

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der
Inneren Klinik (Tumorforschung)

Evaluation neuer molekularer Marker als prädiktive und prognostische Faktoren
bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Johanna Wendling
aus Paderborn
2017

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. St. Kasper
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. C. Birdir

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2017

Diese Publikation beinhaltet Teile der Dissertation:

Preemptive tumor profiling for biomarker-stratified early clinical drug development in metastatic breast cancer patients. Welt, A., Tewes, M., Aktas, B., O, O. H., Wiesweg, M., Ting, S., Reis, H., Worm, K., Richly, H., Hense, J., Palmer, M. R., Lee, B. H., Wendling, J., Kossow, J., Scheulen, M. E., Lehnerdt, C., Kohl, M., Derks, C., Skottky, S., Haus, U., Schmid, K. W., Kimmig, R., Schuler, M., Kasper, S. (2013). *Breast Cancer Res Treat* 142, 81-88.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	7
Das Mammakarzinom.....	7
1.1 Epidemiologie.....	7
1.2 Ätiologie.....	7
1.2.1 Risikofaktoren und Pathogenese.....	7
1.2.2 PI3K/AKT-Signalweg.....	9
1.3 Histopathologie und klinische Manifestation.....	11
1.4 Stadieneinteilung.....	12
1.5 Prognostische und prädiktive Faktoren.....	14
1.5.1 Lymphknotenbefall.....	14
1.5.2 TumorgroÙe.....	15
1.5.3 Metastasierung.....	15
1.5.4 Histologisches Grading.....	15
1.5.5 Alter und Menopausenstatus.....	16
1.5.6 Peritumorale Lymph- und GefäÙinvasion.....	16
1.5.7 Hormonrezeptorstatus.....	16
1.5.8 HER2/neu.....	17
1.5.9 Tumorassoziierte Proteolysefaktoren.....	17
1.5.10 Molekulare Mammakarzinomsubtypen.....	18
1.6 Symptome.....	19
1.7 Diagnostik.....	20
1.8 Therapie.....	21
1.8.1 Chirurgische Therapie.....	21
1.8.2 Strahlentherapie.....	22
1.8.3 Adjuvante Systemtherapie.....	23
1.8.4 Neoadjuvante Therapie.....	25
1.8.5 Palliative Therapie.....	25
1.9. Nachsorge.....	27
1.10 Aufgabenstellung.....	29
2. Material und Methoden.....	30
2.1. Patienten und Studiendesign.....	30
2.2 Evaluation des Therapieansprechens.....	31
2.3 Biomarkeranalyse.....	32
2.3.1 PTEN.....	33
2.3.2 <i>FGFR1</i> -Amplifikation.....	33
2.3.3 <i>PIK3CA</i> -Mutation und -Amplifikation.....	33
2.4 Statistische Auswertung.....	34
2.5 Ethikvotum.....	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Patientencharakteristika.....	36
3.1.1 Patientencharakteristika.....	36
3.1.2 Stadium des Primärtumors.....	36
3.1.3 Metachrone Metastasierung.....	38
3.1.4 Histologie und Grading des Primärtumors.....	38
3.1.5 Hormonrezeptor- und HER2/neu-Rezeptor.....	39

3.1.6 Therapie	40
3.2 Prognose für die Gesamtpopulation	41
3.2.1 mediane Überlebenszeiten der Gesamtpopulation	41
3.2.2 Medianes krankheitsfreies Überleben (DFS) und Gesamtüberleben nach Metastasierung (MST _{paII}) nach UICC.....	43
3.3. Biomarkeranalyse.....	44
3.3.1 Tumormaterial und Durchführbarkeit.....	44
3.3.2 Prävalenz etablierter Biomarker im Patientenkollektiv.....	45
3.4. Experimentelle Biomarker	46
3.4.1 Prävalenz der experimentellen Biomarker.....	46
3.4.2 Lokalisation der <i>PIK3CA</i> -Mutationen.....	48
3.4.3 Alterationen im PI3K/AKT Signalweg	49
3.4.4 Prävalenz der Biomarker im Tumorgewebe des Primarius und der Metastase.....	51
3.5 Prognose in Abhängigkeit der Biomarker	52
3.5.1 Prognostische Bedeutung der Hormonrezeptorexpression	52
3.5.2 Prognostische Bedeutung der HER2/neu-Rezeptor-expression	53
3.5.3 Prognostische Bedeutung triple negativer-Tumoren	54
3.5.4 Prognostische Bedeutung der experimentellen Biomarker.....	55
3.5.5 Prognostische Bedeutung von Alterationen des PI3K/AKT-Signalweges	56
3.5.6 Prognostische Bedeutung von Alterationen des PI3K/AKT-Signalweges in verschiedenen Subgruppen.....	57
3.6 Prädiktive Bedeutung der experimentellen Biomarker auf die Wirksamkeit verschiedener antitumorale Therapien.....	60
3.6.1 Antihormonelle Therapie	60
3.6.2 Erstlinienchemotherapie	62
4. Diskussion	68
4.1 Patientencharakteristika	68
4.1.1 Patientencharakteristika	68
4.1.2 Hormonrezeptor- und HER2/neu-Rezeptor	69
4.2 Biomarkeranalyse.....	72
4.2.1 Durchführbarkeit.....	72
4.2.2 Verteilung der etablierten Biomarker	72
4.3 Experimentelle Biomarker	73
4.3.1 Verteilung der experimentellen Biomarker	73
4.3.2 Lokalisation der <i>PIK3CA</i> -Mutation.....	75
4.3.3 Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg	75
4.3.4 Expression der Biomarker im Primarius und der Metastase.....	76
4.4. Prognose in Abhängigkeit der Biomarker	77
4.4.1 Prognostische Bedeutung des Hormonrezeptor-Status auf das Gesamtüberleben.....	77
4.4.2 Prognostische Bedeutung des HER2/neu-Rezeptor-Status auf das Gesamtüberleben.....	78
4.4.3 Prognostische Bedeutung triple negativer Tumoren auf das Gesamtüberleben.....	79
4.4.4 Prognostische Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges für das Gesamtüberleben.....	79
4.4.5 Einfluss des PI3K/AKT-Signalweges auf das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von den etablierten Biomarkern.....	81

4.5.1 Progressionsfreies Überleben unter antihormoneller Therapie	83
4.5.2 Progressionsfreies Überleben unter Erstlinienchemotherapie.....	84
5. Zusammenfassung.....	85
6. Literaturverzeichnis	86
7.1 Tabellenverzeichnis.....	94
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	95
7.3 Abkürzungsverzeichnis	96
8. Danksagung	99
9. Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Persönliche Informationen.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Geburtsdatum: 26.08.1987	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

Das Mammakarzinom

1.1 Epidemiologie

Das Karzinom der Brustdrüse (Mammakarzinom) ist mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die häufigste maligne Neubildung der Frau, nahezu eine halbe Millionen Frauen sterben jährlich daran. In Deutschland beträgt das mittlere Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken 9,2%, das heißt durchschnittlich erkrankt jede 11. Frau an einem Mammakarzinom. Männer erkranken sehr viel seltener, sie sind in etwa 1% der Fälle betroffen. Im Vergleich zu anderen Malignomen wird die Diagnose des Brustkrebses deutlich früher gestellt. Es manifestiert sich meist in der 6. Lebensdekade und ist mit 18% die häufigste Krebstodesursache aller Frauen. Mit zunehmendem Alter kommt es zum Anstieg des Erkrankungsrisikos. (Giersiepen et al., 2005) Die Brustkrebsinzidenz steigt in Deutschland seit 1980 stetig an, jedoch muss berücksichtigt werden, dass auch vollständigere Erfassungsraten sowie ein gesteigerter Einsatz des Mammographiescreenings dazu beitragen könnten. (Bauernfeind, 2011) Hingegen dessen ist die Brustkrebsmortalität seit 1997 rückläufig, wobei unklar ist, inwieweit die Früherkennung und die Therapie hier eine Rolle spielen. (Giersiepen et al., 2005)

1.2 Ätiologie

1.2.1 Risikofaktoren und Pathogenese

Bisher ist die Ursache des Mammakarzinoms unbekannt; es wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Zu den gesicherten Risikofaktoren zählen z.B. Faktoren des Lebensstils, hormonelle Einflüsse oder die genetische Disposition, die in etwa 5% der Fälle nachzuweisen ist. Hierunter zählen insbesondere die Mutationen der Gene *BRCA1* und *BRCA2*. (van der Groep et al., 2011) Das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs und/-oder an einem Ovarialkarzinom zu erkranken liegt für die Trägerinnen der mutierten *BRCA*-Gene bei 45-85%. (Euhus, 2012)

Obwohl eine positive Familienanamnese das Brustkrebsrisiko erhöht, kann man beim Großteil der Fälle keine positive Familiengeschichte eruieren. Der weitaus größere Teil entsteht sporadisch unter dem Einfluss verschiedener Risikofaktoren. Lebensstilfaktoren wie postmenopausale Gewichtszunahme, Alkoholkonsum, Rauchen und geringe körperliche Aktivität scheinen ebenfalls ätiologische Faktoren darzustellen. (Gerber et al., 2003) Auch hormonelle Einflüsse wie Nulliparität, späte Erstparität, kurze Stillperiode, frühe Menarche und späte Menopause, sowie eine länger als 5 Jahre andauernde Östrogen-Gestagen-Kombinationstherapie in der Menopause steigern das Brustkrebsrisiko signifikant. (Armstrong et al., 2000)

Das normale Brustdrüsenepithel besitzt Östrogen- sowie Progesteronrezeptoren. Diese übermitteln endokrine Signale und sind an der Zellproliferation des Brustdrüsengewebes beteiligt. Bei der Entstehung eines Mammakarzinoms kommt es zunächst zu einer veränderten Regulation der Zellzahl, wodurch eine Epithelhyperplasie entsteht. Durch eine genetische Instabilität in mehreren Zellklonen kommt es im Verlauf zu einer atypischen Hyperplasie, welche durch eine kaskadenartige Abfolge von genetischen Defekten in der Entstehung eines Mammakarzinoms mündet. Molekulargenetisch handelt es sich bei diesen genetischen Störungen u.a. um eine Überexpression bzw. Amplifikation der proliferativ wirkenden Onkogene *HER2/neu*, *INT-2*, *K-RAS* und *C-MYC* und einer verminderten Expression und/oder Funktionsbeeinträchtigung der Tumorsuppressorgene *BRCA-1* und *2*, *TP-53* (Li-Fraumeni-Syndrom), *PTEN*, *ATM* (Ataxia-teleangiectasia-Syndrom), *NM23* und *RB1*. Neben den auf die Proliferation einwirkenden Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sind auch Gene mit anderen Funktionen beteiligt. Dazu gehören Gene, welche die Zellzykluskontrolle (z.B. *CCND1*, kodiert für Cyclin-D1), die Zell-Adhäsion (z.B. *CDH1*, kodiert für E-Cadherin), die Expression von matrixlysierenden Proteasen zur Tumordinfiltration in die Umgebung sowie die Neoangiogenese beeinflussen. (Riede et al., 2004)

1.2.2 PI3K/AKT-Signalweg

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) vermitteln als Lipidkinasen verschiedene Mechanismen wie Zellwachstum, Überleben, Differenzierung und Proliferation und sind entscheidend in der Pathogenese des Brustkrebses beteiligt. Durch Mutation oder Amplifikation der kodierenden Gene (z.B. *PIK3CA*) oder durch Funktionsverlust der negativen Regulatoren wie PTEN kann es zu einer konstitutiven Aktivierung in der Signaltransduktion und letztlich zur malignen Transformation kommen. (Castaneda et al., 2010) *PIK3CA*- Mutationen und –Amplifikationen, der Verlust von PTEN sowie Amplifikationen von Rezeptortyrosinkinasen bewirken eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und zählen zu den häufigsten Alterationen in der Tumorphagenese. (Yuan et al., 2008)

PI3-Kinasen werden in drei Gruppen unterteilt, von denen insbesondere die IA-Untergruppe (die katalytische Untereinheit p110 α (kodiert durch *PIK3CA*) und seine regulatorische Untereinheit p85) deutlich an der Onkogenese beteiligt ist. Durch das Zusammenspiel mit Tyrosinkinaserzeptoren (z.B. EGF-Rezeptoren, HER2/neu-Rezeptoren) sowie dem Protoonkogen *RAS* kommt es zur Verlagerung der p110 α -Untereinheit an die Zellmembran und zu dessen Aktivierung. Dies führt zur Phosphorylierung von Phosphatidyl-Bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidyl-Trisphosphat (PIP3), welches als Signaltransduktor fungiert und weitere Zielstrukturen wie beispielsweise AKT aktiviert. In einem weiteren Weg, der unabhängig von p85 stattfindet, kann *RAS* mit der *RAS*-bindenden Domäne (RBD) von p110 α interagieren und diese so aktivieren. (Castaneda et al., 2010) Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) zählt zu den Rezeptortyrosinkinasen und aktiviert den PI3K-Signalweg. In Tumoren lässt sich häufig eine Veränderung dieses Rezeptors nachweisen. Insbesondere maligne Gliome und verschiedene Adenokarzinome zeigen vielfach eine EGFR-Amplifikation. In circa 5-10 % lässt sich bei Adenokarzinomen der Lunge eine aktivierende Mutation nachweisen, besonders bei Nichtrauchern. Ein weiteres Mitglied der EGFR-Gruppe ist der HER2/neu-Rezeptor, welcher in 25-30% aller Mamma- und Ovarialkarzinome überexprimiert ist. (Yuan et al., 2008)

