

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Ludwig-Maximilian-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. S. Mahner

**Prospektiver Vergleich der Invasionsfaktoren  
uPA/PAI-1 und des 21-Gen-Tests OncotypeDX<sup>®</sup>  
im Rahmen der WSG Plan-B Studie**

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

vorgelegt von  
**Tom Degenhardt**  
aus Dresden

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Nadia Harbeck  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Schindlbeck  
Priv. Doz. Dr. Oliver J. Stötzer  
Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:  
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2016

## Inhaltsverzeichnis

1	Hintergrund .....	5
1.1	Invasionsfaktoren uPA/PAI-1.....	5
1.1.1	Biologische Grundlagen von uPA/PAI-1 .....	6
1.1.2	Bestimmungsverfahren der Proteasen uPA/PAI-1 .....	7
1.1.3	Validierung von uPA und PAI-1 als Prognosefaktoren .....	8
1.1.4	uPA/PAI-1 als prädiktive Faktoren .....	13
1.1.5	uPA/PAI-1 in der klinischen Routine in Deutschland .....	15
1.2	21-Gen-Analyse: Der Recurrence Score des OncotypeDX®.....	16
1.2.1	Grundlagen des Recurrence-Score .....	16
1.2.2	Validierung des Recurrence Score als Prognosefaktor .....	17
1.2.3	Der Recurrence Score als prädiktiver Faktor .....	20
1.2.4	RS-Risikogruppen versus Risikoskala .....	24
1.3	Übersicht über weitere Biomarker beim Mammakarzinom .....	24
1.3.1	Proliferationsassoziiertes Protein Ki67 .....	24
1.3.2	70-Gen-Expressionsprofil MammaPrint® .....	25
1.3.3	Dezentral bestimmtes Risikoprofil: EndoPredict® .....	26
1.3.4	Subtypen des Mammakarzinoms: Prosigna®: PAM50-Test .....	27
1.4	Vergleich einiger Biomarker .....	29
1.4.1	Unterschiedliche Ergebnisse in identischen Kollektiven .....	29
1.4.2	Gewebe zur Bestimmung der Biomarker .....	31
1.4.3	Einfluss von Stanzbiopsien auf uPA/PAI-1, RS und EndoPredict®.....	32
1.4.4	Kostenvergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score .....	33
1.5	Mangelhafte Standards bei der Bestimmung etablierter Faktoren .....	33
2	Zielsetzung .....	34
3	Methoden: Die WSG-Plan B Studie.....	35

3.1	Bestimmung der Proteasen uPA/PAI-1, des Recurrence Score sowie der histopathologischen Faktoren in der Plan B Studie .....	38
3.2	Statistische Überlegungen .....	39
4	Ergebnisse .....	40
5	Diskussion: Vergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score .....	46
6	Laufende Studien: ein Ausblick .....	52
6.1	RxPonder, TAILORx und WSG-ADAPT: prospektive Validierung des RS .....	52
6.2	uPA/PAI-1 im modernen Therapieschema; NNBC-3 Studie .....	55
7	Zusammenfassung: .....	56
8	Literaturverzeichnis .....	58
9	Abbildungsverzeichnis .....	70
10	Danksagung .....	72
11	Eidesstattliche Versicherung .....	73

# 1 Hintergrund

Beim Mammakarzinom sind die Prognose, der Nutzen einer Therapie und das Ansprechen auf diese wohl die wichtigsten Informationen, die Patientinnen und Therapeuten benötigen, um Therapieentscheidungen treffen zu können. Die traditionellen prognostischen und prädiktiven Faktoren wie Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Tumorgrading, Anzahl der befallenen Lymphknoten, Hormonrezeptor- und Her2-Status sind heutzutage nicht mehr ausreichend, um Patientinnen mit Brustkrebs eindeutig einer Hoch- beziehungsweise Niedrigrisikogruppe zuzuweisen. Einen großen Fortschritt bieten hier gut validierte moderne Biomarker, wie die Proteasen Urokinase Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und sein Inhibitor Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1), sowie die 21-Gen-Analyse, der Recurrence Score des OncotypeDX®. Beide, der Recurrence Score und die Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 sind von den Leitlinien der AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie), des St. Gallen-Konsensus und des ASCO (American Society of Clinical Oncology) genannte bzw. empfohlene Biomarker, die die Prognose bestimmen und bei der Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie helfen können. Die adjuvante Chemotherapie hat für Patienten mit primärem Mammakarzinom einen Benefit im Gesamtüberleben gezeigt (1). Die Übertherapie ist jedoch ein zunehmend wichtiges Thema, da aufgrund der nationalen Screening Programme in Deutschland mehr und mehr Patientinnen mit Brustkrebs in einem sehr frühen Stadium ohne oder nur mit ein paar wenigen befallenen Lymphknoten diagnostiziert werden. Der große Teil dieser Patientinnen kann allein durch eine lokale Therapie geheilt werden (2). Auch dafür werden neue Biomarker dringend benötigt, die uns bei der Entscheidung helfen, welcher Patientin wir die Chemotherapie ersparen können, beziehungsweise welche Patientin besonders von einer Chemotherapie profitiert.

In dieser Arbeit werden die ersten im Voraus geplanten Korrelationen von den beiden gut validierten Biomarkern Recurrence Score und uPA/PAI-1 aus der WSG-Plan B Studie vorgestellt.

## 1.1 Invasionsfaktoren uPA/PAI-1

Die Entwicklung neuer Biomarker ist ein langwieriger Prozess. Von der Idee über den Nachweis der zugrunde liegenden biologischen Vorgänge bis hin zu einem geeigneten

Testverfahren und dem Einsatz in der klinischen Routine dauert es viele Jahre der intensiven Forschungsarbeit. Im Fall von uPA/PAI-1 dauerte dieser Prozess mehr als zehn Jahre.

### 1.1.1 Biologische Grundlagen von uPA/PAI-1

Der Urokinase Type Plasminogen Aktivator und sein Gegenspieler Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 spielen eine Schlüsselrolle bei der Invasion und Metastasierung von Brustkrebs. Für diese Eigenschaften maligner Zellen sind verschiedene ineinandergreifende Prozesse nötig: die Ablösung der Zellen von ihrer ursprünglichen Lokalisation, die Migration, die Invasion des sie umgebenden Gewebes, der Zugang zu Lymph- und Blutgefäßen, sowie die Fähigkeit sich andernorts anzusiedeln (3). Bei all diesen Vorgängen sind proteolytische Enzymsysteme involviert. Eines der wichtigsten dieser Systeme ist das uPA/PAI-1 System. Es beinhaltet die Aktivierung des inaktiven Plasminogens zur Breitspektrum-Serin-Proteinase Plasmin, welche in der Lage ist, Matrixmetalloproteasen zu aktivieren, sowie selbst einen Großteil der Proteine der Extrazellulärmatrix abzubauen und somit die Voraussetzung für Migration und Invasion der Brustkrebszellen zu schaffen (4). Ein weiterer, nicht proteolytischer Mechanismus des uPA/PAI-1-Systems ist die Adhäsion der Tumorzelle am Vitronektin der Extrazellulärmatrix. Diese wird über den uPA-Rezeptor in Interaktion mit Integrinen der Zellmembran vermittelt. PAI-1 löst diese Bindung, sodass die zielgerichtete Fortbewegung der Tumorzelle im Gewebe ermöglicht wird (siehe: Abbildung 1: Migration und Invasion durch uPA/PAI-1). Beide Mechanismen werden durch die Bindung von uPA an seinen Zellmembran gebundenen Rezeptor uPA-R (CD 87) aktiviert und durch die Bindung des Inhibitors PAI-1 kontrolliert und reguliert. Die Interaktion von PAI-1 mit dem uPA/uPA-R-Komplex führt zur Internalisierung des gesamten Tertiärkomplexes mit anschließendem Abbau von uPA und PAI-1 in der Zelle, während der uPA-Rezeptor zurück an die Zelloberfläche geschleust wird. Dieser Vorgang ermöglicht die Organisation einer effizienten proteolytischen Aktivität an der Zelloberfläche, sowie eine zielgerichtete Fortbewegung. Die Aktivierung von Plasmin und die Bildung des uPA/uPA-R-Komplexes bereitet die Zelle und die extrazelluläre Matrix auf die Migration vor. Diese erfolgt gezielt durch die Bindung von PAI-1 und den lysosomalen Abbau von uPA/PAI-1 und das Wiedererscheinen des unbesetzten uPA-Rezeptors an der Zelloberfläche (5). Neben dem Ab- und Umbau des den Tumor umgebenden Gewebes ist das uPA/PAI-1-System noch in weitere Mechanismen involviert: Chemotaxis, Zellproliferation, Zellkommunikation, Adhäsion und Angiogenese (6). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Mechanismen werden noch

weitere Veränderungen an den Tumorzellen selbst sowie am umgebenden Gewebe im Zusammenhang mit uPA/PAI-1 beobachtet. Es handelt sich im Einzelnen um Up-, beziehungsweise Downregulierungen von Signalkaskaden, Veränderungen in der Oberflächenstruktur der Zellmembran, sowie Endo- und Exozytose von Proteinen (7).

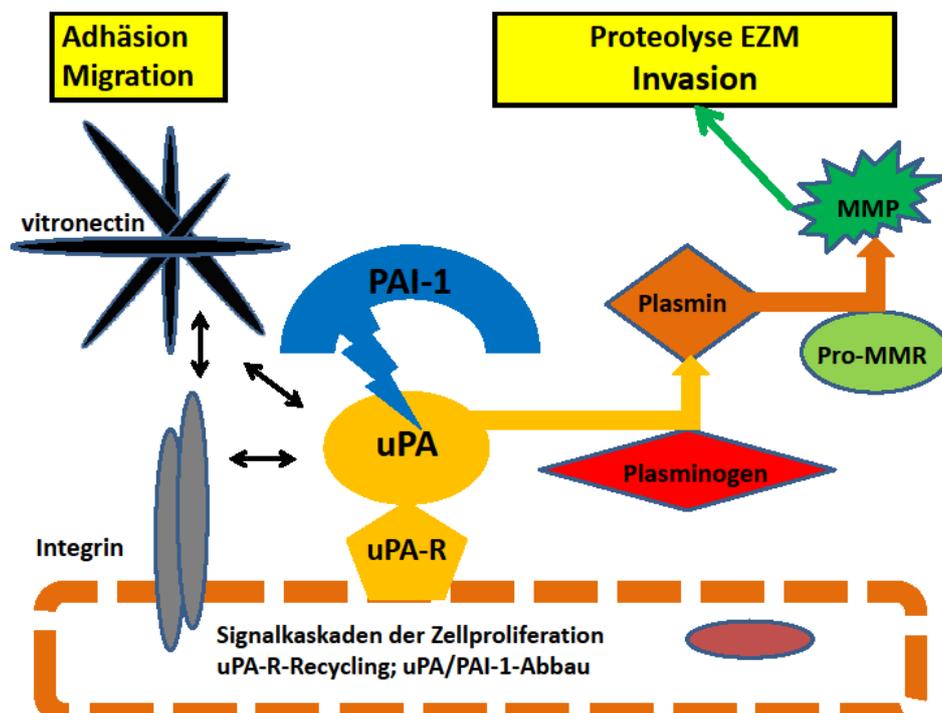


Abbildung 1: Migration und Invasion durch uPA/PAI-1 modifiziert nach Harbeck et al, Thrombosis and Haemostasis 2004 (8)

### 1.1.2 Bestimmungsverfahren der Proteasen uPA/PAI-1

Für die routinemäßige Bestimmung der Proteasenfaktoren uPA und PAI-1 wird vom Pathologen ein nicht fixiertes, ca. 50-200 mg schweres, repräsentatives Gewebestück des Tumors abgetrennt und zeitnah ohne Zusätze bei mindestens  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Auch die Bestimmung aus mindestens zwei bis drei Stanzzyllindern ist möglich (9). uPA und PAI-1 werden aus dem Gewebe extrahiert und mittels Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) quantitativ bestimmt. Als Ergebnis erhält der behandelnde Arzt Absolutwerte für die Proteasen uPA und PAI-1. Der validierte Grenzwert für uPA ist 3 ng/mg und 14 ng/mg für PAI-1 (10). In einer externen Kontrolle des Qualitätsstandards konnte dem kommerziell erhältlichen ELISA-Test

Femmetelle® von American Diagnostics® ein hoher Qualitätsstandard und eine gute Reproduzierbarkeit bescheinigt werden (11).

### 1.1.3 Validierung von uPA und PAI-1 als Prognosefaktoren

Vor dem Hintergrund, dass uPA und PAI-1 bei der Zellmigration und Invasion des Gewebes eine so wichtige Rolle spielen und gerade diese Eigenschaften einen Hauptgrund für ein schlechtes Gesamtüberleben der Tumorpatienten darstellen, wurde die Rolle der beiden Proteasen als prognostische und prädiktive Marker schon früh untersucht. Bereits 1988 ergaben sich Hinweise darauf, dass erhöhte Werte von uPA im Tumor bei Brustkrebspatientinnen mit einem verringerten krankheitsfreien Überleben einhergehen (12). Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass nicht nur die enzymatische Aktivität, sondern vor allem uPA-Antigen-Level von prognostischer Relevanz sind (13). Zwei Jahre später stellte sich uPA als starker prognostischer Marker unabhängig vom Lymphknotenstatus, der Tumorgroße und des Östrogenrezeptorstatus heraus (14) (15). Im selben Jahr konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Antigenlevel von PAI-1 einen enormen Einfluss auf die Prognose der Patientinnen mit Brustkrebs hatten. Patientinnen mit einem niedrigen Level an PAI-1 im Tumor hatten eine signifikant bessere Überlebenschancen als Patientinnen mit einem erhöhten PAI-1 (16). Dieser Zusammenhang, dass erhöhte Antigenlevel des Inhibitors von uPA mit einer schlechteren Prognose einherging, erscheint widersprüchlich. Basierend auf den im Abschnitt „Biologische Grundlagen von uPA/PAI-1“ beschriebenen Vorgängen, beruht das gesamte System jedoch auf komplexen Interaktionen von Agonist und Antagonist. Dieser starke prognostische Wert von uPA und PAI-1 für krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben wurde in einer Vielzahl an darauffolgenden Studien bestätigt (siehe: Abbildung 6).

Einmalig für einen biologischen Tumormarker ist das Fehlen widersprüchlicher Evidenz zum Einfluss von uPA/PAI-1 auf die Prognose. Dies beeindruckt besonders auf dem Hintergrund der demographischen Vielfalt, die von den diversen Studien untersucht wurden. Harbeck et al. zeigten 1999, dass die Kombination aus erhöhten uPA- und/oder PAI-1-Werten gegenüber einer Erniedrigung beider Werte der Bestimmung der einzelnen Faktoren alleine überlegen ist. Zudem ist die prognostische Aussagekraft unabhängig von etablierten Faktoren, wie Menopausenstatus, Tumorgroße, Tumorgading und Hormonrezeptorstatus (10). Interessanterweise hat die zusätzliche Bestimmung des Her2-Status keinen Einfluss auf die Risikoeinschätzung durch uPA/PAI-1 bei Patientinnen mit nodal negativem Brustkrebs (17).

Als erste große prospektive klinische Studie, in der aufgrund von modernen Biomarkern Entscheidungen für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie getroffen wurden, startete 1993 die Chemo-N<sub>0</sub>-Studie. Die Rationale der Studie bestand darin, dass damals rund 90 % der Patientinnen mit primärem Brustkrebs ohne befallene Lymphknoten aufgrund der etablierten klinischen Charakteristika, wie Tumorgröße, Alter, Menopausenstatus, Hormonrezeptorstatus und histo-pathologischem Grading zur Hochrisikogruppe gezählt wurden und somit potentielle Kandidaten für eine Chemotherapie waren (18). Jedoch erlitten nur circa 30 % dieser Patientin ein Rezidiv und würden deshalb eine adjuvante Therapie benötigen. Es wurden neue Entscheidungshilfen benötigt zum einen für die Prognose der Erkrankungen und zum anderen bezüglich des Benefits von einer adjuvanten Chemotherapie. Mit Hilfe der uPA/PAI-1 Antigenlevel aus dem Primärtumor ließen sich rund 55 % der Patientinnen mit nodalnegativer Erkrankung zur Niedrigsikogruppe zuordnen. Diese Gruppe mit niedrigen uPA/PAI-1-Werten hatte eine exzellente Prognose und eine Rückfallwahrscheinlichkeit von nur 5 % in sechs Jahren (10). Es stellte sich also die Frage, ob man dieser Gruppe generell eine Chemotherapie anraten sollte (19). In der ersten geplanten Zwischenbilanz der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie nach einem Beobachtungszeitraum von 4,5 Jahren bestätigten Jänicke et al. die prognostische Relevanz des Tests für das krankheitsfreie Überleben und zeigten, dass Hochrisiko-Patientinnen nach uPA/PAI-1 von einer adjuvanten Chemotherapie im Sinne einer Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens profitierten (20). Diese Ergebnisse konnten in einer zweiten geplanten Zwischenanalyse 2001 von Harbeck et al bestätigt werden. Zusätzlich konnte die Aussagekraft von uPA/PAI-1 auf das Gesamtüberleben validiert werden. Die Gruppe der nodalnegativen Brustkrebspatienten mit niedrigem uPA und PAI-1 ohne adjuvante Therapie hatten eine exzellente Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von ungefähr 95 % (21).

Einige Probleme im Zusammenhang mit der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie wurden von den Autoren schon früh aufgeführt. Zu Beginn der Studie, bestand keine generelle Empfehlung zur adjuvanten Therapie von Patientinnen mit nodalnegativer Erkrankung. Erst 1998 wurde der adjuvanten Therapie bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall durch die St. Gallen Konsensuskriterien mehr Gewichtung gegeben (18). Desweiteren haben Metaanalysen der „Early Breast Cancer Trialists‘ Collaborative Group“ 1998 den deutlichen Nutzen von Tamoxifen bei hormonrezeptor-positiven Erkrankungen gezeigt (22). Zudem enthielt das Chemotherapieschema der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie keine modernen Substanzen wie Taxane oder

Anthrazykline, sondern die Substanzen: Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Floururacil (CMF). Aus diesen Gründen wurde die Rekrutierung im Dezember 1998 abgebrochen (20). Die abschließenden Zehn-Jahres-Überlebensdaten der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie veröffentlichten Harbeck et al. 2013 im European Journal of Oncology. Der prognostische Wert von uPA/PAI-1 wurde auch in der abschließenden Analyse bestätigt. Zudem stellte sich, wie in Abbildung 2 zu sehen ist, das histo-pathologische Grading als unabhängiger Prognosefaktor heraus.

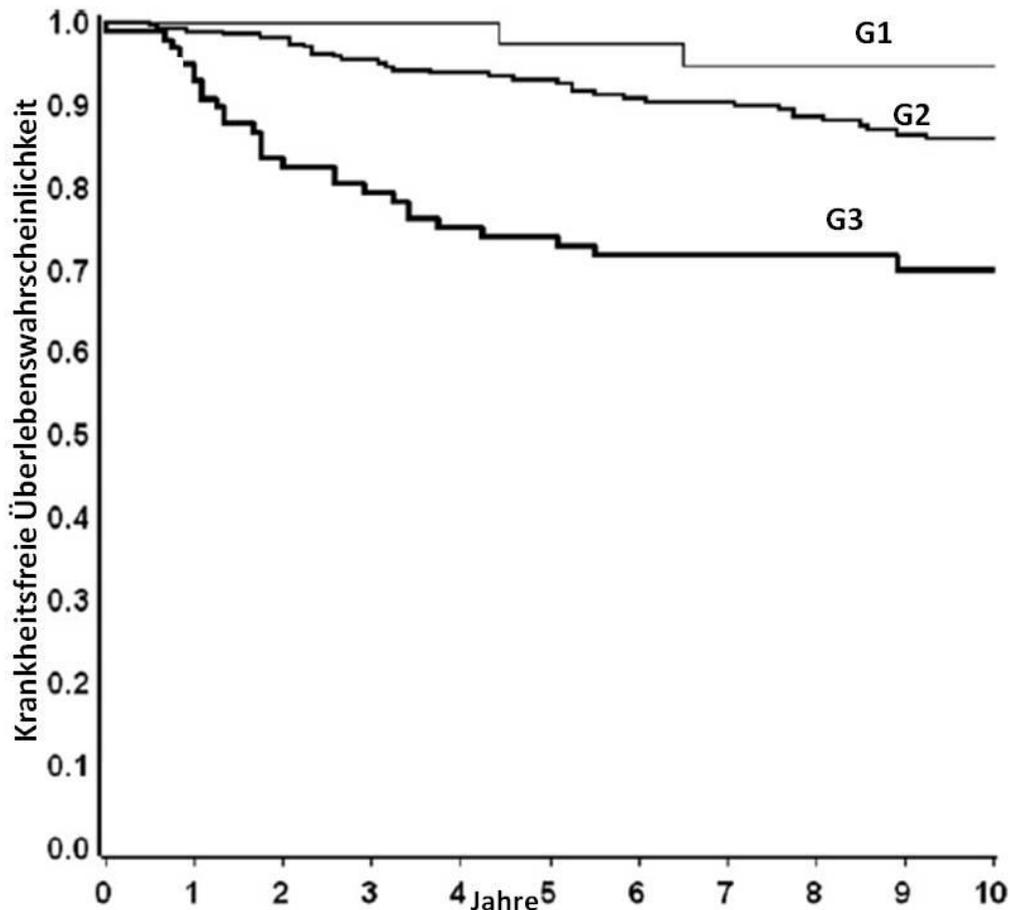


Abbildung 2: Krankheitsfreies Überleben nach histo-pathologischem Grading, modifiziert nach (23)

In der klinisch relevanten Subgruppe der G2-Tumore bewies sich uPA/PAI-1 als Marker, der in dieser nach histo-pathologischem Grading mittleren Risikogruppe eine Aussage über die Prognose der Erkrankung treffen kann (siehe: Abbildung 3).

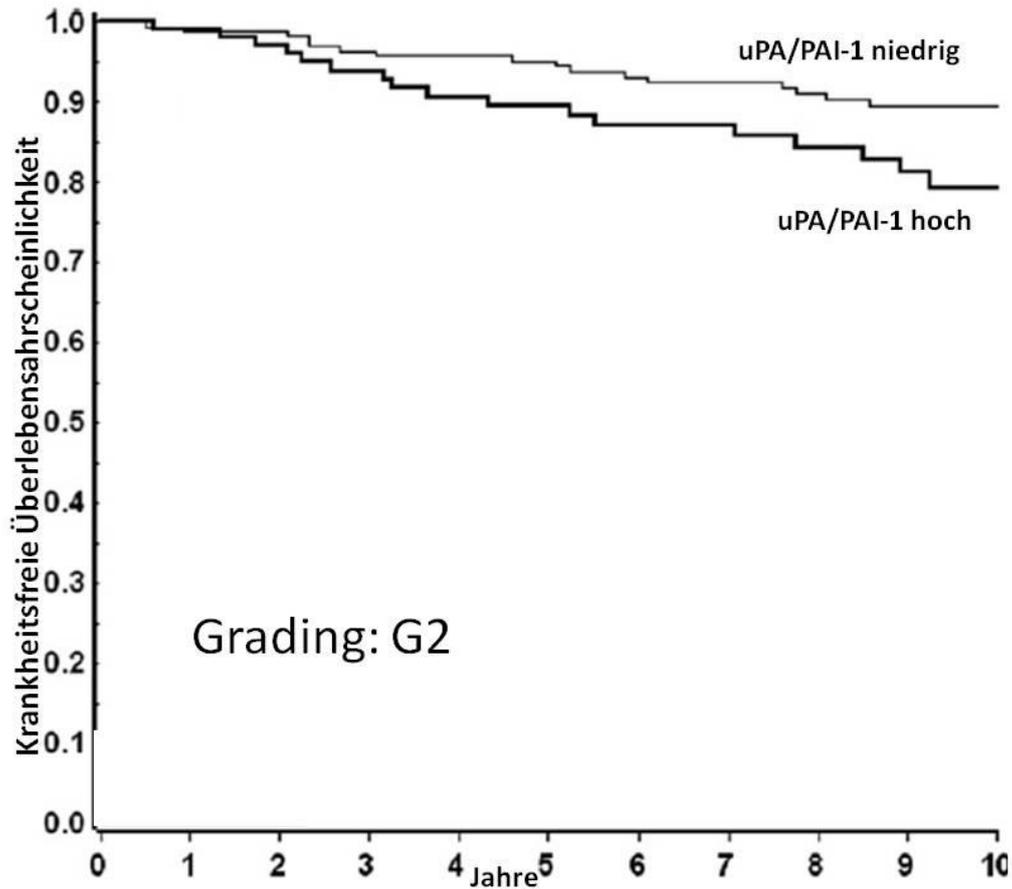


Abbildung 3: uPA/PAI-1 bei Tumoren mit mittlerer Differenzierung (Grading: G2), modifiziert nach (23)

In der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie erhielten 409 Patientinnen keine adjuvante Therapie. Davon erlitten nur 12,9 % der Patientinnen mit niedrigen uPA- und PAI-1-Werten im Zeitraum von zehn Jahren ein Rezidiv. Demgegenüber waren es schon 23 % der Patientinnen mit erhöhtem uPA und/oder PAI-1. Auch im Gesamtüberleben unterschieden sich die beiden Risikogruppen (siehe: Abbildung 4) (23).

