtet. Die Tabelle zeigt (vom Intensitätsgrad unabhängig) den semiquantitativ geschätzten Anteil von Tumorzellen mit nukleärer Färbereaktion für p63:

**Tabelle 6: Prozentuale Anteile der p63 positiven Tumorzellen, absolute und relative Anzahl der untersuchten Mammakarzinome**

positive Färbereaktion in Prozent der Tumorzellen	p63 positive Tumore	
0%	226 (92,6%)	negativ 234 (95,9%)
Weniger 10% der der Tumorzellen	8 (3,3%)	
10% der Tumorzellen	5 (2,05%)	überwiegend negativ 10 (4,1%)
20% der Tumorzellen	5 (2,05%)	
30% der Tumorzellen	0 (0%)	
40% der Tumorzellen	0 (0%)	
50% der Tumorzellen	0 (0%)	
60% der Tumorzellen	0 (0%)	überwiegend positiv 0
70% der Tumorzellen	0 (0%)	
80% der Tumorzellen	0 (0%)	
90% der Tumorzellen	0 (0%)	
100% der Tumorzellen	0 (0%)	
Gesamt	244 (100%)	positive Fälle 10 (4,1%)

#### 4. Ergebnisse

Als positiv gewertet wurde wenn mindestens 10% der Tumorzellen in einem Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung eine positive Färbereaktion aufwiesen. Dabei ergab sich für p63 eine Rate von 10/244 (4,1%) positiver Gewebeproben. Dabei wiesen die Proben eine überwiegend negative (10%-50%) und keine überwiegend positive (60%-100%) Färbereaktionen auf.



**Abbildung 8/ Fall 105**, links: 100 fache Vergrößerung, rechts 400 fache Vergrößerung, 10% der Tumorzellkerne mit positiver Färbereaktion (braun) für p63 (überwiegend negative Färbereaktion)

## 4. Ergebnisse

### 4.6.5 Beziehungen zwischen CK5/6, CK14, $\alpha$ -SMA und p63

77/244 Gewebeproben (31,5%) waren für CK5/6, CK14, p63 oder SMA positiv, in 27 von diesen 77 Fällen (35,1%) lagen die Marker kombiniert vor und in 50/77 Fällen (64,9%) wiesen die Gewebeproben die Färbereaktion für nur einen Marker auf.

Statistisch signifikante Assoziationen zwischen den Markern fanden sich nach Tabelle 7 zwischen CK5/6 und CK14, für CK5/6 und p63 sowie für CK14 und SMA. Die myoepithelialen Marker  $\alpha$ -SMA und p63 kamen nur einmal zusammen vor. CK14 war bis auf einen Fall immer mit CK5/6 verknüpft.

**Tabelle 7 : Zusammenhänge der IHC Marker untereinander, absolute und relative Häufigkeiten und p-Werte des Chi<sup>2</sup>-Tests**

Positivität der Tumorzellen für	CK 5/6 >10%	CK14 >10%	SMA >10%	P63 >10%
CK 5/6 >10% : n=69	-	18/69 ( <b>26,1%</b> ) p=0,000	6/69 ( <b>8,7%</b> ) p=0,056	7/69 ( <b>10,1%</b> ) p=0,006
CK14 >10% : n=19	18/19 ( <b>94,7%</b> ) p=0,006	-	4/19 ( <b>21,1%</b> ) p=0,006	1/19 ( <b>5,3%</b> ) p=0,0563
SMA >10% : n=11	6/11 ( <b>54,5%</b> ) p=0,056	4/11 ( <b>36,4%</b> ) p=0,006	-	1/11 ( <b>9,1%</b> ) p=0,375
P63 >10% : n=10	7/10 ( <b>70%</b> ) p=0,006	1/10 ( <b>10%</b> ) p=0,0563	1/10 ( <b>10%</b> ) p=0,375	-

#### 4. Ergebnisse

Bei Karzinomen mit überwiegendem (>50% der Tumorzellen) CK5/6 positiven Anteil war auch der CK14 positive Anteil dominierend. Bei Karzinomen mit einer überwiegend negativen (10-50% der Tumorzellen) Färbereaktion für CK5/6 lag auch die Färbereaktion für CK14 häufiger im Bereich zwischen 10%-50% der Tumorzellen.

**Tabelle 8: Anteil von CK14 positiven Fällen an 69 CK5/6 positiven Tumoren; p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests p=0,003**

Anteil der Tumorzellen mit positiver Färbereaktion	CK14 in 10%-50% n=9	CK14 in >50% n=10	Anteil von CK14 graphisch
CK5/6 in 10% - 50% ; n= 36	6/36 (16,7%)	0/36 (0%)	
CK5/6 in > 50%; n=33	3/33 (9,1%)	9/33 (27,3%)	

## 4. Ergebnisse

### **4.7. Bildung von Subgruppen durch verschiedene Kombinationen der Marker für basale /myoepitheliale Differenzierung**

Zur Korrelation mit den klinischen und pathologischen Parametern wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zu 4 Gruppen zusammengefasst:

#### **1. basaloider Phänotyp**

(nicht zu Verwechseln mit basaloider Differenzierung der Tumorzellen im histologischen Sinne)

wenn CK5/6 und / oder CK14 in  $>10\%$  und  $\leq 50\%$

(36 Fälle; 14,8%)

#### **2. dominant basaler Phänotyp**

wenn CK5/6 und / oder CK14 in  $>50\%$

(34 Fälle; 13,9%)

#### **3. myoepithelialer Phänotyp**

wenn  $\alpha$ -SMA und / oder p63 in  $> 10\%$

(20 Fälle; 8,2%)

#### **4. CK5/6 &14 doppelt positiver Phänotyp**

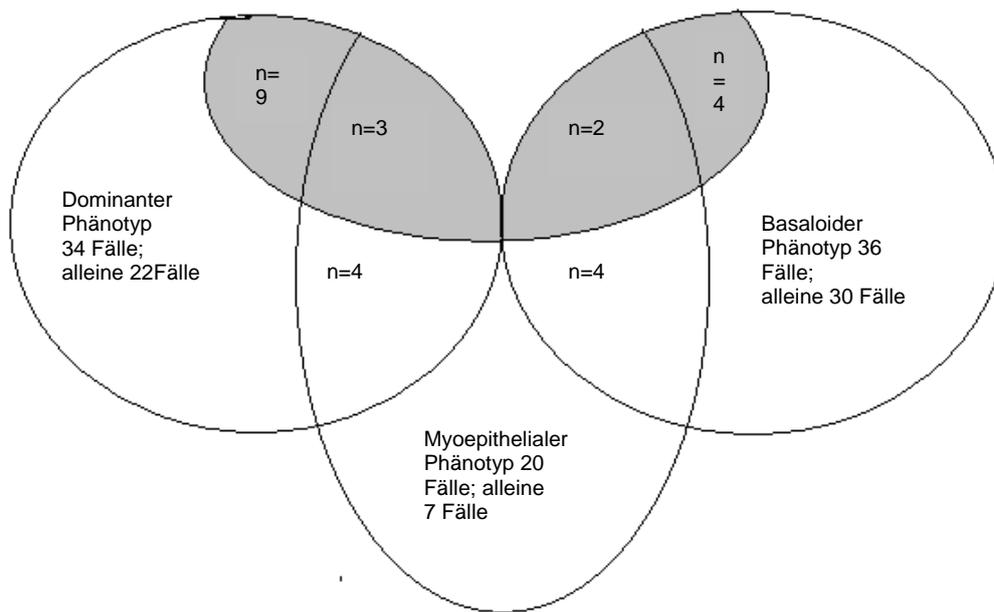
bei Koexpression von CK5/6 und CK14

(18 Fälle; 7,4%)

#### 4. Ergebnisse

Dominant basaler und basaloider Phänotyp schlossen sich gegenseitig aus, bildeten aber Schnittmengen mit dem myoepithelialen und dem CK5/6 & 14 doppelt positiven Phänotyp. Der myoepitheliale Phänotyp war Schnittmenge mit allen anderen Phänotypen. Der CK5/6 & 14 doppelt positive rekrutierte sich aus Teilmengen des dominanten und basaloiden Phänotyps und bildete dabei eine Schnittmenge mit dem myoepithelialen Phänotyp.

CK5/6 & 14 doppelt positiver Phänotyp: grau unterlegt, 18 Fälle; alleine kein Fall

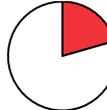


**Abbildung 10: Überlappungsbereiche der immunohistochemisch definierten Phänotypen der 244 untersuchten Mammakarzinome**

#### 4. Ergebnisse

7 von 20 (35,0%) Tumoren des myoepithelialen Phänotyps zeigten ausschließlich eine Expression der myoepithelialen, nicht aber der basalen Marker. Dominant basaler und CK5/6& 14 doppelt positiver Phänotyp hatten einen im Vergleich mit der Gesamtgruppe signifikant erhöhten Anteil an myoepithelialen Fällen. ( $p=0,011$  bzw.  $0,009$ ).

**Tabelle 9: Anteil myoepithelialer Fälle an den anderen Phänotypen und in der Gesamtgruppe**

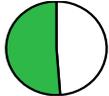
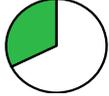
	Anteil myoepithelialer Fälle		p-Wert des $\chi^2$ -Tests
basaloid n=36	n=6 (16,7%)		$p=0,055$
dominant basal n=34	n=7 (20,6%)		$p=0,011$
doppelt positiv n=18	n=5 (27,8%)		$p=0,009$
Gesamtgruppe n=244	n=20 (8,2%)		

## 4. Ergebnisse

### 4.8. Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse für Hormonrezeptoren: Östrogenrezeptor- $\alpha$ und Progesteronrezeptor- $\alpha$

Für alle 244 Mammakarzinome konnte der Hormonrezeptorstatus (HR) anhand der immunhistochemischen Untersuchung des Östrogenrezeptors (ER) und des Progesteronrezeptors (PR) erhoben werden. Als negativ wurde zytoplasmatische und stromale Färbereaktion gewertet. Als fraglich hormonsensibel gelten Tumoren, deren Tumorzellkerne eine positive Färbereaktion in 1%-10% der Tumorzellkerne aufweisen, diese wurden als negativ gewertet. Als Hormonrezeptor positiv werden solche Mammakarzinome bezeichnet die entweder Immunreaktivität für den Östrogenrezeptor und / oder den Progesteronrezeptor in mindestens 10% der Tumorzellkerne aufwiesen.

**Tabelle10: Hormonrezeptorpositive Gewebeproben**

	negativ	positiv	
ER und / oder PR = HR	n=104 (42,6%)	n=140 (57,4%)	
ER	n=119 (48,8%)	n=125 (51,2%)	
PR	n=150 (61,5%)	n=94 (38,5%)	
ER und PR synchron	n=165 (67,6%)	n=79 (32,4%)	
ER ohne PR	n=198 (81,1%)	n=46 (18,9%)	
PR ohne ER	n=229 (93,9%)	n=15 (6,1%)	

## 4. Ergebnisse

### 4.9. Klinische Parameter und Pathomorphologie der Primärtumoren in Abhängigkeit von den Phänotypen

#### 4.9.1. Alter der Patientinnen bei Fernmetastasierung nach Phänotypen

Bei Fernmetastasierung waren Patientinnen mit myoepitheliale Phänotyp im Mittel 55,3 Jahre (27,7 - 77,3), mit basaloidem Phänotyp 56,9 Jahre (33,6 - 77,9), mit dominant basalem Phänotyp 53,3 Jahre (31,1 - 77,3) und mit CK5/6 & 14 doppelt positivem Phänotyp 52,1 Jahre (33,6 - 71,8) Jahre alt. Die Mittelwerte der Gruppen und der Gesamtgruppe unterschieden sich nicht signifikant voneinander. CK5/6 & 14 doppelt positiver Phänotyp tritt seltener in der Altersgruppe jünger 50 Jahre auf, die Beziehung war statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 11: Anteil von Patientinnen älter als 50 Jahre zum Zeitpunkt der Fernmetastase, absolute und relative Anteile sowie p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	> 50 a	p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
dominanter Phänotyp n=34	n=22 (64,7%)	p=0,332
basaloider Phänotyp n=36	n=25 (69,4%)	p=0,574
myepithelialer Phänotyp n=20	n=15 (75%)	p=0,382
CK5/6 & 14 doppelt positiver Phänotyp n=18	n=10 (55,6 %)	p=0,148
gesamt n=244	n=169 (69,3%)	

#### 4.9.2. Tumorlokalisierung nach Phänotypen

Die Karzinome traten 113 mal (46,3%) links, 104 mal (42,6%) rechts und 26 mal (10,6%) beidseits (synchron). Bei einem Tumor war die Seite unbekannt. Die Tumorlokalisierung zeigte bei basalen und myoepithelialen Phänotypen keine signifikanten Unterschiede zur Gesamtgruppe ( $p > 0,05$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.9.3. Histopathologische Klassifikation nach Phänotypen

220 (90,2%) der untersuchten Tumoren waren als invasiv duktales Karzinome (IDC), 21 (8,6%) als invasiv lobuläre Karzinome (ILC), 2 (0,8%) als gemischt invasiv duktales und lobuläre Karzinome und einer (0,4%) als muzinös-gemischt klassifiziert worden. Bei dominant basalem, myoepithelialen und CK5/6 CK14 doppelt positiven Phänotyp handelte es sich ausschließlich um IDC, beim dominanten Phänotyp war die Beziehung signifikant. Ein ILC wurde dem basaloiden Phänotyp zugeordnet, ansonsten bestand dieser Subtyp aus IDC.

**Tabelle 12: Zusammenhang zwischen histologischer Klassifikation und Phänotypen: absolute und relative Werte vom Phänotyp, p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	invasiv duktales Karzinom	andere	p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
dominanter Phänotyp n=34	n=34; (100%)	0	p=0,022
basaloider Phänotyp n=36	n=35; (97,2%)	1 (0,4%)	p=0,100
myoepithelialer Phänotyp n=20	n=20; (100%)	0	p=0,115
CK5/6+14 doppelt n=18	n=18; (100%)	0	p=0,144
Gesamtgruppe n=244	n=220; (90,2%)	24 (9,8%)	

## 4. Ergebnisse

### 4.9.4. Tumorgröße nach Phänotypen

Die Tumorgröße wurde zu einem vereinfachten pT-Stadium nach WHO zusammengefasst. T1a, T1b und T1c wurden zu T1 und T4a, T4b, T4c und T4d zu T4 zusammengefasst. CK5/6&14 doppelt positiver Phänotyp kam nicht bei T1 Tumoren vor. Aufgrund der niedrigen Erwartungswerte pro Zelle wurde der Chi<sup>2</sup>-Tests nicht durchgeführt.

**Tabelle 13: Zusammenhang von pT Stadium und Phänotypen, absolute und relative Werte**

	pT1	pT2	pT3	pT4
Dominanter Phänotyp n=33	n=3; (8,8%)	n=19; (55,9%)	n=3; (8,8%)	n=8; (23,5%)
basaloider Phänotyp n=33	n=4; (11,1%)	n=15; (41,7%)	n=7; (19,4%)	n=7; (19,4%)
myoepithelialer Phänotyp n=20	n=4; (20%)	n=10; (20%)	n=3; (15%)	n=3; (15%)
CK5/6+14 doppelt n=18	n=0; (0%)	n=10; (55,6%)	n=2; (11,1%)	n=6; (33,3%)
Gesamtgruppe n=230	n=42; (17,2%)	n=99; (40,6%)	n=32; (13,1%)	n=57; (23,4%)

pT Stadien zusammengefasst, unbekanntes pT bei n=14; (5,7%)

CK5/6 & 14 doppelt positive Tumoren waren signifikant ( $p=0,023$ ) seltener klein und lokal begrenzt (pT1) im Vergleich mit der Gesamtgruppe.

**Tabelle14: Zusammenhang zwischen pT1- Stadium und Phänotypen, absolute und relative Werte und p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	pT1	≥pT2	p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
Dominanter Phänotyp n=33	n=3; (9,1%)	n=30; (90,9%)	p=0,105
basaloider Phänotyp n=33	n=4; (12,1%)	n=33; (87,9%)	p=0,234
myoepithelialer Phänotyp n=20	n=4; (20%)	n=16; (80%)	p=0,515
CK5/6+14 doppelt n=18	n=0; (0%)	n=18; (100%)	p=0,023
Gesamtgruppe n=230	n=42; (17,2%)	n=99; (40,6%)	

## 4. Ergebnisse

### 4.9.5. Nodalstatus nach Phänotypen

Keiner der Phänotypen zeigte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine von der Gesamtgruppe signifikant abweichende Assoziation zur Tumorausbreitung in die axillären Lymphknoten.

**Tabelle 15: Lymphknotenstatus bei Erstdiagnose, unbekannt in n=29, absolute und relative Häufigkeiten und p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	Lymphknotenstatus negativ	Lymphknotenstatus positiv	p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
dominanter Phänotyp n=31	n=7 (22,6%)	n=24 (77,4%)	p=0,172
basaloider Phänotyp n=31	n=4 (12,9%)	n=27 (87,1%)	p=0,463
myoepithelialer Phänotyp n=19	n=3 (15,8%)	n=16 (84,2%)	p=0,610
CK5/6+14 doppelt n=17	n=2 (11,8%)	n=15 (88,2%)	p=0,584
Gesamtgruppe n=215	n=33 (15,3%)	n=182 (84,7%)	-

Für 175 der 182 Fälle, bei denen der Lymphknotenstatus positiv war, lagen Angaben zur Anzahl der betroffenen Lymphknoten, zusammengefasst in drei Gruppen (1-3 Lymphknoten, 4-9 Lymphknoten, 10 und mehr Lymphknoten) vor. Auch hier konnte keine signifikante Beziehung zu einem der Phänotypen gefunden werden.