Das *PIK3CA*-Gen kodiert für die katalytische Untereinheit p110 α und liegt häufig in Mammakarzinomen mutiert vor (27%). Weitere Mutationen können in Endometrium- (23%) und kolorektalen Karzinomen (14%) und in Tumoren des Harntraktes (17%), sowie der Ovarien (8%) nachgewiesen werden. (Yuan et al., 2008) Die Mehrzahl der *PIK3CA*-Mutationen sind in drei so genannten „hot-spot“ Regionen lokalisiert (80% aller Mutationen) und führen zu einem Austausch einzelner Aminosäuren. (Di Cosimo et al., 2009) In Exon 9 kommt es zu einem Austausch des Glutamats in der helikalen Domäne an Position 542 oder 545 mit Lysin (E542K und E545K). In Exon 20 wird an Position 1047 in der Kinaseregion von p110 α das Histidin durch Arginin ersetzt (H1047R). (Castaneda et al., 2010; Di Cosimo et al., 2009) Die beiden erstgenannten Mutationen verhindern die inhibitorische Wechselwirkung zwischen p85 und der helikalen Domäne von p110 α . Letzterer Aminosäureaustausch wird durch die häufigste Mutation von *PIK3CA* bedingt (H1047A) und führt zu einer leichteren Rekrutierung von p110 α an die Zellmembran. Die Konsequenz aller Mutationen ist eine erhöhte Aktivität von p110 α , wodurch eine onkogene Transformation resultiert. (Castaneda et al., 2010; Saal et al., 2005) Die Amplifikation des *PIK3CA*-Gens findet sich neben Mammakarzinomen in Kopf-Hals-Tumoren, in Lungenkarzinomen, sowie in Magen- und Zervixkarzinomen. (Yuan et al., 2008)

Die Phosphatase PTEN wirkt als Gegenspieler von PI3K, indem sie durch Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 die Signalweiterleitung hemmt und dadurch den programmierten Zelltod (Apoptose) fördert. *PTEN* ist daher ein Tumorsuppressor. Es kann sowohl eine Mutation als auch ein Verlust von *PTEN* in Tumoren auftreten. Mutationen lassen sich überwiegend in Endometriumkarzinomen (39%) und Glioblastomen nachweisen. (Yuan et al., 2008) Häufiger als Mutationen findet sich ein Verlust der PTEN-Proteinexpression. Neben dem Mammakarzinom lässt sich der PTEN-Verlust in Endometrium-, Lungen-, Kolon- und Prostatakarzinomen sowie in Glioblastomen nachweisen. (Leslie et al., 2004)

Als Zielstruktur des PI3K-Signalweges fungiert unter anderem die Serin-/Threonin-Proteinkinase AKT, bestehend aus drei Untergruppen (AKT1, 2 und 3). Nach Rekrutierung an die Zellmembran wird sie durch die „Phosphoinositide-dependent kinase-1“ (PDK1) und den „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR) -Komplex (mTORC-2) phosphoryliert und somit aktiviert. Im aktivierten Zustand kann AKT im Zytoplasma und im Zellkern weitere Zielproteine wie die Proteinkinase mTORC-1 aktivieren. Die aktivierte mTORC-1-Kinase führt über die Regulation der ribosomalen p70S6 Kinase (S6K) und dem eukaryoten Translations-Initiationsfaktor 4E (ELF4E) zur Stimulation der Proteinsynthese, sowie zum Zellwachstum. Darüber hinaus moduliert AKT Inhibitoren des Zellzyklus wie

Das invasive Mammakarzinom wird im Wesentlichen in zwei Hauptformen gegliedert: In das in 80% der Fälle vorkommende duktale, welches sich im Milchgangsystem ausbreitet, und in das in etwa 10% der Fälle auftretende lobuläre, im Drüsenlappen proliferierende Karzinom. Sehr viel seltener, aber mit einer besseren Prognose vergesellschaftet, sind tubuläre, papilläre, muzinöse und medulläre Differenzierungsformen. Histologisch zeichnet sich das duktale Karzinom durch ein relativ buntes Bild mit teilweise drüsenbildenden, teilweise soliden Anteilen aus. In der Umgebung findet sich häufig ein duktales *Carcinoma in situ*. Vielfach entsteht das Mammakarzinom multizentrisch und bei 3-4% der Patientinnen bilateral. (Riede et al., 2004) Eine Sonderform bildet der *Morbus Paget* der Mamille. Dieser imponiert makroskopisch durch eine ekzematöse, teils mit Krustenbildung und Entzündung einhergehende Veränderung der Mamille. Histologisch finden sich neben dem Befund eines CIS der großen Ausführungsgänge typischerweise Paget-Zellen. In den meisten Fällen deutet ein *Morbus Paget* auf ein invasives Milchgangskarzinom in der Tiefe der Brustdrüse hin. (Breckwoldt et al., 2007) Das lobuläre Karzinom ist häufig kleinzelliger mit geringem Zusammenhalt der Epithelien, bedingt durch eine *CDH1*-Mutation und folgender Adhäsionsverluste. Es bilden sich oftmals multizentrisch und bilateral vorkommende Herde. Charakteristische Merkmale sind das so genannte Gänsemarsch- sowie das Schießscheibenmuster. (Riede et al., 2004) Die meisten Karzinome manifestieren sich mit 48% im oberen äußeren Quadranten, gefolgt vom retromamillären Bereich (20%). (Breckwoldt et al., 2007)

1.4 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms (siehe Tab. 1) erfolgt nach der TNM-Klassifikation nach den Richtlinien der UICC. Es werden Tumordurchmesser (T), Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und die Metastasierung (M) beschrieben. Während ipsilaterale axilläre, parasternale, supra- und infraklavikuläre Lymphknoten als regionär angesehen werden, wird der Befall zervikaler wie auch kontralateraler Lymphknoten als Fernmetastasierung klassifiziert. Wichtig für den weiteren therapeutischen Verlauf und die prognostische Bewertung sind zudem der Differenzierungsgrad (Grading), sowie die pathologische Verifizierung der pTNM-Stadien am Operationspräparat (p steht hier für die histologische Einteilung durch den Pathologen). (Wittekind et al., 2010)

Tabelle 1: Stadieneinteilung (TNM-Klassifikation) nach UICC Nr. VII

T	Primärtumor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	≤ 2 cm in größter Ausdehnung
- T1mi	- Mikroinvasion ≤ 0,1 cm
- T1a	- > 0,1 bis max. 0,5 cm
- T1b	- > 0,5 bis max. 1 cm
- T1c	- > 1 bis max. 2 cm
T2	> 2 cm bis max. 5 cm
T3	> 5 cm
T4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand (einschließlich Rippen, Interkostalmuskulatur, vordere Serratusmuskeln) oder Haut
- T4a	- Ausdehnung auf die Brustwand
- T4b	- Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzeration oder Satellitenknötchen der Haut
- T4c	- Kriterien von 4a und 4b vereinigt
- T4d	- Entzündliches Karzinom

Tabelle 2: Lymphknotenstatus

N	Regionäre Lymphknoten		
N1	beweglich axillär	pN1mi	Mikrometastasen >0,2 mm ≤ 2mm
		pN1a	1-3 axilläre Lymphknoten
		pN1b	Lymphknoten entlang der <i>A. mammaria int.</i> , klinisch nicht erkennbar ^a
		pN1	pN1a und pN1b gemeinsam
N2a	fixiert axillär	pN2a	4-9 axilläre Lymphknoten
N2b	<i>A. mammaria int.</i> , klinisch erkennbar	pN2b	<i>A. mammaria int.</i> , klinisch nicht erkennbar ^a / keine axillären Lymphknoten
N3a	infraklavikulär	pN3a	>10 axilläre oder infraklavikuläre Lymphknoten
N3b	Axillär und <i>A. mammaria int.</i> , klinisch erkennbar	pN3b	Axillär und <i>A. mammaria int.</i> , klinisch erkennbar oder >3 axilläre und <i>A. mammaria int.</i> , klinisch nicht erkennbar ^a
N3c	supraklavikulär	pN3c	Supraklavikulär

^a nachgewiesen durch Sentinel-Lymphknoten Untersuchung

Tabelle 3: Fernmetastasen

M	Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen vorhanden

1.5 Prognostische und prädiktive Faktoren

Prognoseparameter und prädiktive Faktoren haben das Ziel, eine individualisierte, auf den Patienten zugeschnittene Therapie auszuwählen und den Krankheitsverlauf frühzeitig beurteilen zu können. Es werden Prognosefaktoren, die eine Vorhersage des Rezidivrisikos oder Letalitätsrisikos beschreiben, von den prädiktiven Faktoren abgegrenzt. Letztere gehen einen Schritt weiter, sie helfen das Ansprechen auf eine spezifische Therapie vorherzusagen und somit bei der Therapieauswahl. Von besonderer Bedeutung sind die etablierten Parameter axillärer Lymphknotenstatus, Tumorgöße, Metastasierung, histologischer Typ und Grading, Alter wie auch Menopausenstatus, peritumorale Lymph- und Gefäßinvasion, Steroidrezeptor- und HER2/neu-Rezeptorstatus sowie tumorassoziierte Proteolysefaktoren wie der Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA) und sein Inhibitor PAI-1. (Bauernfeind, 2011)

1.5.1 Lymphknotenbefall

Der Befall der axillären, ipsilateralen Lymphknoten stellt den wichtigsten Prognoseparameter bei nicht fernmetastasierter Erkrankung dar und ist ein zentrales Entscheidungsmerkmal hinsichtlich einer adjuvanten systemischen Therapie. Die Anzahl befallener Lymphknoten korreliert direkt mit dem krankheitsfreien Intervall sowie dem Gesamtüberleben. Liegt ein Befall von mehr als 3 Lymphknoten vor, so gilt eine adjuvante Therapie nach den Empfehlungen der St. Gallener Konsensuskonferenz von 2011 als indiziert. Bei nur geringer Ausbreitung in die axillären Lymphknoten wird der Einsatz der adjuvanten Chemotherapie insbesondere bei postmenopausalen Patientinnen mit einem Hormonrezeptor positiven, HER2/neu negativen Tumor mit niedrigem Durchmesser und hohem Differenzierungsgrad stark diskutiert. (Bauernfeind, 2011) Die Wirkung der Therapie ist im Allgemeinen unabhängig vom Lymphknotenstatus, welcher somit keinen prädiktiven Wert besitzt. (Scharl, 2011)

1.5.2 Tumorgröße

Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist der Tumordurchmesser, der eine hohe Korrelation mit dem Krankheitsverlauf aufweist. Je größer der Durchmesser, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven axillären Lymphknotenstatus und einer früheren Tumorzell dissemination. (Bauernfeind, 2011) Dennoch können auch kleine Tumoren bereits metastasieren. Durch die verbesserten Früherkennungsmaßnahmen im Sinne von Screening- und Selbstuntersuchungsprogrammen werden Mammakarzinome vermehrt im Frühstadium entdeckt, was zur Reduktion der brustkrebsassoziierten Letalität führt. (Scharl, 2011)

1.5.3 Metastasierung

Das Mammakarzinom metastasiert sowohl lymphogen als auch hämatogen. Auch nach einer Therapie mit rezidivfreiem Intervall kann es zu Spätmetastasen nach 10 oder mehr Jahren kommen. Oftmals bestehen schon zum Zeitpunkt der Diagnose okkulte Mikrometastasen. Die Metastasierungstendenz des Tumors ist direkt abhängig von der Primärtumorgröße, vom histologischen Grading und von der Ausdehnung des axillären Lymphknotenbefalls. (Breckwoldt et al., 2007) Die lymphogene Ausbreitung erfolgt in den meisten Fällen zunächst in die Lymphknoten der Axilla, sowie in die supraclaviculären und mediastinalen Lymphknoten. Da parasternal gelegene Lymphknoten der klinischen Untersuchung nicht zugänglich sind, wird dies als erhöhtes Risikopotential für eine unerkannte lymphogene Metastasierung angesehen. (Krag, 1999)

Die häufigste Lokalisation der hämatogenen Metastasierung ist mit 60% der Knochen: Es handelt sich meist um osteolytische Metastasen der Wirbelsäule, des Beckens sowie der langen Röhrenknochen. Nicht selten verursachen diese hämatogenen Metastasen die ersten Symptome. Des Weiteren zeigen sich häufig Metastasen der Lunge, der Pleura und der Leber. Fast immer ist der Tod an einem Mammakarzinom Folge der Metastasierung. (Breckwoldt et al., 2007)

1.5.4 Histologisches Grading

Das zelluläre Grading nach den Vorschlägen von Bloom und Richardson und deren Modifikation durch Elston und Ellis erlaubt eine Einteilung in gut, mittelgradig und schlecht differenzierte Karzinome. Berücksichtigt werden die Entwicklung tubulärer Strukturen, die Mitoserate und der Kernpolymorphismus. (Elston et al., 2002) Liegt ein undifferenziertes