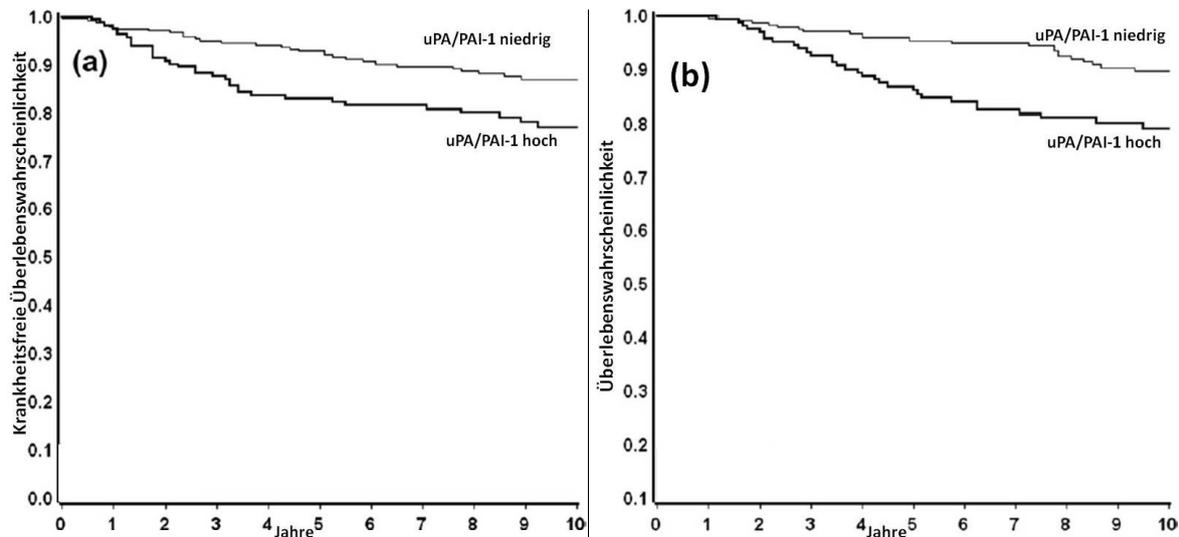


Abbildung 4: Krankheitsfreies Überleben (a) und Gesamtüberleben (b) nach zehn Jahren Nachbeobachtung der Patientinnen der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie in den uPA/PAI-1 Risikogruppen, modifiziert nach (23)

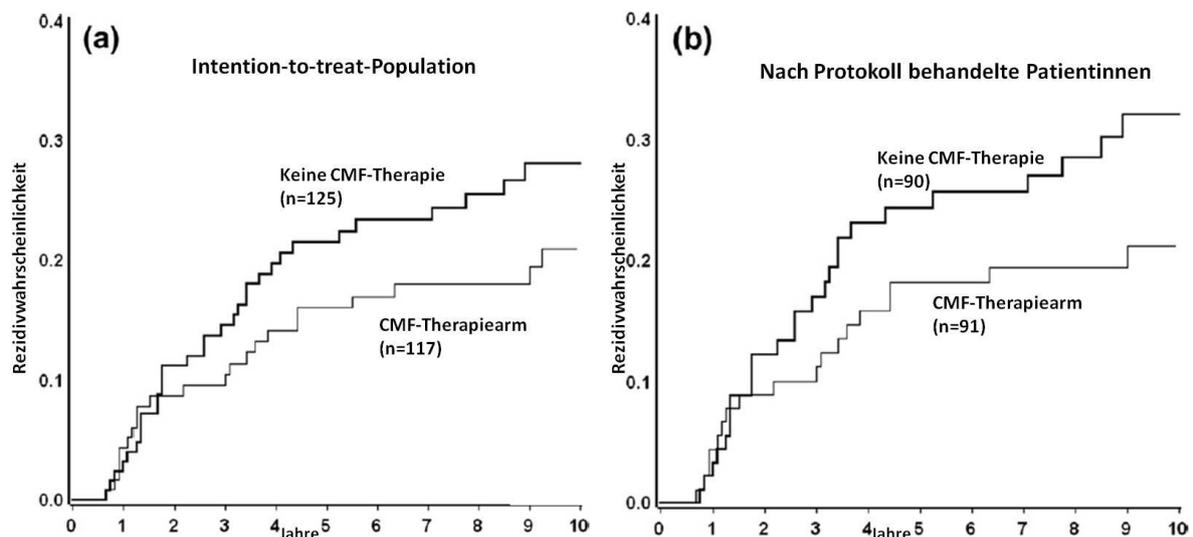
Eine Metaanalyse der Receptor und Biomarker Group (RBG) der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) bestätigte 2002 die zuvor veröffentlichten unizentrischen Daten über den prognostischen Wert der Proteasfaktoren uPA und PAI-1 bei Patienten mit primärem Mammakarzinom. Die Analyse beinhaltete die Informationen aus 18 Datensätzen, die von Mitgliedern der EORTC RBG bereitgestellt wurden. Das ergab insgesamt 8377 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom über einen mittleren Beobachtungszeitraum von 6,5 Jahren (2). Neben dem Lymphknotenstatus hatte die Bestimmung der Proteasfaktoren uPA/PAI-1 die stärkste Aussagekraft über das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben. Hohe Werte für uPA und/oder PAI-1 führten zu mehr als einer Verdopplung des Risikos eines Rezidivs oder am Brustkrebs zu sterben. Innerhalb der klinisch sehr relevanten Untergruppe der nodalnegativen Patientinnen ohne jegliche adjuvante systemische Therapie, zu der 3362 Patienten gehörten, waren uPA/PAI-1 die stärksten prognostischen Faktoren. Mit diesen beiden Studien, die beide den Anforderungen der durch Hayes et al. postulierten Kriterien entsprachen, erreichten die Proteasen uPA und PAI-1 als erste neue Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom das höchste Level of evidence, LOE I (24), (25). Daraufhin wurde 2002 uPA/PAI-1 in die Liste der Prognosefaktoren, die beim primären Mammakarzinom von den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) empfohlen werden, aufgenommen (26). Beim neunten International Expert Consensus Meeting in St. Gallen 2005 wurde der Prognostische Wert von uPA/PAI-1 bestätigt, die klinische Praktikabilität des Tests aber in Frage gestellt. Es wurde kritisiert, dass uPA/PAI-1 nur an Frischgewebe des Tumors und nicht an konserviertem Gewebe zu bestimmen ist (27). In die Leitlinien der American

Society of Clinical Oncology (ASCO) wird die Bestimmung der Proteasen uPA/PAI-1 als prognostischer Faktor bei primärem Mammakarzinom seit dem Jahr 2007 empfohlen (28).

#### **1.1.4 uPA/PAI-1 als prädiktive Faktoren**

Eine Literaturrecherche über Faktoren, die Informationen über die Prognose von Patientinnen mit hormonrezeptor-positiver, Her2-negativer Erkrankung lieferte, wurde auf der diesjährigen St. Gallen Breast Cancer Konferenz von Plun-Favreau et al. publiziert. Die Autoren kamen zum Ergebnis, dass etablierte Faktoren, wie Tumorgröße, histo-pathologisches Grading, der Proliferationsmarker Ki67 sowie Computerprogramme wie Adjuvant! Online als prognostische Faktoren gut validiert sind. Jedoch konnte ihnen kein prädiktiver Wert bezüglich des Nutzens einer adjuvanten Therapie zugeschrieben werden (29). Schon in den beiden Zwischenbilanzen der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie deutete sich ein Benefit für Patientinnen mit erhöhtem uPA und/oder PAI-1 von der Therapie mit Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Floururacil an (20) (21). Aufgrund dieser Daten untersuchten Harbeck et al den prädiktiven Einfluss, also inwieweit Patientinnen mit hohem Risiko nach uPA/PAI-1 von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. Das Ergebnis dieser retrospektiven Studie mit 3424 Patientinnen bestätigte den prädiktiven Wert von uPA/PAI-1. Es wurde darauf hingewiesen, dass der Goldstandard für die Untersuchung prädiktiver Faktoren zwar die ordentlich angelegte prospektive Studie ist, aber aus ethischer Sicht jedoch Studien, in denen Kontrollgruppen ohne adjuvante Therapie eingeschlossen werden, nicht mehr durchführbar waren. Daher musste man sich auf ausführliche retrospektive Datenanalysen beschränken (30). Auch waren retrospektiv erhobene Daten bei fortgeschrittenen und metastasierten Mammakarzinomen, die ein vermindertes Ansprechen auf eine palliative antihormonelle Therapie bei erhöhten uPA/PAI-1-Werten zeigten (31), nicht als Widerspruch zu den Ergebnissen der Studie per se zu sehen. Wenn man die zugrundeliegende Tumorbiologie betrachtet, könnten hohe Level an uPA/PAI-1 für einen aggressiven Tumortypen stehen. Dieser spräche in der adjuvanten Situation zwar gut auf eine systemische Therapie an, wäre aber in der metastasierten, palliativen Situation für ein adäquates Ansprechen zu weit fortgeschritten (32). In der finalen Analyse der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie nach zehn Jahren Beobachtungszeitraum konnte die prädiktive Aussagekraft von uPA/PAI-1 endgültig bestätigt und der Nutzen der Cyclophosphamid-, Methotrexat- und 5-Floururacil-haltigen Chemotherapie für Hochrisikopatientinnen gezeigt werden. Von den insgesamt 647 in 12 Zentren zwischen 1993 und 1998 rekrutierten Patientinnen waren aufgrund niedriger

uPA/PAI-1 Werte 283 Patientinnen in der Niedrigrisikogruppe. Von den restlichen 364 Patientinnen mit erhöhtem uPA und/oder Pai-1 wurden 242 randomisiert. 117 Patientinnen kamen in den CMF-Chemotherapiearm und 117 Patientinnen in den Beobachtungsarm. In beiden Armen bekamen jedoch nur 91 beziehungsweise 90 Patientinnen die laut Studienprotokoll geplante Chemotherapie beziehungsweise keine Therapie. Analysiert man den Chemotherapienutzen in dieser Patientengruppe, die tatsächlich nach Protokoll behandelt wurden, ergab sich für die 91 Patientinnen nach Behandlung mit Cyclophosphamid, Methotrexat und Floururacil eine Rückfallrate von 21,3 % gegenüber 32,1 % in der Gruppe ohne jegliche Therapie ( $p = 0,019$ ) (siehe: Abbildung 5). Die Chemo- $N_0$ -Studie war somit die erste auf Biomarkern basierende Therapiestudie die gute Langzeitergebnisse im krankheitsfreien Überleben erzielen konnte. Es wurde gezeigt, dass circa der Hälfte der Patientinnen ohne Lymphknotenbefall, nämlich denjenigen mit niedrigen uPA und PAI-1 Werten im Tumor, eine Chemotherapie erspart werden konnte, während Hochrisikopatientinnen von einer adjuvanten Chemotherapie profitierten. Damit wurde in einer prospektiven Studie der prognostische und prädiktive Nutzen von uPA/PAI-1 auf dem höchsten Level of Evidence (LOE I) bewiesen (23).



**Abbildung 5: ChemoNO: Krankheitsfreies Überleben für Hochrisikopatientinnen nach uPA/PAI-1 mit versus ohne Chemotherapie. Für: alle randomisierten Patientinnen (nicht signifikant) (a), nach Studienprotokoll behandelte Patientinnen ( $p=0,019$ ) (b), modifiziert nach (23)**

### 1.1.5 uPA/PAI-1 in der klinischen Routine in Deutschland

Nach der langen Phase der Entwicklung als Biomarker beim Mammakarzinom, kam die Phase der Validierung von uPA/PAI-1 in großen prospektiven (z.B.: Chemo-N<sub>0</sub>) Studien und Metaanalysen. Im Anschluss erfolgte die Bewertung des Nutzens dieses neuen Biomarkers für die Klinik und die Aufnahme in die Leitlinien (siehe: Abbildung 6). Aktuell wird die Bestimmung in der klinischen Routine vorwiegend bei Patientinnen mit kleinem primärem Mammakarzinom durchgeführt, die älter als 35 Jahre sind, keine befallenen Lymphknoten oder Metastasen aufweisen, die hormonrezeptor-positiv und Her2-negativ sind und deren Tumor einem mittleren histopathologischen Grading (G2) zugeordnet werden kann. Es handelt sich also um Patientinnen, die nach klinischen Kriterien einer mittleren Risikogruppe zugeordnet werden. Bei diesen Patientinnen ist mit den traditionellen klinischen Kriterien ein Nutzen der systemischen adjuvanten Chemotherapie nicht sicher vorherzusagen.

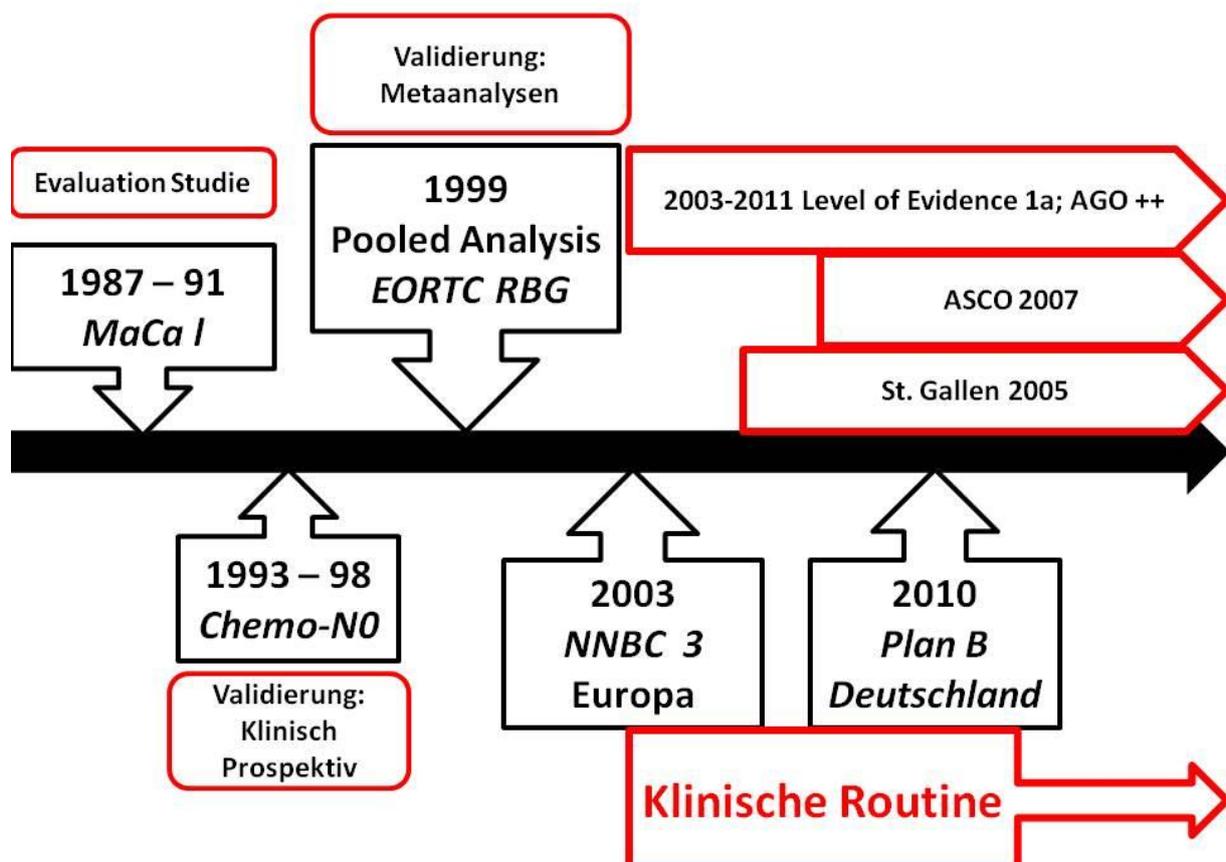


Abbildung 6: Validierung von uPA/PAI-1, modifiziert nach Kantelhardt et al, ASCO 2009 (33)

## 1.2 21-Gen-Analyse: Der Recurrence Score des OncotypeDX®

Seit dem Beginn der Sequenzierung des menschlichen Genoms durch das Human-Genom-Projekt im Jahr 1990 steigt das Interesse der Medizin an der Erforschung der molekularen Mechanismen von Krebserkrankungen. Der Recurrence Score des OncotypeDX® stellt das derzeit beim Mammakarzinom am besten validierte Testsystem dar.

### 1.2.1 Grundlagen des Recurrence-Score

Die Entwicklung des 21-Gen-Tests OncotypeDX® verlief in einem mehrstufigen Prozess. Zuerst wurde eine Real-Time-Reverse-Transkriptase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) mit hoher Effektivität entwickelt, mit der man quantitative RNA-Genexpressionsanalysen in Paraffinblöcken von Tumorgewebe durchführen konnte (34). Im Anschluss wurden 250 Kandidaten-Gene auf ihren Zusammenhang mit der Rückfallrate untersucht und letztendlich 16 dieser Gene im Recurrence-Score vereint (siehe: Abbildung 7).

### Die 21 Gene des OncotypeDX

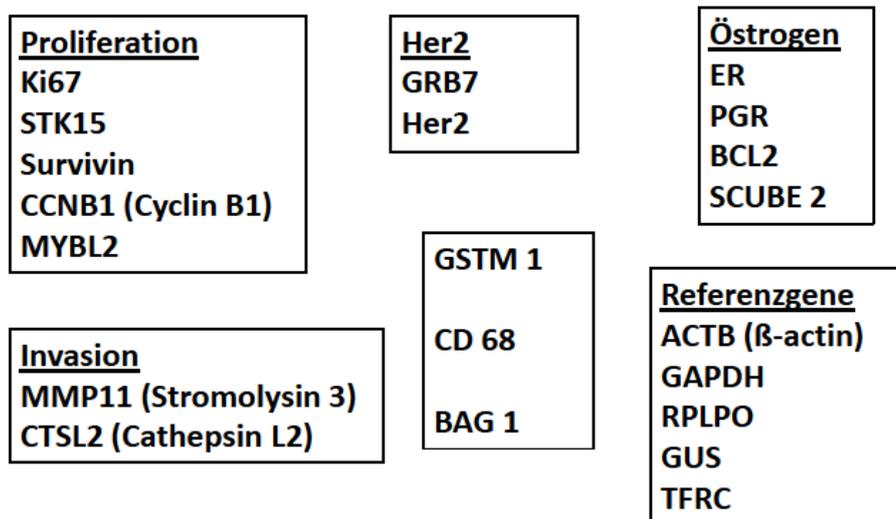


Abbildung 7: Gene, deren Expression im OncotypeDX® untersucht werden (35)

Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Metastase bei Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs erfolgt beim OncotypeDX® durch die Bestimmung der Level dieser 16 onkologischen Gene im Verhältnis zu fünf Referenzgenen. Referenzgene sind Gene, die im Tumor enthalten sind, aber auf die Tumorgenese und die Biologie des Tumors keinen Einfluss nehmen. Die Höhe der Genexpression spiegelt sich in der Menge der Gen-spezifischen RNA im Tumor wider. Zum Ausgleich von Unterschieden in Quantität und Qualität der RNA im fixierten Tumorblock dienen die fünf Referenzgene. Im Anschluss wird mit Hilfe eines mathematischen Algorithmus der Recurrence Score ermittelt. Dieser kann Werte von null bis 100 annehmen und korreliert mit der Wahrscheinlichkeit ein Fernrezidiv innerhalb von zehn Jahren zu entwickeln (36). Bei der Betrachtung der Gene, die im OncotypeDX® vereint sind, fällt auf, dass einige Genprodukte bereits in traditionellen Faktoren Verwendung finden. Beispiele dafür sind der Proliferationsmarker Ki67, der Zellrezeptor Her2, sowie die Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron. Genau dieser Zusammenhang wurde auf dem deutschen Senologiekongress 2013 in München in diversen Diskussionen angesprochen. Es kam wiederholt die Frage auf, ob Genexpressionsanalysen wie der OncotypeDX® letztendlich „nur“ alternative Bestimmungsmethoden der bekannten Faktoren darstellen.

### **1.2.2 Validierung des Recurrence Score als Prognosefaktor**

In großen klinischen Studien, NSABP-B14 und NSABP-B20, konnte bereits in den neunziger Jahren der Nutzen von Tamoxifen und Chemotherapie für Patientinnen mit primärem, nodalnegativem, östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom gezeigt werden (37). Die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung während der darauffolgenden zehn Jahre lag jedoch bei ungefähr 15%, sodass rund 85% der Patientinnen übertherapiert würden, wenn man jede Patientin einer adjuvanten Chemotherapie zuführte. Es wurden Testverfahren benötigt, die Auskunft über den Krankheitsverlauf und den Nutzen einer adjuvanten Therapie geben können. Der OncotypeDX® scheint genau diese Informationen liefern zu können. 2004 zeigten Paik, et al., dass der Recurrence Score mit der Rezidivrate innerhalb von zehn Jahren bei Patientinnen mit nodalnegativem, hormonrezeptor-positivem, primärem Mammakarzinom, die mit Tamoxifen behandelt wurden, korreliert (35). Diese gute Korrelation trifft sowohl für den Recurrence Score als kontinuierliche Variable, als auch für die Einteilung in Risikogruppen zu (siehe: Abbildung 8).