**Tabelle 16: Anzahl betroffener Lymphknoten in drei Gruppen, Beziehung zu Phänotypen, absolute und relative Häufigkeiten und p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	1-3 Lymphknoten	4-9 Lymphknoten	10 und mehr Lymphknoten	p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
Dominanter Phänotyp n=21	n=7 (33,3%)	n=7 (33,3%)	n=7 (33,3%)	p=0,932
basaloider Phänotyp n=26	n=10 (38,5%)	n=9 (34,6%)	n=7 (26,9%)	p=0,541
myoepithelialer Phänotyp n=14	n=4 (28,6%)	n=3 (21,4%)	n=7 (50%)	nicht durchgeführt
CK5/6+14 doppelt n=14	n=6 (42,9%)	n=2 (14,3%)	n=6 (42,9%)	nicht durchgeführt
Gesamtgruppe n=244	n=58 (33,1%)	n=53 (30,3%)	n=64 (36,6%)	

## 4. Ergebnisse

### 4.9.6. Histopathologisches Tumorgrading nach Phänotypen

Dominant basaler, CK5/6 & 14 doppelt positiver, myoepithelialer und basaloider Phänotyp waren stark mit hohem histologischem Grading assoziiert. Bei dominant basalem und CK5/6 & 14 positiven Phänotyp war das gehäufte Auftreten von Grad 3 Tumoren statistisch signifikant (79,4% vs. 56,1%;  $p=0,002$  und 88,9% vs 56,1%;  $p=0,002$ ).

**Tabelle 17: Zusammenhang zwischen histologischem Grading und Phänotypen, absolute und relative Werte, Grade 1 (n=3) und Grade 2(n=104) zusammengefasst, p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	Grad 1 oder 2	Grad 3	p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
Dominanter Phänotyp n=34	n=7 (20,6%)	n=27 (79,4%)	p=0,002
basaloider Phänotyp n=36	n=12 (33,3%)	n=24 (66,7%)	p=0,115
myoepithelialer Phänotyp n=20	n=5 (5,0%)	n=15 (75,0%)	p=0,060
CK5/6+14 doppelt n=18	n=2 (11,1%)	n=16 (88,9%)	p=0,002
Gesamtgruppe n=244	n=107 (43,9%)	n=137 (56,1%)	

## 4. Ergebnisse

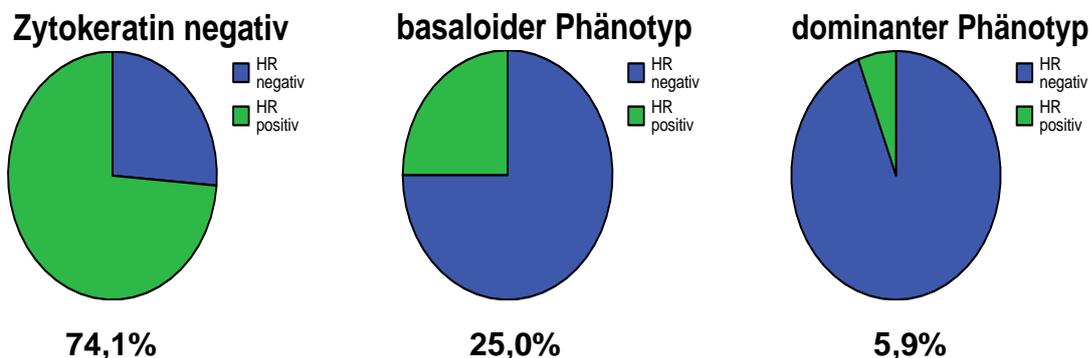
### 4.9.7. Hormonrezeptorstatus nach Phänotypen

Die Phänotypen waren überwiegend Hormonrezeptor negativ, am stärksten ausgeprägt bei dominant basalem und CK5/6 & 14 doppelt positivem Phänotyp ( $p=0,000$ ). Mit zunehmendem Anteil an basalen Zytokeratinen nahm der Anteil an Hormonrezeptor positiven Fällen ab.

**Tabelle 18: Zusammenhang zwischen Hormonrezeptorstatus und Phänotypen, absolute und relative Häufigkeiten und p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	Hormorezeptorstatus negativ	Hormonrezeptorstatus positiv	p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
Dominanter Phänotyp n=34	n=32 (94,1%)	n=2 (5,9%)	p=0,000
basaloider Phänotyp n=36	n=27 (75,0%)	n=9 (25%)	p=0,000
myoepithelialer Phänotyp n=20	n=15 (75,0%)	n=5 (25,0%)	p=0,002
CK5/6+14 doppelt n=18	n=16 (88,9%)	n=2 (11,1%)	p=0,000
Gesamtgruppe n=244	n=104 (42,6%)	n=140 (57,4%)	

Mit steigendem Anteil der basalen Zytokeratine nahm die Anzahl der Hormonrezeptor positiven Fälle ab (25,0% vs. 5,9%;  $p=0,029$ ). Bei den Fällen, die als Zytokeratin negativ gewertet worden waren, (n=174) betrug der Anteil der Hormonrezeptor positiven Tumoren 74,1%.



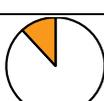
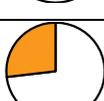
**Abbildung 11: Anteil Hormonrezeptor positiver Fälle in Abhängigkeit vom Anteil der basalen Zytokeratine**

## 4. Ergebnisse

### 4.9.8. HER-2/*neu* Status nach Phänotypen

Basaloider und myoepithelialer Phänotyp waren häufiger als in der Gesamtgruppe HER-2/*neu* positiv, der Unterschied war statistisch nicht signifikant. CK5/6 & 14 doppelt positiver Phänotyp war nur 2 mal HER-2/*neu* positiv, der Unterschied zur Gesamtgruppe war statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 19: Anteil der HER-2/*neu* -positiven Fälle an den Phänotypen, absolute und relative Werte und p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	Anteil HER-2/ <i>neu</i> positiver Fälle (orange)		p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
dominanter Phänotyp n=33	n=8 (23,5%)		p=0,851
basaloider Phänotyp n=36	n=13 (36,1%)		p=0,323
myoepithelialer Phänotyp n=20	n=7 (35%)		p=0,626
CK5/6 & 14 doppelt positiver Phänotyp n=18	n=2 (11,1%)		p=0,299
Gesamtgruppe n=243	n=64 (26,2%)		

Zwischen dominant basalem und basaloidem Phänotyp war kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils HER-2/*neu* -positiver Fälle zu finden (23,5% vs. 36,1%; p=0,188).

## 4. Ergebnisse

### 4.9.10 Dauer des metastasenfreen Intervalls nach Phänotypen

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lagen in 101 Fällen Fernmetastasen vor. Die metastasenfreen Zeiten wurden in zwei Intervallen zusammengefasst: weniger und mehr als 24 Monate zwischen Primärtherapie und erster Evidenz für Fernmetastasen. CK5/6 & 14 doppelt positiver und basaloider Phänotyp waren öfter mit einem kurzen Intervall von weniger als 24 Monaten assoziiert, der Zusammenhang war statistisch nicht signifikant. Der CK5/6&14 doppelt positive Phänotyp war seltener primär metastasiert, der Zusammenhang erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

**Tabelle 20: Dauer des metastasenfreen Intervalls nach Phänotypen, absolute und relative Häufigkeiten und p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests**

	primär metastasiert	metastasenfrees Intervall <24 Monate	metastasenfrees Intervall > 24 Monate	p-Wert des Chi <sup>2</sup> -Tests
Dominanter Phänotyp n=33	n=12 (35,3%)	n=11 (32,4%)	n=11 (32,4%)	p=0,473
basaloider Phänotyp n=36	n=13 (36,1%)	n=13 (36,1%)	n=10 (27,8%)	p=0,191
myoepithelialer Phänotyp n=20	n=6 (30%)	n=6 (30%)	n=8 (40%)	p=0,553
CK5/6+14 doppelt n=18	n=4 (22,2%)	n=8 (44,4%)	n=6 (33,3%)	p=0,081
Gesamtgruppe n=244	n=101 (41,4%)	n=59 (24,2%)	n=84 (34,4%)	

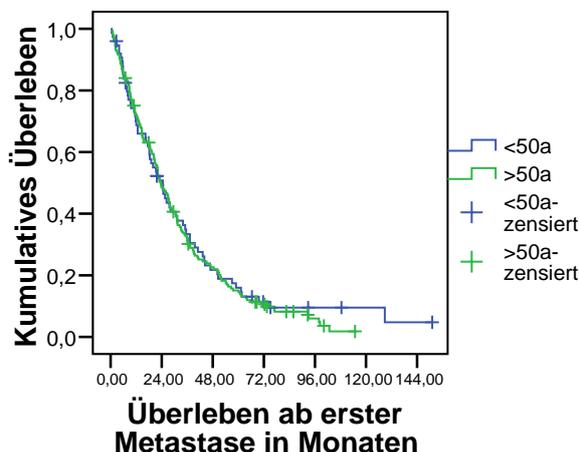
## 4. Ergebnisse

### 4.10 Überlebensanalyse

Das Überleben nach erster Metastase betrug zwischen 5 Tagen und 151,1 Monaten (Median 23,8 Monate; 95% Konfidenzintervall 20,3-27,3). Die 1 Jahres Überlebensrate betrug 71,7% (kein Fall lost to follow up).

#### 4.10.1. Univariate Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier für etablierte Prognosefaktoren

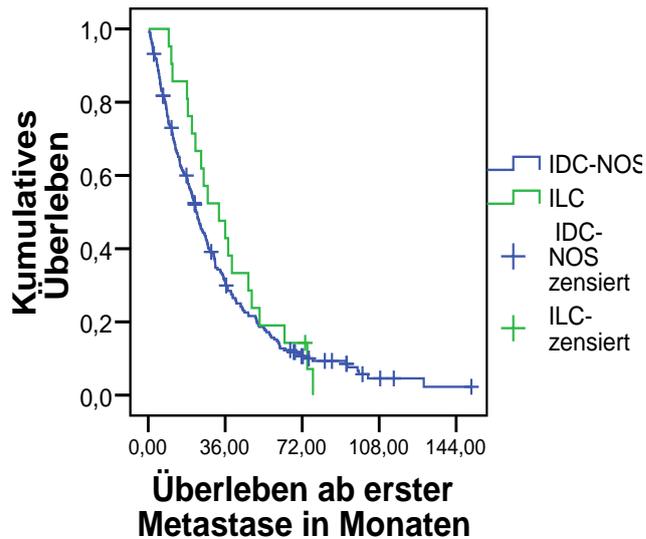
Die Überlebensverteilungen der über 50-Jährigen (zum Zeitpunkt der ersten Metastase) war nicht verschieden im Vergleich mit den unter 50-Jährigen. Das mediane Überleben für über 50 jährige (n=169) betrug 23,6 Monate (95% Konfidenzintervall 19,7-27,4) und für unter 50-Jährige (n=75) 24,6 Monate (95% Konfidenzintervall 18,0-31,1),  $p=0,672$ .



#### Abbildung 12: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit vom Patiententalter bei erster Metastase

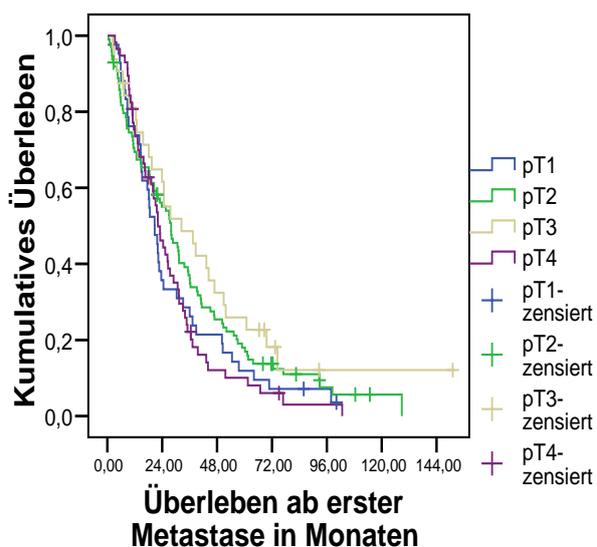
Aufgrund der geringen Fallzahl für muzinöse Karzinome (n=1) und invasiv duktal/lobulär gemischten Karzinome (n=2) wurde die Überlebensanalyse in Abhängigkeit von der histopathologischen Klassifikation nur für invasiv duktale (n=220) und invasiv lobuläre Karzinome (n=21) durchgeführt. Das mediane Überleben für invasiv duktale Karzinome betrug 22,7 Monate (19,4-25,9 95% Konfidenzintervall) und für invasiv lobuläre Karzinome 33,1 Monate (18,0-48,1 95% Konfidenzintervall). Der Log Rang Test auf Unterschiede der Überlebenskurven war nicht signifikant mit  $p=0,405$ .

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 13: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der histopathologischen Klassifikation**

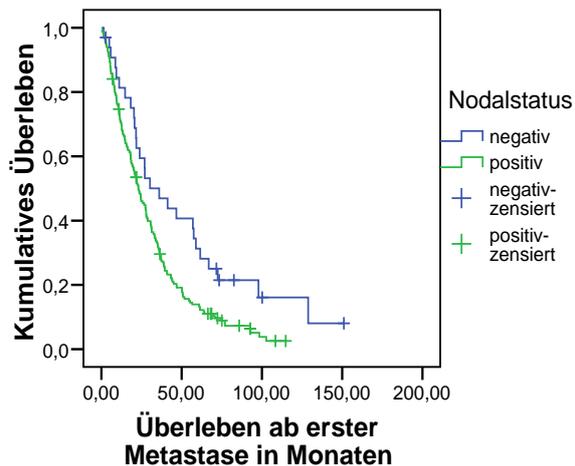
Patientinnen mit T1 Tumoren (n=42) überlebten im Median 20,7 Monate (16,5-24,8 95% Konfidenzintervall), mit T2 Tumoren (n=99) 27,9 Monate (21,4-34,3 95% Konfidenzintervall), mit T3 Tumoren (n=32) 32,4 Monate (13,5-51,3 95% Konfidenzintervall) und mit T4 Tumoren (n=57) 22,1 Monate (18,1-26,0 95% Konfidenzintervall). Die Überlebenskurven unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,128$ ).



**Abbildung 14: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der lokalen Tumorausbreitung (pT)**

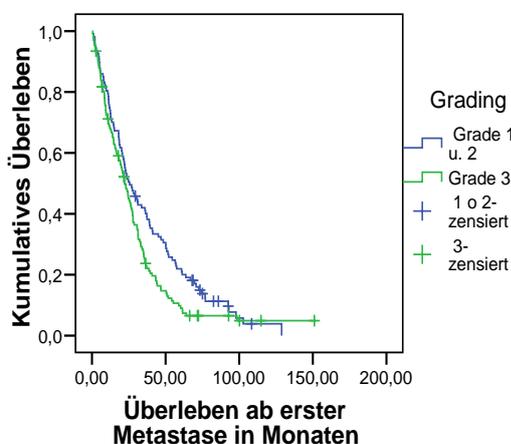
#### 4. Ergebnisse

Patientinnen mit Tumorbefall der axillären Lymphknoten (n=182) hatten ein medianes Überleben von 23,1 Monaten (18,7-27,5 95% Konfidenzintervall) und Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus (n=33) ein medianes Überleben von 36,0 Monaten (16,3-55,6 95% Konfidenzintervall). Der Log Rang Test auf Unterschiede der Überlebenskurven war signifikant ( $p=0,005$ ).



**Abbildung 14: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit vom axillären Lymphknotenstatus**

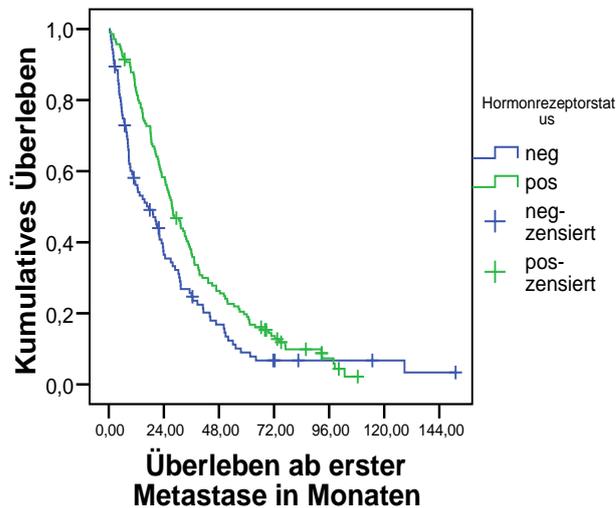
Gut (n=3) und mäßig differenzierte (n=104) Mammakarzinome wurden zu einer Gruppe zusammengefasst (n=107). Der Median der Überlebenszeit betrug für diese Gruppe 25,6 Monate (18,2-33,9 95% Konfidenzintervall). Schlecht differenzierte, Grad 3 Karzinome, (n=137) hatten eine kürzere mediane Überlebenszeit von 22,1 Monaten (17,9-26,3 95% Konfidenzintervall). Die Überlebenskurven unterschieden sich signifikant ( $p=0,034$ ) im Log Rang Test.