Karzinom (G3) vor, ist mit einer ungünstigeren Prognose zu rechnen (ähnlich eines nodalpositiven Status). Häufig spricht es nur gering auf endokrine Therapien an, sodass eine adjuvante systemische Chemotherapie indiziert ist. Im Gegensatz dazu haben Patientinnen mit hochdifferenzierten Tumoren (G1) eine günstigere Prognose. Wegen der überwiegend hohen Hormonsensitivität kann die adjuvante Therapie häufig allein endokrin erfolgen. Trotz der oben genannten Einteilungsmuster sollte berücksichtigt werden, dass die Untersuchung des histopathologischen Gradings untersucherabhängig und methodisch schwer standardisierbar ist. (Scharl, 2011)

1.5.5 Alter und Menopausenstatus

Patientinnen mit einem Alter unter 35 Jahren und/oder einem prämenopausalen Karzinom haben eine ungünstigere Prognose. Bedeutsamer als das Alter ist der Menopausenstatus. Liegt ein hormonsensitiver Tumor vor, so wird die Art des Hormonentzugs anhand des Menopausenstatus festgelegt. Aus physiologischen Gründen profitieren prämenopausale Patientinnen von einer ovariellen Suppression, sei es als beidseitige Ovarektomie oder in Form der medikamentösen Suppression. Entgegengesetzt sind Aromataseinhibitoren (AI) nur bei postmenopausalen Patientinnen indiziert, da sie die Ovarialfunktion prämenopausal nicht ausreichend unterdrücken. In diesen Fällen können sie sogar über einen negativen „*feedback*“-Mechanismus zur Stimulation der Ovarien und nachfolgender Östrogensynthese führen. (Scharl, 2011)

1.5.6 Peritumorale Lymph- und Gefäßinvasion

Das Vorliegen einer peritumoralen *Lymphangiosis* sowie *Hämangiosis carcinomatosa* ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Bei diesen Patientinnen ist die Wahrscheinlichkeit des axillären Lymphknotenbefalls erhöht. Es kommt häufiger zu Lokalrezidiven und das Gesamtüberleben ist geringer. (Schoppmann et al., 2004)

1.5.7 Hormonrezeptorstatus

Ein weiterer anerkannter Prognose- sowie prädiktiver Faktor ist der Steroidrezeptorstatus im Tumorgewebe. Endogene sowie exogene Steroidhormone können in die Zelle eindringen und am Östrogen- (ER) bzw. Progesteronrezeptor (PR) binden. Diese Komplexe können direkt an die nukleäre DNA binden und die Zelle zur Proteinsynthese, zum Wachstum und zur Proliferation stimulieren. (Donegan, 1992) Rezeptorpositive Zellen werden als differenzierte Zellen angesehen, die Expression des Östrogenrezeptors

(ER) spricht insgesamt für eine günstigere Tumorbiologie. Eine fehlende Rezeptorexpression ist mit einer früheren Rezidiventwicklung vergesellschaftet. (Schmitt et al., 1997) Wichtiger als die prognostische Wertigkeit ist die prädiktive Bedeutung der Östrogenrezeptorexpression. Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus profitieren deutlich von einer adjuvanten oder palliativen endokrinen Therapie. (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2005) Liegt zudem ein Progesteronrezeptor positiver Tumor vor, so ist eine deutlich bessere Wirksamkeit der endokrinen Therapie zu verzeichnen. (Scharl, 2011) Hormonrezeptor-negative Tumoren sprechen im Vergleich zu Hormonrezeptor-positiven signifikant besser auf eine primäre Chemotherapie an. (Ellis et al., 2008)

1.5.8 HER2/neu

Die Untersuchung einer HER2/neu-Überexpression und/-oder einer Amplifikation des dazugehörigen Gens mittels Immunhistochemie oder Fluoreszenz- bzw. chromogener-*in-situ*-Hybridisierung (FISH, CISH) ist inzwischen ein fester Bestandteil in der Primärdiagnostik des Mammakarzinoms. (Wolff et al., 2007) Dieser transmembranäre Wachstumsfaktorrezeptor ist bei ca. 20-25% der Mammakarzinome überexprimiert und geht mit einem aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung sowie einer geringeren Expression der Steroidrezeptoren einher. (Konecny et al., 2003) Entscheidend ist seine prädiktive Bedeutung als Voraussetzung für eine Therapie mit den rekombinanten humanen anti-HER2/neu-Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab: Patientinnen mit einem HER2/neu-überexprimiertem Tumor profitieren deutlich von einer Antikörperbasierten Therapie, insbesondere im Hinblick auf ein geringeres Rezidivrisiko sowie in der palliativen Situation. (Dahabreh et al., 2008) Des Weiteren scheint eine HER2/neu-Überexpression mit einem geringeren Ansprechen auf Tamoxifen und auf die Kombination aus Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil (CMF) einherzugehen, während taxan- und anthrazyklinhaltige Therapien eine erhöhte Wirksamkeit versprechen. (Carlomagno et al., 1996)

1.5.9 Tumorassoziierte Proteolysefaktoren

Die tumorassoziierten Proteolysefaktoren uPA und PAI-1 zählen zu den „neueren“ prognostischen Markern, die in vielen retro- und prospektiven Studien validiert wurden. Bezüglich der prädiktiven Bedeutung konnte in der prospektiven „Chemo-N0-Studie“ im nodal negativen Mammakarzinom gezeigt werden, dass Patientinnen mit einem hohen uPA/PAI-1 von einer adjuvanten Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Methotrexat und

5-Fluoruracil (CMF-Schema) profitieren. (Scharl, 2011) Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) haben im Zusammenspiel mit dem uPA-Rezeptor (uPA-R) eine Schlüsselfunktion beim Abbau des Tumorstromas sowie der Basalmembran und fördern deren Invasions- und Metastasierungsfähigkeit. Hohe Konzentrationen von uPA und/oder PAI-1 sind prognostisch ungünstig. Sie korrelieren mit einer erhöhten Metastasierungstendenz und einem geringeren Gesamtüberleben. (Look et al., 2002) Insbesondere beim nodalnegativen Mammakarzinom kann sich ein klinischer Nutzen für die Bestimmung beider Faktoren ergeben: 70% aller Mammakarzinome mit negativem axillären Lymphknotenbefall haben eine günstige Prognose. Eine adjuvante Therapie mit all ihren Nebenwirkungen scheint nicht indiziert. In 20-30% zeigen auch Patientinnen mit einem negativen Nodalstatus eine vergleichsweise schlechte Prognose mit erhöhtem Rezidiv- und Fernmetastasierungsrisiko und profitieren von einer adjuvanten Therapie. (McGuire et al., 1992) (Zemzoum et al., 2003) Die Bestimmung der Gewebekonzentration von uPA und PAI-1 im Primärtumorgewebe kann dabei helfen letzteres Patientenkollektiv zu ermitteln und eine Entscheidungshilfe zur adjuvanten Chemotherapie zu geben.

1.5.10 Molekulare Mammakarzinomsubtypen

In der St. Gallerer Konsensuskonferenz erfolgte 2011 die Zuordnung der Tumoren zu 4 molekularen Subgruppen: Luminal-A, Luminal-B, HER2/neu-positive und Basalzellartige („*basal-like*“) Mammakarzinome. Basalzellartige Tumortypen exprimieren basale Zytokeratine und zeigen ein prognostisch ungünstiges Verhalten mit einem deutlich erhöhten Rezidiv- und Metastasierungsrisiko. In den meisten Fällen sind diese Neoplasien Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu- Rezeptornegativ (triple negativ). Somit fehlen in den Therapieansätzen drei wichtige Zielstrukturen, wodurch weder endokrine noch gegen HER2/neu gerichtete Therapiemaßnahmen effektiv sind. Während die immunhistochemisch bestimmte Proliferationsrate Ki-67 bisher keinen Standardmarker darstellte, kann dieser insbesondere in der Differenzierung zwischen Luminal-A- und -B Typen von Nutzen sein. Dennoch muss angemerkt werden, dass es zu methodischen Problemen in der Messung des Proliferationsmarkers gibt und zum anderen die Schwellenwerte nicht endgültig definiert sind. Sicher ist, dass ein Wert <10% mit einer guten Prognose vergesellschaftet ist. Luminal-A Mammakarzinome stellen die Gruppe der hormonsensitiven Tumore dar und benötigen in der Regel eine alleinige antihormonelle Therapie. Hingegen müssen erhalten Patientinnen mit einem Luminal-B Mammakarzinomsubtyp zusätzlich zu den endokrinen Substanzen eine Chemotherapie. Dies beruht auf der Tatsache, dass diese Tumoren zum einen mit einem erhöhten

Rezidivrisiko einhergehen und zum anderen durch die erhöhte Proliferationsrate ein gutes Ansprechen auf Chemotherapeutika zeigen. (Untch et al., 2011)

Tabelle 4: Die derzeit relevanten molekularen Mammakarzinomsubtypen (Untch et al., 2011) (Coates et al., 2015)

Basal-like (sporadisch/BRCA)	HER2/neu+	Luminal-A	Luminal-B
ER-/PR-	ER-/PR- (ER+/PR+)	ER+/PR+	ER+/PR-
G3	G3 (G1, G2)	G1, G2	G3 (G2)
Ki-67: 50-60%		Ki-67: <20%	Ki-67: >20%
HER2/neu-/EGFR+	HER2/neu+	HER2/neu-	HER2/neu- (HER2/neu+)
p53/c-MYC+			

Darüber hinaus existieren einige weitere neue Faktoren, deren klinischer Nutzen in größeren Studien evaluiert werden muss und aktuell noch keinen Einfluss auf die Therapieentscheidung hat. In Multigenanalysen wie beispielsweise OncotypeDX werden verschiedene Gene, welche eine Assoziation mit der Tumorinvasion, der Zellproliferation, sowie der Östrogen- und HER2/neu-Rezeptoraktivität zulassen, bestimmt. Je nach Höhe eines durch einen mathematischen Algorithmus errechneten „Recurrence Scores“ lässt sich das Ansprechen auf Chemotherapeutika, sowie die Rezidivwahrscheinlichkeit vorhersagen. (Bauernfeind, 2011)

Auch der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut, die PARP-Überexpression, Topoisomerase-2 α , CYP2D6, Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR=HER1), VEGF A, Thymidinphosphorylase und die Cyclooxygenase 2 sind Bestandteil verschiedener Studien und zielen darauf ab, in Zukunft eine weitere Subklassifizierung zu ermöglichen.

1.6 Symptome

Eine Symptomatik in frühen Tumorstadien fehlt meist. Typischerweise fällt das Mammakarzinom durch einen derben, meist indolent tastbaren Knoten auf, der bei der Selbstuntersuchung palpabel ist. Weitere Leitsymptome sind Brustschwellungen, Größenveränderungen, Hauteinziehungen, Rötungen, Retraktion der Mamille, Ulzera und blutige oder seröse Sekretion aus der Mamille. In den meisten Fällen müssen diese

Erscheinungen jedoch bereits als Spätsymptome angesehen werden. Eine spezielle Wachstumsform ist das inflammatorische Karzinom, welches sich diffus entlang der Lymphgefäße bis in die Haut ausbreitet und ein entzündungsähnliches Bild im Sinne einer Rötung, eines Hautödems sowie einer Großporigkeit zeigt. Diese Veränderungen werden als „*Peau d'orange*“ benannt. (Breckwoldt et al., 2007)

1.7 Diagnostik

Zur Basisdiagnostik für Patientinnen mit Mammakarzinom, unklaren oder suspekten Befunden sowie Präkanzerosen zählen die klinische Untersuchung mittels Inspektion und Palpation der Brust und der Lymphabflusswege, die Mammographie und die Mammasonographie. Während für die klinische Brustuntersuchung sowie die Brust-Selbstuntersuchung keine Evidenz in der Senkung der Brustkrebssterblichkeit gezeigt werden konnte, ist die Mammographie die einzige diagnostische Maßnahme, die im Rahmen der Früherkennung die Brustkrebsmortalität nachweislich senkt. Dennoch wird die Selbstuntersuchung in Deutschland weiterhin empfohlen, da in einigen Fällen oberflächlich gelegene Tumoren im Frühstadium entdeckt werden können. (Bauernfeind, 2011)

Im Hinblick auf die Erkennung von Präkanzerosen sowie frühen Tumorstadien gilt die Mammographie als einzig wirksam anerkannte Methode. Mit Hilfe von Screening-Projekten auf der Basis der Krebs-Früherkennungsrichtlinie (KFÜ) und der hierfür hervorgerufenen Bundesmantelverträge, bei denen asymptomatische Frauen zwischen 50 und 69 Jahren persönlich zum Mammographiescreening eingeladen werden, will man die Früherkennung deutlich verbessern. (Kreienberg et al., 2012) Als mammographische Tumorzeichen sind sternförmige Verschattungen mit strahligen, „krebsfüßchenartigen“ Ausläufern zu werten, sowie insbesondere gruppierte Mikroverkalkungen, die man schon beim *Carcinoma in situ*, im Speziellen beim DCIS, findet. Insbesondere bei älteren Frauen mit fettreichem Brustgewebe ist diese Form der Röntgenuntersuchung sehr aussagekräftig. Die Brust junger, prämenopausaler Patientinnen ist hingegen gut vaskularisiert und besitzt eine hohe mammographische Dichte, sodass hier die Sonographie der Mammographie überlegen ist. Auch als Zusatzuntersuchung zur Abklärung unklarer Befunde ist die Ultraschalluntersuchung unverzichtbar geworden. Die hiermit mögliche Differenzierung zwischen Fibroadenomen und Karzinomen sowie die Erkennung von Zysten erhöhen die Sensitivität der Mammographieergebnisse. (Breckwoldt et al., 2007)

Eine Magnetresonanztomographie mit Kontrastmittel wird nach der S3-Leitlinie präoperativ beim lobulären Mammakarzinom zur Ermittlung der Exzisionsgrenzen empfohlen. Bei Auffälligkeiten in der Basisuntersuchung sollte sich zur Sicherung der endgültigen Diagnose und zur weiteren Therapieplanung eine histologische Untersuchung durch Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie oder offener Biopsie anschließen. Liegt ein lokal fortgeschrittenes Karzinom oder der klinische Verdacht der Metastasierung vor, so wird bereits prätherapeutisch ein Staging mittels Röntgenuntersuchung des Thorax, Leber-sonographie und Szintigraphie des Skelettsystems empfohlen. (Kreienberg et al., 2012)

1.8 Therapie

Zur genauen Diagnostik und Risikoabschätzung sowie zur Therapieplanung sind die prognostischen und prädiktiven Faktoren von besonderer Bedeutung. Zusätzlich müssen das Alter der Patientin und das simultane Vorliegen weiterer Erkrankungen berücksichtigt werden.