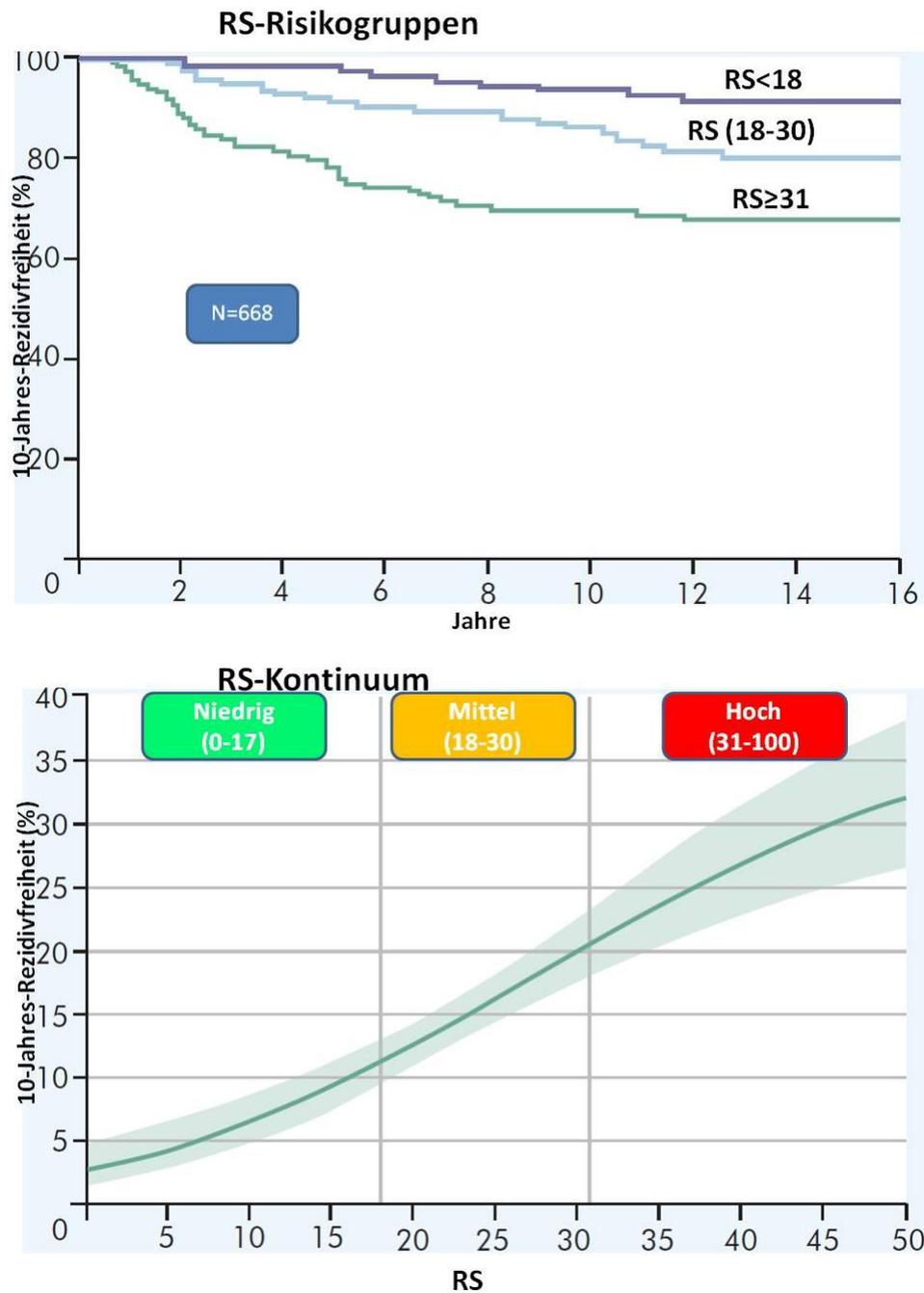


Abbildung 8: Rezidivfreies Überleben in den Risikogruppen nach Recurrence Score (RS) in der NSABP B14 Studie (35)

Die prognostische Aussagekraft des Recurrence Score konnte durch diverse Publikationen bestätigt und auf weitere Patientengruppen ausgeweitet werden. In einer TransATAC-Studie wurde der größere Nutzen eines Aromataseinhibitors bei postmenopausalen Hormonrezeptorpositiven Brustkrebspatientinnen gegenüber Tamoxifen gezeigt. Zudem wurde in diesem Patientenkollektiv erstmals gezeigt, dass der Recurrence Score unabhängig vom Lymphknotenbefall, keiner versus eins bis drei, eine prognostische Aussagekraft bezüglich des

Fernrezidivs besaß (38). Dies konnte in der Arbeit von Goldstein et al. auf dem ASCO 2007 bestätigt werden (39). Auch bei Patientinnen, die keine Tamoxifen Behandlung erhielten, lieferte der Recurrence Score wichtige Informationen über das Gesamtüberleben. Dies konnte in einer groß angelegten Fall-Kontroll-Studie auf dem ASCO 2006 von Habel et al. gezeigt werden (40). Die signifikante Korrelation des Recurrence Score mit dem krankheitsfreien Überleben, dem Gesamtüberleben, dem Auftreten eines Fernrezidivs und dem krankheitsspezifischen Überleben konnte im Patientenkollektiv der NSABP B-28 Studie erneut bestätigt werden. Es handelte sich um prä- und postmenopausale Patientinnen mit Hormonrezeptor positiver, nodalpositiver Brustkrebserkrankung, die mit Tamoxifen und Doxorubicin plus Cyclophosphamid (AC) oder AC gefolgt von Paclitaxel behandelt wurden. Es konnte ein positiver Effekt für die Hinzunahme von Paclitaxel gezeigt werden. Dieser Effekt konnte vom Recurrence Score jedoch nicht statistisch signifikant vorhergesagt werden (41) (42). Für Patientinnen ohne antihormonelle Therapie mit Tamoxifen konnte in einer kleinen retrospektiven Studie mit Tumorblöcken von 149 Brustkrebspatientinnen kein Zusammenhang des Recurrence Score mit der Rückfallrate gezeigt werden (43). In diesem Bereich sind weitere Studien von Nöten. Der Wert des Recurrence Score als prognostischer Faktor konnte in der Patientengruppe der SWOG 8814 Studie, die nur mit Tamoxifen behandelt wurde, erneut bestätigt werden. Bei postmenopausale Patientinnen mit Hormonrezeptor- und nodalpositiver Erkrankung zeigten sich Zehn-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten von 77 %, 68 % und 51 % in der Niedrig-, mittleren und Hochrisikogruppe des Recurrence Score (44). Einzug in die klinische Anwendung erhielt der Recurrence Score des OncotypeDX® 2007 mit der Aufnahme in die Leitlinien der American Society of Clinical Oncology (ASCO) (28). In die St. Gallen Konsensusleitlinien ging die 21-Gen-Analyse des OncotypeDX® als Prognosefaktor mit der Möglichkeit eines zusätzlichen Informationsgewinns bezüglich der Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie seit 2009 mit ein (45). Auch in die deutschen Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO) wurde der OncotypeDX® aufgenommen. Die Empfehlung Genexpressionsanalysen zur Prognoseabschätzung zu verwenden, wurde jedoch unter Vorbehalt und präferentiell mit Studienteilnahme empfohlen. Auch die Anwendung in der Abschätzung eines etwaigen Benefits von einer Chemotherapie sollte in weiteren Studien abgeklärt werden. Speziell für die Gen-Expressions-Analysen, wie den OncotypeDX®, wurde eine neue Kategorie, das Level of Evidence IB eingeführt. Dies hat zum Vorteil, dass nun Tests, die an konservierten Gewebeblöcken aus prospektiv angelegten

Studien, zwar retrospektiv betrachtet werden, trotzdem aber zur Vergabe des Levels of Evidence I führen können. Es sind also nicht mehr viele Jahre der Patientenbeobachtung in neuen prospektiven Studien notwendig, um diese retrospektiv sehr gut validierten Tests in der Klinik einzusetzen (26). Die Kriterien, die zum Erlangen des Level of Evidence Ib erfüllt werden müssen, wurden von Mc Shane and Hayes, et al. 2012, publiziert (46). Neben der AGO und des ASCO haben auch weitere Organisationen den OncotypeDX® in ihre Empfehlungen aufgenommen. Die European Society for Medical Oncology (ESMO) akzeptiert seit 2010 Genexpressionsanalysen wie OncotypeDX® oder MammaPrint (siehe Abschnitt:1.3.2) als zusätzliche Entscheidungshilfen zu den klinisch-pathologischen Kriterien (47). Das National Comprehensive Cancer Network (NCCN) integrierte die Möglichkeit der Genexpressionsanalyse durch OncotypeDX® in den Entscheidungsprozess für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie bei US-amerikanischen Patientinnen mit nodalnegativer, Hormonrezeptor-positiver, Her2-negativer Brustkrebserkrankung, deren Tumor größer als 0,5 cm ist (48). Ganz aktuell wurde zur Untermauerung der bisherigen Ergebnisse die ersten prospektiven Ergebnisse der TAILORx-Studie im New England Journal of Medicine (NEJM) veröffentlicht (September 2015). In der Studie erhielten 1626 Patientinnen mit Indikation zur Chemotherapie aufgrund eines niedrigen RS (0-10) nur eine endokrine Therapie. Diesen Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiver, Her2 und nodal negativer Erkrankung konnte eine Chemotherapie erspart werden und es zeigte sich ein sehr gutes 5-Jahres rezidivfreies und Gesamtüberleben (98,7 %, 95 % CI: 97,9 - 99,2 % und 98,0 %, 95 % CI: 97,1 - 98,6 %) (49).

### **1.2.3 Der Recurrence Score als prädiktiver Faktor**

Die 21-Gen-Analyse, die im Recurrence Score resultiert, quantifiziert die Wahrscheinlichkeit für Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiven, ohne befallene Lymphknoten, mit adjuvanter Tamoxifen-Therapie ein Fernrezidiv zu erleiden. Inwieweit der Recurrence Score auch eine Aussage über den Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie machen kann, war bis 2006 unklar. Paik, et al. konnten im Rahmen der NSABP-B20 Studie auch die prädiktive Aussagekraft des Recurrence Score nachweisen. Es wurden 651 Patientinnen in einen Tamoxifenarm (n = 424) und einen Tamoxifen plus Chemotherapiearm (n = 227) randomisiert. Die Chemotherapie bestand aus Cyclophosphamid, Methotrexat plus/minus Fluoruracil (CMF). Die Berechnung des relativen Nutzens einer Chemotherapie bezogen auf den Recurrence Score war statistisch signifikant (p = 0,038). Nach den Risikokategorien des Recurrence Score ergab sich für die

Hochrisikogruppe ( $RS \geq 31$ ) der deutlichste Benefit von der Chemotherapie. Der nach Kaplan-Meier geschätzte Anteil der Patientinnen, die nach zehn Jahren ohne Fernrezidiv blieben, stieg in der Hochrisikogruppe von 60 % ohne Chemotherapie auf 88 % durch Hinzunahme einer Chemotherapie zum Tamoxifen. In der Niedrigrisikogruppe ( $RS < 18$ ) konnte kein relevanter Benefit einer Chemotherapie gezeigt werden. In der großen Gruppe mit mittlerem Risiko nach Recurrence Score ( $RS = 18$  bis 30) konnte nur ein geringer Nutzen der Chemotherapie (CTx) gezeigt werden (siehe: Tabelle 1).

Risikogruppe (RS)	n gesamt	Tamoxifen-therapie 10-Jahres- Rezidivfreiheit (%)	n Tam	Tamoxifen+CTx 10-Jahres- Rezidivfreiheit (%)	n Tam + CTx	Relatives Risiko (95%-CI)
Alle	651	87,8	227	92,2	424	-
Niedrig (<18)	353	96,8	135	95,6	218	1,31 (0,46-3,78)
Mittel (18-30)	134	90,9	45	89,1	89	0,61 (0,24-1,59)
Hoch ( $\geq 31$ )	164	60,5	47	88,1	117	0,26 (0,13-0,53)

Tabelle 1: Recurrence Score und Ansprechen auf eine Chemotherapie mit CMF oder MF in der NSABP B20 Studie (50)

Die Unsicherheit in der Abschätzung konnte die Frage nach einem eventuellen klinischen Benefit für diese Patientinnen nicht klären (50). Der prädiktive Aussagewert des Recurrence Score wurde durch eine weitere kleine Studie von Gianni, et al. bekräftigt. Es wurde das komplette pathologische Ansprechen von Tumoren auf eine neoadjuvante taxan- und anthracyclinhaltige Chemotherapie untersucht. Herausgestellt hat sich, dass Patientinnen mit niedrigem Rezidivrisiko nach Recurrence Score ( $RS < 18$ ) in den seltensten Fällen eine Komplettremission erreichten ( $p = 0,005$ ). Das spricht für einen eher geringen Nutzen der

Chemotherapie für diese Patientinnen (51). In der Studie von Chang et al., in der 72 Fälle mit fortgeschrittenem Mammakarzinom ausgewertet wurden, erwies sich der Recurrence Score als guter Indikator für eine klinische Komplettremission nach neoadjuvanter Therapie mit Docetaxel. Die Korrelation des Recurrence Score mit der klinischen Komplettremission war statistisch signifikant ( $p = 0,008$ ). Ein hoher Recurrence Score bedeutete eine höhere Ansprechwahrscheinlichkeit auf die Therapie. Eine Erhöhung des Recurrence Score um 50 Einheiten ging mit einer fünffach erhöhten Wahrscheinlichkeit einher, eine klinische Komplettremission zu erreichen (52). In der SWOG 8814-Studie wurden postmenopausale Patientinnen mit hormonrezeptor-positiver Erkrankung mit Lymphknotenbefall untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Cyclophosphamid, Doxorubicin und Fluoruracil (FEC) zusätzlich zu Tamoxifen ein Überlebensvorteil erreicht werden konnte (53). Dieser zeigte sich besonders in der Hochrisikogruppe mit einem Recurrence Score von 31 und mehr. Das Gesamtüberleben nach fünf Jahren lag in dieser Gruppe bei 68 % im Arm mit Tamoxifen plus Chemotherapie, gegenüber nur 51 % bei Patientinnen, die Tamoxifen allein erhielten ( $p = 0,0271$ ). Diesen Vorteil konnte man bei niedrigen ( $RS < 18$ ) und mittleren ( $18 < RS < 31$ ) Recurrence Score Werten nicht beobachten. In der Gruppe der Patientinnen mit einem bis drei befallenen Lymphknoten und einem Recurrence Score unter 18 war die Rückfallrate in beiden Therapiearmen (Tamoxifen versus Tamoxifen plus Chemotherapie) mit rund 7 % gleich. Der prädiktive Effekt verlor die statistische Signifikanz, wenn man einen Zeitraum von zehn Jahren betrachtete ( $p = 0,122$ ). Das entspricht der Annahme, dass die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie den höchsten Nutzen für Rezidive innerhalb von fünf Jahren besitzt (44). Auf dem San Antonio Breast Cancer Symposium 2014 (SABCS) konnte von Nitz et al erstmals prospektiv in der WSGPlan B-Studie gezeigt werden, dass Patientinnen mit mittlerem und niedrigem Risiko gegenüber Patientinnen mit hohem Risiko nach Oncotype DX® ein exzellentes dreijahres-rückfallfreies Überleben hatten (98 % vs. 92 %). Patientinnen mit niedrigem Recurrence Score und bis zu drei befallenen Lymphknoten erhielten in der Plan B-Studie keine Chemotherapie, sondern wurden nur endokrin behandelt. Diesen Patientinnen, die mit positivem Nodalstatus laut aktuellen Leitlinien eine Indikation zur Chemotherapie hatten, konnte aufgrund der Genexpressionsanalyse (Oncotype DX®) die Chemotherapie erspart werden (54). Inwieweit jedoch der Recurrence Score in einem Hochrisiko-Kollektiv mit moderner adjuvanter Therapie einen prognostischen und prädiktiven Faktor darstellt bleibt

noch zu klären. Einen Überblick über die wichtigsten Studien zur Validierung des Recurrence Score als prognostischen und prädiktiven Faktor zeigt Tabelle 2.

Studie	Publikation	n	Patientenmerkmale	Aussage	Studientyp/Validierung
NSABP B14	Paik S et al. 2004 (35)	668	ER-positiv, nodalnegativ, 5 Jahre Tamoxifen	10-Jahres-Rezidivfreiheit in RS-Risikogruppen: RS<18: 6,8%, RS=18-30: 14,3%, RS≥31: 30,5% (p<0,001)	Retrospektiv/Prognose
	Gianni et al. 2005 (51)	89	Fortgeschrittenes Mammakarzinom, neoadjuvantes Anthracyclin + Taxan	Korrelation von RS und pathologischer Komplettremission (pCR) nach neoadjuvanter Chemotherapie	Neoadjuvant/pCR-Rate (Prädiktion)
NSABP B20	Paik S et al. 2006 (50)	651	ER-positiv, nodalnegativ, Tamoxifen oder Tamoxifen + CMF/MF	Chemotherapienutzen für RS≥31: relatives Risiko: 0,26, CI: 0,13-0,53	Retrospektiv/Prognose+ Prädiktion
Kaiser Permanente	Habel et al. 2006 (40)	220 + 570	nodalnegativ, verstorben	10 Jahre nach OP: Sterberisiko für RS<18: 2,8%, RS=18-30: 10,7%, RS≥31: 15,5%	Fall-Kontroll/Prognose
ECOG 2197	Goldstein et al. 2008 (39)	776	ER-positiv, nodalnegativ, nodalpositiv	Prognose für Rezidiv bei nodalpositiv und -negativ (p=0,001)	Fall-Kontroll/Prognose
3 Phase-II-Studien	Chang et al. 2008 (52)	72	Fortgeschritten, neoadjuvant Docetaxel	RS korreliert mit klinischer Komplettremission (p=0,008)	Neoadjuvant/klinische Komplettremission (Prädiktion)
Multi-zentrische Studie	Toi et al 2010 (55)	200	ER-positiv, T1-T2, nodalnegativ, Tamoxifen	RS korreliert mit Fernrezidivrisiko, Prognose über Rezidivfreies- und Gesamtüberleben in asiatischen Patientinnen (p<0,001)	Retrospektiv/Prognose
TransATAC	Dowsett et al. 2010 (38)	1231	ER-positiv, nodalnegativ, nodalpositiv, 5 Jahre Tamoxifen oder Tamoxifen + Anastrozol, postmenopausal	Prognose für Fernrezidiv in nodalnegativen (p<0,001) und nodalpositiven (p=0,02) Mammakarzinomen,	retrospektiv/Prognose
SWOG 8814	Albain et al. 2010 (44)	367	ER-positiv, nodalpositiv, 5 Jahre Tamoxifen, CAF + Tamoxifen: sequenziell oder zeitgleich	Prognose für Rezidiv (p=0,006), auch bei 1-3 Lymphknoten, sowie 4 und mehr Lymphknoten, kein Nutzen von CAF bei RS<31, Prädiktion für RS≥31: 10-Jahres-Rezidivfreiheit: 43% für Tamoxifen und 55% für CAF + Tamoxifen (p=0,03), Gesamtüberleben nur für RS≥31 signifikant (p=0,0271)	Retrospektiv/Prognose+ Prädiktion
NSABP B28	Mamounas et al. 2012 (42)	1065	ER-positiv, nodalpositiv, Tamoxifen und Doxorubicin/Cyclophosphamid +/- Paclitaxel	Prognose für pre- und postmenopausal	Retrospektiv/Prognose
TAILORx	Sparano et al. 2015 (49)	1100	ER-positiv, nodalnegativ mittlerer RS zwischen 11 und 25 randomisiert: endokr. Therapie +/- Chemotherapie	Frage nach Therapie für mittleren RS	prospektiv
SWOG S 1007 RxPONDER	-	4000 gepl	ER-positiv, N 1-1, RS ≤25 randomisiert: endokr. Therapie +/- Chemotherapie	Frage nach Therapie für mittleren und niedrigen RS	prospektiv
Plan B	Nitz et al. 2014 (54)	3000	ER-positiv, N 0-1, RS<12 keine Chemotherapie	Frage nach Therapie bei N+ und niedrigem RS	prospektiv

Tabelle 2: Überblick über Validierungsstudien für OncotypeDX®

### **1.2.4 RS-Risikogruppen versus Risikokala**

Der Recurrence Score wurde ursprünglich als eine kontinuierliche Risikokala entwickelt und sollte auch als solche verwendet werden. Soonmyung Paik erläutert dies am Beispiel einer Patientin mit einem Recurrence Score von 17, die zwar in die Kategorie Niedrigrisiko fällt, deren Rezidivwahrscheinlichkeit jedoch ähnlich der einer Patientin mit RS = 19, die bereits zum mittleren Risiko zählt, liegt. Demgegenüber steht zum Beispiel eine Patientin mit einem RS = 2, deren Rückfallwahrscheinlichkeit sich davon deutlich unterscheiden wird (56). Für die klinische Routine werden jedoch Grenzwerte gefordert, ab denen man Entscheidung für oder gegen eine Therapie trifft. Das erklärt die aktuelle Situation der laufenden Studien, die sich im Hinblick auf die Grenzwerte für niedrig, mittel und hoch unterscheiden (z.B.:NSABP B14: 18 und 31; Plan B: 11 und 25).

## **1.3 Übersicht über weitere Biomarker beim Mammakarzinom**

Im Folgenden werden einige der aktuell am häufigsten diskutierten und am weitesten verbreiteten Biomarker dargestellt, die der Einschätzung von Prognose und Prädiktion beim Mammakarzinom dienen sollen.

### **1.3.1 Proliferationsassoziiertes Protein Ki67**

Unkontrollierte Proliferation ist eine Grundvoraussetzung für die Malignität eines Tumors. Für die Ermittlung der Teilungsrate eines Tumors existieren verschiedene Methoden. Die aktuell am weitesten verbreitete Methode ist die immunhistochemische Anfärbung von Ki67. Dieses Protein wird in allen Proliferationsphasen des Zellzyklus exprimiert, also in der G(1)-, G(2)- und in der M-Phase. Ausschließlich in der G(0)-Phase, also in ruhenden Zellen, ist es nicht nachzuweisen (57). Daher eignet sich der Nachweis von Ki67 mittels geeigneter Antikörper zur immunhistochemischen Färbung derjenigen Zellen, die sich gerade in Teilung befinden. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich mit einem Antikörper gegen Ki67 anfärben lassen, gibt Auskunft darüber, wie viele Tumorzellen sich teilen. Viale et al. konnten zeigen, dass Ki67 eine Aussage über die Prognose beim Mammakarzinom treffen kann (58). Für die Einteilung in Hoch- und Niedrigrisikogruppen werden Schwellenwerte benötigt. Diese Schwellenwerte sind aktuell Thema vieler Diskussionen. Das St. Gallen-Konsensus-Panel legte 2011 einen Grenzwert von 14 % angefärbter Zellen fest (59). Im St. Gallen-Konsensus-Panel 2013 einigte

man sich auf 20 % (60). Es besteht aktuell aber zusätzlich noch das Problem der Qualitätssicherung bei der Bestimmung der Proliferation mittels Ki67 in unterschiedlichen Laboren. Zwei Beispiele für mögliche Fehlerquellen sind:

- Unterschiedliche Antikörper zur Färbung
- Untersuchung nicht repräsentativer Anteile des Tumors

Um die Qualität der Bestimmung von Ki67 zu gewährleisten haben Dowsett et al. Empfehlungen zur Bestimmung von Ki67 bei Brustkrebs erstellt (61).

### **1.3.2 70-Gen-Expressionsprofil MammaPrint®**

Die Entwicklung der 70-Gen-Signatur des MammaPrint® geht zum großen Teil auf eine Studie von van't Veer et al., die 2002 in der Zeitschrift Nature veröffentlicht wurde, zurück. Hier wurden Tumoren von 98 Brustkrebspatientinnen untersucht. Unter diesen Patientinnen fanden sich 34 Fernrezidive innerhalb von fünf Jahren, 54 Patientinnen ohne Fortschreiten der Erkrankung, sowie 18 mit BRCA-1 und 2 Patientinnen mit BRCA-2 Genmutation. Von den Tumoren der Patientinnen wurde ein Pool von 25.000 Genen untersucht. Letztendlich wurden die 70 relevantesten Gene herausgefunden und im MammaPrint® vereint (62). Mithilfe der 70 Gene, die im MammaPrint® untersucht werden, ließen sich Patientinnen in eine Hochrisikogruppe und eine Gruppe, deren Rückfallrisiko sehr gering war, einteilen. In der Studie von van de Vijver, et al. konnte an 295 Patientinnen mit primären frühen Mammakarzinomen gezeigt werden, dass die Genanalyse mittels MammaPrint® der Risikostratifizierung nach klinisch-pathologischen Kriterien (St. Gallen Kriterien) überlegen war. In der Niedrigrisikogruppe nach klinisch-pathologischen Gesichtspunkten konnten mit dem MammaPrint® Patientinnen mit einer schlechten Prognose herausgefunden werden. Auch in der Hochrisikogruppe konnten mittels MammaPrint® einige Patientinnen mit niedrigem Risiko für Fernrezidive innerhalb von fünf Jahren ermittelt werden. Patientinnen mit erhöhtem Risiko nach MammaPrint® waren nach fünf Jahren zu 60,5 % rezidivfrei, wohingegen dies für 94,7 % der Patientinnen mit niedrigem Risiko zutraf. Im Gesamtüberleben spiegelte sich die Prognosekraft des MammaPrint® auch deutlich wider. Nach zehn Jahren lebten in der Hochrisikogruppe nur 54,6 % gegenüber 94,5 % in der Niedrigrisikogruppe. Innerhalb der Patientinnengruppe mit diskordantem Ergebnis zwischen MammaPrint® und den klinisch-pathologischen Kriterien stellte sich der MammaPrint als überlegen heraus. Auch für die Gruppe der Patientinnen mit einem bis drei befallenen Lymphknoten konnte eine prognostische

Aussage mittels Mammaprint® getroffen werden, obwohl zu erwähnen ist, dass ein Großteil dieser Patientinnen eine adjuvante Chemo- und antihormonelle Therapie erhielt. Die Autoren widersprachen der weitverbreiteten Ansicht, dass ein Tumor die Fähigkeit zur Metastasierung erst in fortgeschrittenen Stadien erlangt. Vielmehr sollte man diese Eigenschaft in den zugrundeliegenden Genprofilen suchen (63). 2007 wurde eine prospektive multizentrische Studie, die MINDACT-Studie (Microarray in Node-negative and 1 to 3 positive lymph node Disease may Avoid ChemoTherapy) ins Leben gerufen. Es sollte die prognostische Aussagekraft des MammaPrint mit der Aussagekraft etablierter klinisch pathologischer Prognosefaktoren verglichen werden. Die Auswertung der Pilotphase ergab, dass die Einteilung des MammaPrint in Hoch- und Niedrigrisiko bei 73 % der Patientinnen mit der Einteilung nach klinisch-pathologischen Faktoren übereinstimmt. Insgesamt 8,25 % der bis dahin 800 Patientinnen würden aus der klinisch-pathologisch Hochrisikogruppe als Niedrigrisiko nach Mammaprint® eingestuft und könnten daher möglicherweise auf eine adjuvante Chemotherapie verzichten (64). Das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie konnte in einer gepoolten Analyse von Knauer, et al. durch den MammaPrint-Test vorausgesagt werden. Von 541 Patientinnen wurden 289 (53 %) als Hochrisiko eingestuft. Davon profitierten diejenigen, die zusätzlich zur endokrinen Therapie eine Chemotherapie erhielten mit einem rezidivfreien Fünf-Jahres-Überleben von 88 % gegenüber 76 % ( $p < 0,01$ ) (65). Der Mammaprint® wird an frischem oder in Formalin fixiertem Tumorgewebe, das in ein spezielles Nährmedium eingebracht wird, in einem zentralen Labor in Amsterdam, Niederlande durchgeführt. Es handelt sich um ein Microarray-Verfahren, bei dem die RNA bestimmter Gene nachgewiesen wird. Im Februar 2007 wurde der Mammaprint® von der Amerikanischen Food and Drug Administration genehmigt.