**Abbildung 15: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit vom Tumorgrading**

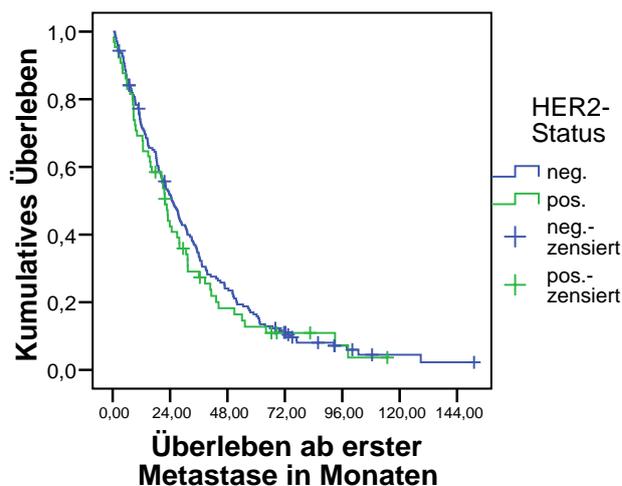
#### 4. Ergebnisse

Das mediane Überleben nach erster Metastase bei Hormonrezeptor negativen Primärtumoren (n=104) betrug 17,5 Monate (10,0-25,0 95% Konfidenzintervall) und bei Hormonrezeptor positiven Primärtumoren (n=140) 27,6 Monate (23,0-32,2 95% Konfidenzintervall). Der Log Rang Test auf Unterschiede der Überlebenskurven war signifikant ( $p=0,005$ ).



**Abbildung 16: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus**

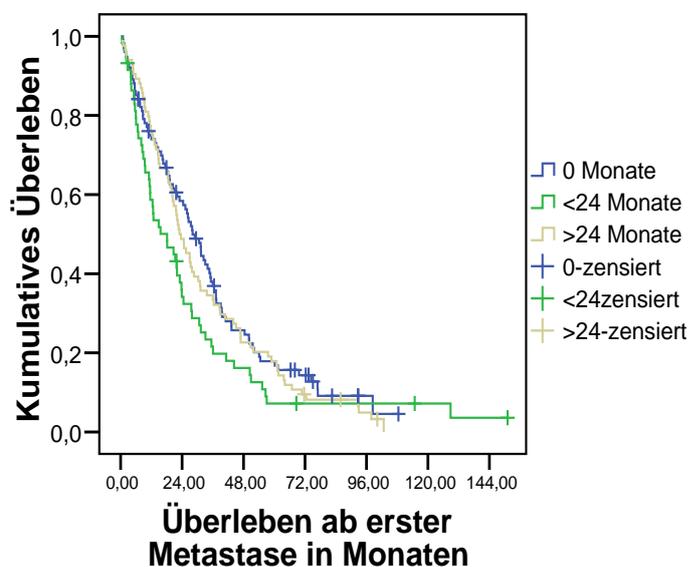
HER-2/*neu* - positive Fälle hatten ein medianes OASM von 21,8 Monaten (18,9-24,6 95% Konfidenzintervall) und unterschieden sich nicht signifikant ( $p=0,414$ ) von HER-2/*neu* - negativen Fällen, welche ein medianes OASM von 25,3 Monaten (21,2-29,4 95% Konfidenzintervall) aufwiesen.



**Abbildung 17: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit vom HER-2/*neu* Status**

#### 4. Ergebnisse

Die Zeitdauer zwischen Primärtherapie und dem Datum der ersten Evidenz einer Fernmetastase wurde in drei Abschnitte eingeteilt. Es zeigte sich für primär metastasierte Fälle (n=101) ein medianes Überleben von 28,1 Monaten (23,0-33,2 95% Konfidenzintervall), für ein Zeitintervall von kürzer als 24 Monaten ab Primärtherapie (n=59) ein medianes Überleben von 18,2 Monaten (8,3-28,0 95% Konfidenzintervall) und für ein Zeitintervall von länger als 24 Monate (n=84) ein medianes Überleben von 23,0 Monaten (18,2-27,8 95% Konfidenzintervall). Die Unterschiede der Überlebensverteilungen waren im Log Rang Test nicht signifikant mit  $p=0,147$ .



**Abbildung18: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der Zeitdauer des Krankheitsfreien Intervalls ab Primärtherapie**

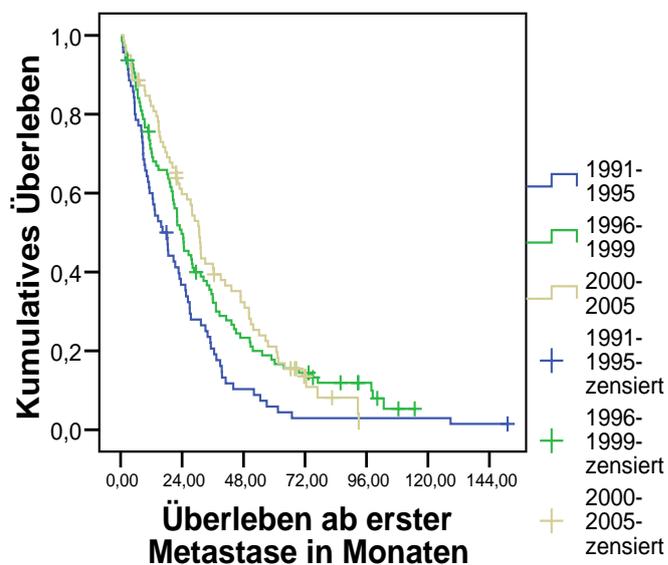
#### 1.6. Überlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom Startjahr der palliativen Chemotherapie

Der Beginn der palliativen Chemotherapie lag im Zeitraum zwischen den Jahren 1991 und 2005. Bei der Einteilung dieses Zeitabschnitts in drei kalendarische Intervalle zeigte sich ein kürzeres medianes OASM für Patientinnen, deren palliative Chemotherapie zwischen 1991 und 1995 begonnen hatte verglichen mit Patientinnen deren palliative Chemotherapie in den Zeiträumen zwischen 1996 und 1999 oder 2000 und 2005 begann. Der Unterschied der Überlebenskurven war signifikant im Log Rang Test ( $p=0,001$ ).

#### 4. Ergebnisse

**Tabelle 21: mediane Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Startjahr der palliativen Chemotherapie**

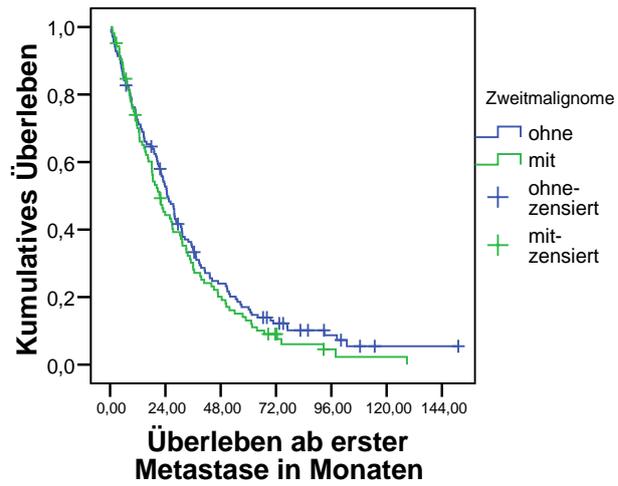
Startjahr der palliativen Chemotherapie	Median der Überlebenszeit / 95% Konfidenzintervall
1991-1995 n=70	16,4 Monate 10,4-21,8
1996-1999 n=95	23,8 Monate 19,5-28,1
2000-2005 n=79	30,7 Monate 27,1-34,3



**Abbildung 19: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit vom Startjahr der palliativen Chemotherapie**

Um die Auswirkungen von kontralateralen Karzinomen, Lokalrezidiven und Zweitmalignomen auf die Prognose der Patientinnen nach der ersten Metastase zu überprüfen, wurde die Überlebensanalyse im Vergleich zwischen einer Gruppe, in welcher es sich bei dem Primärtumor um die einzige Krebserkrankung gehandelt hatte (n=139) und einer Gruppe in der kontralaterale Mammakarzinome, Lokalrezidive und Zweitmalignome aufgetreten waren (n=105) durchgeführt. Der Median der Überlebenszeit für die erste Gruppe betrug 24,7 Monate (21,0-28,5 95% Konfidenzintervall) und für die zweite Gruppe 21,7 Monate (17,1-26,5 95% Konfidenzintervall). Der Log Rang Test auf Gleichheit der Überlebensverteilung war nicht signifikant (p= 0,218).

#### 4. Ergebnisse

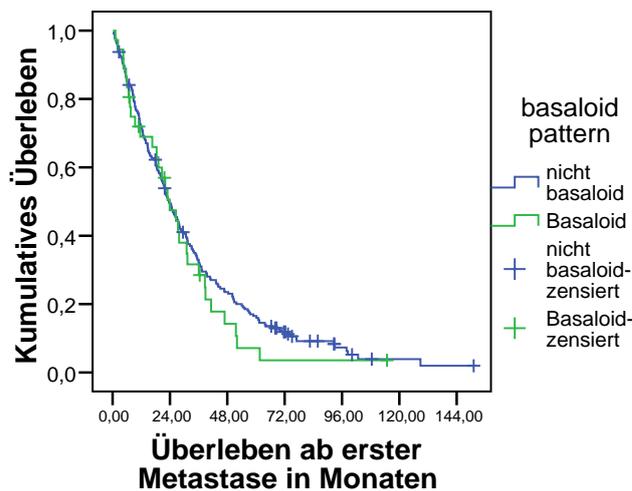


**Abbildung 20: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier für Gruppen mit und ohne kontralaterale Karzinomen, Lokalrezidive und Zweitmalignome**

## 4. Ergebnisse

### 4.10.2. Univariate Überlebensanalyse nach Kaplan Meier nach Phänotypen

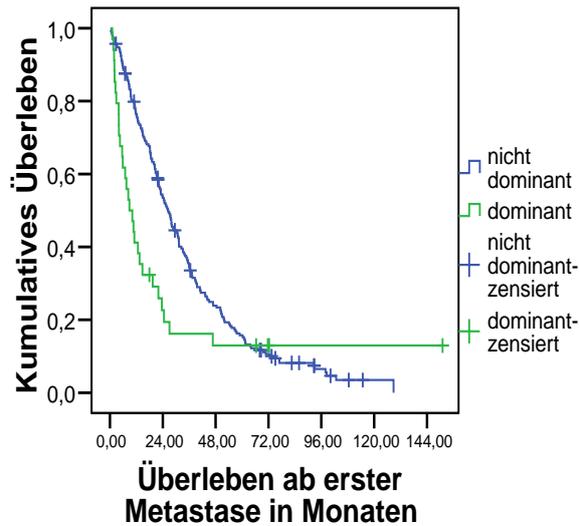
Die Überlebenskurven für den basaloiden (n=36) und nicht-basaloiden Phänotyp (n=208) unterschieden sich nicht signifikant (p=0,449). Das mediane Überleben betrug dabei 23,9 Monate (16,0-31,8 95% Konfidenzintervall) bzw. 23,6 Monate (19,7-27,5 95% Konfidenzintervall).



**Abbildung 21: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von basaloidem und nicht-basaloiden Phänotyp**

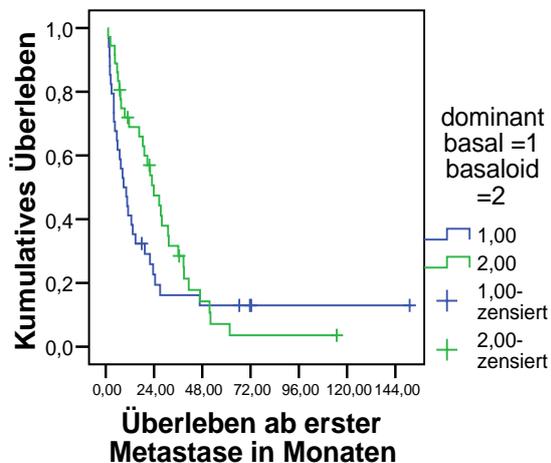
Die mediane Überlebenszeit nach Diagnose der ersten Metastase betrug bei dominant basalem Phänotyp (n=34) 8,8 Monate (4,3-13,4 95% Konfidenzintervall) und bei nicht- dominant basalem Phänotyp n=(210) 26,3 Monate (22,5-30,0 95% Konfidenzintervall). Der Log Rank Test auf Unterschiede der Überlebenskurven war signifikant mit p=0,018. Nach 2 Jahren, der medianen Überlebenszeit der Gesamtgruppe, lebten nur noch 20 % der Patientinnen mit dominant basalem Phänotyp, diese 20 % überlebten dann jedoch auffallend lang. Die Patientin mit dem längsten beobachteten OASM (151 Monate) der gesamten Studie gehörte dem dominant basalen Phänotyp an.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 22: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von dominant basalem oder nicht dominant basalem Phänotyp**

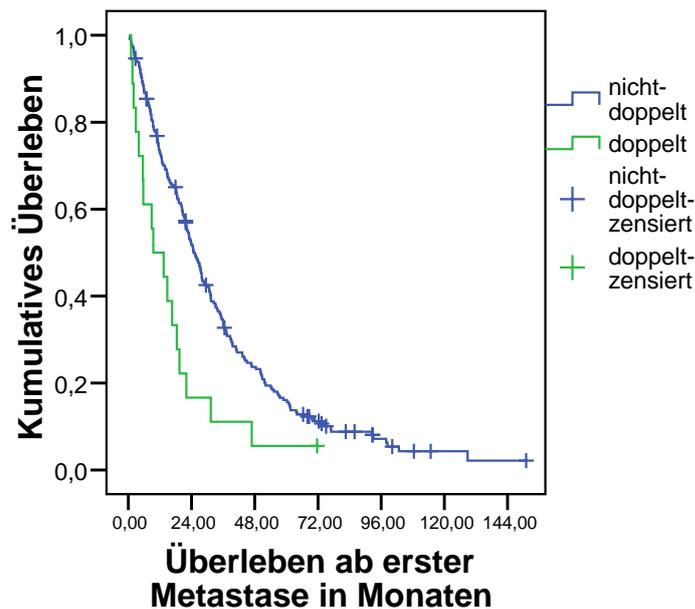
Der direkte Vergleich zwischen dominant basalem und basaloidem Phänotyp konnte trotz der deutlichen Tendenz zu kürzerem OASM die Unterschiede in den Überlebensverteilungen im Log Rang Test nicht als signifikant erkennen ( $p=0,172$ ).



**Abbildung 23: Überlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit von dominant basalen vs. basaloiden Phänotyp**

#### 4. Ergebnisse

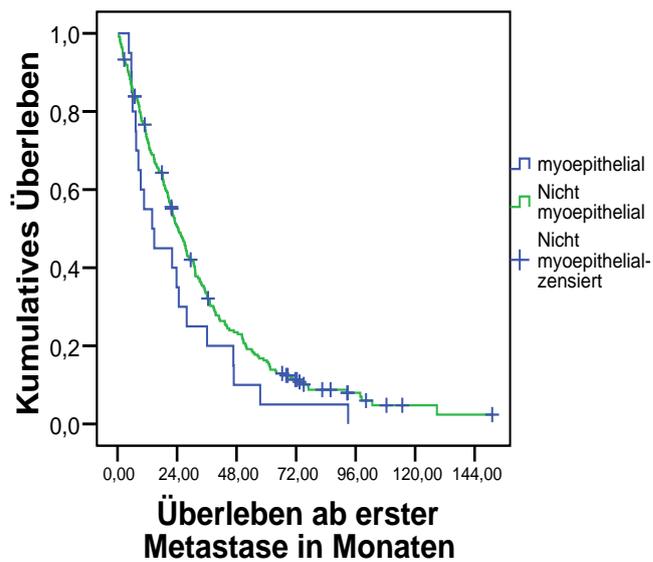
Die mediane Überlebenszeit nach Diagnose der ersten Metastase betrug bei CK5/6 & 14 doppelt positiven Tumoren (n=18) 9,4 Monate (0,0-18,9 95% Konfidenzintervall) und bei nicht-CK5/6 & 14 doppelt positiven Primärtumoren (n=226) 24,7 Monate (21,3-28,2 95% Konfidenzintervall). Der Log Rang Test auf Unterschiede der Überlebenskurven war signifikant mit  $p=0,003$ .



**Abbildung 24: Überlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom CK5/6 & 14 doppelt positiven Phänotyp**

#### 4. Ergebnisse

Patientinnen mit Primärtumoren vom myoepithelialen Phänotyp (n=20) hatten ein medianes Überleben nach dem Zeitpunkt der ersten Metastase von 13,9 Monaten (4,9 -23,0; 95% Konfidenzintervall). Für nicht-myoepitheliale Tumoren (n=144) betrug das mediane Überleben 24,4 Monate (20,8-28,0 95% Konfidenzintervall). Obwohl das mediane Überleben für myoepitheliale Tumoren doch deutlich kürzer war, erreichte der Log Rang Test auf Unterschiede der Überlebenskurven keine statistische Signifikanz ( $p=0,094$ ).