1.8.1 Chirurgische Therapie

Im Mittelpunkt der Behandlung des Mammakarzinoms steht die operative Therapie mit dem Ziel der kompletten Entfernung des Tumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand zur Minimierung des Lokalrezidivrisikos. In den meisten Fällen kann eine brusterhaltende Therapie (BET) mit anschließender Bestrahlung erfolgen. Diese erzielte in randomisierten klinischen Studien bei adäquater Indikation identische Überlebensraten wie die Entfernung der kompletten Brust (Mastektomie). (Fisher et al., 2002), (Veronesi et al., 2002)

Bei großen, multizentrischen, oder inflammatorischen Tumoren ist eine brusterhaltende Operation meist nicht möglich. In diesen Fällen erfolgt die Mastektomie. Bei der heute gängigen modifizierten radikalen Mastektomie wird das gesamte Brustdrüsengewebe, die Haut und der Mamillen-Areola-Komplex sowie die Pektoralisfaszie entfernt, während die Pektoralismuskulatur erhalten bleibt. Liegt die Indikation für eine Mastektomie vor, sollte die Patientin über die Möglichkeit eines primären oder sekundären Brustwiederaufbaus aufgeklärt werden, wobei der Wunsch der Patientin berücksichtigt werden muss. (Kreienberg et al., 2012)

Wichtig für die histopathologische Tumorklassifikation, die Prognoseabschätzung sowie die Indikationsstellung zur adjuvanten systemischen Therapie ist die Bestimmung des Lymphknotenbefalls der Axilla. Während bei der Axilladissektion mindestens 10 Lymphknoten entfernt werden und ein hohes Risiko der akuten und chronischen Morbidität des betroffenen Armes besteht, gilt die Wächterlymphknoten (Sentinel-Lymphknoten) -Entfernung aufgrund signifikanter Reduktion der Morbidität als derzeitiger Standard bei Patientinnen mit sonographisch und klinisch negativem Lymphknotenstatus. Der Sentinel-Lymphknoten ist der erste Lymphknoten im Lymphabflussgebiet des Tumors mit der höchsten Wahrscheinlichkeit der Infiltration. Nach Markierung mit einem radioaktiven und/oder Farbstoff-Tracer werden diejenigen Lymphknoten, die einen oder beide Tracer aufnehmen als Sentinel-Lymphknoten erkannt und anschließend entfernt. Wird in mehr als 2 Sentinellymphknoten eine Karzinominfiltration nachgewiesen, so schließt sich eine axilläre Lymphonodektomie an, andernfalls kann auf die Axilladissektion verzichtet werden. (Bauernfeind, 2011)

1.8.2 Strahlentherapie

Die adjuvante Strahlentherapie spielt bei der Therapie des Mammakarzinoms weiterhin eine entscheidende Rolle, um das Rezidivrisiko zu verringern. Die lokale Bestrahlung der Tumorregion verfolgt das Ziel, eventuell verbliebene Karzinomzellen nach einem operativen Eingriff zu eradizieren und in ihrem Wachstum zu hemmen. In randomisierten Studien konnte gezeigt werden, dass die Strahlentherapie einen eindeutigen Effekt auf die Senkung der Lokalrezidivrate hat. Zudem wird die Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant erhöht. Sowohl nach brusterhaltender Operation als auch nach Mastektomie wird die tumorbedingte Sterblichkeit nach 15 Jahren um 5,4% reduziert. (Clarke et al., 2005) Eine Radiatio der betroffenen Brustdrüse einschließlich der Thoraxwand nach brusterhaltender Therapie gilt unabhängig von der Tumorgröße sowie dem Lymphknotenbefall als therapeutischer Standard. (Holle et al., 2009)

Auch nach modifizierter radikaler Mastektomie führt eine adjuvante Bestrahlung der Thoraxwand zu einer Verringerung der Rezidivwahrscheinlichkeit sowie zu einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit. Insbesondere bei Vorliegen einer der folgenden Risikofaktoren ist eine Strahlentherapie im Anschluss an die *Ablatio mammae* indiziert: Vorliegen eines T3/T4-Tumors, >3 befallenen Lymphknoten oder inkompletter Resektionsstatus (R1 oder R2). (Bauernfeind, 2011)

1.8.3 Adjuvante Systemtherapie

Durch ständige Erweiterung der Indikation zur adjuvanten systemischen Therapie, ist bei nahezu jeder Patientin mit einem primären, nicht metastasierten invasiven Mammakarzinom eine individualisierte postoperative systemische Behandlung indiziert. Einzig bei kleinen Tumoren ($\leq 1\text{cm}$), mit guter Differenzierung (Grading), positiven Hormon- und negativen HER2/neu-Rezeptorstatus scheint der Nutzen gering zu sein. (Bauernfeind, 2011) Die medikamentöse Behandlung erfolgt in Form einer Chemotherapie, einer endokrinen Therapie, einer HER2/neu-Antikörpertherapie oder einer Kombination dieser Therapieformen.

Die systemische Chemotherapie ist ein wichtiger Bestandteil der adjuvanten Therapie. Sie verfolgt das Ziel der Rezidivsenkung und Erhöhung der Überlebenschancen. Insbesondere Patientinnen mit nodalpositiven, Hormonrezeptor-negativen Karzinomen, sowie nodalnegativen Karzinomen, vergesellschaftet mit ungünstigen Prognoseparametern, sollte eine Chemotherapie empfohlen werden. Die Behandlung in Form einer Polychemotherapie hat sich als effektiver herausgestellt. Sie setzt an mehreren Angriffspunkten an und wirkt dabei einer Resistenzentwicklung sowie einer erhöhten Unverträglichkeit durch hohe Einzeldosen entgegen. Derzeitiger Standard in der adjuvanten Situation bei Patientinnen mit nodalpositiven Mammakarzinomen sind anthrazyklin- und taxanhaltige Chemotherapeutika. Liegt ein nodalnegativer Tumor mit günstigen Prognosefaktoren vor, ist eine anthrazyklinhaltige Dreierkombination einer taxanhaltigen Systemtherapie zu bevorzugen. (Bauernfeind, 2011)

Für ein optimales Therapieergebnis ist es sinnvoll, eine dosisintensivierte und dosisdichte Chemotherapie durchzuführen. Die einzelnen Therapiezyklen werden in kürzeren Abständen verabreicht, sodass die Regenerationsfähigkeit der malignen Tumorzellen vermindert wird. Durch die Einführung granulozytenstimulierender Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF) ist eine Erholung der Granulozytopenie bereits nach kürzerer Zeit gegeben, sodass die wöchentliche Dosisintensität gesteigert werden kann. (Moebus et al., 2010)

Die Tatsache, dass das Mammakarzinom zu den hormonabhängigen Tumoren zählt, macht sich die endokrine Therapie zu Nutze. Indikation für die Hormontherapie ist ein positiver Steroidrezeptorstatus, der die Hormonsensitivität anzeigt. Zur Vermeidung der wechselseitigen Wirkungsabschwächung sollte eine simultane Therapie in Kombination mit einer eventuell ebenfalls indizierten Chemotherapie vermieden werden. Es wird empfohlen, die Hormontherapie im Anschluss an die Chemotherapie durchzuführen.

(Bauernfeind, 2011) Die hormonelle Therapie kann parallel zur oder nach Ende der Bestrahlung eingeleitet werden. (Ahn et al., 2005) Wichtig für diese Therapieform ist die Unterscheidung zwischen prä- und postmenopausalen Patientinnen. Bei prämenopausalen Patientinnen ist eine antiöstrogene Therapie mit dem selektiven Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen über 5-10 Jahre je nach Risikofaktoren (z.B. positiver Nodalstatus) bzw. bis zum Rezidiv insbesondere bei zusätzlicher Durchführung einer Chemotherapie Standard. (Kreienberg et al., 2012) Bei Kontraindikationen gegenüber Tamoxifen gibt es zudem die Möglichkeit zur Suppression der Ovarialfunktion. Diese führt zur Erniedrigung systemischer Östrogenspiegel und in weiterer Folge zur Suppression des östrogenen Wachstumsstimulus. Entweder kann die Ovarablation medikamentös über Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRH-Analoga) oder permanent mittels Operation (Ovarektomie) erfolgen. Letzteres gehört zu den historischen Verfahren und wird kaum noch durchgeführt. (Scharl, 2011)

Mehr als 20 Jahre galt die antiöstrogene Therapie mit Tamoxifen über 5 Jahre auch bei postmenopausalen Patientinnen als Mittel der 1. Wahl und wird auch heute noch in einigen Fällen empfohlen. Nach aktueller Datenlage sind jedoch Aromataseinhibitoren (AI) der 3. Generation der Tamoxifentherapie hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens überlegen. Die AI-Therapie wird entweder allein, oder in der Sequenz mit Tamoxifen durchgeführt: Die alleinige AI-Therapie erfolgt über 5 Jahre. Weitere Therapieschemata sind eine 2-3-jährige Gabe von Tamoxifen gefolgt von AI bis zur Gesamtdauer von 5 Jahren, eine 2-3-jährige AI-Therapie gefolgt von Tamoxifen bis zur Gesamtdauer von 5 Jahren, oder die Verabreichung von Tamoxifen über 5 Jahre, gefolgt von 5 Jahren AI. Die sequentielle Therapie des AI gefolgt von Tamoxifen wird bei nodalpositiven Patientinnen bevorzugt. (Scharl, 2011) (Kreienberg et al., 2012) Die gleichzeitige Gabe beider Wirkstoffe hat sich in Studien nicht bewährt und gilt nicht als indiziert. (Fisher et al., 2001)

Bei Patientinnen mit HER2/neu-Überexpression eignet sich eine zielgerichtete Therapie mit dem monoklonalen humanisierten Antikörper Trastuzumab, der gegen die extrazelluläre Domäne des HER2/neu-Wachstumsfaktorrezeptors gerichtet ist. Dieser ist für die adjuvante und metastasierte Situation zugelassen. Die empfohlene Therapiedauer beträgt ein Jahr. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine adjuvante Therapie mit Trastuzumab in Kombination mit einer Chemotherapie die Rezidivrate bei HER2/neu-überexprimierenden Mammakarzinomen um bis zu 50% und die Mortalität um ca. 30% reduziert. (Dahabreh et al., 2008; Perez et al., 2011)

1.8.4 Neoadjuvante Therapie

Liegt ein lokal fortgeschrittenes, primär inoperables oder inflammatorisches Mammakarzinom vor, so ist die präoperative neoadjuvante Therapie eine geeignete Behandlungsoption. Sie erfolgt in der Regel in Form einer Chemotherapie, kann aber in bestimmten Fällen (bei postmenopausalen Patientinnen) auch hormonell erfolgen. Zusätzlich zur neoadjuvanten Chemotherapie ist eine Kombination mit einem gegen den HER2/neu-Rezeptor gerichteten Medikament möglich, falls eine Überexpression des Rezeptors nachgewiesen werden kann. Die primär systemische Therapie verfolgt das Ziel einer Tumogrößenreduktion, um eine vollständige Operabilität oder eine geeignete Situation für eine brusterhaltende Operation zu schaffen. Zudem hilft sie dabei die Wirksamkeit der Therapie festzustellen und bietet die Option im Rahmen von neoadjuvanten Studien schneller individuelle Therapiemöglichkeiten zu finden. (Kaufmann et al., 2006)