### **1.3.3 Dezentral bestimmtes Risikoprofil: EndoPredict®**

Der EndoPredict® ist ein neuer auf der Bestimmung von RNA beruhender Test zur Abschätzung des Rückfallrisikos bei Brustkrebspatientinnen. Untersucht werden acht tumorrelevante Gene und drei Referenzgene. Aus der Expression der Gene wird mit Hilfe eines mathematischen Algorithmus ein Score ermittelt, der Patientinnen mit Mammakarzinom einer Hoch- oder einer Niedrigrisikogruppe zuweist. Der Test wurde in zwei großen prospektiven Phase-III-Studien validiert, der ABCSG-6 mit 378 und der ABCSG-8 mit 1324 eingeschlossenen Hormonrezeptor-positiven, Her2-negativen Brustkrebspatientinnen, die

adjuvant mit Tamoxifen behandelt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Prognosekraft des EndoPredict® der Aussagekraft bekannter klinischer Marker, wie zum Beispiel Adjuvant! Online, überlegen war. Der EndoPredict® erhielt mit diesen beiden prospektiv erhobenen Studien (ABCSG-6 und ABCSG-8) das Level of Evidence I und wurde in die Therapieleitlinien beim Mammakarzinom der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) aufgenommen (26). Zusätzlich wurde ein Score durch Hinzunahme von Nodalstatus und Tumorgröße, der EndoPredictClin® entwickelt. Dieser Score teilte das Patientenkollektiv der beiden Studien in zwei Gruppen ein. Die Niedrigrisikogruppe hatte ein Zehn-Jahres-Rückfallrisiko von 4 %. Demgegenüber stand mit 22 - 28 % für Hochrisikopatientinnen ein deutlich erhöhtes Risiko ein Fernrezidiv zu erleiden (66). Ein Vorteil des EndoPredict® gegenüber dem OncotypeDX® ist die Möglichkeit den Test an in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe dezentral durchzuführen. Auch der logistische Aufwand wird verringert, indem für die Bestimmung des EndoPredict® kein Tumorgewebe in ein Zentrallabor verschickt werden muss, sondern diese dezentral in lokalen Laboratorien durchgeführt werden kann. Eine geringe Variation der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Laboren, konnte dem EndoPredict® in einer Studie von Kronenwett, et al. 2012 bescheinigt werden (67).

#### **1.3.4 Subtypen des Mammakarzinoms: Prosigna®: PAM50-Test**

Die Heterogenität der Brustkrebserkrankung wurde durch die Arbeit von Perou et al. unterstrichen. Es wurden an 42 Tumorgeweben hierarchische Cluster-Analysen der Genexpression aus Microarray-Verfahren durchgeführt. Die Arbeitsgruppe konnte dabei vier intrinsische Subtypen (Luminal, Normal Breast-Like, Her2-Overexpressing und Basal-like) herausarbeiten, die sich in ihren Genexpressionsmustern unterscheiden (68). Diese Subtypen wurden in den folgenden Jahren durch viele Diskussionen und Studien verändert und verbessert. Es stellte sich heraus, dass man den Luminal-Subtypen noch in Luminal A und B unterteilen kann. Diese Subtypen können nicht nur hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils unterschieden werden, sie besitzen auch eine Relevanz im Hinblick auf Therapieansprechen und Gesamtüberleben (69). Aktuell werden zwei Verfahren zur Bestimmung der Subtypen des Mammakarzinoms herangezogen. Zum einen Microarray- oder RT-PCR-Verfahren basierend auf 50 Genen und fünf Kontrollgenen, PAM 50 (70) und histopathologische immunhistochemische Untersuchungen des Tumorgewebes im Hinblick auf Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Her2-Expression, Proliferation mittels Ki67 und histologisches

Grading. Die Abschätzung der Rezidivrate innerhalb von zehn Jahren bei hormonrezeptor-positiven, postmenopausalen Brustkrebspatientinnen, die fünf Jahre antihormonell behandelt wurden, erfolgte mit Hilfe des Risk of Recurrence (ROR-) Score, der auf der Basis des PAM50 ermittelt wird (71). Eine Untersuchung des klinischen Nutzens der Subtypen und der Bestimmungsmethode wurde von der IMPAKT 2012 Task Force angestellt. Die Task Force kam zum Ergebnis, dass die Informationen, die zu den intrinsischen Subtypen aktuell vorlagen noch nicht ausreichten, um danach Therapieentscheidungen zu treffen beziehungsweise zu modifizieren. Es war dabei unerheblich, ob die Einteilung in die Subtypen mittels Microarray-Verfahren, wie PAM 50, oder mittels histo-pathologischer Kriterien (St. Gallen, 2011) durchgeführt wurde (72). Aktuell wurde in der Konsensusentscheidung in St. Gallen 2013, aufgrund des Wissens um die Heterogenität der Prognose und des Therapieansprechens in den verschiedenen intrinsischen Subgruppen, zugestimmt, dass die Subgruppen einen Einfluss auf die Therapieentscheidung haben. Eine Genexpressionsanalyse ist im klinischen Alltag jedoch nicht erforderlich (60). Die aktuellen intrinsischen Subtypen nach klinisch-pathologischen Gesichtspunkten sind in Tabelle 3 abgebildet.

Intrinsischer Subtyp	Luminal B		Her2-positiv	Basal-Like
	Luminal A	Her2 - positiv		
Hormonrezeptor	positiv	positiv	negativ	negativ
Her2	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ
Ki67	< 14 %	> 14 %	Egal	Egal
Grading	G1,G2	G1,G2,G3	G1,G2,G3	G1,G2,G3

**Tabelle 3: Immunhistochemische bestimmung der intrinsischen Subtypen beim Mammakarzinoms (59)**

Aktuell wurde die Methode zur Bestimmung des PAM 50 modernisiert. Durch die Weiterentwicklung des Analyseverfahrens, durch die Nano Strings Technology Inc.®, kann der PAM50 auf der Basis des urheberrechtlich geschützten nCounter-Analyseverfahrens dezentral mit den vor Ort bestehenden Laborinfrastrukturen durchgeführt werden (73).

## **1.4 Vergleich einiger Biomarker**

Biomarker sollen Aufschluss über die Aggressivität und das Therapieansprechen von Brustkrebs geben. Aktuell befinden sich neben den beiden am besten untersuchten modernen Biomarkern, uPA/PAI-1 und OncotypeDX<sup>®</sup>, wie oben beschrieben, weitere auf dem Markt. Um den Nutzen der diversen Tests einzuschätzen, sind klinische Vergleichsstudien wie die WSGPlanB-Studie unumgänglich. Auf einige dieser Studien wird im Folgenden eingegangen.

### **1.4.1 Unterschiedliche Ergebnisse in identischen Kollektiven**

Den Vergleich zwischen dem ROR-Score auf der Basis des PAM50, dem IHC4-Score, abgeleitet von der immunohistochemischen Auswertung von ER, PR, Her2 und Ki67 und dem Recurrence Score des OncotypeDX<sup>®</sup> an 1017 Patientinnen der TransATAC Studie stellten Dowsett et al. 2013 an. Der ROR-Score war dem Recurrence Score hinsichtlich der Prognose eines Rezidivs innerhalb von 10 Jahren überlegen. Zudem konnten mit Hilfe des PAM 50 besser zwischen den Risikogruppen differenziert werden. Im Vergleich zu den histo-pathologischen Faktoren des IHC4-Score liefert der ROR-Score ähnlich viele prognostische Informationen (74). Diese Vorteile für den PAM50 spiegelten sich auch in einer weiteren Studie an 108 Tumorblöcken von Kelly N, et al. wider. Es konnte ungefähr die Hälfte der Patientinnen mit mittlerem Recurrence Score einem niedrigen Risiko nach PAM 50 (Luminal A) zugeordnet werden (siehe: Abbildung 9). In der Hochrisikogruppe mit einem Recurrence Score von mehr als 31 ergab sich eine sehr gute Korrelation mit dem PAM 50 Hochrisikoprofil (Luminal B) (75).

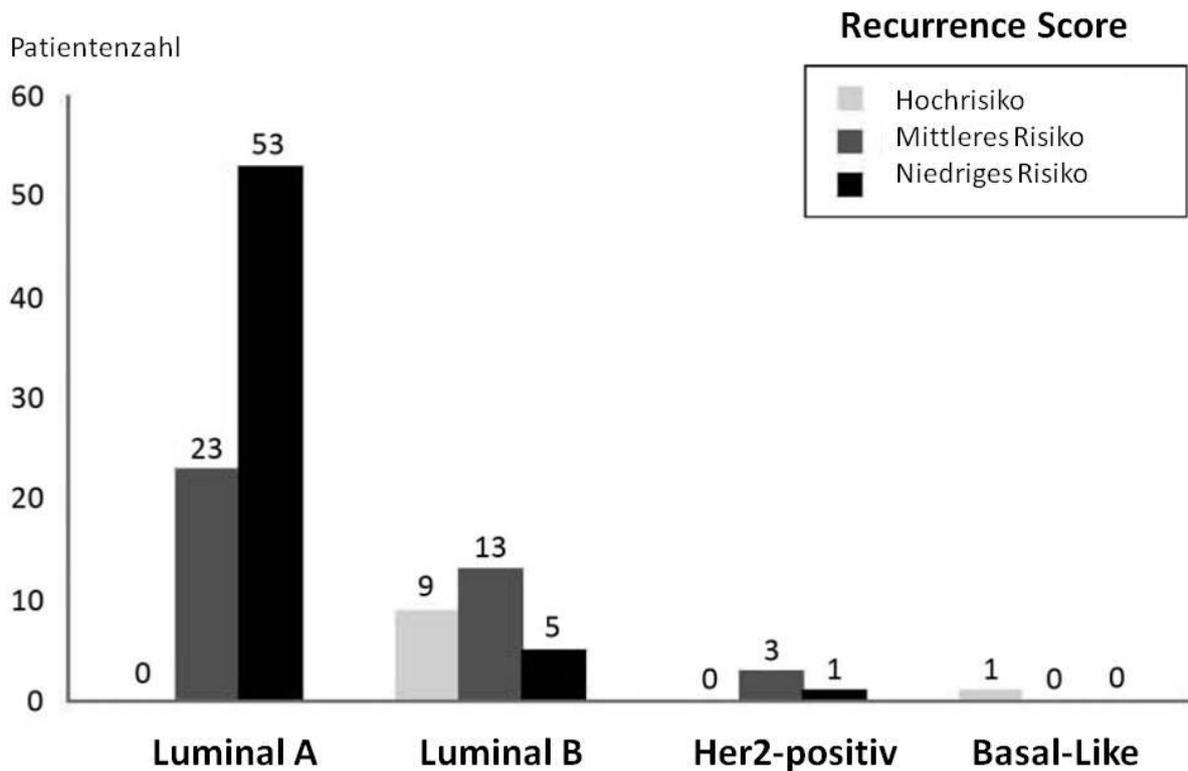


Abbildung 9: Subtypen des Mammakarzinoms nach PAM 50 und Recurrence Score (75)

Auf dem ASCO-Treffen 2013 in Chicago wurde die erste prospektive Studie zum Vergleich der Proteasen uPA/PAI-1 und dem EndoPredict® präsentiert. Ettl et al. rekrutierten 94 Hormonrezeptor-positive, Her2-negative Brustkrebspatientinnen. Die Therapieentscheidung wurde für jede Patientin in einer interdisziplinären Tumorkonferenz beschlossen. Für alle 94 Patientinnen lag ein EndoPredict®-Ergebnis vor. 34 % wurden als Hoch- und 66 % als Niedrigrisiko klassifiziert. uPA/PAI-1 war von 54 Patientinnen bekannt. Von diesen wurden mittels uPA/PAI-1 67 % der Hochrisikogruppe zugeordnet. Nur zwei Patientinnen der Hochrisikogruppe nach EndoPredict® zeigten niedrige Level von uPA/PAI-1. Im Gegenzug wurden jedoch 32 % der Patientinnen mit erhöhtem uPA/PAI-1 vom EndoPredict® als Niedrigrisiko eingestuft ( $p = 0,003$ ). Diese Studie zeigte somit zum ersten Mal, dass ein hohes Risiko im EndoPredict® zwar sehr gut mit einer Erhöhung von uPA/PAI-1 korreliert, jedoch die Niedrigrisikogruppe des EndoPredict® noch einen relevanten Anteil an Patientinnen einschließt (32 %), die laut uPA/PAI-1 ein erhöhtes Rezidivrisiko besitzen (76). Aufgrund der aktuellen Datenlage ist trotz der im Einzelnen sehr gut validierten Tests eine Durchführung

mehrere Tests an ein und derselben Patientin abzulehnen. Bei der deutlichen Diskordanz zwischen den Ergebnissen vor allem im mittleren und niedrigen Risikobereich ist eine auf Evidenz basierende Therapieentscheidung nur bei der Entscheidung für eines der Untersuchungsverfahren möglich. Von den deutschen Experten des St. Gallen Konsensus Panels 2013 wird vor dem so genannten „Test-Hopping“ ausdrücklich gewarnt (60).

#### **1.4.2 Gewebe zur Bestimmung der Biomarker**

Die Bestimmung der Proteasen uPA/PAI-1 ist nur für frisches oder eingefrorenes Tumorgewebe validiert. Da ein Großteil der Patientinnen vor Therapiebeginn eine histologische Sicherung des Brustkrebs mittel Stanzbiopsie erhalten, stellt sich die Frage, ob nicht schon eine Bestimmung aus dem bei Stanzbiopsien gewonnenem Gewebe die Messung der Proteasenlevel möglich ist. Thomssen et al. untersuchten diesen Sachverhalt an 42 Tumorgeweben, bei denen vor der chirurgischen Entfernung Stanzbiopsien durchgeführt wurden. In 40 der 42 Fälle stimmte die Risikoeinteilung mittels uPA/PAI-1 der Stanze mit denen im endgültigen Tumorgewebe überein. Daraus schlossen die Autoren, dass die Bestimmung der Proteasen aus mindestens zwei bis drei Stanzzyindern in der Routine einsetzbar ist (9). In 110 Stanzbiopsien und den dazugehörigen chirurgisch entfernten Tumoren stellte sich in einer Studie, die auf dem San Antonio Breast Cancer Symposium 2012 (SABCS) präsentiert wurde, heraus, dass niedrige Proteaselevel im Gewebe der Stanzbiopsie zwar mit niedrigen Leveln im Tumor korrelierten, es aber insgesamt zu Abweichungen zwischen der Höhe von uPA/PAI-1 im Stanzmaterial und im endgültigen Tumorgewebe kam (77). Letztendlich geht die Notwendigkeit frisch eingefrorenes Gewebe zur Bestimmung von uPA/PAI-1 in die Pathologie zu versenden, mit einem erhöhten logistischen Aufwand einher. Dies könnte einer der Gründe für die Entscheidung gegen den Einsatz von uPA/PAI-1 darstellen. Sind die logistischen Strukturen jedoch einmal etabliert, fällt dieser Mehraufwand in der Routine nicht mehr ins Gewicht. Bei der Entwicklung der Real-Time-PCR für den OncotypeDX® wurde darauf geachtet, dass die Durchführung der Genexpressionsanalyse an fragmentierter RNA möglich ist. Bei der routinemäßigen Fixation mit Formalin und Einbettung in Paraffin wird die benötigte RNA zum Teil fragmentiert. Dies führt bei der Expressionsanalyse mittels RT-PCR aber deshalb nur selten zu Verfälschungen der Ergebnisse, da die untersuchten Gene nicht für sich allein betrachtet werden, sondern im Verhältnis zu Referenzgenen, die auch dem Zersetzungsprozess unterliegen. (34). Somit ist die Durchführung des OncotypeDX® zur Bestimmung des

Recurrence Score ohne Änderung im Routineablauf der Klinik möglich. Eine Übersicht über die Aussagekraft und Art der Tumorgewebe für die kommerziell erhältlichen Tests zur Risikoeinschätzung beim primären Mammakarzinom zeigt Tabelle 4.

Test	Studie	Aussagekraft, Evidenz	Gewebe	Labor	Kosten (Tage)	Risiko	Leit- linien
uPA/PAI-1,	Harbeck, et al. 2013 (23)	Prognose Prädiktion pro-/retrospektiv	Frisch- gewebe	De- zentral	250€ 5 d	Hoch Niedrig	AGO + ASCO
Oncotype- DX®	Paik S, et al. 2004 (35)	Prognose Prädiktion - retrospektiv	FFPE	Zentral, USA	3000€ 14 d	Hoch Mittel Niedrig	AGO +* ASCO
Endo- Predict®	Filipits, et al. 2011 (66)	Prognose retrospektiv	FFPE	De- zentral	1800€ 7 d	Hoch Niedrig	AGO +*
Mamma- Print®	Van t'Veer, et al. 2002 (62)	Prognose retrospektiv	Frisch- gewebe FFPE	Zentral, Nieder- lande	2500€ 14 d	Hoch Niedrig	AGO +/-
PAM 50	Parker, et al. 2009 (70)	Prognose retrospektiv	FFPE	De- zentral	3000€ -	Sub- typen	AGO +/-

**Tabelle 4: Vergleich der kommerziell erhältlichen Prognosetests beim Mammakarzinom (78)**  
\*nur bei ausgewählten Patientinnen, bei denen alle anderen Faktoren eine Therapieentscheidung nicht zulassen

### 1.4.3 Einfluss von Stanzbiopsien auf uPA/PAI-1, RS und EndoPredict®

Der Urokinase-type-plasminogen-activator (uPA) und sein Inhibitor Plasminogen-activator-inhibitor-1 (PAI-1) sind nicht nur an der Invasion und Metastasierung von Tumoren beteiligt, sie spielen auch eine große Rolle bei Entzündungsreaktionen und der Wundheilung. Dies ist ein möglicher Grund für die von Haas et al. gemessene Erhöhung der Proteasen im Bereich des Stanzkanals. Daher besteht die allgemeine Empfehlung, dass Gewebe für die Proteasenbestimmung nicht aus der unmittelbaren Nähe des Biopsiekanals zu entnehmen (79). Auch bei der Bestimmung des Recurrence Score (RS) gibt es Hinweise darauf, dass Tumoren mit enthaltenen Biopsiekanälen einen veränderten Recurrence Score aufweisen, als der restliche

Tumor. Bei der Aufbereitung des chirurgisch entfernten Tumors ist daher darauf zu achten, dass Biopsiekanäle mikrochirurgisch vom erfahrenen Pathologen entfernt werden und erst anschließend der Recurrence Score am restlichen Gewebe bestimmt wird (80). Im Gegensatz dazu konnte eine Studie von Müller, et al. 2012 zeigen, dass Entzündungsreaktionen und Wundheilungsprozesse aufgrund vorausgegangener Stanzbiopsien keinen messbaren Einfluss auf die Risikoeinschätzung durch den EndoPredict®-Test zu haben scheinen. In dieser Studie wurden 40 Tumorblöcke mit den dazugehörigen präoperativ gewonnenen Gewebeblöcken aus Stanzbiopsien verglichen. Die Ergebnisse des EndoPredict® im Stanzgewebe korrelierten sehr gut mit denen aus dem endgültigen Tumorgewebe. Der fehlende Einfluss von Stanzbiopsien auf das Ergebnis des EndoPredict® könnte darauf beruhen, dass keine Gene, die im Zusammenhang mit Entzündung und Wundheilung stehen, im EndoPredict® enthalten sind (81).

#### **1.4.4 Kostenvergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score**

Für den uPA/PAI-1 Test konnte in einer Studie von Jacobs et al. auf dem SABCS 2010 gezeigt werden, dass die Bestimmung der Proteasen bei einer Hormonrezeptor-positiven, Her2-negativen, 55 jährigen Brustkrebspatientin mit einem mittleren Grading (G2) kosteneffektiv war. Allein durch die Einsparungen, die durch nicht verabreichte Chemotherapeutika in der Niedrigrisikogruppe erzielt werden könnte, würde sich eine Testung aller Patientinnen lohnen. Für die Bestimmung der Proteasen wurden Gesamtkosten von 385 € angenommen (82). Demgegenüber kostet die Bestimmung des Recurrence Score durch OncotypeDX® ungefähr 3000 €. Trotzdem konnte auch für den Recurrence Score in einem ähnlichen Patientenkollektiv gezeigt werden, dass eine Testung aller Patientinnen gesundheitsökonomisch betrachtet rentabel wäre (83).

### **1.5 Mangelhafte Standards bei der Bestimmung etablierter Faktoren**

In den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie 2013 (AGO) wird auf die zum Teil sehr großen Unterschiede in der Bestimmung der klinisch-pathologischen Faktoren, wie Grading, Hormonrezeptor-, Her2- und Nodalstatus hingewiesen. Untersuchungen zur Testgenauigkeit lieferten bis zu 20 % diskordante Ergebnisse (26). Auch bei der Bestimmung des Proliferationsmarkers Ki67 gab es Ungenauigkeiten vor allem, wenn

es sich nicht um sehr hohe oder sehr niedrige Werte handelt (61). Es stellt sich also die Frage, ob man neue Biomarker mit etablierten Faktoren vergleichen kann, obwohl sich herausstellte, dass die bekannten Faktoren zur klassischen Einteilung von Brustkrebs keine konstanten Ergebnisse liefern.

## **2 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist der prospektive Vergleich von zwei der am besten validierten Biomarker beim Mammakarzinom im selben Patientenkollektiv. Es soll erstmals untersucht werden, wie sich die beiden weit verbreiteten und gut etablierten Biomarker, uPA/PAI-1 und OncotypeDX®, im selben Patientenkollektiv verhalten. Das Besondere an diesem Projekt ist die Durchführung beider Tests an derselben Patientin im Rahmen einer prospektiven, randomisierten, multizentrischen Phase III Studie. Beide Biomarker sind für sich allein betrachtet sehr gut bezüglich Prognosekraft und Prädiktion validiert. Jedoch ist bisher nicht ausreichend untersucht, inwieweit beide Tests im selben Patientenkollektiv bezüglich, Rückfallrisiko, Gesamtüberleben oder Ansprechrates auf eine Chemotherapie zum gleichen Ergebnis kommen, oder ob sie sich signifikant unterscheiden. Zudem stellt sich die Frage, ob ein Informationsgewinn durch das Hinzuziehen eines weiteren Biomarkers möglich ist, indem zum Beispiel mit Hilfe eines Biomarkers eine Risikogruppe des anderen weiter unterteilt werden kann (zum Beispiel: mittleres Risiko im OncotypeDX® in Hoch- und Niedrigrisikogruppe mittels uPA/PAI-1). Im klinischen Alltag kommt es aktuell schon vermehrt zu Fällen in denen Patienten die Ergebnisse mehrerer Tests mitbringen. Die Bewertung der klinischen Relevanz vor allem bei diskordanten Ergebnissen der verschiedenen Biomarker stellt den behandelnden Arzt vor eine sehr schwierige Aufgabe. Es werden somit dringend Studien benötigt, die sich mit dem Dilemma diskordanter Ergebnisse verschiedener Biomarker im Hinblick auf Prognose und Prädiktion, beschäftigen.