**Abbildung 25: Überlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom myoepithelialen und nicht-myoepithelialen Phänotyp**

## 4. Ergebnisse

### 4.10.3 Multivariate Überlebensanalyse mit der Cox Regressionsanalyse

Um die Einflussvariablen auf das OASM gleichzeitig untersuchen zu können, wurde eine Regressionsanalyse nach Cox durchgeführt. Kategoriale Variablen waren: histologische Klassifikation, Tumorgröße nach pT-Stadium, Nodalstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, HER-2/*neu* -Status, Patientenalter bei erster Metastase, Zeitdauer des metastasenfrenen Intervalls, Startjahr der palliativen Chemotherapie, basaler Phänotyp, basaloider Phänotyp, dominant basaler Phänotyp, myoepithelialer Phänotyp und CK5/6 & 14 doppelt positiver Phänotyp. Von 244 Fällen wurden 212 Fälle, abzüglich HER-2/*neu* -unbekannt (fehlendes Material), pTX und pNX analysiert. Verwendet wurde die Methode LR Rückwärts mit schrittweisem Fallausschluss (Ausschluss bei  $p > 0,1$ ), die Tabelle zeigt die signifikanten Kategorien an. Der Ausdruck der Gesamtanalyse findet sich im Anhang.

**Tabelle 22: Ergebnisse der Cox Regressionsanalyse**

	Signifikanz	Exp(B)	95% Konfidenzintervall für Exp(B)
Nodal positiv vs Nodal negativ	0,000	2,756 1,0	1,747 – 4,349
HR-negativ vs HR-positiv	0,023	1,472 1,0	1,056 – 2,051
CK5/6&14 doppelt positiv vs. CK5/6&14 doppelt negativ	0,032	1,830 1,0	1,055 – 3,174
1991-1995 vs. 2000-2005	0,000	2,333 1,0	1,589 – 3,425
<24 Monate vs. primär metastasiert	0,049	1,508 1,0	1,002 – 2,270
>24 Monate vs. primär metastasiert	0,003	1,713 1,0	1,204 – 2,435

Basales Immunprofil per se sowie deren Unterteilung in Gruppen mit dominant basaler oder basaloider Zytokeratinexpression hatte genauso wenig wie myoepitheliales Immunprofil einen unabhängigen Vorhersagewert in der multivariaten Analyse. CK5/6 & 14 doppelt positiver Phänotyp zeigte sich neben positivem Nodalstatus, negativem Hormonrezeptorstatus, Startjahr der Rekrutierung zur palliativen Chemotherapie zwischen 1991 und 1995 und dem Krankheitsfreien Intervall als signifikanter Prognosefaktor für kürzeres OASM.

## 5.Diskussion

Der Krankheitsverlauf des metastasierten Mammakarzinoms ist außerordentlich heterogen (Cha et al. 1999). In dieser Situation benötigt der behandelnde Arzt Entscheidungshilfen die die Notwendigkeit und prädiktive Faktoren welche die Wirksamkeit einer palliativen Chemotherapie anzeigen (Heinemann et al. 2005). Über die Ansprechraten der Tumoren vom sogenannten basalen Subtyp in der palliativen Situation existieren bisher keine Veröffentlichungen.

Zur Untersuchung der Prognose von Tumoren der Brust mit basaler / myoepithelialer Differenzierung werden bisher verschiedene Kombinationen von immunhistochemischen Markern und molekularbiologischen Techniken angewendet. Verwendet werden CK14 alleine (Fulford et al. 2006, Jones et al. 2004), CK4, CK14 und / oder 17 (Malzahn et al 1998), eine Mischung aus CK5/14 und p63 in einem Untersuchungsgang (Laakso et al 2006; Jumppanen et al 2007), CK 5/6 und / oder CK14 positiv (Rakha et al. 2006) oder CK5/6 und / oder CK17 positiv (Potemski et al. 2006; van de Rijn et al. 2002). Ebenso werden verschiedene Kombinationen gleichzeitig verwendet und miteinander verglichen (Tischkowitz et al. 2007). Bei Genexpressionsanalysen mit cDNA Microarrays wird die mRNA Expression von 476 Genen bestimmt und über eine Clusteranalyse 5 Subgruppen gebildet, von denen der basale Subtyp ein Cluster mit starker Expression der RNA von CK5 und CK17 sowie fehlender Expression von *HER-2/neu* und *ER* (Sorlie et al. 2001) ist. Die Expression der mRNA für basale Zytokeratine ist dabei nicht spezifisch für den basalen Subtyp sondern wird auch bei anderen Subtypen gefunden. Diese Methode wird von mehreren Arbeitsgruppen angewandt (Sotiriou et al. 2003, Rouzier et al. 2005). Mit der Kombination der immunhistochemischen Marker *HER-2/neu* und *ER* negativ und CK5/6 und / oder EGFR positiv ist es möglich, den basalen Subtyp der Genexpressionsanalyse mit 76% Sensitivität und 100% Spezifität zu erkennen (Nielsen et al. 2004). Diese Definition des basalen Subtyps wird von weiteren Arbeitsgruppen aufgegriffen (Rodriguez-Pinilla et al. 2006; Conforti et al. 2007) und noch erweitert indem positive IHC für CK5, CK14, EGFR und / oder c-kit mit negativem *ER* und *HER-2/neu* den basalen Subtype definieren (Kim et al 2006). Der basale Subtyp wird auch mit „tripel negativ“ gleichgesetzt (Carey et al. 2007). Mit tripel negativ werden Mammakarzinome bezeichnet, die sich durch fehlende Expression von *HER-2/neu*, *ER* und *PR* auszeichnen. Von drei Autoren werden zusätzlich Untergruppen mit vorwiegend negativer oder überwiegend positiver

## 5. Diskussion

Expression der basalen Zytokeratine unterschieden (Rakha et al. 2006; Laakso et al. 2006; Fulford et al. 2007). Die Abgrenzung eines myoepithelialen Immunprofils wird durch den Nachweis von  $\alpha$ -SMA und / oder p63 geführt (Rakha et al. 2006).

Für die vorliegende Untersuchung wurden immunhistochemische Methoden zur Detektion von CK5/6, CK14, SMA und p63 verwendet. Eine Subgruppierung die sich auf den negativen Ausfall einer immunhistochemischen Untersuchung beruft, wie das Konzept des tripel negativen Subtyps, ist problematisch da auch technische Gründe für eine negative Färbereaktion ursächlich sein könnten (Rakha et al. 2007). Immunhistochemische Untersuchungen sind vergleichsweise kostengünstig, die Durchführung automatisiert, die Auswertung ist schnell erlernbar und die Fehlerquellen sind abgrenzbar. Bei den uns zur Verfügung stehenden Gewebeproben handelt es sich um formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes (PFPE) Archivmaterial. Die Verwendung von solchem Archivmaterial ist eine bewährte Methode zur retrospektiven Analyse größerer Fallzahlen mit immunhistochemischen Methoden. Moderne Techniken des hitzeinduzierten *antigen retrieval* ermöglichen die Wiedergewinnung der Immunreaktivität vieler Antigene, deren Bestimmung früher nur an Gefrierschnitten möglich war (Shi et al. 1997), die Limitationen dieser Methode dürfen jedoch nicht außer Acht gelassen werden. Clarke et al. (2005) verweisen auf verminderte Immunreaktivität für CK8/18 an PFPE im Vergleich mit Gefrierschnitten. Unterschiedliche präanalytische Handhabung von Gewebeproben (Dauer der Fixation, Mengenverhältnis von Fixativ zu Gewebe) hat Auswirkungen auf die Immunreaktivität vieler Antigene, im klinischen Alltag ist eine Standardisierung kaum möglich (Leong et al. 2004). Der Wechsel auf ein anderes Fixativ im Jahr 1993 im Institut (gewechselt wurde von 10% zu 4% gepufferter Formalinlösung) trug weiter dazu bei, dass die untersuchten Proben sich in ihrer Immunreaktivität unterscheiden könnten, durch die verwendete interne Positivkontrolle kann jedoch ein totaler Verlust der Immunreaktivität ausgeschlossen werden. Molekularbiologische Methoden sind für retrospektive Analysen an Archivmaterial nur eingeschränkt anwendbar, die Analyse von Genamplifikationen mittels der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) gehört in den Alltag eines pathologischen Labors und ist auch an PFPE Material möglich. Genexpressionsanalysen detektieren mRNA und setzen die Verfügbarkeit von größerer Mengen sofort nach der Probenentnahme tiefgefrorener Gewebeproben

## 5. Diskussion

voraus (Penland et al. 2007) und sind sehr kostenaufwändig (Fadare et al. 2007). Die Reliabilität dieser Technik ist noch nicht abschließend geklärt.

Für diese Untersuchung wurden Fälle mit vorwiegend negativer und überwiegend positiver Färbereaktion zu Gruppen zusammengefasst, dafür wurde der Anteil immunhistochemisch positiver Tumorzellen semiquantitativ geschätzt. Dieses Auswertungskriterium beeinflusst das Untersuchungsergebnis gewiss subjektiv (Walker 2006). Das zeigt sich zum Beispiel in der Auswertung von CK5/6, in welcher die Kategorie 90% unbesetzt bleibt und die Kategorie 50% im Vergleich mit den benachbarten Kategorien überzufällig häufiger ermittelt worden war. Im Vergleich mit einer bildanalytischen Auswertung, wie sie Laakso et al. (2006) für die Quantifizierung von basalem Zytokeratin exprimierende Tumorzellen angewandt hatten, wirkt die semiquantitative Auswertung ungenauer. Da präanalytische Einflussfaktoren auf die Immunreaktivität nur sehr schwer zu kontrollieren sind (Leong et al. 2004) besteht aber die Gefahr, dass durch „zu genaue“ Auswertung eine Exaktheit vorgetäuscht wird, die nicht existiert.

Die prognostische Bedeutung des basalen und myoepithelialen Immunprofils des metastasierten Mammakarzinoms wurde Anhand einer Gruppe von Patientinnen untersucht, die eine palliative Chemotherapie erhalten hatten. Die Kohorte besteht aus einem Teil (51,0%) aller Patientinnen, die an einer einzigen Klinik (Frauenklinik Großhadern der LMU München) zwischen 1991 und 2005 eine palliative Chemotherapie erhalten hatten und von denen Material des Primärtumors im Pathologischen Institut archiviert worden war. Signifikant mehr Patientinnen in dieser Kohorte haben im Vergleich mit der Gesamtgruppe bei Erstdiagnose eine lokal weit fortgeschrittene (pT3 oder pT4), Nodal positive oder primär metastasierte Erkrankung. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Patientinnen mit großen Tumoren und Metastasen zur Erstbehandlung öfter unmittelbar ein Krankenhaus der Maximalversorgung (wie das Klinikum Großhadern) aufgesucht hatten. Das mediane Gesamtüberleben der untersuchten Fälle nach erster Metastase (OASM) beträgt 23,8 Monate. Daten des Tumorregisters München ergeben für die Jahre 1978 bis 2006 ein vergleichbares medianes OASM von 22 Monaten für 6365 Patientinnen (Tumorregister München 2007).

Die verwendeten Therapiestrategien sind außerordentlich heterogen. Neben unterschiedlichsten systemischen Chemotherapien erhielten die Patientinnen

## 5. Diskussion

endokrine Therapien, lokoregionäre Chemotherapien, Immuntherapien, Strahlentherapien, Metastasen Chirurgie und supportive Maßnahmen. Darin liegt die größte Schwäche dieser Studie, retrospektive Studien tragen die Gefahr eines Behandlungs-Bias in sich. Die gravierendste therapeutische Innovation dürfte die seit 1996 beginnende Behandlung mit Trastuzumab sein.

Der Einfluss von bilateralen (synchronen und metachronen) Mammakarzinomen, Lokalrezidiven und Zweitmalignomen auf den Erkrankungsverlauf und das OASM ist schwer abzuschätzen, so dass die Frage auftritt ob diese Fälle (n=105) überhaupt in die Studie einbezogen werden sollen. Grundsätzlich entscheidend für die Prognose ist das Tumorstadium, das heißt die Größe des lokalen Befundes und das Ausmaß des Lymphknotenbefalls, unabhängig vom ein- oder beidseitigen Befall. So wird das bilaterale Mammakarzinom so behandelt wie der prognostisch ungünstigste Tumor der Patientin (Gabka et al. 2005). Das Lokalrezidiv gilt, solange die Erkrankung noch nicht generalisiert ist, als heilbar. Tritt es jedoch nach adjuvanter Chemotherapie sowie lokaler Strahlentherapie auf ist von einer aggressiven, therapieresistenten Erkrankung auszugehen (Kaufmann et al. 2006). Therapiedaten sind uns jedoch nicht bekannt. Weiterhin ist zu bedenken, dass auch das Lokalrezidiv metastatisches Potential hat, und so möglicherweise ein anderer Phänotyp wie der von uns vermutete die Progression bewirkt. Nur der geringere Anteil der Fälle mit metachronen Mammakarzinomen und Lokalrezidiven (35,0% bzw. 29,5%) liegt jedoch vor dem Zeitpunkt der Fernmetastasierung. Patientinnen mit offensichtlich um die Todesursache konkurrierenden Zweitmalignomen sind primär nicht in die Studie eingeschlossen. Es wurde eine Kaplan-Meier Analyse mit einer Gruppe aus bilateralen Karzinomen, Lokalrezidiven und Zweitmalignomen durchgeführt. Es zeigt sich für diese ein 3 Monate kürzeres medianes OASM (24,7 vs 21,7 Monate;  $p=0,218$ ). Die Überlebensverteilungen unterscheiden sich nicht signifikant und es erscheint gerechtfertigt diese Fälle nicht auszuschließen.

Die Überlebensverteilungen in drei verschiedenen kalendarischen Intervallen (1991 - 1995; 1996 -1999; 2000 - 2005) unterscheiden sich signifikant voneinander. Dabei wird ein zunehmend längeres OASM beobachtet. Die Studienkohorte besteht aus einer Teilmenge der vom Tumorregister München erfassten Patientinnen, und so stehen diese Ergebnisse im Kontrast zu den Daten des Tumorregisters München,

## 5. Diskussion

welche zwischen den kalendarischen Intervallen 1990-1994 und 1995-2000 keine Verbesserung der Überlebenszeiten feststellen (Schlesinger-Raab et al. 2005). Zur genaueren Interpretation dieses Befundes wären die Behandlungsdaten der von uns untersuchten Gruppe notwendig, die uns jedoch nicht zur Verfügung stehen. Die bedeutendsten Neuerungen der Therapiestrategien in dem beobachteten Zeitraum seien in der Folge aufgeführt: erstens vermehrter Einsatz von Taxanen und Taxanhaltigen Kombinationstherapien, zweitens die Einführung von Trastuzumab in der Behandlung des HER-2/*neu* positiven Mammakarzinoms in Studien ab 1996 und drittens die ab Mitte der neunziger Jahre einsetzende großzügigere Indikationsstellung zur Gabe von Bisphosphonaten bei ossären Metastasen. Die Literatur zeigt, dass Taxane in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms durchaus einen verlängernden Einfluß auf die Überlebenszeit haben können (Colozza et al. 2007). Die lebensverlängernde Wirkung von Trastuzumab als Mono- und in Kombinationstherapie wird in zahlreichen Studien belegt (Ferretti et al. 2007). Ein Einfluß von Bisphosphonaten auf die Überlebenszeiten von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und Knochenmetastasen wäre möglich, kann aber bisher nicht belegt werden (Pavlakis et al. 2005). Weiterhin zu Diskussion steht die lebensverlängernde Wirkung der Aromatasehemmer der 3. Generation Anastrozol, Letrozol und Exemestan im Vergleich mit herkömmlicher endokriner Therapie (Lück 2006; Kaufmann et al. 2006). Die Unterschiede zwischen der Entwicklung der Überlebenszeiten aus der vorliegenden Studie und den Daten des Tumorregister Münchens können so allerdings nicht erklärt werden.

Es werden 28,2% der Fälle als CK5/6 positiv, 7,8% als CK14 positiv, 4,5% als  $\alpha$ -SMA positiv und 4,1% als p63 positiv klassifiziert. Der Vergleich mit Literaturdaten ist nur bedingt möglich, da die Arbeiten anderer Autoren sich bezüglich verwendeter Antikörper, Fixierung, Antigendemaskierung, Auswertungskriterien und den Eigenschaften der untersuchten Gruppe unterscheiden. Die Raten liegen für basale Zytokeratine zwischen 4% (Dairkee et al. 1987) und 37% (Potemski et al. 2006), für p63 zwischen 0,8% (Rakha et al. 2006) und 20,1% (Matos et al 2005) und für  $\alpha$ -SMA zwischen 1,3% (Korsching et al. 2005) und 13,7% (Rakha et al. 2006). Trotzdem können Übereinstimmungen gesehen werden: In 4 Fällen tritt CK14 und  $\alpha$ -SMA gemeinsam auf, der Zusammenhang ist statistisch signifikant. Auch Tsuda et al.

## 5. Diskussion

(1999) beschreiben eine enge Assoziation zwischen CK14 und  $\alpha$ -SMA in Grade 3 invasiv duktalem Karzinomen. Ribeiro-Silva et al. (2005) finden eine enge Korrelation zwischen der Expression von p63 und CK5/6 in invasiv duktalem Karzinomen, wie auch in unserer Studie die Assoziation zwischen p63 und CK5/6 positiven Fällen statistisch signifikant ist. Eine enge Korrelation zwischen CK5/6 und CK14 finden auch Rakha et al. (2006), doch während in Ihrer Studie der Anteil der ausschließlich CK14 positiven Fälle 18,8% beträgt, ist in unserer Studie die Assoziation zwischen CK14 und CK5/6 so eng, dass es nur einen einzigen Fall mit ausschließlicher CK14 Expression, einer Rate von 1,4% entsprechend, gibt.