1.8.5 Palliative Therapie

Die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms soll in erster Linie Symptome lindern, das Auftreten neuer Beschwerden verhindern und das Leben verlängern. Wegen der vielfältigen Krankheitsverläufe muss die Auswahl der Behandlung individuell entschieden werden. Liegt ein Hormonrezeptor-positives Karzinom vor, sollte mit einer endokrinen Therapie begonnen werden. Es wird wie zuvor beschrieben zwischen prä- und postmenopausalen Patientinnen unterschieden. Die Hormontherapie eignet sich aufgrund ihrer geringen Toxizität, zeigt jedoch im Vergleich zur Chemotherapie ein langsames Ansprechen. Weist die Erkrankung eine rasche Tumorprogression, ein unzureichendes Ansprechen auf die hormonelle Therapie trotz positivem Rezeptorstatus, oder eine fehlende Hormonsensitivität auf, so ist mit einer ungünstigeren Prognose zu rechnen. In diesen Fällen ist der primäre Einsatz einer systemischen Chemotherapie indiziert bzw. sollte auf diese umgestellt werden. Bei langsamem Progress, sowie geringen Beschwerden kann eine Monotherapie zum Einsatz kommen, ansonsten muss auf die Polychemotherapie zurückgegriffen werden. Bei metastasierten Mammakarzinomen wird die Therapie weniger aggressiv im Vergleich zur adjuvanten Behandlung ausgewählt. Da in der palliativen Situation meist keine Heilung erzielt werden kann, sollen die Nebenwirkungen der Systemtherapie möglichst gering sein. Trotz vielfältiger Therapieregime gibt es keine generellen Chemotherapieabfolgen, sodass die Therapie anhand individueller Bedürfnisse und Faktoren der Patientinnen wie Alter,

Allgemeinzustand und Komorbiditäten ausgewählt werden sollte. (Bauernfeind, 2011) Als mögliche Chemotherapeutika eignen sich Anthrazykline (auch in liposomaler Form), Taxane, Alkylantien, Vinorelbin, Fluorpyrimidine, Platinkomplexe und das Halichondrin Eribulin. In der Polychemotherapie erreichen Taxane in Kombination mit einem Anthrazyklin oder Antimetaboliten die höchsten Remissionsraten. Aufgrund der Kardiotoxizität von Anthrazyklinen muss eine regelmäßige Überprüfung der Organfunktion erfolgen. Eine dosisintensivierte Therapie zeigt keinen Überlebensvorteil und sollte im Gegensatz zur adjuvanten Systemtherapie nicht erfolgen.

Alternativ kann bei Hormonrezeptor-positiven, HER2/neu negativen Tumoren, nach einem Rezidiv bzw. Progress unter vorausgegangener Therapie mit einem nicht steroidalen Aromataseinhibitor, eine Therapie mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus in Kombination mit Exemestan erfolgen. Everolimus hemmt den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, welcher eine wichtige Rolle in der Resistenzentwicklung der Hormontherapien spielt. Durch den Einsatz von Everolimus konnte das progressionsfreie Überleben in randomisierten Studien mehr als verdoppelt werden. (Beaver et al., 2012) (Royce et al., 2015) Seit kurzem ist zudem ein weiterer Wirkstoff bei Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem, HER2/neu-negativen metastasierten Mammakarzinom zugelassen, der ebenfalls eine Therapieoption bei vorliegender Resistenz gegenüber einer antihormonellen Therapie bietet. Der CDK4/6-Inhibitor (Cyclin-dependent kinases 4 and 6) Palbociclib konnte in randomisierten klinischen Studien das progressionsfreie Überleben in Kombination mit Fulvestrant mehr als verdoppeln. Die Enzyme CDK4 und 6 sind an dem Übergang der G1-Phase in die S-Phase und somit an der Zellteilung beteiligt. Palbociclib hemmt die Aktivität dieser Enzyme und somit das Tumorwachstum. (Cristofanilli et al., 2016)

Im Falle eines HER2/neu-überexprimierenden Tumors eignet sich in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms der monoklonale Antikörper Trastuzumab. Als Empfehlung gilt die Kombination von Trastuzumab mit einer Chemotherapie, nach Remissionsinduktion als Monotherapie oder nach Vorbehandlung mit Taxanen bzw. Anthrazyklinen mit einem nicht-kreuzresistenten Chemotherapeutikum. (Kreienberg et al., 2012) Ein weiterer gegen HER2/neu gerichteter Wirkstoff ist Lapatinib. Der duale Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib hemmt die Signaltransduktion von EGFR-1 und HER2/neu. Aufgrund seines unterschiedlichen Angriffspunktes kann eine Wirksamkeit auch bei Resistenz gegenüber Trastuzumab beobachtet werden. Bei fortgeschrittener Erkrankung wird nach vorangegangener Therapie mit Trastuzumab, Anthrazyklinen und Taxanen eine Kombination von Lapatinib und Capecitabin empfohlen. (Geyer et al., 2006) Zudem sind zwei weitere Wirkstoffe zugelassen, die an dem HER2/neu-Rezeptor

angreifen: Der humanisierte monoklonale Antikörper Pertuzumab ist gegen ein anderes Epitop von HER2/neu gerichtet und wird derzeit auch in klinischen adjuvanten Therapiestudien geprüft. Aktuellen Ergebnissen zur Folge führt der Dimerisierungsinhibitor Pertuzumab in Kombination mit Trastuzumab und Docetaxel zu einer erhöhten Reduktion des Rezidivrisikos sowie einem verlängerten progressionsfreien Überleben (PFS). (Baselga et al., 2012; Baselga et al., 2010) Darüber hinaus scheint Pertuzumab auch dann wirksam zu sein, wenn eine Resistenz gegenüber Trastuzumab vorliegt. (Zagouri et al., 2013) Basierend auf der Phase-III-Studie EMILIA wurde der Wirkstoff Trastuzumab Emtansin (T-DM1) in der Behandlung von Patientinnen mit HER2/neu-positivem, fortgeschrittenem Brustkrebs zugelassen. Das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat T-DM1 verbindet die HER2/neu-Antikörper Eigenschaften von Trastuzumab mit der zytotoxischen Wirkung des Mitosehemmstoffes DM1. Beide sind über einen systemisch stabilen „Linker“ miteinander verbunden. T-DM1 verlängert signifikant das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei Patienten mit metastasiertem HER2/neu-positivem Brustkrebs, die zuvor eine Therapie mit Trastuzumab und Taxanen erhielten. (Verma et al., 2012)

Die Therapie mit dem monoklonalen, antiangiogen wirksamen Antikörper Bevacizumab in Kombination mit Taxanen, Anthrazyklinen oder Capecitabin hat bei Patientinnen mit metastasiertem HER2/neu-negativem Brustkrebs unabhängig vom Hormonrezeptorstatus ein deutlich verlängertes Progressionsfreies Überleben gezeigt und wird daher ebenfalls in der Erstlinientherapie empfohlen. (Robert et al., 2011) Aufgrund divergenter Ergebnisse bezüglich des Gesamtüberlebens wurde die Zulassung für Bevacizumab beim metastasierten Mammakarzinom durch die US-amerikanische Food and Drug Administration zurückgezogen, in Europa besteht jedoch weiterhin eine Zulassungsgenehmigung.

Bei auftretenden Skelettmetastasen kann eine Operation oder Strahlentherapie zur Schmerzbekämpfung, zur Wiederherstellung oder zum Erhalt der Stabilität sowie der Lebensqualität erfolgen. Bisphosphonate oder eine Rankligand-Inhibitor-Therapie sollten ergänzend eingesetzt werden. (Kreienberg et al., 2012)

1.9. Nachsorge

Auch viele Jahre nach erfolgreicher Primärtherapie muss mit Rezidiven gerechnet werden, sodass die Nachsorge einen hohen Stellenwert hat. Es erfolgen Untersuchungen zu lokoregionären Rezidiven, Fernmetastasen und kontralateralen Mammakarzinomen.

Zudem werden die Folgen und Unverträglichkeiten der Therapie erfasst. Im Gegensatz zur metastasierten Erkrankungssituation kann ein Lokalrezidiv in vielen Fällen in kurativer Intention behandelt werden. Es wird empfohlen zeitnah, d.h. direkt nach Abschluss der adjuvanten Therapie, mit der Nachsorge zu beginnen. Zusätzlich zur Anamnese und körperlichen Untersuchung sollte mindestens jährlich eine Mammographie, sowie eine zusätzliche Ultraschalluntersuchung der Brust durchgeführt werden. Dies bezieht sich zum einen auf die ipsilaterale aber auch auf die kontralaterale Brust, da ein vorausgegangenes Mammakarzinom ein erhöhtes Risiko eines Zweitkarzinoms der kontralateralen Seite birgt. (Kreienberg et al., 2012) Während die Entscheidung einer geeigneten Therapie anhand von Risikofaktoren gefällt wird, liegen hinsichtlich einer individualisierten Nachsorge, welche die persönlichen Prognoseparameter inkludiert, keine größeren validierten Studien vor.

1.10 Aufgabenstellung

Die Heterogenität des Mammakarzinoms führte in den letzten Jahrzehnten zu einer Vielzahl von Studien über zusätzliche praxisrelevante prognostische sowie prädiktive Biomarker. Ziel dieser retrospektiven Studie ist es, Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom besser zu klassifizieren, um ihnen zukünftig eine personalisierte und präzise Tumortherapie anbieten zu können. Insbesondere vor dem Hintergrund der zunehmenden Anzahl zugelassener Medikamente in dieser Entität nehmen solche „Precision Oncology“-Programme einen immer wichtigeren Stellenwert ein. So können Patientinnen identifiziert werden, die besonders von einer bestimmten Therapie profitieren. Zum anderen helfen sie, Toxizitäten zu verringern und Ressourcen des Gesundheitssystems zu sparen, indem Patientinnen, die nicht auf eine bestimmte Therapie ansprechen, frühzeitig selektioniert werden können.

Hierfür soll ein Patientenkollektiv mit metastasiertem Mammakarzinom, welches am Westdeutschen Tumorzentrum des Universitätsklinikums Essen von 2000 bis 2012 medikamentös therapiert wurde und in Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Tumorproben verfügbar sind, analysiert werden. Diese Tumorproben werden auf definierte molekulare Biomarker analysiert und die klinischen Verläufe in einer SPSS basierten Datenbank erfasst. Anschließend erfolgt eine Korrelation der Biomarker mit dem Ansprechen auf bestimmte Tumortherapien und dem Gesamtüberleben der Patientinnen, um die prognostische und prädiktive Wertigkeit der analysierten Marker zu untersuchen. Neben der bereits etablierten Biomarker wie Hormon- und HER2/neu-Rezeptorstatus liegt ein besonderer Fokus der Studie auf der Analyse des Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT (PI3K/AKT)-Signalweges, da konstitutive Aktivierungen beim Mammakarzinom eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Auswertung der Krankheitsverläufe von 131 Patientinnen mit synchron oder metachron metastasiertem Mammakarzinom, die im Zeitraum von März 2000 bis Dezember 2012 am Westdeutschen Tumorzentrum in der Inneren Klinik (Tumorforschung) oder der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Essen therapiert wurden und im Analysezeitraum von August 2010 bis März 2013 noch lebten. Die Teilnahme an der durch die lokale Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen genehmigten Studie wurde den Patientinnen unabhängig von einer Therapieentscheidung angeboten. Nach schriftlicher Einwilligung wurden Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Tumorproben entweder vom Primärtumor oder einer Metastase auf unten näher definierte molekulare Biomarker analysiert. Existierten mehrere Tumorproben, wurde stets die Probe verwendet, die zeitlich am kürzesten vor Einschluss in die Studie gewonnen wurde. Die Ergebnisse der Biomarkeranalyse sowie die Krankheitsverläufe wurden in einer SPSS-basierten Datenbank erfasst. Dieser „Erhebungsbogen“ beinhaltete alle verfügbaren Informationen zur Patientin, zum Tumorstadium, zur Therapie und zum Krankheitsverlauf. Dazu gehörten Alter der Patientin, Datum der Erstdiagnose bzw. Metastasierung, Lokalisation und Stadium des Primärtumors, Histologie, Differenzierungsgrad, Hormonrezeptor- und HER2/neu-Status sowie die Tumormarker. Als weitere Parameter wurden das krankheitsfreie Überleben (DFS), das Gesamtüberleben (OS) und das Mediane Überleben nach Metastasierung (MST_{pall}) bestimmt. Das DFS wurde definiert als Zeitraum zwischen Erstdiagnose des Primarius und dem Zeitpunkt der ersten Metastasierung. Das OS wurde definiert als Zeitraum von Diagnose bis zum Tod, das MST_{pall} als Zeitraum von Eintritt einer Metastasierung bis zum Tod. Als Datenbankschluss wurde der 07.01.2014 gewählt. Alle Patientinnen, die zu diesem Zeitpunkt noch lebten, wurden zensiert. Konnte das Todesdatum anhand der Patientenakte nicht bestimmt werden, erfolgte eine Anfrage beim Einwohnermeldeamt. Bei einigen Patientinnen gelang keine Feststellung des Todeszeitpunktes, so dass dann das Datum des letzten Kontaktes gewählt wurde und die Patientinnen entsprechend zensiert wurden.