### 3 Methoden: Die WSG-Plan B Studie

Der Standard in der adjuvanten Therapie von Brustkrebs ist eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie. Es gab jedoch Hinweise darauf, dass besonders Her2/neu-positive Patientinnen von den Anthrazyklinen profitieren (84). Anthracycline besitzen eine Haupttoxizität. Sie sind kardiotoxisch und können langfristig in einem Patientenkollektiv, das zu einem sehr großen Anteil von der malignen Erkrankung geheilt werden kann, zu Herzinsuffizienz führen (85). Das Ziel der in Abbildung 10 dargestellten Plan B Studie besteht darin, ein anthracyclinfreies Therapieregime zu etablieren, um den Patientinnen die Kardiotoxizität der Anthracycline ersparen zu können.

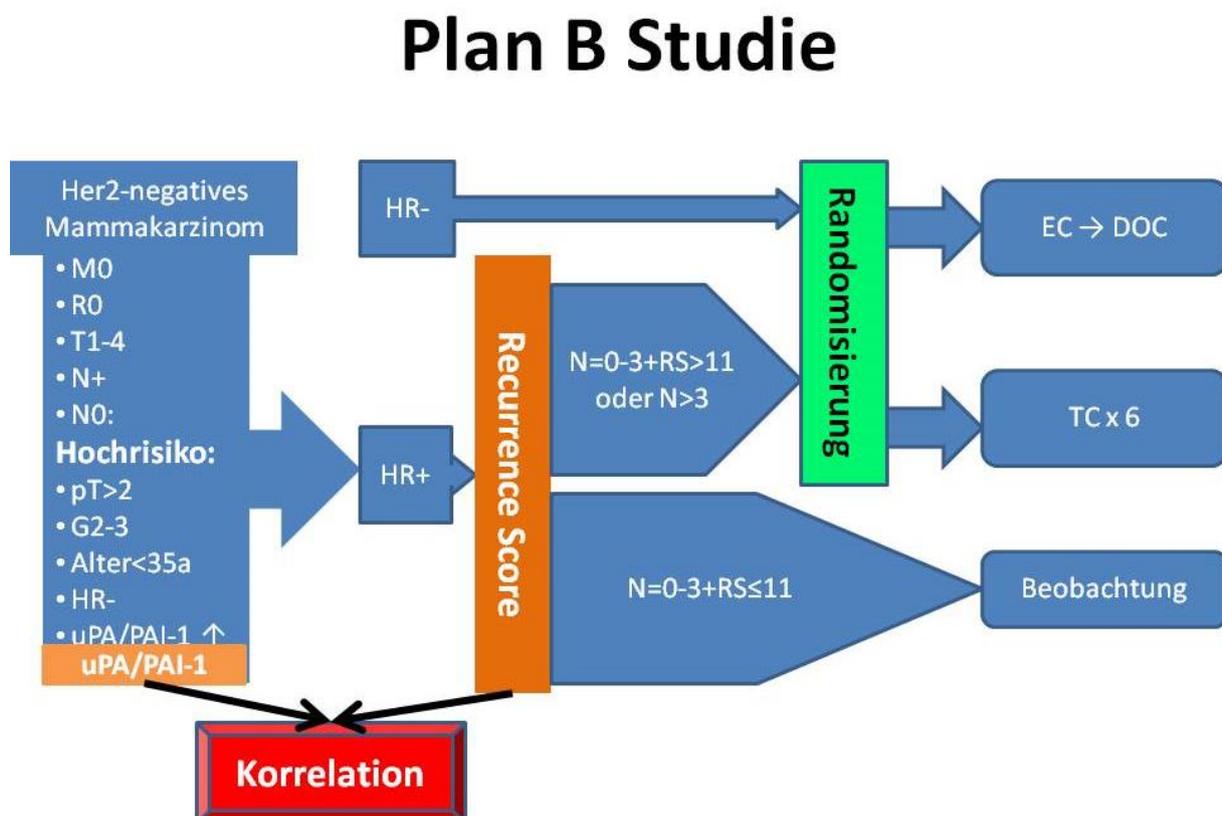


Abbildung 10: Studiendesign der Plan B Studie, uPA/PAI-1 und Recurrence Score Bestimmung

In die Plan B Studie wurden Her2-negative Patientinnen mit moderatem primärem Brustkrebs eingeschlossen. Von den Hormonrezeptor-positiven Patientinnen wurde ein in Formalin fixierter und in Paraffin eingebetteter Tumorblock (FFPE) in das Zentrallabor von Genomic Health, Inc.® in die Vereinigten Staaten zur Bestimmung des Recurrence Score gesendet. Bei Patientinnen mit bis zu drei befallenen Lymphknoten wurde mit Hilfe der Risikoeinteilung des

Recurrence Score die Therapieentscheidung getroffen. Bei einem Recurrence Score von 11 und darunter (niedriges Rezidivrisiko) und bis zu drei befallenen Lymphknoten wurde auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet und die Patientinnen erhielten nur die antihormonelle Therapie. Waren vier Lymphknoten befallen oder null bis drei Lymphknoten und der Recurrence Score größer als 11, wurden die Patientinnen in die Therapiearme mit adjuvanter Chemotherapie randomisiert. Als zusätzlicher Risikofaktor, durch den nodalnegative Patientinnen in die Studie eingeschlossen werden konnten, wurde ein hohes uPA/PAI-1 akzeptiert. Zudem erfolgte die Bestimmung von uPA/PAI-1 in einigen der an der Studie Zentren routinemäßig bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom. In der Plan B Studie wurden wegen höherer Patientensicherheit bei N0 und N1 die konservativen Recurrence Score Grenzwerte, wie sie in der TAILORx-Studie beschrieben wurden, zur Einteilung der Patientinnen in die Risikogruppen verwendet ( $RS \leq 11$ : niedrig,  $11 < RS < 25$ : mittel,  $RS \geq 25$ : hoch).

Patientinnen mit niedrigem Recurrence Score und bis zu drei befallenen Lymphknoten haben ein so geringes Rezidivrisiko, dass man ihnen die Chemotherapie ersparen kann. Erstmals wurde diese exzellente Prognose der Patientinnen trotz befallener Lymphknoten in der TransATAC-Studie von Dowsett et al. auf dem San Antonio Breast Cancer Symposium 2008 vorgetragen. Patientinnen mit bis zu drei befallenen Lymphknoten hatten bei einem Recurrence Score von 11 oder weniger ein neun-Jahres rezidivfreies Überleben von über 90 % (siehe: Abbildung 11).

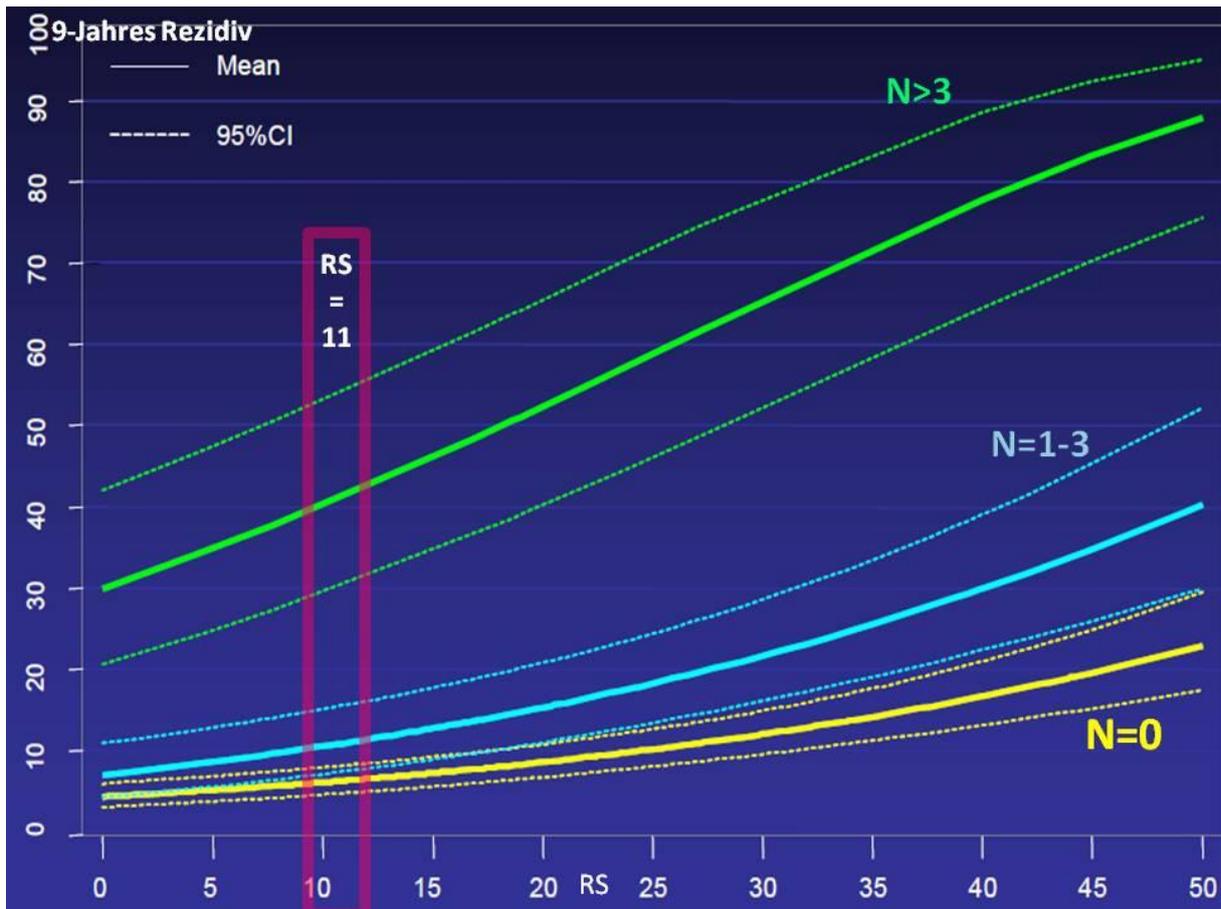


Abbildung 11: 9-Jahres-Rezidivrisiko bei 0, 1-3 und mehr als 3 befallenen Lymphknoten (N) und Recurrence Score (RS), modifiziert nach Dowsett, et al., SABCS 2008 (86)

Die Daten wurden von Dowsett, et al. 2010 im Journal of Clinical Oncology publiziert (38). Als primärer Endpunkt der Plan B Studie wurde das eventfreie Überleben der Patientinnen in den beiden Therapiearmen betrachtet. Die ersten Überlebensdaten werden im Jahre 2015 erwartet. Sekundäre Endpunkte waren das Gesamtüberleben und der Vergleich der Chemotherapieregime hinsichtlich ihrer Toxizität. Geplant wurde zudem eine Analyse bezüglich der Kosteneffektivität.

Von nahezu allen Hormonrezeptor-positiven Patientinnen der Plan B Studie lag ein Recurrence Score vor. Einige dieser Patientinnen erhielten zusätzlich eine Bestimmung von uPA/PAI-1 im Tumor. Diese Patientinnen waren die Grundlage der hier gezeigten, primär geplanten Korrelationsanalysen von uPA/PAI-1 und dem Recurrence Score des OncotypeDX®. Der direkte Vergleich von uPA/PAI-1 mit dem Recurrence Score wurde in der vorliegenden Arbeit weltweit erstmals in einer prospektiven Phase-III-Studie angestellt. Auch konnten zum ersten Mal Korrelationen zwischen RS und uPA/PAI-1 mit histo-pathologischen Faktoren, wie

Hormonrezeptorstatus, Grading, Her2-Expression und Proliferationsmarker Ki67 in der Plan B Studie angestellt werden.

### **3.1 Bestimmung der Proteasen uPA/PAI-1, des Recurrence Score sowie der histo-pathologischen Faktoren in der Plan B Studie**

In der Plan B Studie wurde eine Nachuntersuchung aller Fälle durch eine zentrale Pathologie prospektiv vorgesehen. Dieser wurde durch das Pathologische Institut der Universitätsklinik in Hannover, Deutschland durchgeführt. Der zentral durchgeführte Review war nur für Studienzwecke gedacht und erfolgte verblindet. Der Hintergrund für die Durchführung dieser zentralen Kontrollen der lokalen pathologischen Ergebnisse waren zum Teil deutliche Diskrepanzen von bis zu 30 % zwischen lokal und zentral erhobenen Ergebnissen. Dies traf besonders für die Bestimmung des Gratings, der Hormonrezeptoren und des Her2-Status zu (26). Dass die Diskrepanzen zwischen histo-pathologischen Ergebnissen der klinischen Routine in lokalen Laboren und denen durch erfahrene Pathologen in Zentrallaboren auch aktuell noch von Bedeutung ist, konnte eine vor kurzem in den Niederlanden veröffentlichte Studie erneut zeigen. Von 310 zentral nachuntersuchten Tumorgeweben trat hier bei 24 % eine Diskrepanz zwischen lokal und zentral erhobenen Ergebnissen für Tumortyp, Grading, Hormonrezeptor- und Lymphknotenstatus auf. Dies führte in 8 % der Fälle zu einer Änderung der Therapie (87). Von allen Patientinnen der Plan B Studie wurde daher ein Tumorblock bereitgestellt, um eine zentrale Analyse der Histologie, des Grades, der Hormonrezeptoren, des Her2-Status und des Ki67 in Hannover durchzuführen. Das histo-pathologische Grading wurde nach den Kriterien von Elston und Ellis durchgeführt (88). Ki67 wurde mittels Immunhistochemie bestimmt. Es wurden zwei Grenzwert für erhöhtes Ki67 untersucht: 14 % (St. Gallen 2011 (89)) und 20 % (St. Gallen 2013 (60)) angefärbte Zellen. Zur Bestimmung des Recurrence Score wurde ein in Formalin fixierter und in Paraffin eingebetteter Tumorblock (FFPE) oder Gewebeschnitte an das Labor der Genomic Health, Inc.<sup>®</sup> in den USA versendet. Die Bestimmung der Proteasen uPA und PAI-1 erfolgte dezentral in den lokalen Einsendelaboren der Studienzentren mit Hilfe des kommerziell erhältlichen ELISA Kits Femetelle<sup>®</sup> von American Diagnostica<sup>®</sup>, Stamford, CT, USA. Voraussetzung war die Erfahrung der Labore im Umgang mit der uPA/PAI-1-Bestimmung, sowie der Nachweis über die Teilnahme an einem Qualitätssicherungsprogramm. uPA/PAI-1 wurde entweder an Frischgewebe von zwei bis drei Stanzbiopsien oder am frischen

chirurgisch entfernten Tumorgewebe durchgeführt. Im Laufe der Studie wurde entsprechend des Ethikvotums und der Patienteneinwilligung der WSG-Plan B Studie von allen Patientinnen ein Tumorblock (FFPE) sowie Blutproben für weitere Untersuchungen archiviert.

### 3.2 Statistische Überlegungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die erhobenen Daten aus 91 Studienzentren gesammelt und zusammengefasst. Die Werte für uPA/PAI-1 lagen als kontinuierliche Variablen vor und wurden anhand der validierten und im klinischen Alltag etablierten Grenzwerte (uPA: 3 ng/mg Protein und PAI-1 14 ng/mg Protein) in binäre Variablen umgewandelt. Daraus ergeben sich zwei Risikogruppen nach uPA/PAI-1; die Niedrigrisikogruppe mit uPA und PAI-1 unterhalb der Grenzwerte und die Hochrisikogruppe mit uPA und/oder PAI-1 oberhalb der Grenzwerte. Auch der Recurrence Score des Oncotyper DX<sup>®</sup> lag als stetige Variable mit Werten zwischen 0 und 100 vor. Hier wurden die Daten anhand der konventionellen Grenzwerte sowie der Plan B Grenzwerte in drei Risikogruppen (niedrig, mittel und hoch) eingeteilt. Nach den konventionellen Grenzwerten wurde ein Recurrence Score kleiner 18 der Niedrigrisikogruppe, ein Recurrence Score mit 18 bis 30 der mittleren Risikogruppe und ein Recurrence Score, der größer als 30 war, der Hochrisikogruppe zugeordnet. Die Therapieentscheidung im Rahmen der Plan B Studie erfolgte anhand der strengeren Grenzwerte der TAILORx Studie: ein Niedrigrisiko wurde mit einem Recurrence Score kleiner gleich 11, mittleres Risiko mit einem Recurrence Score von 12 bis 24 und Hochrisiko mit einem Recurrence Score von 25 und mehr attestiert. Die resultierenden diskreten Variablen (uPA/PAI-1 hoch vs. niedrig und Recurrence Score hoch, mittel oder niedrig) wurden mittels Kreuztabelle in Korrelation gesetzt und mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests ( $\chi^2$ ) auf Signifikanz getestet. Statistische Signifikanz wurde gemäß dem Studienprotokoll der Plan B Studie ab einem p-Wert von kleiner 0,05 bei einer Power von 80 % angenommen. Es wurde keine Korrektur für Mehrfachtestung durchgeführt. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2007 und SPSS Version 23 durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

Von April 2009 bis August 2011 wurden 3198 Patientinnen aus 91 Zentren in die Plan B Studie eingeschlossen. Davon wurden 2449, wie geplant in die beiden Therapiearme randomisiert. Die Rekrutierung für die Studie gestaltete sich problemlos, wie in Abbildung 12 zu sehen ist.

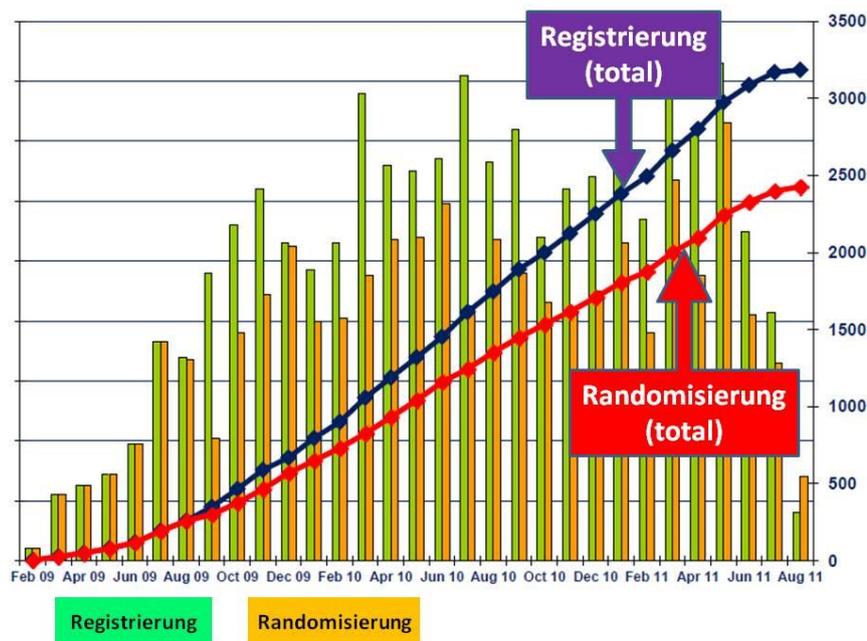


Abbildung 12: Plan B Studie: Rekrutierung und Randomisierung (90)

Im Rahmen des extensiven prospektiv geplanten translationalen Forschungsprogramms innerhalb der Plan B Studie waren für insgesamt 361 Patientinnen die uPA/PAI-1 Werte bekannt. Tabelle 5 zeigt diejenigen Zentren der Plan B Studie, in denen uPA und PAI-1 getestet wurden. Es bestätigt sich der weit verbreitete Einsatz der Proteasefaktoren in der klinischen Routine in Deutschland.

Patienten	Klinikum	Ort
42	Klinikum	Deggendorf
37	Marienhospital	Aachen
35	Klinikum Rechts der Isar	München
34	Universitätsklinikum	Köln
28	Universitätsfrauenklinik	Halle (Saale)
25	Gemeinschaftspraxis	Hildesheim
17	Katholisches Klinikum	Koblenz
14	Helios Kliniken	Berlin
13	St. Elisabeth Krankenhaus	Köln
11	Evangelisches Krankenhaus	Bergisch Gladbach
10	Herman-Josef-Krankenhaus	Erkelenz
9	St. Josefs Hospital	Wiesbaden
9	Katholisches Klinikum	Mainz
9	Ev. Jung-Stilling-Krankenhaus	Siegen
7	St. Barbara Klinikum	Hamm
5	Frauenklinik	Böblingen
5	Evangelische Kliniken	Bonn
4	Ev. Krankenhaus Bethesda	Mönchengladbach
4	Sana Klinikum	Remscheid
4	Wilhelm Anton Spital	Goch
4	Marienhospital	Witten
4	Alfred-Krupp Krankenhaus	Essen
3	Universitätsfrauenklinik	Essen
3	Praxis Schrader/Lück	Hannover
3	Klinikum Essen Mitte	Essen
2	Henriettenstiftung	Hannover
2	Marienhospital	Neuwied
2	Johanniter Frauenklinik	Stendal
2	Südharzkrankenhaus	Nordhausen
2	Medizinisches Zentrum	Bonn
2	Westpfalzkrankenhaus	Kaiserslautern
2	St. Marienstift	Magdeburg
2	Evangelische Kliniken	Gelsenkirchen
2	Frauenklinik Höchst	Frankfurt
2	Gemeinschaftspraxis Lorenz	Braunschweig
1	Kreiskrankenhaus	Hameln
1	Praxis für Gynäkologie	Wuppertal
<b>Gesamt: 361 Patientinnen aus 37 Zentren in Deutschland</b>		

Tabelle 5: Übersicht der Zentren mit uPA/PAI-1 aus der Plan B Studie

Eine Patientin mit erhöhtem uPA (uPA > 3 ng/mg Gesamtprotein im Tumor) und/oder erhöhtem PAI-1 (PAI-1 > 14 ng/mg Gesamtprotein im Tumor) gehört der Hochrisikogruppe an. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, hatten 73 % (n = 262) der Patientinnen ein erhöhtes Rezidivrisiko nach uPA/PAI-1. Demgegenüber konnten 99 Patientinnen (27 %) dem Niedrigrisiko-Kollektiv zugeordnet werden. Diese Patientinnen besitzen eine exzellente Prognose. Man könnte ihnen daher möglicherweise eine adjuvanten Chemotherapie und die damit verbundenen Nebenwirkungen ersparen.

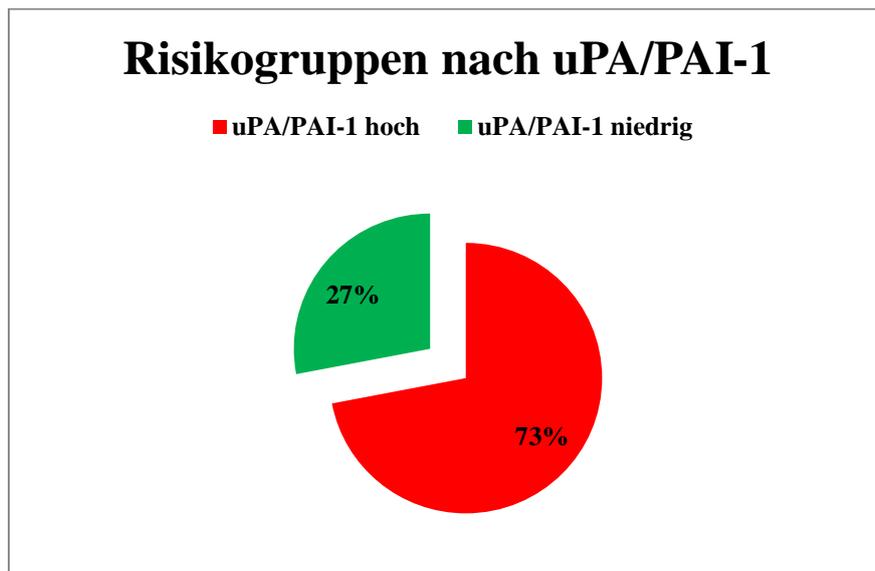


Abbildung 13: Risikogruppen nach uPA/PAI-1 in der Plan B Studie (n=361)

Von den 361 Patientinnen mit Werten für uPA/PAI-1 erhielten die Hormonrezeptor-positiven Patientinnen einen OncotypeDX® (eine Hormonrezeptor-negative Patientin erhielt auch einen OncotypeDX®). Somit waren insgesamt für 340 Hormonrezeptor-positiven Patientinnen sowohl uPA/PAI-1, als auch ein Recurrence Score bekannt. Die Charakteristika dieser 340 Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiver und Her2-negativer Erkrankung wird in Tabelle 6 dargestellt. Es zeigt sich eine heterogene Verteilung der konservativen histo-pathologischen Faktoren.