Es wurden drei Gruppen gebildet, die sich an die Untersuchung von Rakha et al. (2006) anlehnen: basaloider Phänotyp mit 10%-50% der Tumorzellen positiv für CK5/6 und / oder CK14, dominant basaler Phänotyp mit mehr als 50% der Tumorzellen positiv für CK 5/6 und / oder CK14 und myoepithelialer Phänotyp mit mindestens 10% der Tumorzellen positiv für  $\alpha$ -SMA und / oder p63. Die vierte Gruppe besteht aus Fällen die gleichzeitig positiv für CK5/6 und CK14 sind. Diese wird doppelt positiver Phänotyp genannt. Die pathomorphologischen und biologischen Eigenschaften einer solchen Subgruppe des Mammakarzinoms wurden noch nie beschrieben.

Basale Zytokeratine exprimierende Mammakarzinome finden sich in der vorliegenden Untersuchung in 28,7% der Fälle, davon basaloider Phänotyp in 14,8% und dominanter Phänotyp in 13,9%, doppelt positiver Phänotyp in 7,4% und myoepithelialer Phänotyp in 8,2%.

Die im Vergleich höhere Rate von 28,7% der Fälle mit basalem Immunprofil gegenüber 18,6% bei Rakha et al. (2006) in einer Gruppe primärer operabler Mammakarzinome kann unter vereinfachenden Voraussetzungen als Akkumulation von basalen Fällen in die metastasierte Gruppe aufgrund des schlechteren OAS und DFS gedeutet werden. Der geringere Anteil von myoepithelialen Fällen in der metastasierten Gruppe (8,2%) im Vergleich mit Rakha (13,7%) kann durch die weniger schlechte Prognose des myoepithelialen Phänotyps erklärt werden. Basaler und myoepithelialer Phänotyp bilden bei Rakha, wie in unserer Untersuchung, eine Schnittmenge. Dabei liegt der Anteil der ausschließlich myoepitheliale Marker exprimierenden Fälle bei Rakha mit 64,7% deutlich höher als bei uns mit 35%. Der

## 5. Diskussion

dominant basale Phänotyp hat einen etwas höheren Anteil an myoepithelialen Fällen als der basaloide Phänotyp, vergleichbar mit den Ergebnissen von Rakha.

Die Ermittlung des Hormonrezeptorstatus ermöglicht es abzuschätzen inwieweit die Prognose der basalen / myoepithelialen Phänotypen vom Hormonrezeptorstatus abhängig ist. Nach den aktuellen Empfehlungen (Lebeau et al. 2005) gelten Mammakarzinome als hormonsensibel, wenn mindestens 10% der Tumorzellkerne eine immunhistochemische Färbereaktion (unabhängig von der Färbeintensität) gegenüber den Östrogenrezeptor- $\alpha$  (ER) oder den Progesteronrezeptor- $\alpha$  (PR) aufweisen, so dass in dieser Studie Mammakarzinome als Hormonrezeptor positiv klassifiziert werden, falls die IHC entweder ER und / oder PR in mindestens 10% der Tumorzellkerne aufwies. Mammakarzinome deren Primärtumoren einen negativen ER-Status zeigten, haben ein kürzeres OASM (Koenders et al. 1992). Auch Mammakarzinome mit basalem Immunprofil sind überwiegend Hormonrezeptor (HR) negativ (Rakha et al. 2006; Potemski et al. 2006) und es ist gezeigt worden, dass die schlechte Prognose der Mammakarzinome vom basalen Subtyp vom negativen Hormonrezeptorstatus abhängig ist (Potemski et al 2006; Jumppanen et al. 2007). In unserer Studie sind 42,6% der Fälle HR-negativ. Daten des Tumorregister Münchens für 6458 Patienten mit Metastasen nach krankheitsfreiem Intervall zeigen lediglich einen Anteil von 26,7% Hormonrezeptor negativer Fälle (Schlesinger-Raab et al. 2005). Dafür können verschiedene Gründe ausschlaggebend sein: Verlust der Immunreaktivität durch Fixierung oder Archivierung wäre denkbar, wobei aber nachgewiesen ist dass noch 60 Jahre altes Archivmaterial die IHC Analyse von ER und PR zuließ (Camp et al. 2001). Ursächlich könnte auch die Verwendung einer anderen Methodik sein (Immunhistochemie versus biochemischer Assay), oder die Wahl des Grenzwerts, der höher als der früher in Deutschland übliche IRS (*immunreaktiven score*) nach Remmele (Remmele et al. 1986) liegt. Die Auswahl unserer Fälle, Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung bei denen eine Chemotherapie indiziert ist, bedingt letztendlich auch eine Verschiebung zugunsten der Hormonrezeptor negativen Fälle. In einer Münchner Studie über 571 Patientinnen mit Lokalrezidiven oder Fernmetastasen (Rack et al. 2003) beträgt der Anteil Hormonrezeptor negativer Fälle vergleichbare 39,8%. Schließlich wird der Anteil Hormonrezeptor negativer Fälle auch durch das Überwiegen invasiv duktaler

## 5. Diskussion

Karzinome an unserem Untersuchungsgut bestimmt, für welche Bässler (1997) Literaturwerte von 35% bis 45 % Anteile ER-negativer Fälle angibt.

Über Patientinnen mit Tumoren basalem/ myoepithelialen Immunprofils wird berichtet, dass sie signifikant häufiger jünger sind, als diejenigen ohne basalem / myoepitheliales Immunprofil (Ribeiro-Silva et al. 2005; Rakha et al. 2006). Andere Untersucher fanden keine solche Assoziation (Kim et al. 2006; Yang et al. 2007). In unserer Studie weisen die Altersmittelwerte der Patientinnen in den Untergruppen zum Zeitpunkt der Metastasierung keine signifikanten Unterschiede zur Gesamtgruppe auf.

In Gruppen unselektierter Mammakarzinome sind 68,4 % (Rakha et al. 2006) bis 86% (Kim et al. 2006) der Fälle mit basalem / myoepithelialen Immunprofil histologisch als invasiv duktales Karzinom NOS (*not otherwise specified*; IDC-NOS) klassifiziert worden. In unserer Studie handelt es sich, von einem Fall eines lobulären Karzinoms mit basaloidem Phänotyp abgesehen, bei dominantem, basaloidem, myoepithelialen und doppelt positiven Phänotyp ausschließlich um IDC-NOS.

Invasiv lobuläre Karzinome (ILC) exprimieren in 5,4% CK5/6 und 7,4% CK14 (Abd El-Rehim et al. 2004). Von 21 lobulären Karzinomen aus der vorliegenden Arbeit ist eines vom basalen Phänotyp (4,8%).

Fälle mit einer bekannten myoepithelialen (Teil-) Differenzierung sind im Vorfeld ausgeschlossen worden. Dabei handelt es sich um Tumoren vom Speicheldrüsentyp der Mamma (Otterbach et al. 2006) wie Myoepitheliome, pleomorphe Adenome, adenoid-zystische Karzinome, low grade adenosquamöse Karzinome und Adenomyoepitheliome. Diese sind insgesamt selten bis sehr selten und haben eine, im Vergleich mit duktales und lobulären Karzinomen, besseren Prognose (Tavassoli et al. 2003). Auch in tubulären (Rakha et al. 2006) und metaplastischen Karzinomen (Reis-Filho et al. 2006) werden basale und myoepitheliale Marker exprimiert. Auch diese weisen eine gute Prognose auf (Ellis et al. 1992; Tavassoli et al. 2003). Medulläre Karzinome zeigen regelmäßig ein basales / myoepitheliales Immunprofil (Milde et al. 2006). Ihnen wird teils eine bessere und teils eine den invasiv duktales Karzinomen vergleichbare Prognose zugesprochen (Tavassoli et al. 2003).

In unserer Studie steht die Tumorausdehnung in keiner signifikanten Beziehung zu einem der Phänotypen, abgesehen vom doppelt positiven Phänotyp, welcher nicht bei kleinen, begrenzten Tumoren auftritt. In der Literatur wird von einer Assoziation

## 5. Diskussion

der basalen (Rakha et al. 2006) und der basoluminalen (Laakso et al 2006), nicht aber der myoepithelialen Mammakarzinome mit größerem Tumordurchmesser berichtet (Laakso et al 2006).

Die regionalen, axillären Lymphknoten sind laut Literatur bei basalem Immunprofil öfter (Laakso et al. 2006) oder seltener (Fulford et al. 2006; Jumppanen et al. 2007) betroffen, bei myoepitheliale Immunprofil fand sich keine Assoziation zum Lymphknotenstatus (Rakha 2006). In unserer Studie liegt der Anteil Nodal positiver Fälle insgesamt bei 84,7%, wobei 97,3% der primären M1- Befunde und 78% der primären M0- Befunde Nodal positiv sind. Zum Vergleich: Bei Koenders et al. (1992) waren 74% der 258 Fälle (primär M0 und M1) nodalpositiv. Die Daten des Tumorregisters München ergeben bei M0 67,4% und bei M1 88,7% Nodal positive Fälle (Schlesinger-Raab et al.2005). Die von uns untersuchten Phänotypen sind alle überwiegend Nodal positiv und weisen darin keinen signifikanten Unterschied zur Gesamtgruppe auf.

Basales und myoepitheliales Immunprofil ist laut Literatur mit schlechter histologischer Differenzierung assoziiert (Malzahn et al. 1998; Rakha et al 2006; Laakso 2006). Eine statistisch signifikante Häufung von Grad 3 Karzinomen ergibt sich bei uns nur bei dominant basalem ( $p=0,002$ ) und doppelt positivem Phänotyp ( $p=0,002$ ), nicht bei basaloidem ( $p=0,115$ ) und myoepitheliale Phänotyp ( $p=0,06$ ). Tumoren mit basalem und myoepitheliale Immunprofil weisen zumeist einen negativen Hormonrezeptorstatus auf (Rakha et al. 2006; Fulford et al. 2007; Jumppanen et al. 2007). Die von uns beschriebenen Phänotypen sind überwiegend Hormonrezeptor negativ, die niedrigste Rate an Hormonrezeptor positiven Fällen liegt beim dominant basalen und doppelt positiven Phänotyp.

In der univariaten Kaplan-Meier-Analyse zeigt sich ein signifikant verkürztes OASM für Primärtumoren mit positivem gegenüber negativem Nodalstatus (23,1 vs. 36,0 Monate;  $p=0,005$ ), mit schlechter Differenzierung gegenüber mäßiger und guter Differenzierung (22,1 vs. 25,6 Monate;  $p=0,034$ ) und mit negativem gegenüber positivem Hormonrezeptorstatus (17,5 vs. 27,6 Monate;  $p=0,005$ ). Für die Tumorausdehnung (nach pT-Stadium) wird eine Tendenz zu verkürztem OASM beobachtet, die statistisch nicht signifikant war ( $p=0,128$ ). Bei der Zeitdauer des metastasenfreen Intervalls (primär metastasiert, weniger oder mehr als 24 Monate;

## 5. Diskussion

$p=0,147$ ) dem Patientenalter bei erster Metastase (jünger oder älter als 50 Jahre;  $p=0,672$ ) und der histopathologischen Klassifikation (lobulär vs. duktal) zeigen sich keine im Log Rang Test signifikanten Unterschiede in den Überlebensverteilungen ( $p=0,405$ ).

In der Literatur werden positiver Nodalstatus (Clark et al. 1987; Koenders et al. 1992), schlechte Differenzierung des Primärtumors (Jimeno et al. 2004) sowie negativer Östrogenrezeptorstatus (Vogel et al. 1992; Koenders et al. 1992;) und / oder Progesteronrezeptorstatus (Chang et al. 2003) des Primärtumors als Risikofaktoren für verkürztes OASM genannt. Ebenso wird in einigen Studien ein metastasenfreies Intervall von < 24 Monaten zusammen mit kürzerem OASM beobachtet (Clark et al. 1987; Vogel et al. 1992; Chang et al. 2003), wohingegen andere Untersucher (Koenders et al. 1992) diesen Zusammenhang nicht bestätigen. Die Auswirkung der Tumorgröße auf das OASM wird nicht oft untersucht, Jimeno et al. (2004) beschreibt Primärtumoren ab Stadium pT3 als prognostisch ungünstig. Bezüglich des Patientenalters ist die Literatur uneinheitlich, dieses gilt als Einflussfaktor für kürzeres OASM (Chang et al. 2003) oder auch nicht (Koenders et al. 1992; Jimeno et al. 2004). Lobuläre zeigen im Gegensatz zu duktalem Karzinomen eine Präferenz zu Metastasen in Knochen, Gastrointestinaltrakt, Uterus und Ovar (Borst et al. 1993; Doyle et al. 2005). Bei lobulären Karzinomen wird ein im Vergleich mit duktalem Karzinomen verkürztes OASM beschrieben (Jimeno et al. 2004).

Der HER-2/*neu* -Status ist nicht von prognostischer Relevanz, dies spiegelt den Übergang von einem Faktor der eine ungünstige Prognose anzeigt zu einem prädiktiven Faktor für das Ansprechen auf die lebensverlängernde Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen das HER-2/*neu* Onkoprotein wieder (Ferretti et al. 2007, Yamauchi et al. 2001). Vergleichende Studien zur Analyse des HER-2/*neu* -Status zeigen eine höhere Rate von HER-2/*neu* positiven Tumoren bei Anwendung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung im Vergleich mit der immunhistochemischen Analyse (Pauletti et al. 2000). Bei ausschließlicher Verwendung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wäre in der vorliegenden Arbeit vermutlich eine höhere Rate an HER-2/*neu* positiven Fällen zu erwarten.

Die univariate Kaplan Meier Analyse zeigt ein verkürztes OASM für den basalen Phänotyp (Median 16,6 vs. 27,0 Monate;  $p=0,025$ ), den dominant basalen (Median

## 5. Diskussion

8,8 vs. 26,3 Monate;  $p=0,018$ ) und den doppelt positiven Phänotyp (Median 9,4 vs. 24,7 Monate;  $p=0,003$ ). Der myoepitheliale Phänotyp zeigt eine nicht signifikante Tendenz zu verkürztem medianen OASM (Median 13,9 vs. 24,4 Monate;  $p=0,094$ ). Der basaloide Phänotyp weist in der Überlebensverteilung keinen Unterschied (Median 23,9 vs. 23,6 Monate;  $p=0,449$ ) zu den nicht basaloiden Fällen auf. Die schlechte Prognose der Fälle mit basalem Immunprofil wirkt so vor allem als durch den Anteil der prognostisch schlechten Fälle des dominant basalen Phänotyps hervorgerufen. Im direkten Vergleich zwischen dominantem und basaloidem Phänotyp zeigt der dominante im Vergleich zum basaloiden Phänotyp eine Tendenz zu kürzerem OASM, allerdings ist der Log Rang Test nicht signifikant ( $p=0,172$ ).

Die multivariate Überlebensanalyse unter Berücksichtigung etablierter Prognosefaktoren bestätigt neben positivem Nodalstatus, negativem Rezeptorstatus, dem metastasenfrem Intervall und dem Rekrutierungszeitpunkt für die Chemotherapie zwischen 1991 und 1995 den CK5/6 & 14 doppelt positiven Phänotyp als negativen Prognosefaktor von statistischer Signifikanz.

Von besonderem Interesse sind die Unterschiede zwischen den Fällen mit überwiegend negativer und überwiegend positiver Expression der basalen Zytokeratine. Unsere Befunde zeigen, dass dominant basale im Vergleich zu basaloiden Fällen signifikant häufiger Hormonrezeptor negativ sind. Dieser Trend findet sich auch in den Arbeiten von Rakha et al. (2006) und Laakso et al. (2006) wieder. Die von Laakso et al. und Rakha et al. beschriebene Prädominanz der HER-2/*neu* positiven Fälle in der Gruppe mit überwiegend negativer Färbereaktion für basale Zytokeratine kann in unserer Untersuchung nicht bestätigt werden, basaloide Fälle weisen zwar einen Trend zu vermehrtem positivem HER-2/*neu* Status auf, der allerdings nicht signifikant ist ( $p=0,113$ ). Die von Fulford et al. (2007) und Laakso et al. (2006) berichtete prognostisch schlechtere Tendenz für die Mammakarzinome mit überwiegend negativem basalem Immunprofil kann aus unseren Ergebnissen nicht auf die palliative Situation übertragen werden, im Gegenteil sind es die Mammakarzinome mit dominant basalem Immunprofil die hier die kürzeren Überlebensraten zeigen. Allerdings zeigt sich das dominant basale Immunprofil aufgrund der weiten Spanne der Überlebenszeiten als Prognosefaktor mit eingeschränkter Vorhersagekraft.