Ebenfalls zu den Basisdaten zählten Informationen zur neoadjuvanten, adjuvanten und insbesondere zur palliativen Therapien (Chemo-, Hormon- und Strahlentherapie, sowie eine etwaige Therapie mit Trastuzumab oder Lapatinib) inklusive deren Anwendungsdauer, deren Linien mit Dosis und Anzahl der Zyklen. Bei der palliativen Systemtherapie wurde das beste Ansprechen, sowie das Progressionsfreie Überleben unter den verschiedenen Therapielinien ermittelt. Eine Therapielinie wurde definiert als die Folge eines gleichen Medikaments oder der gleichen Kombination von Medikamenten bis zum Wechsel oder Abbruch des jeweiligen Regimes. Hierbei wurden sowohl antihormonelle als auch chemotherapeutische Behandlungsstrategien erfasst. Das spätere Wiederaufgreifen eines Therapiekonzepts nach vorherigem Wechsel oder Beendigung wurde als Beginn einer neuen Behandlungslinie gewertet.

2.2 Evaluation des Therapieansprechens

Die Beurteilung der Therapieeffektivität erfolgte für jede Therapielinie mit Hilfe bildgebender Verfahren. Zudem wurden, falls vorhanden, serologische Parameter wie beispielsweise Tumormarker zur Beurteilung des Therapieerfolges mit berücksichtigt. Die Ansprechrate wurde nach den Kriterien der Weltgesundheitsbehörde (WHO) definiert. (Miller et al., 1981) Hierbei galt die komplette Remission als Verschwinden aller Ziel-Läsionen ohne Residuen (CR), die partielle Remission als Abnahme der Läsionen $\geq 50\%$ (PR), die minimale Regression als Abnahme der Läsionen um $\geq 25\%$ aber $< 50\%$ (MR) und die Progression als Größenzunahme der Läsionen um $\geq 25\%$ oder das Auftreten neuer Läsionen (PD). Bei der stabilen Erkrankung zeigten die Läsionen keine Größenregression $> 25\%$ oder eine Größenprogression $> 25\%$ (SD). Als Progressionsfreies Überleben (PFS) wurde der Zeitraum zwischen Therapiebeginn und dem Auftreten einer Tumorprogression (PD) oder Eintreten des Todes definiert.

2.3 Biomarkeranalyse

Am Formalin fixierten in Paraffin eingebetteten Tumormaterial wurden folgende Biomarker analysiert:

Tabelle 5: Biomarkeranalyse

Biomarker	Methode
Östrogenrezeptor (ER)	IHC
Progesteronrezeptor (PR)	IHC
HER2/neu	IHC/ISH
PTEN	IHC
<i>FGFR1</i> -Amplifikation	ISH
<i>PI3KCA</i> Mutation	Sequenzierung
<i>PI3KCA</i> -Amplifikation	ISH

IHC: Immunhistochemie, ISH: *in-situ*-Hybridisierung

Die Analysen wurden zu Beginn der Studie zentral durch das Novartis Institute for BioMedical Research (Cambridge, MA, USA) durchgeführt und im Verlauf am Institut für Pathologie des Westdeutschen Tumorzentrum etabliert und vollständig durchgeführt. Die Analyse der hormonabhängigen Tumoren basiert auf dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellen in der Immunhistochemie. Als hormonsensibel gelten diejenigen Tumoren, deren Anteil positiv gefärbter Tumorzellen $\geq 1\%$ betragen. (Scharl, 2011) Der HER2/neu-Rezeptorstatus wird mittels Immunhistochemie sowie Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bzw. Chromogener-*in-situ*-Hybridisierung (CISH) oder Silber-*in-situ*-Hybridisierung (SISH) bestimmt. Die immunhistochemische Diagnostik erfolgte mittels HercepTest™ für den Dako Autostainer (K5207; Dako, Glostrup, Denmark) anhand der Herstellerempfehlungen. Als HER2/neu positiv gelten alle Tumoren, die eine starke, d.h. dreifach positive Rezeptor-Überexpression in der Immunhistochemie zeigen (IHC 3+). Immunhistochemisch kann in diesen Fällen eine starke zirkuläre Membranfärbung von $>30\%$ der invasiven Zellen nachgewiesen werden. Bei schwach positivem Ergebnis (IHC 2+, d. h. wenn $> 10\%$ der invasiven Tumorzellen eine mäßig-schwache zirkuläre oder $\leq 30\%$ eine starke Membranfärbung zeigen) muss zudem eine Gen-Amplifikation in der FISH bzw. CISH-Diagnostik vorliegen. (Kreienberg et al., 2012)

2.3.1 PTEN

Der Nachweis des Tumorsuppressorgens PTEN erfolgte mittels Immunhistochemie. Hierfür wurden Immunfärbungen mit Hilfe eines monoklonalen Kaninchen-Anti-Human-PTEN-Antikörpers durchgeführt (Klon 138G6; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Fachärzte der Pathologie bewerteten die PTEN-Färbungen semi-quantitativ mit Hilfe eines Histologischen-Scores (H-Score), deren Einteilung anhand der Intensität der immunhistochemischen Färbungen erfolgte. Dabei wurde eine starke Intensität mit 3, eine moderate mit 2, eine schwache mit 1 und keine Färbung mit 0 bewertet. Anschließend wurde der H-Score mit folgender Formel berechnet:

$$\text{H-Score} = (\text{Anteil der Zellen mit Intensitätsgrad 1 (\%)}) + (\text{Fraktion der Zellen mit Intensitätsgrad 2 (\%) x 2}) + (\text{Fraktion der Zellen mit Intensitätsgrad 3 (\%) x 3})$$

Eine negative PTEN Expression lag bei einem H-Score ≤ 10 vor.

2.3.2 FGFR1-Amplifikation

Mittels *in-situ*-Hybridisierung (ISH) wurde eine Genamplifikation des Fibroblasten Wachstumsfaktorrezeptor 1 (*FGFR1*) ermittelt. Dies erfolgte entweder mittels chromogener oder Silber-*in-situ*-Hybridisierung (CISH oder SISH). Die Genkopiezahl von *FGFR1* wurde dann als amplifiziert gewertet, wenn das Verhältnis der Signale zum Tumorzellkern ≥ 6 war. Alle Tumorproben mit einem Verhältnis unter 6 galten als nicht amplifiziert.

2.3.3 PIK3CA-Mutation und -Amplifikation

Mikrodissezierte Tumorschnitte wurden mittels des Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega, Madison WI, USA) entparaffiniert und die DNA extrahiert. *PIK3CA* Amplifikationen wurden mit Hilfe des PCR basierten „HS06617043_cn Copy Number Assays“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) detektiert. Die Spezifität für den Nachweis der Genamplifikation betrug 100%, als Sensitivitätsgrenze wurde das Vorliegen von mindestens vier Kopien gewertet. Mutationen in den „hot-spot“-Regionen des *PIK3CA*-Gens (Codon E542, E545 und H1047) wurden mittels SNaPshot-Multiplex-Genotypisierung (ABI Prism SNaPshot Multiplex-Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) oder alternativ mittels Sanger Sequenzierung detektiert. Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle 6: Primer der *PIK3CA*-Mutationsanalyse

Primer	Sequenz
SNaPshot multiplex: exon 10 forward	AGC TAG AGA CAA TGA ATT AAG GGA
SNaPshot multiplex: exon 10 reverse	GCA CTT ACC TGT GAC TCC ATA GA
SNaPshot multiplex: exon 21 forward	TCG AAA GAC CCT AGC CTT AGA TA
SNaPshot multiplex: exon 21 reverse	CAT GCT GTT TAA TTG TGT GGA A
SNaPshot extension: E542	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AAT TTC TAC ACG AGA TCC TCT CTC T
SNaPshot extension: E545	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TCG AGA TCC TCT CTC TGA AAT CAC T
SNaPshot extension:H1047	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTC ATG AAA CAA ATG AAT GAT GCA C

Die Spezifität der Mutationsanalysen betrug 100%, die Sensitivität lag bei 10% Mutationsfrequenz der Allele.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen und Datenanalysen erfolgte mit Hilfe des Programmsystems SPSS Statistics 19. Potenzielle Korrelationen verschiedener Merkmale untereinander wurden mittels bivariater Regressionsanalyse oder mittels Kreuztabelle unter Anwendung des Pearsons- bzw. Chi-Quadrat-Tests analysiert. Hierbei galten die Ergebnisse als statistisch signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war; Werte $p < 0,1$ wurden als im Trend unterschiedlich angesehen. Der Einfluss bestimmter Biomarker auf das DFS, PFS, OS und das MST_{Pall} erfolgte mit Hilfe der univariaten Cox-Regressionsanalyse und Bestimmung der Hazard Ratio sowie des p -Wertes. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Mit einem Konfidenzintervall von 95% lagen lediglich 5% der Patientinnen außerhalb des angegebenen Intervalls. (Ziegler et al., 2007a) Anhand der Kaplan-Meier-Methode wurden die Überlebenskurven dargestellt und mittels logrank-Test konnte die Signifikanz ermittelt werden. Dieser Test ermöglichte auch die Berücksichtigung zensierter Daten. Als zensierte Daten werden Daten mit zunächst unbekanntem Eigenschaften definiert. Dabei handelt es sich entweder um Patienten, die zu einem festen Zeitpunkt noch nicht verstorben sind, oder sich der weiteren Beobachtung entzogen haben. (Ziegler et al., 2007b)

2.5 Ethikvotum

Die Analyse der Biomarker, sowie die retrospektive Auswertung wurden durch die Ethik-Kommission der Universität Duisburg-Essen (Az. 10-4455) genehmigt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

3.1.1 Patientencharakteristika

Die retrospektive Studie der 131 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde im August 2010 initiiert (Tabelle 7). Das mediane Erkrankungsalter der Primärdiagnose lag bei 50 Jahren (25,7 bis 75,9). Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Tumorlokalisation zwischen rechter (51 Patientinnen) und linker Brust (59 Patientinnen). Bei 5 Patientinnen präsentierte sich der Tumor sowohl links als auch rechts. Die Metastasierung erfolgte durchschnittlich mit 57,3 Jahren (32,5 bis 79,4) nach einem medianen Zeitraum von 4,9 Jahren (0-22,75) seit Diagnose des Primärtumors. Der Einschluss in die klinische Biomarkerstudie sowie die Analysen der Tumorproben erfolgte im Median mit 62,7 Jahren (34,8-82,6) bzw. 2,36 Jahre (0-16,95) nach Erstdiagnose einer Metastasierung.

Tabelle 7: Patientencharakteristika

Patientenzahl	131
Alter bei Diagnose (Jahre)	50 (25,7-75,9)
Alter bei Metastasierung (Jahre)	57,3 (32,5-79,4)
Alter bei Biomarkeranalyse	62,7 (34,8-82,6)
Seite des Mammakarzinoms (links/rechts/beide/n.b.)	59/51/5/16
Zeit von Primärdiagnose bis zur Metastasierung (Jahre)	4,9 (0-22,75)
Zeit von Metastasierung bis zur Biomarkeranalyse (Jahre)	2,36 (0-16,95)

n.b.: nicht bekannt

3.1.2 Stadium des Primärtumors

Die Erstdiagnose wurde meist in einem frühen Tumorstadium gestellt (Tabelle 8): Während 70% der Mammakarzinome im Stadium T1 und T2 nachgewiesen werden konnten, wurden lediglich 16,8% der Fälle in fortgeschrittenen T-Stadien erkannt (Std. T3 und T4). In knapp 50% der Patientinnen konnten lokoregionäre Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (Tabelle 9). Das T-Stadium korrelierte mit dem Lymphknotenbefall,

d.h. je größer der Primärtumor war, desto höher war die Wahrscheinlichkeit eines positiven Lymphknotenbefalls ($p=0,007$, Chi-Quadrat). Eine synchrone Fernmetastasierung konnte in 16% der Fälle beobachtet werden (Tabelle 10). Auch hier zeigte sich eine Korrelation mit der initialen Tumorgöße, d.h. Patientinnen mit initial großen Tumoren hatten eine höhere Wahrscheinlichkeit einer synchronen Fernmetastasierung ($p=0,021$, Chi-Quadrat). Die restlichen Patientinnen entwickelten eine metachrone Metastasierung. Nicht bei allen Patientinnen konnte das TNM-Stadium aus der Krankenakte entnommen werden. Bei 21 Patientinnen fehlten Daten hinsichtlich des T-Stadiums, bei 29 hinsichtlich des N-Stadiums und in 27 Fällen ließ sich kein initiales M-Stadium eruieren.

Tabelle 8: Tumorstadium des Primärtumors

T (Primärtumor)	N	%
1	42	32,1
2	46	35,1
3	10	7,6
4	12	9,2
Keine Angaben	21	16,0

Tabelle 9: Lymphknotenstatus des Primärtumors

N (Primärtumor)	N (Anteil)	%
0	39	29,8
1	35	26,7
2	21	16,0
3	7	5,3
Keine Angaben	29	22,1

Tabelle 10. Fernmetastasen bei Erstdiagnose

M (Primärtumor)	N	%
0	81	61,8
1	21	16,0
x	2	1,5
Keine Angaben	27	20,6

x= M-Status bei Diagnose unbekannt

3.1.3 Metachrone Metastasierung

In die vorliegende Studie wurden nur Patientinnen mit metastasierter Erkrankung eingeschlossen. Dabei war es irrelevant, ob diese bei Diagnosestellung (synchron), oder erst im Verlauf auftrat (metachron). Der überwiegende Anteil der Patientinnen wies eine metachrone Metastasierung auf. Deren häufigste Lokalisation stellte das Skelettsystem dar (58 Patientinnen, Tabelle 11), gefolgt von der hepatischen Metastasierung (45 Patientinnen). In absteigender Reihenfolge traten Metastasen in der Lunge, im Gehirn und in anderen viszerale Organen auf.