<b>Patienten mit Hormonrezeptor-positivem, Her2-negativem Brustkrebs und uPA/PAI-1 und Recurrence Score</b>		
<b>Patientenalter</b>	Range	32-76 Jahre
	Mittelwert	55 Jahre
	Median	55 Jahre
<b>Tumorgröße</b>	T1	182
	T2	105
	T3	5
	T unbekannt	48
<b>Grading (zentral)</b>	G1	25
	G2	209
	G3	101
	G unbekannt	5
<b>Lymphknoten</b>	N0	251
	N1	85
	N2	4
<b>Histologie</b>	invasiv duktal	222
	invasiv lobulär	56
	andere	62
<b>Total</b>		340

Tabelle 6: Charakteristika der Patientinnen mit uPA/PAI-1 und Recurrence Score

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen nun die Einteilung der 340 Patientinnen mittels Recurrence Score nach den Plan B und den Konventionellen Grenzwerten. Betrachtet man die Risikogruppen, sieht man, dass 18 % (Plan B) und 8 % (Konventionelle Grenzwerte) der Patientinnen ein hohes Rezidivrisiko besaßen und somit von einer adjuvanten Chemotherapie profitierten. 19 % beziehungsweise 51 % hatten ein niedriges Risiko und konnten somit aufgrund der sehr guten Überlebenswahrscheinlichkeit auf eine adjuvante Chemotherapie verzichten. Die sehr große und heterogene mittlere Risikogruppe (63 %/41 %) ist Bestandteil laufender klinischer Studien (siehe Kapitel: 6). Mit Hilfe des Recurrence Score ist in diesem Patientengut aktuell keine sichere Aussage über Prognose und den Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie möglich.

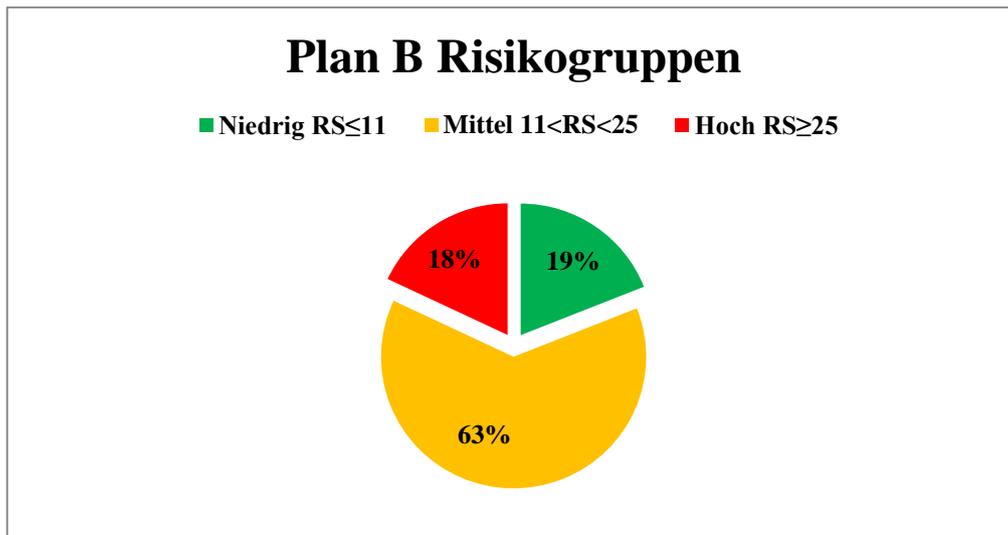


Abbildung 14: Risikogruppen nach Recurrence Score (Plan B Grenzwerte) (n=340)

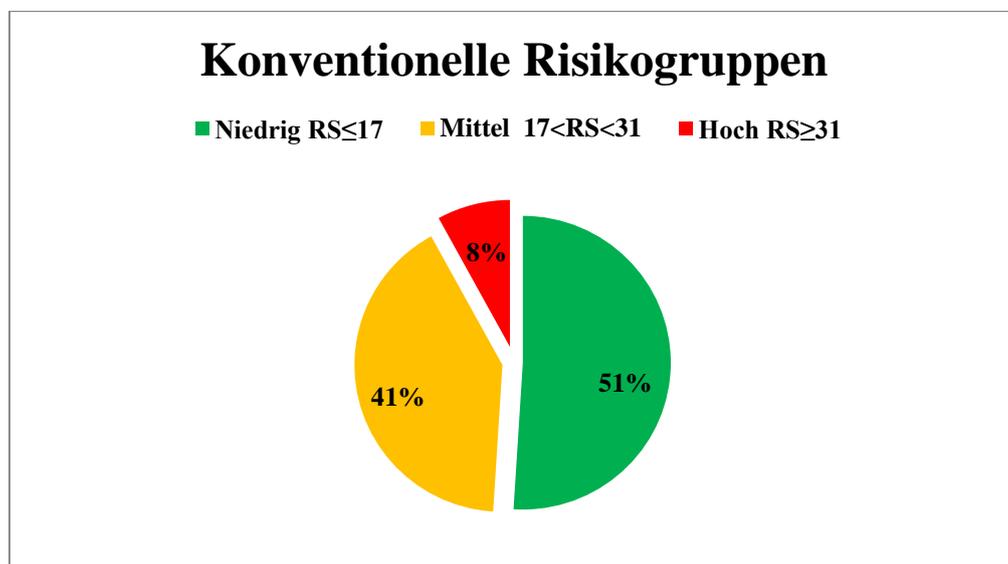


Abbildung 15: Risikogruppen nach Recurrence Score (Konventionelle Grenzwerte) (n = 340)

Betrachtet man die Risikogruppen nach uPA/PAI-1 und Recurrence Score, fällt auf, dass in der Hochrisikogruppe der Plan B Studie ( $RS \geq 25$ ,  $n = 61$ ) nur acht Patientinnen (13 %) ein niedriges uPA/PAI-1 hatten. In der Hochrisikogruppe nach konventionellen Recurrence Score Grenzwerten (Hochrisiko für  $RS \geq 31$ ,  $n = 28$ ) hatten nur zwei Patientinnen ein niedriges uPA/PAI-1. Somit konnte ein hohes Risiko nach Recurrence Score ein hohes Risiko nach uPA/PAI-1 vorhersagen. Im Gegensatz dazu wurde in der Recurrence Score-Niedrigrisikogruppe ( $RS \leq 11$ ,  $n = 65$ ) 44 Patientinnen (68 %) mit Hilfe der Proteasen uPA/PAI1 ein hohes Risiko attestiert. Dasselbe traf auch für die konventionellen Grenzwerte

zu. In der sehr großen und klinisch relevanten Gruppe mit mittlerem Risiko nach Recurrence Score (Plan B Grenzwerte: n = 214 (63 %); Konventionelle Grenzwerte: n = 141 (41 %)) gehörten für beide Recurrence Score Grenzwerte circa 30 % der Patientin der Niedrigrisikogruppe nach uPA/PAI-1 an (siehe: Tabelle 7 und Tabelle 8).

Plan B Recurrence Score Grenzwerte				
	uPA/PAI-1 hoch	uPA/PAI-1 niedrig	Gesamt	$\chi^2$
RS niedrig (RS $\leq$ 11)	44 (68 %)	21 (32 %)	65	p<0,004
RS mittel (11 < RS < 25)	148 (69 %)	66 (31 %)	214	
RS hoch (RS $\geq$ 25)	53 (87 %)	8 (13 %)	61	
Gesamt	245 (72 %)	95 (28 %)	340	

Tabelle 7: uPA/PAI-1 und Recurrence Score (Plan B Grenzwerte)

Konventionelle Recurrence Score Grenzwerte				
	uPA/PAI-1 hoch	uPA/PAI-1 niedrig	Gesamt	$\chi^2$ -
RS niedrig (RS $\leq$ 17)	117 (68 %)	54 (32 %)	171 (50 %)	P < 0,009
RS mittel (17 < RS < 31)	102 (72 %)	39 (28 %)	141 (41 %)	
RS hoch (RS $\geq$ 31)	26 (93 %)	2 (7 %)	28 (9 %)	
Gesamt	245 (72 %)	95 (28 %)	340	

Tabelle 8: uPA/PAI-1 und Recurrence Score (Konventionelle Grenzwerte)

## 5 Diskussion: Vergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zum ersten Mal uPA/PAI-1 und die 21-Gen-Analyse des OncotypeDX® (resultiert im Recurrence Score) in einer prospektiven Phase-III-Studie miteinander verglichen. Es handelt sich bei diesen Biomarkern um zwei der am besten evaluierten modernen Prognosefaktoren. Zusätzlich sind sie Faktoren, für die beim Mammakarzinom, neben konventionellen Faktoren (Hormonrezeptor-, Her2-Status), eine prädiktive Aussagekraft belegt ist. Sie ermöglichen somit zum einen eine Aussage über den weiteren Verlauf der Erkrankung und definieren zum anderen das Ansprechen auf eine eventuelle systemische Therapie. Beide Tests werden von den Leitlinien der American Society of Clinical Oncology (ASCO) und der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) zur Unterstützung bei der Therapieentscheidung empfohlen. Aus diesen Gründen entschied man sich dafür, die Risikostratifizierung in der Plan B Studie mit Hilfe der Bestimmung von uPA/PAI-1-Leveln (optional) und des Recurrence Score durchzuführen. Insgesamt waren für 340 Patientinnen aus den 91 Studienzentren der Plan B Studie Werte für uPA und PAI-1 sowie ein Recurrence Score vorhanden. Bei der Untersuchung der Ergebnisse beider Tests im Patientenkollektiv der WSG-Plan B Studie fiel auf, dass ein hohes Risiko nach Recurrence Score sehr gut mit hohen Werten für uPA/PAI-1 korrelierte. Diese signifikante Korrelation war unabhängig davon, welche Grenzwerte für die Risikogruppen betrachtet wurden (Plan B Grenzwerte: 11 und 25 oder konventionelle Grenzwerte: 17 und 31). Ein hoher Recurrence Score konnte somit hohe Proteaselevel für uPA/PAI-1 vorhersagen. Im Gegensatz dazu hatten in der Gruppe mit geringem Rezidivrisiko nach Recurrence Score ( $RS \leq 11$  beziehungsweise  $RS \leq 17$ ) 68 % der Patientinnen hohe Werte für uPA/PAI-1. In der klinisch relevanten Untergruppe mit mittlerem Risiko nach OncotypeDX® (Plan B Grenzwerte:  $n=214$  (63 %); Konventionelle Grenzwerte:  $n = 141$  (41 %)) wurde circa 30 % der Patientinnen mit Hilfe der Proteasen uPA/PAI-1 ein niedriges Risiko attestiert (siehe: Abbildung 16 und Abbildung 17). Möglicherweise sind dies Patientinnen, denen aufgrund der niedrigen Proteasen, trotz mittleren Risikos im OncotypeDX®, eine Chemotherapie erspart werden könnte.

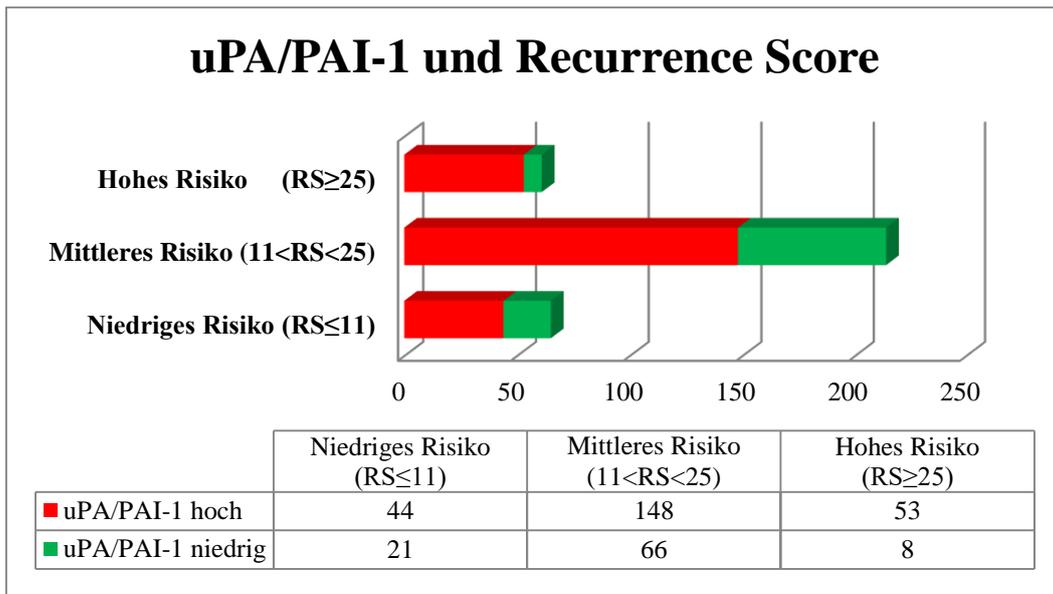


Abbildung 16: Vergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score (Plan B Grenzwerte)

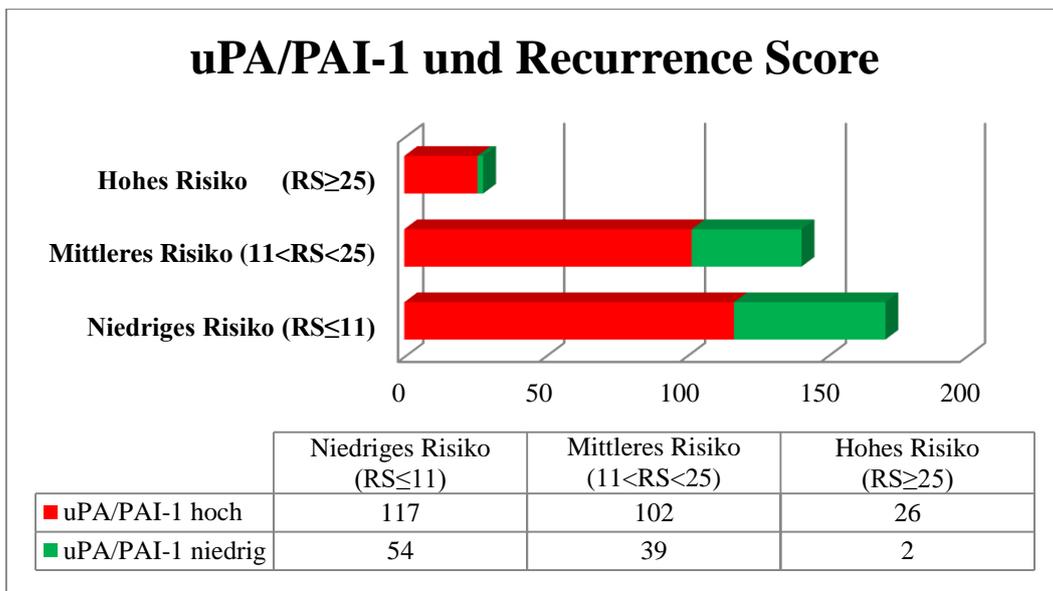


Abbildung 17: Vergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score (konventionelle Grenzwerte)

uPA/PAI-1 und der Recurrence Score unterscheiden sich nicht nur anhand ihrer Aussagekraft im Patientenkollektiv der Plan B Studie. Weitere für die klinische Anwendung äußerst relevante Unterschiede werden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Kriterium	uPA/PAI-1		Recurrence Score	
	Vorteil	Nachteil	Vorteil	Nachteil
Prognose (Validierung)	Prospektive Studien, Metaanalysen		Prospektive Studien	
Prädiktion	Prospektive Studien, Retrospektive Studien	Prospektiv für CMF <u>ohne</u> Antihormonelle Therapie	Retrospektive Studien <u>mit</u> Antihormoneller Therapie	Nur für CMF, FEC versus Antihormonelle Therapie
Nodalstatus	N0		N0-3	
Hormonrezeptor	+/-		Nur +	
Kosten	~250€		~3000€	
Kosteneffektivität	✓		✓	
Gewebe	Frischgewebe, Logistik für Kühlung und Transport		Fixierter Tumor- Paraffinblock, keine Änderung der Routine	
Gewebegewinnung	50mg, Stanzbiopsie, Chirurgie	Tumor-mindestgröße (~pT1c)	35-65µm, Stanzbiopsie, Chirurgie	
Stabilität des Testverfahrens	ELISA an Frischgewebe	Sofortiger Transport/Kühlung	Normale Konservierung	Denaturierung der RNA durch Fixation
Durchführbarkeit dezentral im lokalen Labor	ELISA Kit von Femetelle®		Tumorblock ins Zentrallabor nach Amerika	
Erhalt des Testergebnisses	5 Tage		14 Tage	
Risikogruppen	Hoch versus Niedrig		Untersuchung der Expression von Einzelgenen	Hoch, Niedrig und große Gruppe mit mittlerem Risiko
Leitlinien	ASCO, AGO „+“, Deutsche Experten St. Gallen 2013		ASCO, NCCN, ESMO, Deutsche Experten St.Gallen 2013	AGO „+/-“, im Rahmen von Studien
Level of Evidence	Ia		Ib	
Klinische Routine	Ja		Ja, wenn alle anderen Faktoren zur Therapieentscheidung nicht ausreichen, Klinische Studien	

Tabelle 9: Vergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score

Wie man Tabelle 9 entnehmen kann, liefern beide Tests Informationen über die Prognose und das Therapieansprechen von Brustkrebspatientinnen. Für beide Faktoren gibt es aber Einschränkungen bezüglich der Vorhersagekraft. Für uPA/PAI-1 wurde die Prädiktion in der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie mit den damals üblichen Therapieregimen prospektiv validiert (Cyclophosphamid Methotrexat, Fluoruracil: CMF). Es lässt sich also keine direkte Aussage über den Nutzen moderner anthrazyklin- und taxanhaltiger Therapieschemata treffen. Zudem wurden die Hormonrezeptor-positiven Patientinnen der Chemo-N<sub>0</sub>-Studie nicht antihormonell (Tamoxifen) therapiert, was heutzutage als Standard gilt und sicherlich einen Einfluss auf die Überlebensdaten hätte. Die Aussagekraft von uPA/PAI-1 ist am besten für nodalnegative Patientinnen validiert.

Die größte Einschränkung des OncotypeDX® ist die bisher weitestgehend fehlende Validierung in randomisierten prospektiven Studien. Jedoch untermauern erste Auswertungen für die Niedrigrisikogruppe aus der prospektiven WSG Plan B und der TAILORx Studie die bisherigen Ergebnisse. In beiden Studien konnte für Patientinnen mit niedrigem RS mit endokriner Therapie, aber ohne Chemotherapie ein exzellentes Rezidivfreies Überleben gezeigt werden (WSGPlanB: dreijahres-rezidivfreies Überleben 98 %; TAILORx: fünfjahres-rezidivfreies Überleben 98,7 %) (54) (49). Retrospektiv wurde der Chemotherapienutzen des OncotypeDX® in den Analysen bisher nicht für moderne taxanhaltige Therapieregime gezeigt, sodass hier keine direkte Aussage über den Benefit möglich ist. Die sehr große Gruppe der Patientinnen mit mittlerem Risiko nach Recurrence Score stellt ein zusätzliches Problem für Therapeuten und Patientinnen dar. Für diese Gruppe kann keine sichere Aussage über Prognose und eventuellen Chemotherapienutzen getroffen werden.

Einige der weiterhin offenen Fragen können möglicherweise mit den finalen Analysen der aktuell laufenden Studien (WSGPlanB, TAILORx, RxPONDER, ADAPT) beantwortet werden.

Die Anwendung von uPA/PAI-1 außerhalb Deutschlands ist wenig verbreitet. Eine Ursache könnte sein, dass die Bestimmung der Proteasefaktoren mit einem gewissen logistischen Aufwand verbunden ist. Die nicht fixierten Tumoren müssen sofort nach chirurgischer Entfernung in die Pathologie transportiert und zeitnah bei -20 °C eingefroren werden. Zudem benötigt man circa 50 mg frisches Tumorgewebe, wofür eine Tumormindestgröße (circa pT1c) erforderlich ist. Bei vorschriftsgemäßem Umgang mit den Proben wird die Bildung von Artefakten minimiert. Die quantitative Bestimmung der Proteasefaktoren mit Hilfe des Enzym

Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) von Femetelle® ist nicht zuletzt auch wegen regelmäßiger Qualitätskontrollen in den uPA/PAI-1-Einsendelaboren ein Verfahren mit höchsten Standards und geringer Störanfälligkeit. Demgegenüber ist die quantitative Analyse von RNA im fixierten Paraffin-Gewebeblock deutlich empfindlicher. Die RNA wird bei der Fixation des Gewebes denaturiert und nimmt somit in der Quantität über die Zeit ab. Entgegenwirken konnten die Entwickler des OncotypeDX® diesem Phänomen mit der Testung der Krebsgene im Verhältnis zu Referenzgenen, die alle der Denaturierung unterliegen. Die Möglichkeit, den Recurrence Score an in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE) durchführen zu können, ermöglicht einen Einsatz des OncotypeDX® im klinischen Alltag ohne dabei Routineabläufe ändern zu müssen. Bedenken sollte man jedoch, dass der OncotypeDX® nur für die Durchführung im Zentrallabor in den USA die Qualitätsstandards erfüllt. Daher ist der zeit- und kostenintensive Versand der Proben nach Amerika obligat. Ein zusätzlicher Vorteil des OncotypeDX® besteht darin, dass einzelne Gene im Hinblick auf ihre Expression untersucht werden können (Hormonrezeptoren, Proliferationsmarker Ki67, Her2, etc.). uPA/PAI-1 wird schon seit mehreren Jahren zur Risikobeurteilung in vielen deutschen Kliniken eingesetzt (siehe: Abbildung 18).