## 5. Diskussion

Das CK5/6 & 14 doppelt positive Immunprofil, welches bis auf einen Fall den CK14 positiven Fällen entspricht, zeigt sich als Indikator für verkürztes OASM in der univariaten und multivariaten Überlebensanalyse. Dies bestätigt die Ergebnisse von Fulford et al. (2007). Zytokeratine bilden Heterotetramere, jeweils zwei saure Typ I Partner mit zwei basischen Typ II Partnern (Moll et al. 1983). CK5 ist dabei der bevorzugte Typ II Partner von dem Typ I Zytokeratin CK14, aber auch von CK17 (Böcker et al. 2002). Dabei ist weniger eine spezifische Bindung zwischen den Zytokeratinen ausschlaggebend für die Paarbildung (außer natürlich der Paarbildung zwischen basischen und sauren Zytokeratinen an und für sich), sondern die Tatsache dass die Zytokeratingene paarweise exprimiert werden (Hatzfeld et al. 1985). Die Rolle der Kombinationen von basalen Zytokeratinen (CK5/6/14/17) bezüglich der Biologie der Mammakarzinome, insbesondere des basalen Phänotyps wird in der Fachliteratur bis jetzt nicht beschrieben, wirft aber unter Bezugnahme auf die Ergebnisse unserer Arbeit interessante Perspektiven auf. So finden sich bei Rakha et al. in 18,8% der CK5/6 und /oder CK14 positiven Fälle Tumoren mit dem Immunprofil CK5/6<sup>-</sup> / CK14<sup>+</sup>, in unserer Studie sind es nur 1,4%. Eine daraus abzuleitende Hypothese wäre eine günstige Prognose der CK5/6<sup>-</sup> / CK14<sup>+</sup> Tumoren, da sie nur selten in einem metastasierten Kollektiv erscheinen. Der basale Phänotyp bildet eine biologisch sowie klinisch heterogene Gruppe. Auch die Technik der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) zeigt, dass sich innerhalb der CK14 positiven invasiv duktalem Gd 3 Karzinome Subgruppen mit unterschiedlichen genetischen Alterationen befinden, die mit guter und schlechter Prognose einhergehen (Jones et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass sich Mammakarzinome mit basalem / myoepithelialen Immunprofil in Untergruppen aufteilen lassen, die sich bezüglich des Überlebens nach palliativer Chemotherapie deutlich unterscheiden. Diese Ergebnisse sprechen für Chemoresistenz oder besonders aggressive Tumorbilologie, vor allem für den dominant basalen und den CK5/6 & 14 doppelt positiven Phänotyp. Die vermutete besondere Chemosensitivität der basalen Subtypen kann an unserem Kollektiv nicht bestätigt werden, zumindest hat sie, wenn vorhanden, keinen Einfluß auf die Überlebenszeit. Die Häufung von Hirnmetastasen bei Tumoren mit metastasiertem basalen Phänotyp (Luck et al. 2008; Tsuda et al. 2000) verschlechtert die Mortalität in diese Gruppe weiter (medianes Überleben 5,5 Monate, Tham et al. 2006). Die Chemotherapie hat einen, wenn auch begrenzten,

## 5. Diskussion

Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei Hirnmetastasen. Diese werden falls möglich chirurgisch saniert oder strahlentherapeutisch behandelt (Lutz et al. 2005). Da basale Zytokeratine keine Pathogenitätsfaktoren im eigentlichen Sinne sind, ist die Suche nach den molekularen Mechanismen, welche für das aggressive Verhalten dieser Tumoren verantwortlich sind und die gleichzeitig ein therapeutisches Ziel sein könnten von großer Bedeutung. In der Studie von Rakha et al. (2006) sind 47,2% der Tumoren positiv für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Positiver EGFR ist mit kürzerem DFS und OAS verbunden (Nielsen et al. 2004, Sainsbury et al. 1987). Erste Phase II Studien welche die Ansprechraten des metastasierten, tripel negativen, Mammakarzinoms auf einen gegen EGFR gerichteten monoklonalen Antikörper (Cetuximab®) evaluieren sollen laufen bereits (Reis-Filho & Tutt 2008).

## 6.Zusammenfassung

### **6.Zusammenfassung**

Es war das Ziel der vorliegenden Studie, die prognostische Bedeutung des basalen und myoepithelialen Phänotyps des Mammakarzinoms nach Diagnose der ersten Fernmetastase in einer Gruppe palliativ chemotherapierter Patientinnen zu evaluieren. Angaben in der Literatur gibt es hierzu bislang nicht.

Paraffin eingebettetes Material von 244 Primärtumoren mit bekannter konsekutiver metastasierter Erkrankung wurde immunhistochemisch auf CK5/6, CK14,  $\alpha$ -SMA, p63, ER und PR untersucht. Anhand von Literaturdaten wurden vier Untergruppen gebildet: basaloider Phänotyp (10-50% CK5/6+ und /oder CK14+) in 14,8%, dominant basaler Phänotyp (>50% CK5/6 und /oder CK14) in 13,9%, CK5/6 & 14 doppelt positiver Phänotyp in 7,4% und myoepithelialer Phänotyp (>10%  $\alpha$ -SMA und /oder p63) in 8,2% der Fälle. Die Beobachtungszeit beträgt zwischen 5 Tagen und 151,1 Monaten, am Ende der Beobachtungszeit leben noch 6,1% der Patientinnen, 90,2% sind verstorben und 3,7% lost to follow up. Die mediane Überlebenszeit für die Gesamtgruppe beträgt 23,8 Monate. In der univariaten Kaplan-Meier-Analyse zeigen sich der dominant basale sowie der CK5/6 & 14 doppelt positive Phänotyp als signifikante Prognosefaktoren für kürzeres Überleben nach erster Metastase (mediane Überlebenszeit 8,8 bzw. 9,4 Monate;  $p=0,018$  bzw.  $0,003$ ), nicht jedoch der basaloide und der myoepitheliale Phänotyp. In der multivariaten Überlebensanalyse nach Cox, unter Einbeziehung etablierter Prognosefaktoren (Patientenalter, histopathologische Klassifikation, Tumorgröße, Nodalstatus, Tumorgrading, Dauer des metastasenfreen Intervalls, Hormonrezeptorstatus, HER-2/*neu* Status, Startjahr der Chemotherapie) ist der CK5/6 & 14 doppelt positive Phänotyp neben dem negativen Hormonrezeptorstatus, dem positiven Nodalstatus, dem krankheitsfreien Intervall und dem Startjahr der Chemotherapie zwischen 1991 und 1995 ein signifikanter Risikofaktor (RR 1,830;  $p=0,032$ ) für ein kürzeres Überleben nach erster Metastase. Bei CK5/6 & 14 doppelt positiven Tumoren könnte es sich um eine Subgruppe des basalen Subtyps mit besonders ungünstiger Prognose handeln. Es ist von großem Interesse die zur aggressiven Tumorbiologie des dominant basalen und des CK5/6 & 14 doppelt positiven Phänotyps führenden molekularen Mechanismen näher zu untersuchen, denn ein Faktor welcher eine ungünstige Prognose anzeigt ohne Therapiealternativen aufzuweisen nützt weder dem behandelnden Arzt noch dem Patienten. Da gezielte Therapieformen, wie endokrine Therapie oder Trastuzumab bei diesen meist HR sowie HER-2/*neu* negativen

## 6.Zusammenfassung

Tumoren unwirksam sind und die Ergebnisse unserer Studie eine weitgehende Chemoresistenz nahe legen, ist es nun vordringlich die Wirksamkeit neuer Therapieformen, wie zum Beispiel monoklonale Antikörper gegen EGFR (Cetuximab) zu prüfen.

## 7.Literatur

- 1.) Abd El-Rehim, Dalia M; Pinder, Sarah E; Paish, Claire E; Bell, J; Blamey, R W; Robertson, John F R et al. (2004) **Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma.** *J Pathol* 203(2): 661–671
- 2.) Andrulis, I L; Bull, S B; Blackstein, M E; Sutherland, D; Mak, C; Sidlofsky, S et al. (1998) **neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer.** *J Clin Oncol* 16(4): 1340–1349
- 3.) Banerjee, S; Reis-Filho, J S; Ashley, S; Steele, D; Ashworth, A; Lakhani, S R; Smith, I E (2006) **Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy.** *J Clin Pathol* 59(7): 729–735
- 4.) Bánkfalvi, Agnes; Ludwig, Andreas; De-Hesselle, Bettina; Buerger, Horst; Buchwalow, Igor B; Boecker, Werner (2004) **Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases.** *Mod Pathol* 17(9): 1051–1061
- 5.) Bässler R: **Mamma**; in: Remmele, Wolfgang (Hrsg.) (1997): Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe, 2.Aufl. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- 6.) Birnbaum, Daniel; Bertucci, François; Ginestier, Christophe; Tagett, Rebecca; Jacquemier, Jocelyne; Charafe-Jauffret, Emmanuelle (2004) **Basal and luminal breast cancers: basic or luminous?** *Int J Oncol* 25(2): 249–258
- 7.) Böcker, Werner; Moll, Roland; Poremba, Christopher; Holland, Roland; van Diest, Paul J; Dervan, Peter et al. (2002) **Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept.** *Lab Invest* 82(6): 737–746
- 8.) Boecker, Werner; Buerger, Horst (2003) **Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept.** *Cell Proliferat* 36 Suppl 1: 73–84
- 9.) Boenisch, Thomas; Henne, Christof (2003) **Handbuch immunchemische Färbemethoden.** 3. Aufl. Dako Deutschland GmbH Hamburg
- 10.) Borst, M J; Ingold, J A (1993) **Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast.** *Surgery* 114(4): 637-41
- 11.) Calza, Stefano; Hall, Per; Auer, Gert; Bjöhle, Judith; Klaar, Sigrid; Kronenwett, Ulrike et al. (2007) **Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients.** *Breast cancer res* 8(4): R34.
- 12.) Camp, R L; Charette, L A; Rimm, D L (2001) **Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma.** *Lab Invest* 80(12): 1943–1949
- 13.) Carey, Lisa A; Dees, E Claire; Sawyer, Lynda; Gatti, Lisa; Moore, Dominic T; Collichio, Frances et al. (2007) **The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.** *Clinical Cancer Res* 13(8): 2329–2334
- 14.) Cha, C H; Kennedy, G D; Niederhuber, J E (1999) **Metastatic breast cancer.** *Surg Clin N Am* 79(5): 1117–1143

## 7.Literatur

- 15.) Chang, Jenny; Clark, Gary M; Allred, D Craig; Mohsin, Syed; Chamness, Gary; Elledge, Richard M (2003) **Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor.** *Cancer* 97(3): 545–553
- 16.) Clark, G M; Sledge, G W, Jr; Osborne, C K; McGuire, W L (1987) **Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients.** *J Clin Oncol* 5(1): 55–61
- 17.) Clarke, Catherine L; Sandle, Jennifer; Parry, Suzanne C; Reis-Filho, Jorge S; O'Hare, Michael J; Lakhani, Sunil R (2004) **Cytokeratin 5/6 in normal human breast: lack of evidence for a stem cell phenotype.** *J Pathol* 204(2): 147–152
- 18.) Colozza, Mariantonietta; de Azambuja, Evandro; Personeni, Nicola; Lebrun, Fabienne; Piccart, Martine J; Cardoso, Fatima (2007) **Achievements in systemic therapies in the pregenomic era in metastatic breast cancer.** *Oncologist* 12(3): 253–270
- 19.) Conforti, R; Boulet, T; Tomasic, G; Taranchon, E; Arriagada, R; Spielmann, M et al. (2007) **Breast cancer molecular subclassification and estrogen receptor expression to predict efficacy of adjuvant anthracyclines-based chemotherapy: a biomarker study from two randomized trials.** *Ann Oncol* 18(9):1477–1483
- 20.) Cox D.R. (1972): **Regression models and live tables.** *J Roy Stat Soc B* 34: 187–220
- 21.) Dairkee, S H; Mayall, B H; Smith, H S; Hackett, A J (1987): **Monoclonal marker that predicts early recurrence of breast cancer.** *Lancet* 1(8531):514
- 22.) Diallo-Danebrock, Raihanatou; Ting, Evelyn; Gluz, Oleg; Herr, Alexander; Mohrmann, Svjetlana; Geddert, Helene et al. (2007) **Protein expression profiling in high-risk breast cancer patients treated with high-dose or conventional dose-dense chemotherapy.** *Clin Cancer Res* 13(2): 488–497
- 23.) Doyle, D J; Relihan, N; Redmond, H P; Barry, J E (2005) **Metastatic manifestations of invasive lobular breast carcinoma.** *Clin Radiol* 60(2): 271–274
- 24.) Ellis, I O; Galea, M; Broughton, N; Locker, A; Blamey, R W; Elston, C W (1992) **Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type.** *Histopathology* 20(6): 479–489
- 25.) Elston, C W; Ellis, I O (1992) **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* 19( 5): 403–410
- 26.) Fadare, Oluwole; Tavassoli, Fattaneh A (2007) **The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal.** *Adv Anat Pathol* 14(5): 358–373
- 27.) Ferretti, Gianluigi; Felici, Alessandra; Papaldo, Paola; Fabi, Alessandra; Cognetti, Francesco (2007) **HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend.** *Curr Opin Obstet Gyn* 19(1): 56–62
- 28.) Fulford, L G; Easton, D F; Reis-Filho, J S; Sofronis, A; Gillett, C E; Lakhani, S R; Hanby, A (2006) **Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast.** *Histopathology* 49(1): 22–34
- 29.) Fulford, Laura G; Reis-Filho, Jorge S; Ryder, Ken; Jones, Chris; Gillett, Cheryl E; Hanby, Andrew et al. (2007) **Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of**

**the breast: patterns of metastasis and long-term survival.** *Breast Cancer Res* 9(1): R4

30.) Gabka C.J., Anthuber C. Bauernfeind I. Baumeister RGH: Eiermann W. Függer Th. Funke I. Hamann U. Höß C. Janni W. Kolben M. Lebeau A. Plattner B. Schwoerer M. Untch M. de Waal JC (2005) **Operative Therapie des primären Mammakarzinoms** S.95-102 in Sauer Hansjörg: "Mammakarzinome" 10. Aufl. Zuckschwerdt München, Wien, New York

31.) Gusterson, Barry A; Ross, Douglas T; Heath, Victoria J; Stein, Torsten (2005) **Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer.** *Breast Cancer Res* 7(4): 143–148

32.) Hannemann, J; Kristel, P; van Tinteren, H; Bontenbal, M; van Hoesel, Q G C M; Smit, W M et al. (2006) **Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase II alpha: predictive role in dose intensive adjuvant chemotherapy.** *Brit J Cancer* 95(10): 1334–1341

33.) Hatzfeld, M; Franke, W W (1985) **Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides.** *J Cell Biol* 101(5 ): 1826–1841.

34.) Heinemann V., Artmann A. Beinert T. Dietzfelbinger H. Eiermann W. Gabius S. Harbeck N. Kahlert S. Kau W. Lombardo S.M. Lorenz T. Merx P. Pihusch R. Rauthe C. Sattler D. Sauer H. Untch M. Wolf C. (2005) **Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms** S. 225-241 in Sauer Hansjörg (Hrg) "Mammakarzinom" (10.Aufl.) Zuckschwerdt München, Wien, New York

35.) Jimeno, Antonio; Amador, María Luz; González-Cortijo, Lucía; Tornamira, María Victoria; Ropero, Santiago; Valentín, Vicente et al. (2004) **Initially metastatic breast carcinoma has a distinct disease pattern but an equivalent outcome compared with recurrent metastatic breast carcinoma.** *Cancer* 100(9): 1833–1842

36.) Jones, Chris; Ford, Emily; Gillett, Cheryl; Ryder, Ken; Merrett, Samantha; Reis-Filho, Jorge S et al. (2004) **Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes.** *Clin Cancer Res* 10(18): 5988–5997

37.) Jumppanen, Mervi; Gruvberger-Saal, Sofia; Kauraniemi, Päivikki; Tanner, Minna; Bendahl, Pär-Ola; Lundin, Mikael et al. (2007) **Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers.** *Breast Cancer Res* 9 (1): R16.

38.) Kaplan E.L., Meier P. (1958) **Nonparametric estimation from incomplete observations.** *J Am Stat Assoc* 53: 457–481.

39.) Kaufmann M. Minckwitz G., Scharl A. Costa S.D. (2006) **Mammakarzinom S.:** 477-533 in Kaufmann M. (Hrg) „Die Gynäkologie“ 2. Aufl. Springer Berlin Heidelberg New York

40.) Kim, Mi-Jung; Ro, Jae Y; Ahn, Sei-Hyun; Kim, Hak Hee; Kim, Sung-Bae; Gong, Gyungyub (2006) **Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes.** *Hum Pathol* 37(9): 1217–1226.