Tabelle 11: Metachrone Metastasierung

Lokalisation	N	%
Skelettsystem	58	44,3
Leber	45	34,4
Lunge	23	17,6
Gehirn	9	6,9
andere viszerale Organe	2	1,5
andere	36	27,5

3.1.4 Histologie und Grading des Primärtumors

Der überwiegende Teil der Primärtumoren erwies sich histologisch als invasiv ductales Adenokarzinom (51,1% aller nachgewiesenen Fälle, Tabelle 12). Das invasiv lobuläre Adenokarzinom ließ sich lediglich in 13 Tumoren nachweisen (9,9%). Die restlichen Fälle verteilten sich auf das inflammatorische Adenokarzinom, das ductale Adenokarzinom *in situ*, sowie auf seltene Adenokarzinome wie beispielsweise das tubuläre Adenokarzinom. Bei 38 der 131 Patientinnen konnten keine Angaben des primären Subtypes erhoben werden.

Die meisten Primärtumoren zeigten einen mäßigen (G2; 38,2%, Tabelle 13) oder niedrigen (G3; 30,5%) Differenzierungsgrad (Grading). Hochdifferenzierte Tumoren (G1) ließen sich bei 3,1% der Patientinnen aufzeigen. In 18 Fällen wurde aus der Krankengeschichte kein Grading ersichtlich.

Tabelle 12: Histologie des Primärtumors

Histologie	N	%
Invasiv ductales Adenokarzinom	67	51,1
Invasiv lobuläres Adenokarzinom	13	9,9
Andere Adenokarzinome	8	6,1
Inflammatorisches Adenokarzinom	4	3,1
Adenokarzinom <i>in situ</i>	1	0,8
keine Angaben	38	29,0

Tabelle 13: Grading des Primärtumors

Grading	N	%
G1	4	3,1
G2	50	38,2
G2-G3	1	0,8
G3	40	30,5
keine Angaben	18	13,7

3.1.5 Hormonrezeptor- und HER2/neu-Rezeptor

In der Mehrzahl der Fälle wurden sowohl der Primärtumor, als auch die Metastase(n) auf den Hormon- und HER2/neu- Rezeptorstatus untersucht. Im Primärtumor zeigte sich eine Positivität für die HR in 64,1% (ER 58,8%, PR 49,6%). Hier galt als HR-positiv, wenn mindestens ein Rezeptor exprimiert wurde. Eine Überexpression des HER2/neu-Rezeptors (IHC3+ oder IHC2+/ISH+) konnte in 16,8% der Fälle beobachtet werden. In den Tumorproben, die aus Metastasen gewonnen wurden, war sowohl die HR-Positivität (42%) als auch die Überexpression des HER2/neu Rezeptors (11,5%) geringer. Von etwa der Hälfte der Patientinnen waren Informationen für die Expression der Rezeptoren sowohl vom Primärtumor als auch von einer Metastase verfügbar, so dass die Expressionen korreliert werden konnte. Es zeigte sich eine Änderung der Hormonrezeptoren (ER und PR) bei ungefähr 25% der Patientinnen. In 15,1% der Fälle wurde ein Wechsel des HER2/neu-Rezeptorstatus von Primarius und Metastase nachgewiesen.

Tabelle 14: Rezeptoren-Wechsel

	Primarius	Metastase	Wechsel
PR	65/121 (49,6%)	38/94 (29%)	16/63 (25,4%)
ER	77/122 (58,8%)	50/93 (38,2%)	15/62 (24,2%)
HR	84/131 (64,1%)	55/131 (42%)	14/65 (21,5%)
HER2/neu	22/122 (16,8%)	15/94 (11,5%)	8/53 (15,1%)

3.1.6 Therapie

Eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten 13 der initial nicht metastasierten Patientinnen. Bei 68 Patientinnen erfolgte eine Radiotherapie nach brusterhaltender Operation oder Ablation, eine adjuvante Chemotherapie erhielten 66 Patientinnen und 56 Patientinnen erhielten eine adjuvante Hormontherapie. In der metastasierten Situation bekamen die Patientinnen im Median 6 (0-12) Therapielinien. Diese setzten sich aus antihormonellen und zytostatischen Therapien zusammen.

Tabelle 15: Therapie

neoadjuvante CTX	13
adjuvante CTX	66
adjuvante Hormontherapie	56
adjuvant Trastuzumab	8
adjuvante RTX	68
Mediane palliative Hormontherapielinien (Bereich)	2 (0-4)
Mediane palliative CTX-Linien (Bereich)	3 (0-10)
Mediane Behandlungslinien für das metastasierte Mammakarzinom (Bereich)	6 (0-12)

CTX: Chemotherapie, RTX: Strahlentherapie

3.2 Prognose für die Gesamtpopulation

3.2.1 mediane Überlebenszeiten der Gesamtpopulation

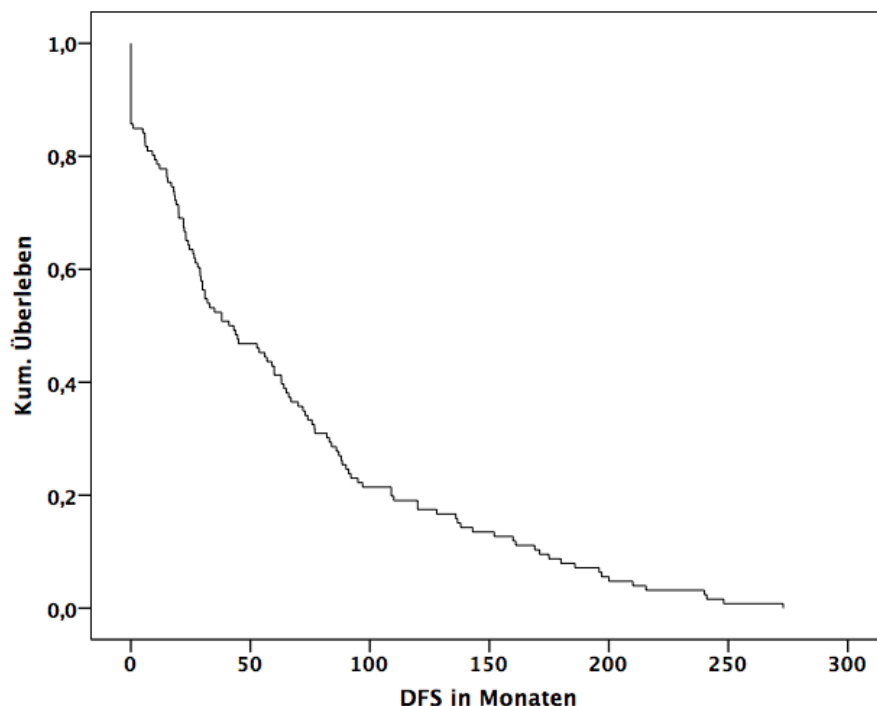
Das mediane krankheitsfreie Überleben (DFS) lag im Patientenkollektiv bei 41 Monaten (21,9 bis 60,2) (Tabelle 16). Das Gesamtüberleben (OS) nach Erstdiagnose betrug 131,1 Monate (111,4 bis 150,7) und das mediane Überleben nach Metastasierung (MST_{pal}) 58,1 Monate (42,5-73,7). Die 1-Jahres-Überlebensrate lag bei 90,2%, die 3-Jahres-Überlebensrate lag bei 70,7% und die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 34,6%.

Tabelle 16: Überlebenszeiten

DFS in Monaten	41 (21,9-60,2)
OS seit Erstdiagnose in Monaten	131 (111,4-150,7)
MST _{pal} seit Metastasierung in Monaten	58,1 (42,5-73,7)

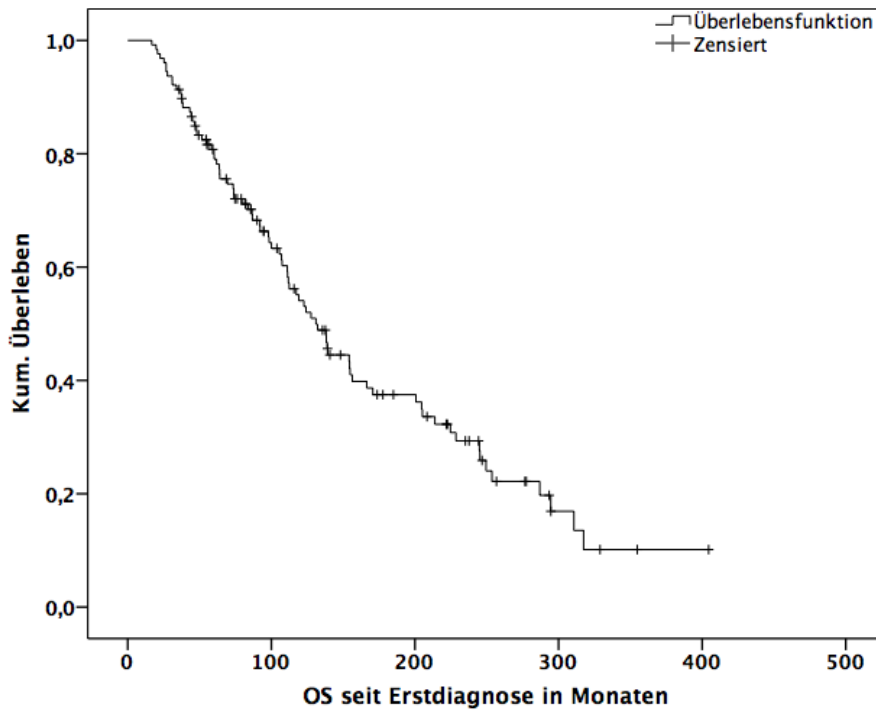
DFS: Medianes krankheitsfreies Überleben, OS: Medianes Gesamtüberleben nach Erstdiagnose, MST_{pal}: Medianes Überleben nach Metastasierung

Abb. 2: Medianes krankheitsfreie Überleben (DFS)



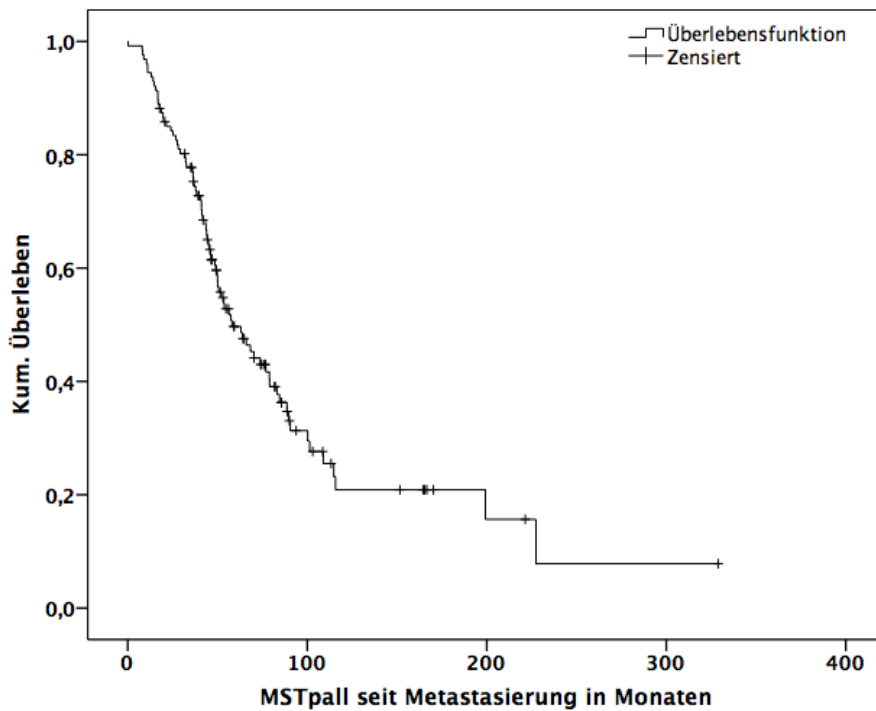
Legende: Kaplan-Meier Kurve des DFS der Gesamtpopulation

Abb. 3. Gesamtüberleben seit Erstdiagnose (OS)



Legende: Kaplan-Meier Kurve des OS seit Erstdiagnose der Gesamtpopulation

Abb. 4: Medianes Überleben seit Metastasierung (MST_{pall})