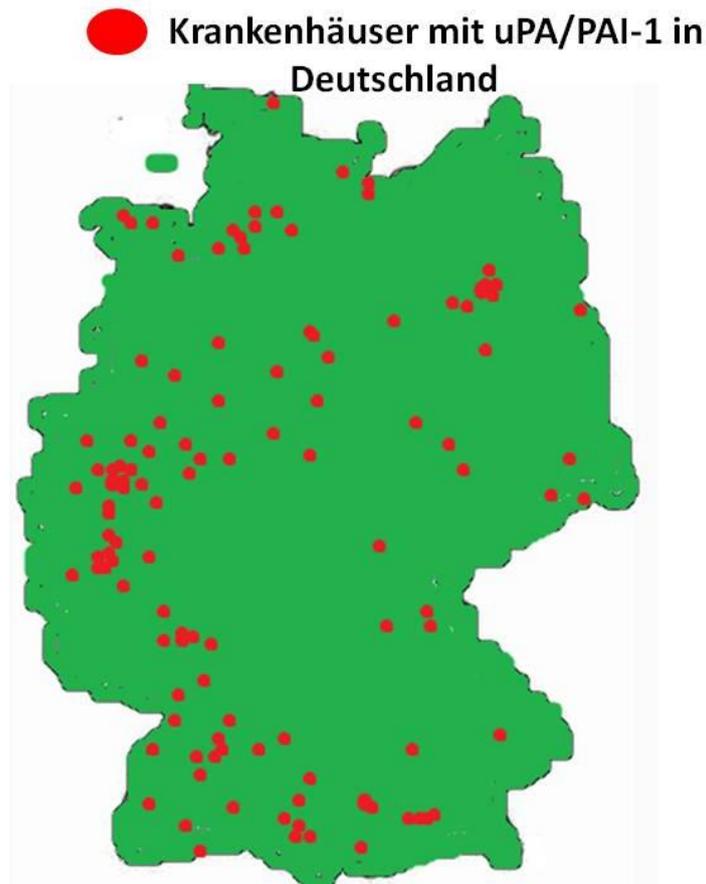


Abbildung 18: Übersicht über deutsche Kliniken/Brustzentren mit uPA/PAI-1-Testung (91) (nicht vollständig)

Dies geschieht vorwiegend bei Patientinnen mit kleinem primärem Mammakarzinom, die nach klinischen und pathologischen Kriterien einer mittleren Risikogruppe angehören. Bei diesen Patientinnen ist mit den traditionellen klinischen Kriterien ein Nutzen der systemischen adjuvanten Therapie nicht sicher vorherzusagen. Werden im Tumor erhöhte Proteasefaktorenlevel (uPA > 3 ng/mg und/oder PAI-1 > 14 ng/mg) gemessen, so tragen diese Patientinnen ein erhöhtes Risiko ein Rezidiv zu erleiden, beziehungsweise am Brustkrebs zu sterben. Diese Patientinnen würden von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. Das spiegelt auch die aktuellen Empfehlungen der Organkommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO), die uPA/PAI-1 mit einem „+“ bewertet, wider. Im Gegensatz dazu wird der routinemäßige Einsatz von Gentests, wie des Recurrence Score (OncotypeDX®), in der aktuellen Stellungnahme der AGO (2014) mit „+“ empfohlen, wenn alle anderen Faktoren zur Therapieentscheidung nicht ausreichen. Primär sollte der Einsatz in Einzelfällen und im Rahmen von Studien erfolgen. Zwar erlangte der OncotypeDX® formal das höchste Level of Evidence (Ib). Dies erfolgte hauptsächlich nicht,

wie für das Level of Evidence (Ia) gefordert, auf der Basis prospektiver Studien, sondern anhand retrospektiver Analysen archivierter Gewebe aus prospektiven Studien (92). Das erklärt die Bewertung des OncotypeDX® bis 2013 mit „+/-“. Die vor Kurzem veröffentlichten prospektiven Daten führten dazu, dass der OncotypeDX® seit 2014 mit „+“ bewertet wird. Eine abschließende Aussage über die klinische Relevanz dieser Zusammenhänge ist mit dem aktuellen Kenntnisstand noch nicht sicher möglich. Es müssen zum einen die finalen Analysen der laufenden Studien (z. B.: Plan B Studie. frühestens im Jahr 2016) abgewartet werden, zum anderen sollten weitere Studien folgen, in denen die Diskrepanzen vor allem im mittleren und niedrigen Risikobereich dieser beiden für sich sehr gut validierten Biomarker prospektiv und randomisiert untersucht werden.

## **6 Laufende Studien: ein Ausblick**

Aufgrund der fehlenden prospektiven Daten für Biomarker (ausgenommen uPA/PAI-1) sind weitere randomisierte Studien notwendig. Für OncotypeDX®, Pam50® und Ki67 laufen aktuell Studien, die prospektiv untersuchen, wie aussagekräftig die Tests sind.

### **6.1 RxPonder, TAILORx und WSG-ADAPT: prospektive Validierung des RS**

Der starke prognostische Effekt, der für den Recurrence Score für Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiver Brustkrebserkrankung und Tamoxifen-Therapie in der NSABP B14 Studie gezeigt werden konnte, sowie der prädiktive Effekt, der sich in der NSABP B20 Studie für eine Therapie mit CMF herausstellte, bilden die Grundlage für weitere Studien (TAILORx-Studie und RxPONDER). In der TAILORx-Studie wird die große Gruppe der nodalnegativen Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiver Erkrankung und mittlerem Recurrence Score-Risiko (CAVE: in diesem Fall RS von 12 bis 25) entweder eine antihormonelle Therapie plus Chemotherapie erhalten oder nur antihormonell behandelt werden. Die veränderten Grenzwerte des Recurrence Score in der TAILORx- gegenüber den Validierungsstudien beruhen auf dem Bestreben, das Risiko einer Untertherapie der Hochrisikogruppe zu minimieren. Ein Effekt der Chemotherapie zeichnete sich im Patientenkollektiv der NSABP B20 Studie für die TAILORx-

Grenzwerte RS = 11-25 schon ab. Dieser Effekt war aber, wie man an den überlappenden Konfidenzintervallen in Abbildung 19 sehen kann, nicht signifikant.

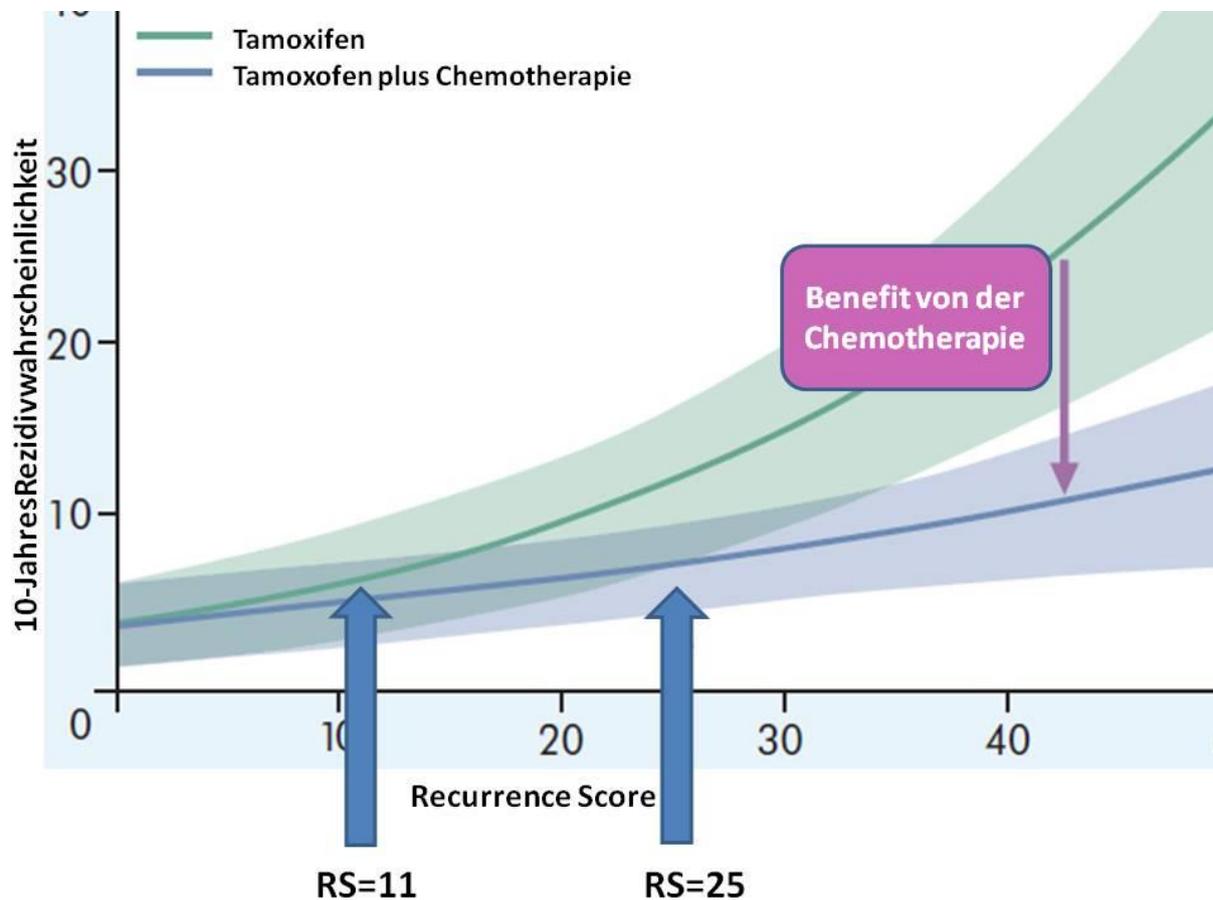


Abbildung 19: Risikogruppen laut TAILORx (RS zwischen 11 und 25 für mittleres Risiko) an Patientinnen der NSABP B20, modifiziert auch (93)

Nicht zuletzt werden Therapieentscheidungen für eine Chemotherapie aktuell ab einem Grenzwert von circa 10 % für ein Rezidiv innerhalb von zehn Jahren getroffen. Das entspricht in etwa dem Risiko einer Patientin mit keinem oder bis zu drei befallenen Lymphknoten und einem RS = 11. Die Niedrigrisikogruppe (RS < 11) wird zur Bestätigung ihrer guten Prognose nur antihormonell behandelt und nachbeobachtet (93). Die zweite prospektive Studie, die 2011 startete, ist die RxPONDER (SWOG S 1007). Hier werden Patientinnen mit Hormonrezeptorpositiven, Her2-negativen Tumoren mit einem bis drei befallenen Lymphknoten eingeschlossen und nach Recurrence Score in die Therapiearme verteilt. Bei einem Recurrence Score von mehr als 25 erhalten die Patientinnen eine antihormonelle Therapie plus Chemotherapie. Bei Werten von 25 und weniger werden die Patientinnen zwischen antihormoneller Therapie allein und

antihormoneller Therapie plus Chemotherapie randomisiert. Weitere Risikostratifizierung erfolgt nach  $RS = 0-13$  und  $RS = 14-25$ , Menopausenstatus und Lymphknotenchirurgie (Axilladissektion versus Sentinellymphknotenbiopsie). Zusätzlich wird der PAM50-Test durchgeführt, wodurch zum ersten Mal ein prospektiver Vergleich der beiden Genexpressionsanalysen möglich wird (94).

Das Studiendesign der beiden prospektiven Studien TAILORx und RxPONDER ist sehr ähnlich (siehe: Abbildung 20) und ermöglicht im besten Fall eine Aussage über die Prognose und den Therapienutzen in der großen Gruppe mit mittlerem Risiko nach Recurrence Score ohne und mit bis zu drei befallenen Lymphknoten.

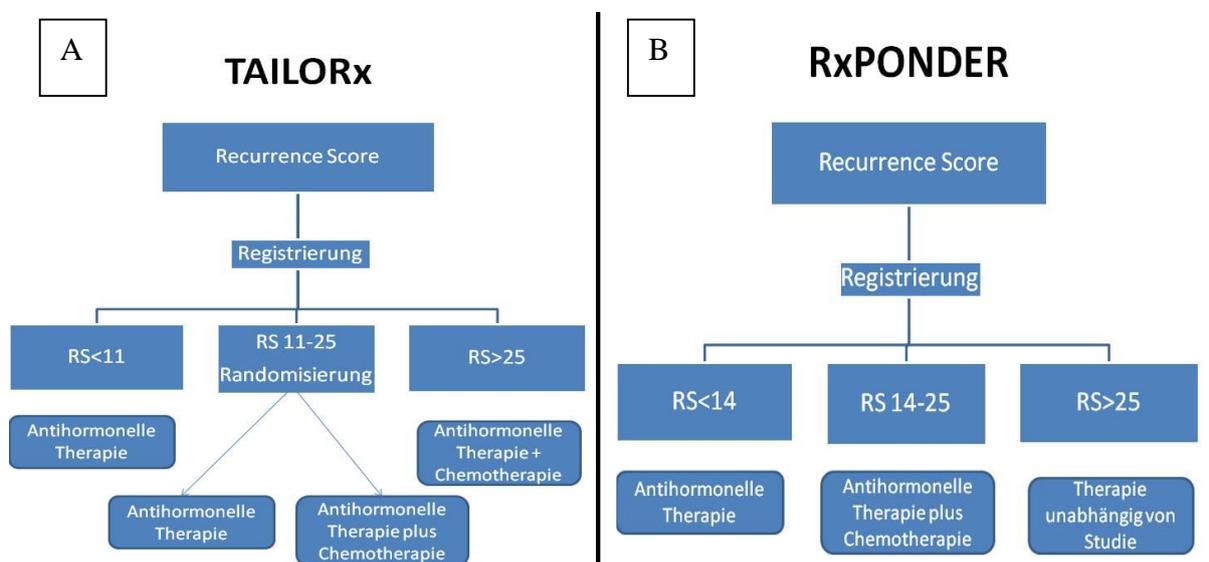


Abbildung 20: Studiendesign der TAILORx (N0) (A) und der RxPONDER (N1) (B), modifiziert nach (73)

Die 2012 gestartete ADAPT-Studie der West German Study Group (WSG) soll in einer Substudie an Hormonrezeptor-positiven Patientinnen die Frage nach dem Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie besonders für Patientinnen mit mittlerem Rezidivrisiko nach Recurrence Score klären. Die Studie sieht für alle Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiver Brustkrebskrankung die Bestimmung des Recurrence Score und des Proliferationsmarkers Ki67 vor Beginn der Therapie aus stanzbiopsisch gewonnenem Gewebe vor. Im Anschluss erhalten die Patientinnen eine antihormonelle Induktionstherapie über einen Zeitraum von drei Wochen. Nach diesen drei Wochen erfolgt eine erneute Bestimmung des Recurrence Score sowie des Ki67. Das Ansprechen der Proliferationsrate des Tumors auf die endokrine Induktionstherapie wird mit Hilfe des Ki67-Ansprechens nach der dreiwöchentlichen Therapie

ermittelt. Patientinnen mit nodalnegativem und nodalpositivem Mammakarzinom mit mittlerem Risiko nach Recurrence Score und gutem Ansprechen der Proliferationsrate auf die endokrine Induktionstherapie werden wie Patientinnen mit niedrigen Recurrence Score Werten adjuvant nur antihormonell behandelt. Hochrisikopatientinnen nach Recurrence Score und Patientinnen mit mittlerem Risiko und schlechtem Ansprechen der Proliferationsrate auf die endokrine Induktionstherapie werden zusätzlich zur antihormonellen Therapie eine Chemotherapie erhalten (siehe: Abbildung 21). Es soll gezeigt werden, dass mit Hilfe des Ansprechens der Proliferationsrate (Ki67) auf eine kurze präoperative endokrine Therapie diejenigen Patientinnen mit mittlerem Risiko nach Recurrence Score herausgefunden werden können, die eine ähnlich exzellente Prognose wie Niedrigrisikopatientinnen besitzen (90).

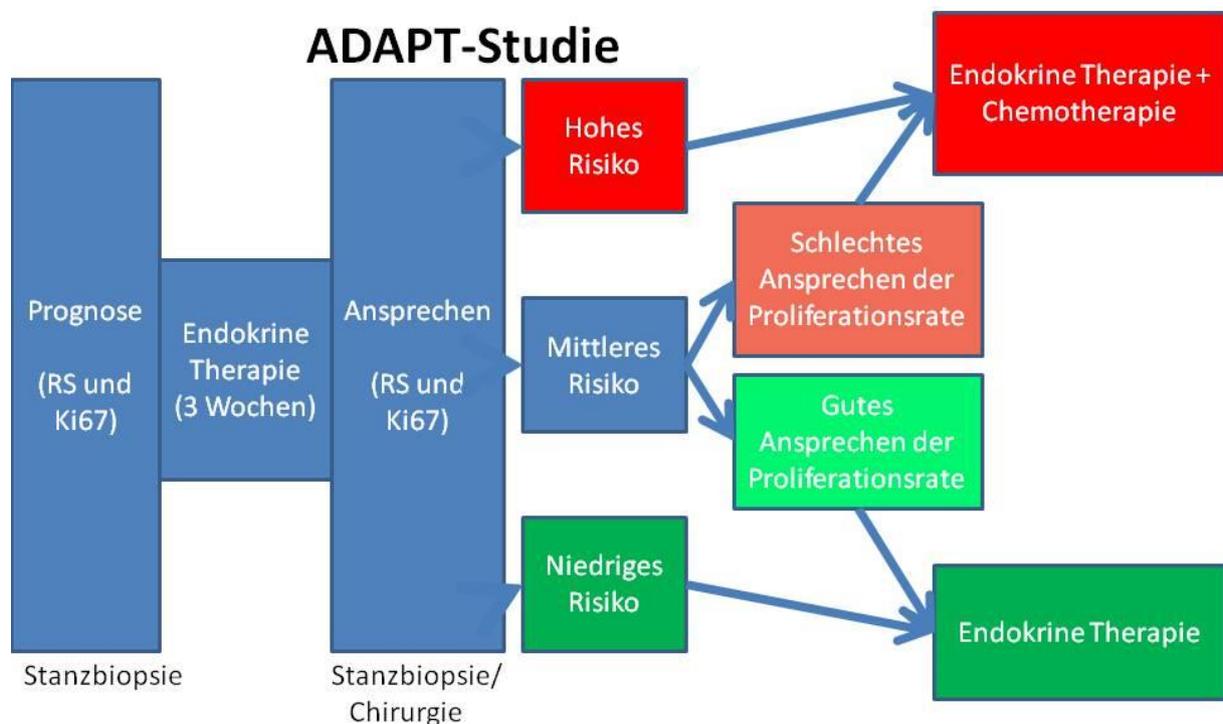


Abbildung 21: Studiendesign der ADAPT-Studie, modifiziert nach (90)

## 6.2 uPA/PAI-1 im modernen Therapieschema; NNBC-3 Studie

Um den klinischen Nutzen von uPA und PAI-1 im Vergleich zu klinisch-pathologischen Kriterien (St. Gallen Konsensus (18)) im modernen Therapieschema zu betrachten, wurden in der Node-Negative-Breast-Cancer-3-Studie (NNBC-3) von 2002 bis 2009 4149 Patientinnen eingeschlossen. Das allein beweist schon, dass moderne Biomarker in der klinischen Routine

zur Anwendung kommen und große klinische Studien auf deren Basis möglich sind. In der Studie wurden Patientinnen entweder nach klinisch-pathologischen Gesichtspunkten (CP) oder nach biologischen Kriterien (UP) den Risikogruppen zugeteilt. Patientinnen mit niedrigem Risiko erhielten eine antihormonelle Therapie. Hochrisikopatientinnen hingegen wurden in eine Gruppe mit anthrazyklinhaltigem Schema (Floururacil, Epirubicin und Cyclophosphamid; FEC) oder eine Sequenz aus FEC und Docetaxel randomisiert. Untersucht werden sollte der zusätzliche Nutzen eines Taxans für Hochrisikopatientinnen (95). In der Zwischenanalyse, die auf dem SABCS 2011 von Thomssen, et al. präsentiert wurde, zeigte sich kein zusätzlicher Nutzen für die Hinzunahme von Taxanen zur anthrazyklinhaltigen Chemotherapie (96). Beim Vergleich der beiden Systeme zur Risikostratifizierung CP versus UP stellte sich eine ähnliche Verteilung der Patientinnen in die Risikogruppen heraus (Hochrisiko: UP: 61,3 %; CP: 68,7 %). Durch die Bestimmung von uPA/PAI-1 könnte also vielen Patientinnen mit mittlerem klinisch-pathologischem Risiko eine Chemotherapie erspart bleiben (97). Die endgültigen Resultate der Studie stehen noch aus. Erst im Anschluss daran kann genaue eine Aussage zur Prognosekraft der beiden Stratifizierungssysteme getroffen werden.

## **7 Zusammenfassung:**

Es gibt beim Mammakarzinom sehr gut validierte und zum Teil auch schon im klinischen Alltag etablierte Biomarker, die wichtige Informationen über die Rückfallrate, das Gesamtüberleben oder die Ansprechrate auf eine Chemo- oder endokrine Therapie liefern. Zwei der am besten untersuchten und in Deutschland am breitesten eingesetzten Biomarker sind die Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 und der OncotypeDX®, eine 21-Gen-Analyse. Beide Tests werden von den Leitlinien der AGO und der ASCO bei der Therapieentscheidung empfohlen. In dieser Doktorarbeit wurden beide Tests erstmals in einer prospektiven, randomisierten Phase-III Studie am selben Patientenkollektiv untersucht und verglichen. Es zeigt sich eine sehr gute Korrelation der Ergebnisse beider Biomarker im Hochrisikokollektiv (ca. 90 %). Betrachtet man hingegen Patientinnen mit niedrigem Risiko, so treten in ca. 70 % der Fälle diskordante Ergebnisse auf. Der mittlere Risikobereich des OncotypeDX® unterteilt sich in Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1 (ca. 30 %) und hohem Risiko nach uPA/PAI-1 (ca. 70 %).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass jeder der beiden Biomarker für sich hinsichtlich seiner Funktion als prognostischer und prädiktiver Faktor auf höchstem Niveau validiert ist. Wie die klinisch relevanten Diskordanzen der beiden Tests vor allem im mittleren und niedrigen Risikobereich zu werten sind, muss durch die finalen Analysen der WSG-Plan B Studie sowie weitere klinische Studien erst noch gezeigt werden. Die endgültigen Überlebensdaten der WSGPlan B Studie werden im Jahr 2016 erwartet. Aufgrund der Tatsache, dass Recurrence Score und uPA/PAI-1 im selben Patientengut unterschiedliche Aussagen über das Rückfallrisiko, das Gesamtüberleben und das Ansprechen auf eine Chemotherapie treffen, ist einer Patientin unbedingt von Mehrfachtestungen, dem so genannten „Test-Hopping“, abzuraten. Eine Patientin sollte, sobald sie einer der gut validierten Tests der Hochrisikogruppe zuordnet, als Hochrisikopatientin angesehen und dementsprechend therapiert werden. Unabhängig der Ergebnisse weiterer Tests sollte diese Einstufung bestehen bleiben.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet*. 1992, Bde. 339: 1-15 and 71-85.
2. Look, Maxime P., et al. Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase- Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst*. 2002, Bd. 94, 2: 116-28.
3. Behrens, J. The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Research Treatment*. 1993, 24: 175-184.
4. K. Dano, P.A. Andreasen, K. Grondahl-Hansen, P. Kristensen, L.S. Nielsen and L. Skriver. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res*. 1985, 44: 139-266.
5. A. Nykjaer, M. Conese, E. I. Christensen, D. Olson, O. Cremona, J. Gliemann, F. Blasi. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *The EMBO Journal*. 1997, Bd. 16, 10: 2610-2620.
6. U. Reuning, V. Magdolen, S. Hapke, M. Schmitt. Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol Chem*. 2003, 384: 1119-1131.
7. Peter A. Andreasen, Lars Kjoller, Lise Christensen and Michael J. Duffy. THE UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR SYSTEM IN CANCER METASTASIS: A REVIEW. *International Journal of Cancer*. 1997, 72: 1-22.
8. N. Harbeck, R. E. Kates, K. Gauger, A. Willems, M. Kiechle, V. Magdolen, M. Schmitt. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thrombosis and Haemostasis*. 2004, 91 (3): 450-456.
9. Thomssen C, Harbeck N, Dittmer J, Abraha-Spaeth SR, Papendick N, Paradiso A, Lisboa B, Jaenicke F, Schmitt M, Vetter M. Feasibility of measuring the prognostic factors uPA and PAI-1 in core needle biopsy breast cancer specimens. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009, 101(14):1028-1029.
10. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt M. Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and

proliferation markers: 6-year median follow-up. *British Journal of Cancer*. 1999, 80(3-4):419-26.

11. Sweep CG, Geurts-Moespot J, Grebenschikov N, de Witte JH, Heuvel JJ, Schmitt M, Duffy MJ, Jänicke F, Kramer MD, Foekens JA, Brüner N, Brugal G, Pedersen AN, Benraad TJ. External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *British Journal of Cancer*. 1998, 78(11):1434-1441.

12. M.J. Duffy, P. O'Grady, D. Devenay, L. O'Siorain, J. J. Fennelly, H. J. Lijnen. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast cancer. *Cancer*. 1988, 62: 531-533.

13. Jänicke F., Schmitt M., Ulm K., Goessner W., Graeff H. Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet*. 1989, 2 (8670): 1049.

14. M. J. Duffy, D. Reilley, C. O'Sullivan, N. O'Higgins, J. J. Fennelly, P. Andreasen. Urokinase-Plasminogen Activator, a New and Independent Prognostic Marker in Breast Cancer. *Cancer Research*. 1990, 50: 6827-6829.

15. F. Jänicke, M. Schmitt, R. Hafter, A. Hollrieder, R. Babic, K. Ulm, W. Goessner, H. Graeff. Urokinase-type plasminogen activator is a predictor of early of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis*. 1990, 4: 69-78.