## 7.Literatur

- 41.) Koenders, P G; Beex, L V; Kloppenborg, P W; Smals, A G; Benraad, T J (1992) **Human breast cancer:survival from first metastasis.***Breast Cancer Res Tr* 21(3):173–180.
- 42.) Korsching, Eberhard; Packeisen, Jens; Liedtke, Cornelia; Hungermann, Daniela; Wülfing, Pia; van Diest, Paul J et al. (2005) **The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential?** *J Pathol* 206(4): 451–457
- 43.) **Krebs in Deutschland** (2006) 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken
- 44.) Laakso, Mervi; Tanner, Minna; Nilsson, Jonas; Wiklund, Tom; Erikstein, Björn; Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko et al. (2006) **Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer.** *Clin Cancer Res* 12(14): 4185–4191
- 45.) Lebeau A., Högel B.Nährig J. Permanetter W. (2005) **Pathomorphologie des Mammakarzinoms** S. 48-72 in Sauer Hansjörg (Hrg.) " Mammakarzinome". 10. Aufl. Zuckschwerdt München, Wien, New York
- 46.) Leong, Anthony S-Y (2004) **Pitfalls in diagnostic immunohistology.** *Adv Anat Pathol* 11(2): 86–93.
- 47.) Luck, A A; Evans, A J; Green, A R; Rakha, E A; Paish, C; Ellis, I O (2008) **The influence of Basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer.** *Clinical Oncol* 20(1): 40–45
- 48.) Lück H J (2006): **Systemische Therapie des Mammakarzinoms.** S. 335-353 in Kreienberg et al. (Hrg.) „Management des Mammakarzinoms“. (3.Aufl.) Springer Berlin Heidelberg New York
- 49.) Lutz L., Kahler S. Lampl L. Rauthe G. Sommer H. Wuttge-Hannig A. (2005): **Zusätzliche palliative Maßnahmen.** S.248-251 in: Sauer Hansjörg (Hrg.) "Mammakarzinom". (10.Aufl.) Zuckschwerdt München, Wien, New York
- 50.) Malzahn, K; Mitze, M; Thoenes, M; Moll, R (1998) **Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas.** *Virch Arch* 433(2):119–129
- 51.) Matos, Irina; Dufloth, Rozany; Alvarenga, Marcelo; Zeferino, Luiz Carlos; Schmitt, Fernando (2005) **p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas.***Virch Arch* 447(4): 688–694
- 52.) Milde, S; Gaedcke, J; v Wasielewski, R; Bruchardt, H; Wingen, L; Gadzicki, D et al. (2006) **Diagnosis and immunohistochemistry of medullary breast cancer.** *Pathologe* 27(5): 358–362
- 53.) Moll, R; Franke, W W; Schiller, D L; Geiger, B; Krepler, R (1983) **The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** *Cell* 31(1): 11–24.
- 54.) Moriya, Takuya; Kasajima, Atsuko; Ishida, Kazuyuki; Kariya, Yoshiyuki; Akahira, Jun-Ichi; Endoh, Mareyuki et al. (2006) **New trends of immunohistochemistry for making differential diagnosis of breast lesions.** *Med Mol Morphol* 39(1): 8–13

## 7.Literatur

- 55.) Nielsen, Torsten O; Hsu, Forrest D; Jensen, Kristin; Cheang, Maggie; Karaca, Gamze; Hu, Zhiyuan et al. (2004) **Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.** *Clin Cancer Res* 10(16): 5367–5374.
- 56.) Niskanen, E; Blomqvist, C; Franssila, K; Hietanen, P; Wasenius, V M (1997) **Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer.** *B J Cancer* 76(7): 917–922
- 57.) Otterbach, F; Bångfalvi, A; Bergner, S; Decker, T; Krech, R; Boecker, W (2000): **Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast.** *Histopathology* 37(3): 232–240
- 58.) Otterbach, F; Schmid, K W (2006) **Salivary gland-like tumors of the breast.** *Pathologe* 27(5): 363–372
- 59.) Paik, S; Hazan, R; Fisher, E R; Sass, R E; Fisher, B; Redmond, C et al. (1990) **Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer.** *J Clin Oncol* 8(1): 103–112
- 60.) Paone, J F; Abeloff, M D; Ettinger, D S; Arnold, E A; Baker, R R (1981) **The correlation of estrogen and progesterone receptor levels with response to chemotherapy for advanced carcinoma of the breast.** *Surg Gynecol Obstet* 152(1): 70–74
- 61.) Pauletti, G; Dandekar, S; Rong, H; Ramos, L; Peng, H; Seshadri, R; Slamon, D J (2000) **Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry.** *J Clin Oncol* 18(21): 3651–3664
- 62.) Pavlakakis, N; Schmidt, R; Stockler, M (2005) **Bisphosphonates for breast cancer.** *Cochrane database Syst Rev* 3: CD003474
- 63.) Péchoux, C; Gudjonsson, T; Ronnov-Jessen, L; Bissell, M J; Petersen, O W (1999) **Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells.** *Dev Biol* 206 (1): 88–99
- 64.) Penland, Shannon K; Keku, Temitope O; Torrice, Chad; He, Xiaping; Krishnamurthy, Janakiraman; Hoadley, Katherine A et al. (2007) **RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors.** *Lab Invest* 87(4): 383–391
- 65.) Perou, C M; Sørlie, T; Eisen, M B; van de Rijn, M; Jeffrey, S S; Rees, C A et al. (2000) **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 406(6797): 747–752
- 66.) Polyak, Kornelia (2007) **Breast cancer: origins and evolution.** *J Clin Invest* 117 (11): 3155–3163
- 67.) Potemski, Piotr; Kusinska, Renata; Watala, Cezary; Pluciennik, Elzbieta; Bednarek, Andrzej K; Kordek, Radzislaw (2006) **Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer.** *Oncology* 69(6): 478–485
- 68.) Rack, Brigitte; Janni, Wolfgang; Gerber, Bernd; Strobl, Barbara; Schindlbeck, Christian; Klanner, Elisabeth et al. (2003) **Patients with recurrent breast cancer: does the primary axillary lymph node status predict more aggressive tumor progression?** *Breast Cancer Res Tr* 82(2) 83–92

## 7.Literatur

- 69.) Rakha, E A; Putti, T C; Abd El-Rehim, D M; Paish, C; Green, A R; Powe, D G et al. (2006) **Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation.** *J Pathol* 208(4): 495–506
- 70.) Reis-Filho, J S; Milanezi, F; Steele, D; Savage, K; Simpson, P T; Nesland, J M et al. (2006) **Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours.** *Histopathology* 49(1): 10–21
- 71.) Reis-Filho, J S; Tutt, A N J (2008) **Triple negative tumours: a critical review.** *Histopathology* 52(1): 108–118
- 72.) Remmele, W; Hildebrand, U; Hienz, H A; Klein, P J; Vierbuchen, M; Behnken, L J et al. (1986) **Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer.** *Virch Arch* 409(2): 127–147
- 73.) Ribeiro-Silva, A; Ramalho, L N Z; Garcia, S B; Brandão, D F; Chahud, F; Zucoloto, S (2005) **p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer.** *Histopathology* 47(5): 458–466
- 74.) Robert-Koch-Institut (2005): **Brustkrebs.** Unter Mitarbeit von Klaus Giersiepen. Gesundheitsberichterstattung des Bundes 25 Robert Koch Institut Berlin
- 75.) Rodríguez-Pinilla, Socorro María; Sarrió, David; Honrado, Emiliano; Hardisson, David; Calero, Francisco; Benitez, Javier; Palacios, José (2006) **Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas.** *Clin Cancer Res* 12(5):1533–1539
- 76.) Rouzier, Roman; Perou, Charles M; Symmans, W Fraser; Ibrahim, Nuha; Cristofanilli, Massimo; Anderson, Keith et al. (2005) **Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy.** *Clin Cancer Res* 11(16): 5678–5685
- 77.) Sainsbury, J R; Farndon, J R; Needham, G K; Malcolm, A J; Harris, A L (1987) **Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer.** *Lancet* 1(8547): 1398–1402.
- 78.) Schlesinger-Raab, A.; Eckel, R.; Engel, J.; Sauer, H.; Löhns, U.; Molls, M.; Hölzel, D. (2005) **Metastasiertes Mammakarzinom. Keine Lebensverlängerung seit 20 Jahren.** *Dtsch Arztebl* 102(40):A 2706–2714
- 79.) Shi, S R; Cote, R J; Taylor, C R (1997) **Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future.** *J Histochem Cytochem* 45(3): 327–343
- 80.) Slamon, D J; Leyland-Jones, B; Shak, S; Fuchs, H; Paton, V; Bajamonde, A et al. (2001) **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** *New Engl J Med* 344(11): 783–792.
- 81.) Sørlie, T; Perou, C M; Tibshirani, R; Aas, T; Geisler, S; Johnsen, H et al. (2001) **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 98, H. 19, S. 10869–10874.
- 82.) Sotiriou, Christos; Neo, Soek-Ying; McShane, Lisa M; Korn, Edward L; Long, Philip M; Jazaeri, Amir et al. (2003) **Breast cancer classification and prognosis**

**based on gene expression profiles from a population-based study.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100(18): 10869-10874

83.) Stingl, John; Eirew, Peter; Ricketson, Ian; Shackleton, Mark; Vaillant, François; Choi, David et al. (2006) **Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells.** *Nature* 439(7079): 993–997

84.) Tavassoli, Fattaneh A.; Devilee, Peter (2003) **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs.** (World Health Organisation classification of tumours, 5) IARC Press Lyon

85.) Tham, Yee-Lu; Sexton, Krystal; Kramer, Rita; Hilsenbeck, Susan; Elledge, Richard (2006) **Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases.** *Cancer* 107(4): 696–704

86.) Thor A.D., Wang J. Bartow S.A. in (2004) **The Breast.** S.: 996-1017 in Rubin E (Hrg.) „Rubin's pathology“ (4.Aufl) Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia

87.) Tischkowitz, Marc; Brunet, Jean-Sébastien; Bégin, Louis R; Huntsman, David G; Cheang, Maggie C U; Akslen, Lars A et al. (2007) **Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer.** *BMC Cancer* 7:134

88.) Tsuda, H; Takarabe, T; Hasegawa, F; Fukutomi, T; Hirohashi, S (2000) **Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases.** *Am J Surg Pathol* 24(2): 197–202

89.) Tsuda, H; Takarabe, T; Hasegawa, T; Murata, T; Hirohashi, S (1999) **Myoepithelial differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas with large central acellular zones.** *Hum Pathol* 30(10): 1134–1139

90.) Tumorregister München: **Überleben C50 Mammakarzinom (Frauen).** Online verfügbar unter [http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv\\_C50f\\_G.pdf](http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C50f_G.pdf).

91.) van de Rijn, Matt; Perou, Charles M; Tibshirani, Rob; Haas, Phillippe; Kallioniemi, Olli; Kononen, Juha et al. (2002) **Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome.** *Am J Pathol* 161(6): 1991–1996

92.) Villadsen, René; Fridriksdottir, Agla J; Rønnev-Jessen, Lone; Gudjonsson, Thorarinn; Rank, Fritz; LaBarge, Mark A et al. (2007) **Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast.** *J Cell Biol* 177(1): 87–101

93.) Vogel, C L; Azevedo, S; Hilsenbeck, S; East, D R; Ayub, J (1992) **Survival after first recurrence of breast cancer. The Miami experience.** *Cancer* 70(1): 129–135

94.) Walker, R A (2006) **Quantification of immunohistochemistry - issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I.** *Histopathology*, 49(4): 406–410

## 8. Verzeichnis der Abkürzungen

### 8. Verzeichnis der Abkürzungen

$\alpha$ -SMA.....	$\alpha$ -smooth muscle actin
cDNA.....	complementary Desoxyribonukleinsäure
CGH.....	comparative genomic hybridization
CK.....	Zytokeratin
c-kit.....	c-kit Receptor, CD117
DFS.....	disease free survival (krankheitsfreies Überleben)
EGFR.....	epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor
ER.....	Östrogenrezeptor
HR.....	Hormonrezeptor
IDC-NOS....	invasiv duktales Karzinom, nicht näher spezifiziert
ILC.....	invasiv lobuläres Karzinom
LK.....	Lymphknoten
LMU.....	Ludwig Maximilians Universität
mRNA.....	messenger Ribonukleinsäure
OAS.....	over all survival (Gesamtüberleben)
OASM.....	over all survival after metastasis (Gesamtüberleben nach Metastasierung)
PFPE.....	primär formalinfixiert Paraffineingebettet
PR.....	Progesteronrezeptor
RNA.....	Ribonukleinsäure
SP.....	Schnellschnitt Paraffineingebettet
WHO.....	World Health Organization

## 9.Danksagungen

### **9.Danksagungen**

An dieser Stelle sei all denjenigen gedankt, die mir diese Arbeit ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. Th. Kirchner für die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner Institutsleitung durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. J. Diebold für die Überlassung des Themas und insbesondere für Ratschläge und wertvolle Kritiken bei der Abfassung der Arbeit.

Frau PD Dr. D. Mayr für die hilfreiche Betreuung bei der Planung und Ausarbeitung der Arbeit.

Herrn Dr.S. Kahlert für die Überlassung der Patientendaten.

Den technischen Angestellten des immunhistochemischen Labors des pathologischen Institutes der LMU, Standort Innenstadt, Heike Prella, Irina Redich und Karina Windhorst für die Anfertigung der immunhistochemischen Schnitte. Ein besonderer Dank geht an Karina Windhorst für die Einführung in die Grundlagen der Immunhistochemie.

## **10.Lebenslauf**

### **1.Persönliche Daten**

Name: Patrick Andreas Mainka  
Geboren: 3.5.1971 in Gräfelfing  
Eltern: Peter und Sieglinde Mainka, geb. Sußmann  
Familienstand: ledig  
Kind: Vicente Mainka geb.5.2.1995

### **2.Schulbildung**

1977-1981 Grundschule in Emmering  
1981-1990 Graf Rasso Gymnasium Fürstenfeldbruck, Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife

### **3.Berufsausbildung**

1993 bis 1996 Berufsfachschule für Krankenpflege der Stadt München

### **4.Berufliche Tätigkeit**

1990 bis 1992 Zivildienstleistender als Pflegehelfer in der Abteilung für Innere Medizin des Kreiskrankenhauses Fürstenfeldbruck

1996 bis 1999 Krankenpfleger an der Abteilung für Dermatologie und Allergologie des Städtischen Krankenhauses München Schwabing

2000 - 2009 Krankenpfleger an der Urologischen Abteilung des Klinikums Großhadern der LMU München, seit Beginn des Medizinstudiums mit der Hälfte der regulären Arbeitszeit

1993 bis 2003 Nebenberuflich Pflege von Schwerbehinderten

seit 6/2009 Assistenzarzt an der Urologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München Harlaching

### **5. Hochschulausbildung**

WS 2002 Beginn des Medizinstudiums an der LMU München  
Physikum 9/2004 mit der Gesamtnote gut (1,66)  
Laborpraktikum am Adolf Butenandt Institut , Molekularbiologie, bei Prof. R.A. Rupp  
Famulaturen in Allgemeinmedizin, Innerer Medizin, Urologie und Pathologie  
Doktorand am Pathologischen Institut der LMU München  
Praktisches Jahr WS 07/08 – WS 08/09 , Wahlfach Urologie  
2. Staatsexamen 4/2009 mit der Gesamtnote sehr gut (1,5)

## 6.Veröffentlichungen

P.Mainka, D.Mayr, S.Kahlert, S.Marlow, T.Kirchner, J.Diebold (2008) **Basal and Myoepithelial Phenotype in Metastatic Mammary Carcinomas: A Prognostic Factor?** *Pathologe* (29) Suppl. 1: 31 (Abstract)

P.Mainka, D.Mayr, S.Kahlert, T.Kirchner, J.Diebold (2008) **Basaler und myoepithelialer Phänotyp des invasiven Mammakarzinoms. Prognostischer Faktor in der palliativen Situation?** Vortrag, 92. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie

P.Mainka, S.Kahlert, T.Kirchner, D.Mayr, J.Diebold (2008) **Basaler und myoepithelialer Phänotyp des invasiven Mammakarzinoms. Prognostischer Faktor in der palliativen Situation?** *Pathologe* (29): 363-369

S.Kahlert, P.Mainka, E.Knall, K.Bauer, D.Mayr (2008) **Efficacy of palliative chemotherapy for metastatic breast cancer according to HER2-status and basal cytokeratin expression.** Poster, 31<sup>st</sup> San Antonio Breast Cancer Symposium

J.Schiffers, S. Kahlert, P.Mainka, T.Kirchner, J.Diebold, D.Mayr (2009) **HER2 gene amplification and Topoisomerase-IIa-amplification/deletion in breast cancer: A comprehensive Fluorescence-in-situ hybridization analysis on 245 cases.** *Pathologe* (30) Suppl.1: 13 (Abstract)

## **11. Anhang**

### **11.1 zu Material und Methoden**

#### **11.1.1. Laborprotokoll: Immunhistochemische Untersuchung für CK14 mit der Polymerkonjugatmethode**

- 1.Schnitte entparaffinieren (30 min in Xylol 100%, rehydrieren in absteigender Alkoholreihe 96% / 70% / aqua dest je 5min)
- 2.Vorbehandlung: 30 min in Mikrowelle bei 600 Watt in TRS 6 (target retrieval solution Fa.*Dako*)
- 3.Inkubation in 7,5% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
4. 10 min fließend wässern
5. 5 min Inkubation in *Wash Buffer ph7,2 Fa.Zytomed Systems*
6. 10 min Inkubation in Protein Blockierungs Reagenz (Fa *Dako*)
7. Schnitte abputzen ohne zu spülen
8. 60 min Inkubation mit Primärantikörper Mouse Anti Human Cytokeratin14 ( Klon LL002 Fa.*Serotec*) bei Raumtemperatur, Verdünnung 1:150 (in antibody diluent Fa. *Dako*)
9. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa.Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
10. 30 min Inkubation mit *EnVision Fa Dako*
11. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa.Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
12. 10 min Inkubation in Aminoethyl-Carbazol Substrat Lösung(Fa. *Zymed Laboratories*)
13. 10 min fließend wässern
14. Gegenfärbung mit Hämalaun (Fa. *Vector*)
15. 10 min fließend wässern
16. eindecken mit Kaisers Glyceringelatine (Fa. *Merck*)

## 11. Anhang

### 11.1.2. Laborprotokoll: Immunhistochemische Untersuchung auf $\alpha$ -SMA, p63, ÖR und PR mit der LSAB (labeled streptavidin biotin) Methode

1. Schnitte entparaffinieren (30 min in Xylol 100%, rehydrieren in absteigender Alkoholreihe 96% / 70% / aqua dest je 5min)
2. Vorbehandlung: 30 min in Mikrowelle bei 600 Watt in TRS 6 (target retrieval solution Fa. *Dako*) für p63, in TUF (target unmasking fluid Fa. *PanPath*) für ÖR und PR und keine Vorbehandlung für  $\alpha$ -SMA
3. Inkubation in 7,5% Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )
4. 10 min fließend wässern
5. 5 min Inkubation in *Wash Buffer ph7,2 Fa. Zytomed Systems*
6. 10 min Inkubation in Protein Blockierungs Reagenz (Fa *Dako*)
7. Schnitte abputzen ohne zu spülen
8. 60 min Inkubation mit Primärantikörper Anti-Human muscle actin (Klon HHF35 Fa. *Dako*) Verdünnung 1:200, Anti-p63 (Klon BC4A4 Fa. *Biocare Medical*) Verdünnung 1:120, Anti-Östrogenrezeptor (Klon 6F11 Fa. *Novocastra*) Verdünnung 1:80 oder Anti-Progesteronrezeptor (Klon 1A6 Fa. *Novocastra*) Verdünnung 1:100; alle Verdünnt in antibody diluent Fa. *Dako*)
9. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa. Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
10. 30 min Inkubation mit LSAB-Link *Fa Dako*
11. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa. Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
12. 30 min Inkubation in LSAB Komplex Fa. *Dako*
13. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa. Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
12. 10 min Inkubation in Aminoethyl-Carbazol Substrat Lösung (*Fa. Zymed Laboratories*)
13. 10 min fließend wässern
14. Gegenfärbung mit Hämalaun (*Fa. Vector*)
15. 10 min fließend wässern
16. eindecken mit Kaisers Glyceringelatine (*Fa. Merck*)

## 11. Anhang

### **11.1.3. Laborprotokoll: Immunhistochemische Untersuchung auf CK5/6 mit der APAAP (alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase) Methode**

1. Schnitte entparaffinieren (30 min in Xylol 100%, rehydrieren in absteigender Alkohltreihe 96% / 70% / aqua dest je 5min)
2. Vorbehandlung: 30 min in Mikrowelle bei 600 Watt in ProTaqus II Antigen Enhancer (Fa. quartett)
3. 5 min Inkubation in *Wash Buffer ph7,2 Fa.Zytomed Systems*
4. 60 min Inkubation mit Primärantikörper Anti-Cytokeratin 5&6 (Klon D5/16B4 Fa. Zymed Laboratories) Verdünnung 1:150 in antibody diluent Fa. Dako)
5. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa. Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
6. 30 min Inkubation in REAL-Link *Fa Dako*
7. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa.Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
8. 10 min Inkubation in REAL APAAP Immunkomplex *Fa. Dako*
9. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa.Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
10. 30 min Inkubation in REAL-Link *Fa Dako*
11. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa.Zytomed Systems* , 5 min stehen lassen
12. 10 min Inkubation in REAL APAAP Immunkomplex *Fa. Dako*
13. zwei mal spülen mit *Wash Buffer ph7,2 Fa.Zytomed Systems*
14. 10 min Inkubation in REAL Chromogen *Fa.Dako*. 10 min fließend wässern
15. Gegenfärbung mit Hämalaun (*Fa. Vector*)
15. 10 min fließend wässern
16. eindecken mit Kaisers Glyceringelatine (*Fa. Merck*)

## 11. Anhang

### 11.1.4. Verwendete Reagenzien und Puffer:

TRS6 = **target retrieval solution** Fa. *Dako* Citratpuffer pH 6 # S2369

Protex II = **Pro Taqs II Antigen-Enhancer** Fa. *Biocyc* TRIS/HCl Puffer pH 9,5  
# 401602192

TUF= **target unmasking fluid** Fa. *PanPath* # Z00R.0000

Polymerkonjugat = Polymerkonjugat Methode **Envision™** mit Anti Maus IgG  
Sekundärantikörper, horseradish peroxidase und Rückgrat aus inertem  
Dextranmolekül Fa. *Dako* # K4001

APAAP = Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Methode , **APAAP-  
REAL Link** , **APAAP-REAL Immunkomplex und REAL Chromogen Lsg.** Fa.  
*Dako* # K50000

LSAB = Labelled StreptAvidin-Biotin Methode ; **LSAB Link und LSAB Komplex**  
Fa. *Dako* # K0674

**Zytomed Systems Wash Buffer** ; Phosphatpuffer pH 7,2 Fa. *Zytomed Systems* #  
ZUC020-2500

Antibody diluent = **antibody diluent** TRIS/HCl Puffer mit stabilisierenden Proteinen  
und 0,015 mol/L Natriumazid Fa. *Dako* # S0809

AEC = **Aminoethyl Carbazol Substratlösung** für horseradish bzw. Meerrettich  
Peroxidase Fa. *Zymed* # 51102187

**Protein Blockierungsreagenz** Fa. *Dako* # X0909

**Kaisers Glyceringelatine** Fa. *Merck* # 109242

**Hämalaun** Fa. *Vector Laboratories* # H3401

# 11. Anhang

## 11.2. Anhang Cox Regressionsanalyse

Codierungen für kategoriale Variablen(c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p)

	Häufigkeit	(1)(a)	(2)	(3)
Histologie(b)	1=inv. duk. Ca.	191	0	0
	2=inv. lob. Ca.	18	1	0
	3=inv. dukt. + lob	2	0	1
	4=muzinös	1	0	0
pT(b)	1,00=pT1	38	0	0
	2,00=pT2	94	1	0
	3,00=pT3	32	0	1
	4,00=pT4	48	0	0
LK_Stat(b)	1=negativ	32	0	
	2=positiv	180	1	
HR_STAT(b)	,00=neg	89	1	
	1,00=pos	123	0	
Basal(b)	1,00=basal	60	0	
	2,00=nonbasal	152	1	
Myoepit(b)	1,00=myoepithelial	19	0	
	2,00=Nicht myoepithelial	193	1	
ct_jah(b)	1=1991-1995	61	1	0
	2=1996-1999	84	0	1
	3=2000-2005	67	0	0
Grade_3(b)	,00=Grade 1 o 2	98	1	
	1,00=Grade 3	114	0	
Doppelt_pos(b)	1,00=neg	196	0	
	2,00=pos	16	1	
HER2_Stat(b)	,00=neg	157	0	
	1,00=pos	55	1	
Dominant(b)	,00=nondombas	182	0	
	1,00=dombas	30	1	
Basaloid(b)	,00=nicht basaloid	182	0	
	1,00=Basaloid	30	1	
M_f_Ü(b)	,00=M1	74	0	0
	1,00=<24	56	1	0
	2,00=>24	82	0	1
ALtMet1Gr(b)	1,00	69	0	
	2,00	143	1	

a Die Variable (0,1) wurde umkodiert. Die Koeffizienten stimmen daher nicht mit den Koeffizienten für die Indikatorkodierung (0,1) überein.

b Kodierung für Indikatorparameter

c Kategorie-Variable: Histologie (histologischer Typ (Ersttumor))

d Kategorie-Variable: pT (pT Stadien zusammengefaßt)

e Kategorie-Variable: LK\_Stat (Nodalstatus)

f Kategorie-Variable: HR\_STAT (ER oder PR pos)

g Kategorie-Variable: Basal (>10%CK56 or 14)

h Kategorie-Variable: Myoepit (>10%SMA or p63)

i Kategorie-Variable: ct\_jah (Startjahr der pall. Chemotherapie)

j Kategorie-Variable: Grade\_3 (Grade 3)

k Kategorie-Variable: Doppelt\_pos (CK5/6 CK14 synchron positiv)

l Kategorie-Variable: HER2\_Stat

m Kategorie-Variable: Dominant (dominant basal pattern)

n Kategorie-Variable: Basaloid (basaloid pattern)

o Kategorie-Variable: M\_f\_Ü

p Kategorie-Variable: ALtMet1Gr

Variablen in der Gleichung

# 11.Anhang

		B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)	
Schritt 1	LK_Stat	1,007	,240	17,568	1	,000	2,737	
	HR_STAT	,257	,200	1,650	1	,199	1,293	
	ct_jah			16,236	2	,000		
	ct_jah(1)	,824	,213	14,968	1	,000	2,279	
	ct_jah(2)	,199	,187	1,139	1	,286	1,220	
	Doppelt_pos	,512	,331	2,393	1	,122	1,669	
	Grade_3	-,051	,182	,080	1	,778	,950	
	Histologie			2,021	3	,568		
	Histologie(1)	,343	,285	1,449	1	,229	1,409	
	Histologie(2)	-,555	,755	,540	1	,462	,574	
	Histologie(3)	-,055	1,029	,003	1	,958	,947	
	pT			4,585	3	,205		
	pT(1)	-,258	,220	1,373	1	,241	,773	
	pT(2)	-,491	,285	2,960	1	,085	,612	
	pT(3)	,021	,256	,007	1	,935	1,021	
	Basal	,083	,252	,109	1	,742	1,086	
	Myoepit	-,362	,271	1,781	1	,182	,697	
	Dominant	,413	,311	1,767	1	,184	1,511	
	Basaloid			.	0(a)	.		
	M_f_Ü			8,780	2	,012		
	M_f_Ü(1)	,532	,230	5,333	1	,021	1,702	
	M_f_Ü(2)	,522	,193	7,310	1	,007	1,686	
	ALtMet1Gr	,105	,178	,346	1	,556	1,111	
	HER2_Stat	,124	,214	,334	1	,563	1,132	
	Schritt 3	LK_Stat	1,011	,240	17,807	1	,000	2,747
		HR_STAT	,270	,194	1,945	1	,163	1,310
ct_jah				16,188	2	,000		
ct_jah(1)		,822	,213	14,940	1	,000	2,274	
ct_jah(2)		,205	,186	1,215	1	,270	1,227	
Doppelt_pos		,511	,331	2,381	1	,123	1,667	
Histologie				1,967	3	,579		
Histologie(1)		,340	,285	1,426	1	,232	1,405	
Histologie(2)		-,534	,751	,505	1	,477	,586	
Histologie(3)		-,026	1,025	,001	1	,979	,974	
pT				4,755	3	,191		
pT(1)		-,254	,220	1,335	1	,248	,776	
pT(2)		-,487	,285	2,913	1	,088	,615	
pT(3)		,037	,249	,023	1	,881	1,038	
Basal		,080	,251	,100	1	,752	1,083	
Myoepit		-,354	,270	1,724	1	,189	,702	
Dominant		,425	,308	1,906	1	,167	1,529	
M_f_Ü				8,736	2	,013		
M_f_Ü(1)		,531	,230	5,335	1	,021	1,701	
M_f_Ü(2)		,519	,193	7,251	1	,007	1,680	
ALtMet1Gr		,097	,176	,303	1	,582	1,102	
HER2_Stat		,140	,206	,463	1	,496	1,150	
Schritt 4		LK_Stat	1,007	,239	17,726	1	,000	2,738
		HR_STAT	,257	,190	1,838	1	,175	1,293
		ct_jah			16,157	2	,000	

## 11.Anhang

	ct_jah(1)	,818	,212	14,900	1	,000	2,267
	ct_jah(2)	,202	,185	1,191	1	,275	1,224
	Doppelt_pos	,482	,317	2,313	1	,128	1,619
	Histologie			1,991	3	,574	
	Histologie(1)	,346	,284	1,479	1	,224	1,413
	Histologie(2)	-,520	,749	,482	1	,488	,594
	Histologie(3)	-,025	1,025	,001	1	,980	,975
	pT			4,914	3	,178	
	pT(1)	-,254	,220	1,339	1	,247	,776
	pT(2)	-,489	,285	2,941	1	,086	,613
	pT(3)	,044	,249	,031	1	,861	1,045
	Myoepit	-,349	,269	1,688	1	,194	,705
	Dominant	,377	,266	2,010	1	,156	1,457
	M_f_Ü			8,619	2	,013	
	M_f_Ü(1)	,526	,230	5,237	1	,022	1,692
	M_f_Ü(2)	,515	,192	7,162	1	,007	1,673
	ALtMet1Gr	,094	,176	,284	1	,594	1,098
	HER2_Stat	,131	,204	,413	1	,520	1,140
Schritt 5	LK_Stat	1,017	,239	18,100	1	,000	2,765
	HR_STAT	,256	,189	1,845	1	,174	1,292
	ct_jah			15,944	2	,000	
	ct_jah(1)	,811	,212	14,685	1	,000	2,250
	ct_jah(2)	,202	,186	1,179	1	,278	1,224
	Doppelt_pos	,463	,313	2,183	1	,140	1,589
	Histologie			2,127	3	,546	
	Histologie(1)	,368	,281	1,708	1	,191	1,444
	Histologie(2)	-,480	,746	,415	1	,519	,619
	Histologie(3)	,019	1,021	,000	1	,985	1,020
	pT			5,415	3	,144	
	pT(1)	-,267	,218	1,499	1	,221	,766
	pT(2)	-,520	,280	3,452	1	,063	,595
	pT(3)	,031	,247	,016	1	,900	1,032
	Myoepit	-,361	,268	1,817	1	,178	,697
	Dominant	,387	,263	2,161	1	,142	1,472
	M_f_Ü			8,739	2	,013	
	M_f_Ü(1)	,510	,228	5,025	1	,025	1,666
	M_f_Ü(2)	,527	,191	7,635	1	,006	1,694
	HER2_Stat	,158	,198	,637	1	,425	1,171
Schritt 6	LK_Stat	1,020	,239	18,222	1	,000	2,773
	HR_STAT	,237	,185	1,635	1	,201	1,267
	ct_jah			15,031	2	,001	
	ct_jah(1)	,793	,211	14,157	1	,000	2,209
	ct_jah(2)	,236	,184	1,645	1	,200	1,266
	Doppelt_pos	,441	,313	1,991	1	,158	1,555
	pT			4,225	3	,238	
	pT(1)	-,186	,210	,789	1	,374	,830
	pT(2)	-,427	,272	2,477	1	,116	,652
	pT(3)	,074	,241	,093	1	,761	1,076
	Myoepit	-,335	,267	1,570	1	,210	,716
	Dominant	,388	,263	2,182	1	,140	1,474
	M_f_Ü			8,498	2	,014	

## 11.Anhang

Schritt 7	M_f_Ü(1)	,471	,224	4,407	1	,036	1,601	
	M_f_Ü(2)	,527	,189	7,780	1	,005	1,694	
	HER2_Stat	,133	,194	,467	1	,494	1,142	
	LK_Stat	1,043	,238	19,243	1	,000	2,837	
	HR_STAT	,263	,182	2,087	1	,149	1,301	
	ct_jah			14,575	2	,001		
	ct_jah(1)	,766	,207	13,692	1	,000	2,152	
	ct_jah(2)	,217	,182	1,423	1	,233	1,242	
	Doppelt_pos	,420	,311	1,827	1	,176	1,522	
	pT			4,006	3	,261		
	pT(1)	-,166	,207	,639	1	,424	,847	
	pT(2)	-,409	,270	2,295	1	,130	,664	
	pT(3)	,085	,241	,123	1	,725	1,088	
	Myoepit	-,366	,263	1,943	1	,163	,693	
	Schritt 8	Dominant	,370	,262	2,004	1	,157	1,448
M_f_Ü				8,879	2	,012		
M_f_Ü(1)		,503	,219	5,275	1	,022	1,654	
M_f_Ü(2)		,527	,189	7,789	1	,005	1,693	
LK_Stat		1,071	,239	20,042	1	,000	2,920	
HR_STAT		,310	,180	2,967	1	,085	1,363	
ct_jah				19,605	2	,000		
ct_jah(1)		,863	,201	18,361	1	,000	2,370	
ct_jah(2)		,244	,181	1,828	1	,176	1,277	
Doppelt_pos		,404	,305	1,751	1	,186	1,498	
Myoepit		-,335	,262	1,640	1	,200	,715	
Dominant		,301	,257	1,377	1	,241	1,352	
M_f_Ü				8,918	2	,012		
M_f_Ü(1)		,416	,210	3,923	1	,048	1,516	
M_f_Ü(2)		,529	,181	8,490	1	,004	1,696	
Schritt 9	LK_Stat	1,016	,233	19,014	1	,000	2,762	
	HR_STAT	,372	,170	4,772	1	,029	1,450	
	ct_jah			21,224	2	,000		
	ct_jah(1)	,889	,200	19,764	1	,000	2,433	
	ct_jah(2)	,250	,181	1,901	1	,168	1,284	
	Doppelt_pos	,516	,289	3,189	1	,074	1,676	
	Myoepit	-,348	,262	1,769	1	,184	,706	
	M_f_Ü			8,419	2	,015		
	M_f_Ü(1)	,392	,210	3,492	1	,062	1,480	
	M_f_Ü(2)	,516	,181	8,082	1	,004	1,675	
	Schritt 10	LK_Stat	1,014	,233	18,993	1	,000	2,756
		HR_STAT	,386	,169	5,205	1	,023	1,472
		ct_jah			20,061	2	,000	
		ct_jah(1)	,847	,196	18,683	1	,000	2,333
		ct_jah(2)	,240	,181	1,757	1	,185	1,271
Doppelt_pos		,604	,281	4,621	1	,032	1,830	
M_f_Ü				9,353	2	,009		
M_f_Ü(1)		,411	,209	3,872	1	,049	1,508	
M_f_Ü(2)		,538	,180	8,972	1	,003	1,713	

a Freiheitsgrad wegen konstanter oder linear abhängiger Kovariaten reduziert