16. Jänicke F., Schmitt M., Graeff H. Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 1991, 17: 303-312.

17. Zemzoum I, Kates RE, Ross JS, Dettmar P, Dutta M, Henrichs C, Yurdseven S, Höfler H, Kiechle M, Schmitt M, Harbeck N. Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003, 21: 1022-1028.

18. Goldhirsch A, Glick J H, Gelber R D, Coates A S, Senn H J. Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *Journal of National Cancer Institute (Bethesda)*. 2001, 19: 3817-3827.

19. Thomssen C, Jänicke F. Do we need better prognostic factors in node-negative breast cancer? *European Journal of Cancer*. 2000. 36: 293-298.

20. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep C G J F, Selbmann H-K, Graeff H, Schmitt M. Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial in High-Risk,

Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients Identified by Urokinase-type Plasminogen Activator und Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001, Bd. 93, 12: 913-920.

21. Harbeck N, Meisner C, Prechtel A, et al. Level-I evidence for prognostic and predictive impact of uPA and PAI-1 in node-negative breast cancer provided by second scheduled analysis of multicenter chemo-N0 therapy trial. *Breast Cancer Research Treatment*. 2001, 69: 213.

22. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 1998, 351: 1451-1467.

23. Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep C G, Lisboa B W, Lux M P, Beck T, Hasmüller S, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C und Group, Chemo-N0 Study. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *EEuropean Journal of Cancer*. 2013, 49 (8): 1825-1835.

24. Hayes D F, Bast R C, Desch C E, Fritsche H Jr, Kemeny N E, Jessup J M, Locker G Y, Macdonald J S, Mennel R G, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn R J. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996, 88 (20): 1456-1466.

25. Hayes D F, Trock B, Harris A L. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Research Treatment*. 1998, 52 (1-3): 305-319.

26. Leitlinien Mammakarzinom der Frau, Version 2012.1D. s.l. : Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, Kommission Mamma.

27. Goldhirsch A, Glick J H, Gelber R D, Coates A S, Thürlimann B, Senn H J. Meeting Highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Annals of Oncology*. 2005, 16 (10): 1569-1583.

28. Harris L, Fritsche H, Memmel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield M R, Hayes D F, Bast C Jr. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. 2007, Bd. 25, 33: 5287-5312.

29. J. Plun-Favreau S. Luthman, C. Svedman, J. Mesterton. REVIEW OF TRADITIONAL PROGNOSTIC AND PREDICTIVE MARKERS IN EARLY-STAGE BREAST CANCER. St. Gallen Breast Cancer Conference, Switzerland : s.n., 2013. Abstract-nr.:126.

30. Harbeck N1, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Research*. 2002, Aug 15;62(16):4617-22.
31. Foekens J A, Look M P, Peters H A, van Putten W L J, Portengen H, Klijn J G M. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *Journal of National Cancer Institute*. 1995, 87: 751-756.
32. Harbeck N, Kates R E, Look M P, Meijer-van Gelder M E, Klijn J G M, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens J A. Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type PLasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (n=3424). *Cancer Research*. 2002, 62: 4617-4622.
33. Kantelhardt, et al. *ASCO 2009*.
34. Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, Esteban JM, Baker JB. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *American Journal of Pathology*. 2004, 164(1):35-42.
35. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner F L, Walker M G, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher E R, Wickerham D L, Bryant J, Wolmark N. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2004, Bd. 351, 27: 2817-2826.
36. Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, Jeong J, Wu J, Langone KC, Watson D. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Chemistry*. 2007, 53(6):1084-91.
37. Fisher B, Jeong JH, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, Wolmark N und trials, National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet*. 2004, 364(9437):858-868.

38. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Forbes J, Mallon E A, Salter J, Quinn E, Dunbier A, Baum M, Buzdar A, Howell A, Bugarini R, Baehner F L, Shak S. Prediction of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated with Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010, 28: 1829-1834.
39. Goldstein LJ, Gray R, Badve S, Childs BH, Yoshizawa C, Rowley S, Shak S, Baehner FL, Ravdin PM, Davidson NE, Sledge GW Jr, Perez EA, Shulman LN, Martino S, Sparano JA. Prognostic utility of the 21-gene assay in hormone receptor-positive operable breast cancer compared with classical clinicopathologic features. *Journal of Clinical Oncology*. 2008, 26(25):4063-4071.
40. Habel L A, Shak S, Jacobs M K, Capra A, Alexander C, Pho M, Baker J, Walker M, Watson D, Hackett J, Blick N T, Geenberg D, Fehrenbacher L, Langholz B, Quesenberry CB. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast cancer Research*. 2006, 8: R25.
41. Mamounas EP, Tang G, Paik S, Baehner FL, Liu Q, Jeong J-H, Kim S-R, Butler SM, Jamshidian F, Cherbavaz DB, Sing AP, Shak S, Julian TB, Lembersky BC, Wickerham DL, Costantino JP, Wolmark N. Association between the 21-Gene Recurrence Score (RS) and Benefit from Adjuvant Paclitaxel (Pac) in Node-Positive (N+), ER-Positive Breast Cancer Patients (pts): Results from NSABP B-28. 2012 San Antonio Breast Cancer Symposium, S1-10.
42. Mamounas E P, Tang G, Paik S, Baehner F L, Liu Q, Jeong J-H, Kim S-R, Butler S M, Jamshidian F, Cherbavaz D B, Shak S, Julian T B, Lembersky B, Wickerham D L, Costantino J P, N Wolmark. Prognostic impact of the 21-gene recurrence score (RS) on disease-free and overall survival of node-positive, ER-positive breast cancer patients (pts) treated with adjuvant chemotherapy: Results from NSABP B-28. *Journal of Clinical Oncology*. 2012, 27: 1.
43. Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, Coombes K, Lee SJ, Baker J, Cronin M, Walker M, Watson D, Shak S, Hortobagyi GN. Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Clinical Cancer Research*. 2005, Bd. 1, 11(9):3315-3319.
44. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, Ravdin P, Bugarini R, Baehner FL, Davidson NE, Sledge GW, Winer EP, Hudis C, Ingle JN, Perez EA, Pritchard KI, Shepherd L, Gralow JR, Yoshizawa C, Allred DC, Osborne CK, Hayes DF und

- Breast. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet*. 2010, 11(1):55-65.
45. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ und members, Panel. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Annals of Oncology*. 2009, 20 (8): 1319-1329.
46. Mc Shane L M, Hayes D F. Publication of tumor marker research results: the necessity for complete and transparent reporting. *Journal of Clinical Oncology*. 2012, 30(34):4223-4232.
47. Aebi S, Davidson T, Gruber G, Castiglione M und Group, ESMO Guidelines Working. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2010, 21(5): 9-14.
48. Network, National Comprehensive Cancer. NCCN Practice Guidelines. v2.2012.
49. *Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer*. Sparano J, Gray R, Makower D, Pritchard K, Albain K, Hayes D, Geyer C, Dees E, Perez E, Olson J, Zujewski J, Lively T, Badve S, Saphner T, wagner L, Whelan T, Ellis M, Paik S, Wood W, Ravdin P, Keane M, Gomez H, Reddy P, Goggins T, Mayer I, Sledge G. s.l. : NEJM, 2015. DOI: 10.1056/NEJMoa1510764.
50. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, BBAehner F L, Watson D, Bryant J, Costantino J P, Geyer C E Jr, Wickerham D L, Wolmark N. Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006, Bd. 24, 23: 37263734.
51. Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, Mariani G, Rodriguez J, Carcangiu M, Watson D, Valagussa P, Rouzier R, Symmans WF, Ross JS, Hortobagyi GN, Pusztai L, Shak S. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005, 23(29):7265-7277.
52. Chang JC, Makris A, Gutierrez M C, Hilsenbeck S G, Hackett J R, Jeong J, Liu M-L, Baker J, Clark-Langone K, Baehner F L, Sexton K, Mohsin S, Gray T, Alvarez L, Chamness G C, Osborne C K, Shak S. Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embeddedcore biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer. *Breast Cancer research Treatment*. 2008, 108:233–240.

53. Albain KS, Barlow WE, Ravdin PM, Farrar WB, Burton GV, Ketchel SJ, Cobau CD, Levine EG, Ingle JN, Pritchard KI, Lichter AS, Schneider DJ, Abeloff MD, Henderson IC, Muss HB, Green SJ, Lew D, Livingston RB, Martino S, Osborne CK und of, Breast Cancer Intergroup. Adjuvant chemotherapy and timing of tamoxifen in postmenopausal patients with endocrine-responsive, node-positive breast cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2009, Bd. 19, 374(9707):2055-2063.
54. *Prognostic impact of discordance between different risk assessment tools in early breast cancer (Recurrence Score, Central Grade, Ki67): early outcome analysis from the prospective Phase III WSG-PlanB Trial*. Nitz U, Gluz O, Kates RE, Hofmann D, Kreipe HH, Christgen M, Shak S, Clemens M, Kraemer S, Aktas B, Kuemmel S, Reimer T, Kusche M, Heyl V, Lorenz-Salehi F, Just M, Liedtke C, Würstlein R, Harbeck N. San Antonio : SABCS, 2014.
55. Toi M, Iwata H, Yamanaka T, Masuda N, Ohno S, Nakamura S, Nakayama T, Kashiwaba M, Kamigaki S, Kuroi K und Group, Japan Breast Cancer Research Group-Translational Research. Clinical significance of the 21-gene signature (Oncotype DX) in hormone receptor-positive early stage primary breast cancer in the Japanese population. *Cancer*. 2010, 116(13):3112-3118.
56. S, Paik. Development and Clinical Utility of a 21-Gene Recurrence Score Prognostic assay in Patients with Early Breast Cancer Treated with Tamoxifen. *The Oncologist*. 2007, 12: 631-635.
57. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology*. 1984, 133(4):1710-1715.
58. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, Price KN, Golouh R, Perin T, Brown RW, Kovács A, Pillay K, Ohlschlegel C, Gusterson BA, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Goldhirsch A, Coates AS und G., International Breast Cancer Study. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008, 100(3):207-212.
59. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ und members, Panel. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*. 2011, 22(8): 1736-1747.

60. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G. Internationaler Brustkrebskongress St. Gallen 2013: Primärtherapie beim frühen Brustkrebs: Evidenz, Kontroversen, Konsens. *Senologie*. 2013, 2: 91-99.
61. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF und Breast, International Ki-67 in. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011, 103(22):1656-1664.
62. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002, 415(6871):530-536.
63. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2002, 347(25):1999-2009.
64. Rutgers E, Piccart-Gebhart MJ, Bogaerts J, Delaloge S, Veer LV, Rubio IT, Viale G, Thompson AM, Passalacqua R, Nitz U, Vindevoghel A, Pierga JY, Ravdin PM, Werutsky G, Cardoso F. The EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial is feasible: results of the pilot phase. *European Journal of Cancer*. 2011, 47(18):2742-2749.
65. Knauer M, Mook S, Rutgers EJ, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, Koornstra RH, Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, van 't Veer LJ. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment*. 2010, 120(3):655-661.
66. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R, Jelen A, Sevela P, Freibauer C, Müller V, Jänicke F, Schmidt M, Kölbl H, Rody A, Kaufmann M, Schroth W, Brauch H, Schwab M, Fritz P, Weber KE, Feder IS, Hennig G, Kronenwett. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clinical Cancer Research*. 2011, 17(18):6012-6020.

67. Kronenwett R, Bohmann K, Prinzler J, Sinn B V, Haufe F, Roth C, Averdick M, RRopers T, Windbergs C, Brase J, Weber K E, Fisch K, Müller B M, Schmidt M. Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC Cancer*. 2012, 12: 456.
68. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000, 406(6797):747-752.
69. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the Naionall Academy of Science of the U S A*. 2001, 98(19):10869-74.
70. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 2009, 27(8):1160-1167.
71. Gnant M, Filipits M, Mlineritsch B, Dubsy P, Jakesz R, Kwasny W, Fitzal F, Rudas M, Knauer M, Singer C, Greil R, Ferree S, Strohoff J, Cowens JW, Schaper C, Liu S, Nielsen T. Gnant M, Filipits M, Mlineritsch B, et al. Clinical validation of the PAM50 risk of recurrence (ROR) score for predicting residual risk of distant-recurrence (DR) after endocrine therapy in postmenopausal women with HR+ early breast cancer (EBC). *Cancer Research*. 2012, 72 (24): P2-10-02.
72. Guiu S, Michiels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennessy BT, Sorlie T, Sotiriou C, Turner N, Van de Vijver M, Viale G, Loi S, Reis-Filho JS. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Annals of Oncology*. 2012, 23(12):2997-3006.
73. Goncalves R, Bose R. Using Multigene Tests to Select Treatment for Early-Stage Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Comprehensive Network*. 2013, 11:174-182.
74. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, Ferree S, Strohoff J, Schaper C, Cuzick J. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With

Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2013, [Epub ahead of print].

75. Kelly CM, Bernard PS, Krishnamurthy S, Wang B, Ebbert MT, Bastien RR, Boucher KM, Young E, Iwamoto T, Pusztai L. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX®) and the PAM50 breast cancer intrinsic Classifier™ in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. 2012, 17 (4): 492-498.

76. Johannes Ettl, Kirsten Grosse Lackmann, Alexander Hapfelmeier, Evelyn Klein, Stefan Paepke, Christoph Petry, Katja Specht, Heinz Hoefler, Marion Kiechle. Prospective comparison of uPA/PAI-1 and EndoPredict-clin score in ER-positive, HER2-negative breast cancer: Impact on risk stratification and treatment decisions. *Journal of Clinical Oncology*. 2013, 31: Abstract 581.

77. Vetter M, Landstorfer B, Lantzsch T, Buchmann J, große R, Ruschke K, Holzhausen K-J, Thomssen C, Kantelhardt E J,. Prognostic factors uPA/PAI-1: measurement in cor needle biopses. *Cancer Research*. 2012, 72 (24): 258-256.

78. Vetter M, Kantelhardt E J, Thomssen C. Prognose beim Mammakarzinom. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*. 2012, 42: 17-25.

79. Haas S, Park T W, Hahne J C, Fischer H P. Influence of preoperative core biopsies on uPA/PAI-1 expression in breast cancer tissue. *Virchows Arch*. 2008, 452 (3): 277-283.

80. Baehner F L, Anderson J, Millward C, Sangli C, Quale C, Cherbavaz D, Goddard A, Shak S. The critical role of surgical pathology in personalized medicine: The impact of biopsy cavities in breast cancer samples on recurrence risk when assessed by quantitative RT-PCR. Abstract Number: e22016 : s.n., 2009 ASCO Annual Meeting.

81. Müller BM, Brase JC, Haufe F, Weber KE, Budzies J, Petry C, Prinzler J, Kronenwett R, Dietel M, Denkert C. Comparison of the RNA-based EndoPredict multigene test between core biopsies and corresponding surgical breast cancer sections. *Journal of Clinical Pathology*. 2012, 65(7):660-662.

82. Jacobs V R, Kates R, Kantelhardt E J, Vetter M, Schmitt M, Jaenicke F, Untch M, Thomssen C, Harbeck N. Health Economic Impact of Risk Group Selection According to ASCO-Recommended Biomarkers uPA/PAI-1 in Node Negative Breast Cancer. *Cancer Research*. 2010, 70 (24): P2-06-02.

83. Burton F. Vanderlaan, MD, et al. Cost-Effectiveness of 21-Gene Assay in Node-Positive, Early-Stage Breast Cancer. *American Journal of Managed Care*. 2011, 17(7):455-464.

84. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, Puntoni M, Colozza M, Pfeffer U, Bruzzi P. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *Journal of National Cancer Institute*. 2008, 100: 14-20.
85. Pinder MC, Duan Z, Goodwin JS, Hortobagyi GN, Giordano SH. Congestive heart failure in older women treated with adjuvant anthracycline chemotherapy for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007, 25:3808-3815.
86. Mitch Dowsett, Jack Cuzick, Christopher Wale, John Forbes, Elizabeth A. Mallon, Janine Salter, Emma Quinn, Anita Dunbier, Michael Baum, Aman Buzdar, Anthony Howell, Roberto Bugarni, Frederick L. Baehner, and Steven Shak. Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010, Bd. 28, 11.
87. Postma EL, Verkooijen HM, van Diest PJ, Willems SM, van den Bosch MA, van Hillegersberg R. Discrepancy between routine and expert pathologists' assessment of non-palpable breast cancer and its impact on locoregional and systemic treatment. *European Journal of Pharmacology*. 2013, [Epub ahead of print].
88. Ellston C W, Ellis I O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991, 19(5):403-410.
89. Michael Gnant, Nadia Harbeck, and Christoph Thomssen. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)*. 2011, Bde. 6(2): 136–141.
90. Gluz O, Kreipe H, Degenhardt T, Kates R, Christgen M, Liedtke C, Shak S, Clemens M, Markmann S, Uleer C, Augustin D, Thomssen C, Nitz U, Harbeck N. Prospective Comparison of Risk Assessment Tools in Early Breast Cancer (Recurrence Score, uPA/PAI-1, Central Grade, and Luminal Subtypes): Final Correlation Analysis from the Phase III WSG-Plan B Trial. *Cancer Research*. 2011, 71(24 ):S4-3.
91. www.femetelle.de. *Liste der Krankenhäuser, die Ihren patientinnen die uPOA/PAI-1 Testung anbieten.* [Online] [http://www.femtelle.de/de/patienten-selbsthilfegruppen/Kliniken\\_die\\_FEMTELLE-Test\\_anbieten.php](http://www.femtelle.de/de/patienten-selbsthilfegruppen/Kliniken_die_FEMTELLE-Test_anbieten.php).
92. Scharl A, Harbeck N, Janni W, Nitz U, Schmidt M, Schneeweis A, Untch M, Kommission Mamma der AGO. Deutsches Ärzteblatt. 2012, Jg.109, 42:2085-2087.

93. JA, Sparano. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clinical Breast Cancer*. 2006, 7 (4): 347-350.
94. A. M. Gonzalez-Angulo, W. E. Barlow, J. Gralow, F. Meric-Bernstam, D. F. Hayes, C. Moinpour, S. D. Ramsey, A. F. Schott, D. B. Sparks, K. S. Albain and G. N. Hortobagyi. SWOG S1007: A phase III, randomized clinical trial of standard adjuvant endocrine therapy with or without chemotherapy in patients with one to three positive nodes, hormone receptor (HR)-positive, and HER2-negative breast cancer with recurrence score (RS). *Journal of Clinical Oncology*. 2011, 29 (15): TPS104.
95. Kantelhardt E J, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Augustin D,hanf V, Meisner C, Paepke D, Schmitt M, Sweep F, von Minckwitz G, Martin P-M, jaenicke F, Thomssen C, Harbeck N. Prospective evaluation of prognostic factorsuPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: PhaseIII NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG)comparing 6 × FEC versus 3 × FEC/3 × Docetaxel. *BMC Cancer*. 2011, 11: 140.
96. Thomssen C, Kantelhardt E J1C Thomssen, 1EJ Kantelhardt, Meisner C, Vetter M, Schmidt M, Martin P, Veyret C, Augustin D,Hanf V, Paepke D, Meinertz W, Hoffmann G, Wiest W, Sweep F, Schmitt M, Jaenicke F, von Minckwitz G, Harbeck N. First planned efficacy analysis of the NNBC 3-Europe trial: Addition of docetaxel to anthracycline containing adjuvant chemotherapy in high risk node-negative breast cancer patients. *Cancer Research*. 2012, Poster: 1-13-13.
97. Vetter M, Thomssen C, Kantelhardt E J, Sweep F, Meisner C, Veyret C, Schmitt M, Hanf V, Augustin D, Paepke D, von Minkwitz G, Schmitt M, Harbeck N. Risk Assessment in Node-Negative Breast Cancer by the Invasion Factors (Urokinase-Type Plasminogen Activator) and Its inhibitor PAI-1. Correlation to the Tumor Characteristics in the Prospective NNBC-3-Europe Trial. *Cancer Research*. 2009, 69 (24): 719-720.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Migration und Invasion durch uPA/PAI-1 modifiziert nach Harbeck et al, Thrombosis and Haemostasis 2004 (8) .....	7
Abbildung 2: Krankheitsfreies Überleben nach histo-pathologischem Grading, modifiziert nach (23) .....	10
Abbildung 3: uPA/PAI-1 bei Tumoren mit mittlerer Differenzierung (Grading: G2), modifiziert nach (23).....	11
Abbildung 4: Krankheitsfreies Überleben (a) und Gesamtüberleben (b) nach zehn Jahren Nachbeobachtung der Patientinnen der Chemo-N <sub>0</sub> -Studie in den uPA/PAI-1 Risikogruppen, modifiziert nach (23).....	12
Abbildung 5: ChemoNO: Krankheitsfreies Überleben für Hochrisikopatientinnen nach uPA/PAI-1 mit versus ohne Chemotherapie. Für: alle randomisierten Patientinnen (nicht signifikant) (a), nach Studienprotokoll behandelte Patientinnen (p=0,019) (b), modifiziert nach (23) .....	14
Abbildung 6: Validierung von uPA/PAI-1, modifiziert nach Kantelhardt et al, ASCO 2009 (33) .....	15
Abbildung 7: Gene, deren Expression im OncotypeDX® untersucht werden (35).....	16
Abbildung 8: Rezidivfreies Überleben in den Risikogruppen nach Recurrence Score (RS) in der NSABP B14 Studie (35) .....	18
Abbildung 9: Subtypen des Mammakarzinoms nach PAM 50 und Recurrence Score (75) ....	30
Abbildung 10: Studiendesign der Plan B Studie, uPA/PAI-1 und Recurrence Score Bestimmung .....	35
Abbildung 11: 9-Jahres-Rezidivrisiko bei 0, 1-3 und mehr als 3 befallenen Lymphknoten (N) und Recurrence Score (RS), modifiziert nach Dowsett, et al., SABCs 2008 (86) .....	37
Abbildung 12: Plan B Studie: Rekrutierung und Randomisierung (90) .....	40
Abbildung 13: Risikogruppen nach uPA/PAI-1 in der Plan B Studie (n=361) .....	42
Abbildung 14: Risikogruppen nach Recurrence Score (Plan B Grenzwerte) (n=340) .....	44
Abbildung 15: Risikogruppen nach Recurrence Score (Konventionelle Grenzwerte) (n = 340) .....	44
Abbildung 16: Vergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score (Plan B Grenzwerte) .....	47

Abbildung 17: Vergleich von uPA/PAI-1 und Recurrence Score (konventionelle Grenzwerte) .....	47
Abbildung 18: Übersicht über deutsche Kliniken/Brustzentren mit uPA/PAI-1-Testung (91) (nicht vollständig) .....	51
Abbildung 19: Risikogruppen laut TAILORx (RS zwischen 11 und 25 für mittleres Risiko) an Patientinnen der NSABP B20, modifiziert nach (93) .....	53
Abbildung 20: Studiendesign der TAILORx (N0) (A) und der RxPONDER (N1) (B), modifiziert nach (73).....	54
Abbildung 21: Studiendesign der ADAPT-Studie, modifiziert nach (90).....	55

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck, die mit der Vergabe des Themas überhaupt erst die Grundlage für diese Arbeit schuf. Zudem stand sie mir immer mit ihrer großen fachlichen, aber vor allem auch menschlichen Kompetenz zur Seite.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. Oleg Gluz, der mit seinem hohen Engagement und seiner Begeisterung an der klinischen Forschung einen Großteil zum Gelingen dieser Arbeit beitrug und mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten weckte.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Ronald Kates für die Unterstützung bei der Datenaufarbeitung und den statistischen Überlegungen bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Westgerman Study Group (WSG) sowie an alle an der Plan B Studie teilnehmenden Zentren und deren Mitarbeiter für ihre bereitwillige und reibungslose Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Freundin Frau Valerie Martin und an meine Familie für ihre bedingungslose Unterstützung und ihre endlose Geduld.

Besonders danken möchte ich allen Patientinnen aus der Plan B Studie. Der medizinische Fortschritt ist heutzutage ohne klinische Studien nicht mehr vorstellbar. Sie alle tragen einen großen Teil zur Verbesserung der Diagnose und der Therapie von Brustkrebs bei.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**Prospektiver Vergleich der Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 und des 21-Gen-Tests OncotypeDX<sup>®</sup> im Rahmen der WSG Plan-B Studie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde. Zudem erkläre ich, dass es zuvor weder bestandene noch nicht bestandene Doktorprüfungen gab.

München,

Degenhardt, Tom (06.08.1986)