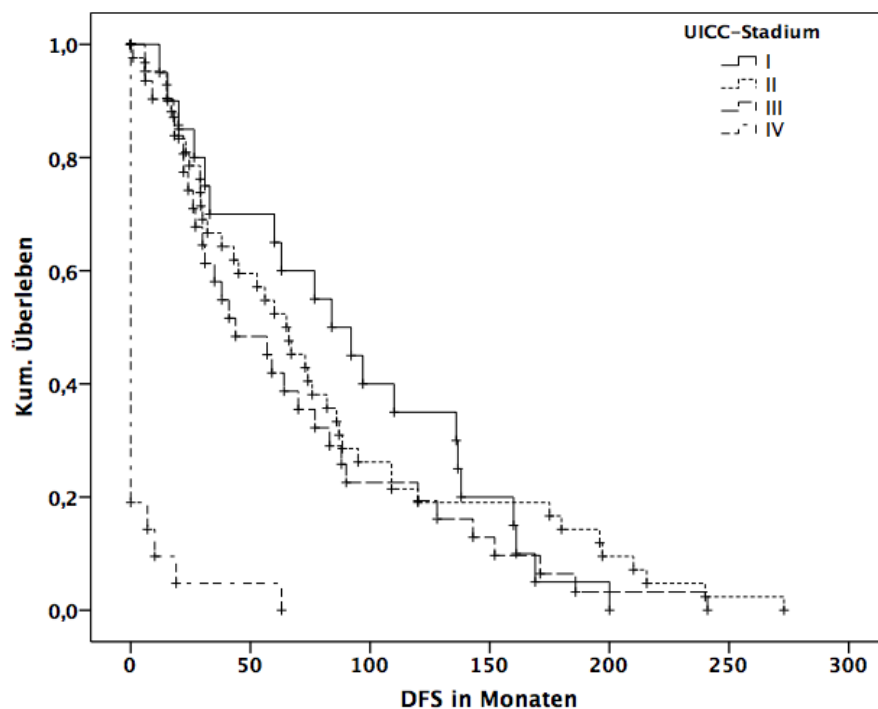


Legende: Kaplan-Meier Kurve des MST_{pall} seit Metastasierung der Gesamtpopulation

3.2.2 Medianes krankheitsfreies Überleben (DFS) und Gesamtüberleben nach Metastasierung (MST_{palI}) nach UICC

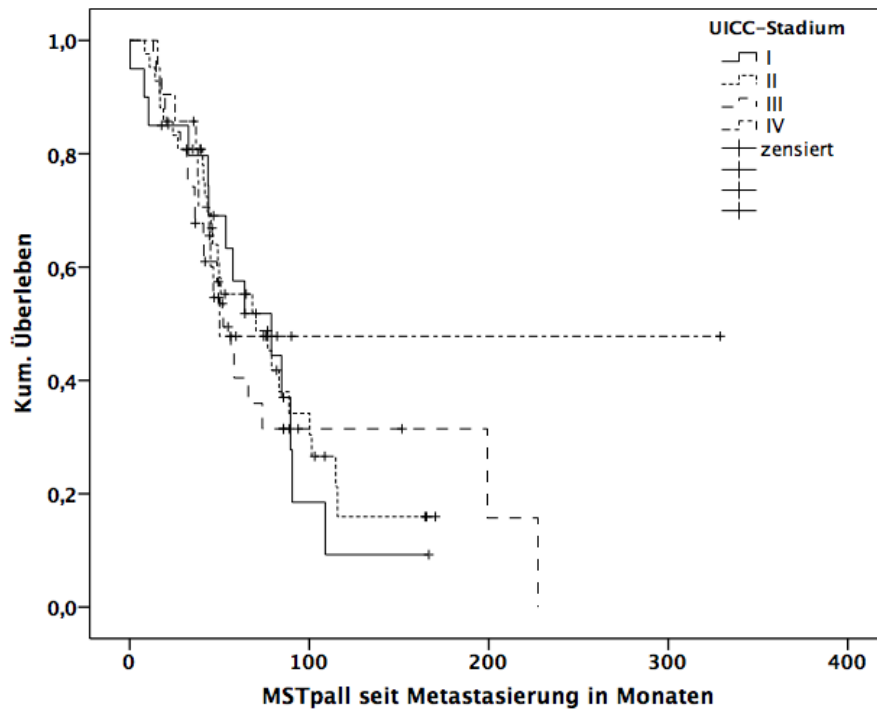
Das mediane krankheitsfreie Überleben (DFS) wurde als Zeitraum zwischen Erstdiagnose des Primarius und dem Zeitpunkt der ersten Metastasierung definiert. Das mediane krankheitsfreie Überleben aufgeschlüsselt nach den UICC-Stadien zeigte, dass Tumoren, die in früheren Stadien erkannt wurden, ein signifikant längeres DFS aufwiesen ($p < 0,001$, Logrank) (Abb. 5): Im Stadium I lag die Zeitspanne bis zum Eintritt der Metastasierung bei 84 Monaten, im Stadium II bei 65 und im Stadium III nach UICC bei 44 Monaten. Einige Patientinnen im initialen Stadium IV wurden kurativ mittels Metastasektomie oder Bestrahlung solitärer Metastasen behandelt und entwickelten im Verlauf ein Rezidiv. Das DFS aller Patientinnen unabhängig vom UICC-Stadium ergab 41 Monate. Interessanterweise unterschied sich das Gesamtüberleben nach Eintritt einer Metastasierung der Patientinnen nicht in Abhängigkeit des initialen UICC Stadiums (Abb. 6).

Abb. 5: Medianes krankheitsfreies Überleben



Legende: Kaplan-Meier Kurve des medianen DFS nach UICC

Abb. 6: Medianes Gesamtüberleben nach Metastasierung



Legende: Kaplan-Meier Kurve des medianen MST_{pall} nach UICC

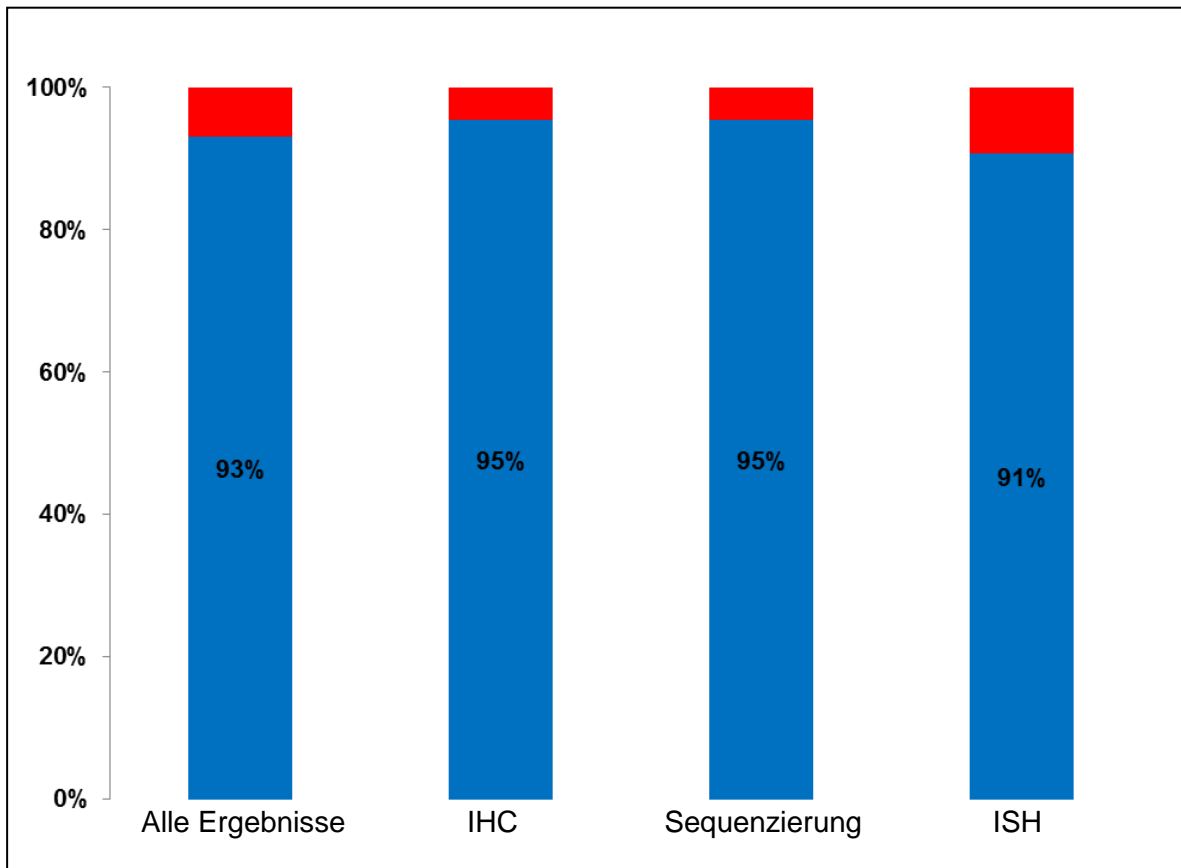
3.3. Biomarkeranalyse

3.3.1 Tumormaterial und Durchführbarkeit

Die Analyse der etablierten Biomarker (Hormonrezeptoren und HER2/neu-Überexpression), sowie der experimentellen Biomarker (*PIK3CA*-Mutation und -Amplifikation, PTEN-Expression und *FGFR1*-Amplifikation) erfolgte mittels Immunhistochemie (IHC), Sequenzierung, oder *in situ* Hybridisierung (ISH). Im Durchschnitt erfolgte die Durchführung der Analysen 78,2 Monate (4,8-367,2) nach Erstdiagnose und 28,3 Monate (0-203,4) nach Eintritt einer Metastasierung. In 70 Fällen wurden Metastasen und in 52 Fällen Proben des Primärtumors untersucht (Tabelle 18). In 9 Fällen gab es keine Angaben hinsichtlich der Herkunft des Tumormaterials. Aufgrund insuffizienten Probenmaterials gelang nicht in allen Tumorproben eine komplette Analyse der Biomarker. Eine vollständige Analyse gelang in 93% der Fälle (122 Patientinnen). Die immunhistochemische Untersuchung von PTEN, der Hormonrezeptoren und der HER2/neu-Überexpression erfolgte bei 125 Patientinnen (95%). Die Mutationsanalyse des *PIK3CA*-Gens gelang ebenfalls in 95% der Fälle. Den limitierenden Faktor stellte somit

die *in-situ*-Hybridisierung dar, so konnte bei lediglich 119 Patientinnen (91%) *FGFR1* und *PIK3CA*-Amplifikationen analysiert werden. (Abb. 5).

Abb. 7: Durchführbarkeit der Biomarkeranalysen



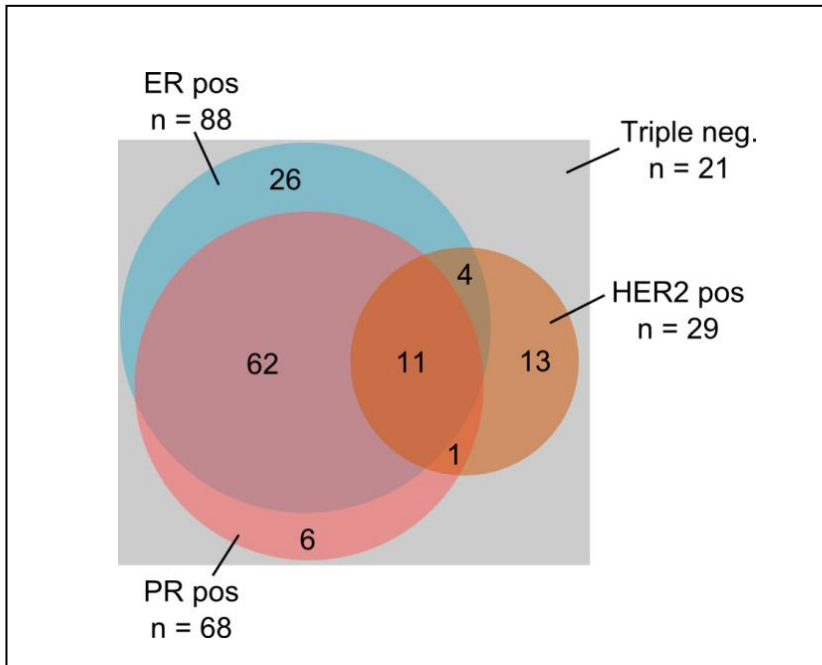
Legende: Durchführbarkeit mittels Immunhistochemie (IHC bei PTEN, HR und HER2/neu), Sequenzierung (*PIK3CA*-Mutation) und *in-situ*-Hybridisierung (ISH bei *FGFR1*, *PIK3CA*-Amplifikation und HER2/neu). Graphik modifiziert nach Welt *et al.* (Welt *et al.*, 2013)

3.3.2 Prävalenz etablierter Biomarker im Patientenkollektiv

Wie beschrieben erfolgte die Biomarkeranalyse in der vorliegenden Studie an der zeitlich vor Einschluss in die Studie am kürzesten zurückliegenden gewonnenen Tumorbiopsie (Primarius/Metastase). Insgesamt konnte eine Expression des Östrogenrezeptors (ER) in 88, eine Expression des Progesteronrezeptors (PR) in 68 und eine Überexpression/Amplifikation des HER2/neu Rezeptors in 29 Tumorproben detektiert werden. Bei 21 Tumorproben konnte keine Expression bzw. Überexpression/Amplifikation einer der drei bekannten Rezeptoren nachgewiesen werden (triple negativ). Eine

Koexpression des ER und des PR zeigte sich bei 62 Tumorproben und eine Koexpression der Hormonrezeptoren und des HER2/neu-Rezeptors in 16 Tumorproben.

Abb. 8: Verteilung der etablierten Biomarker



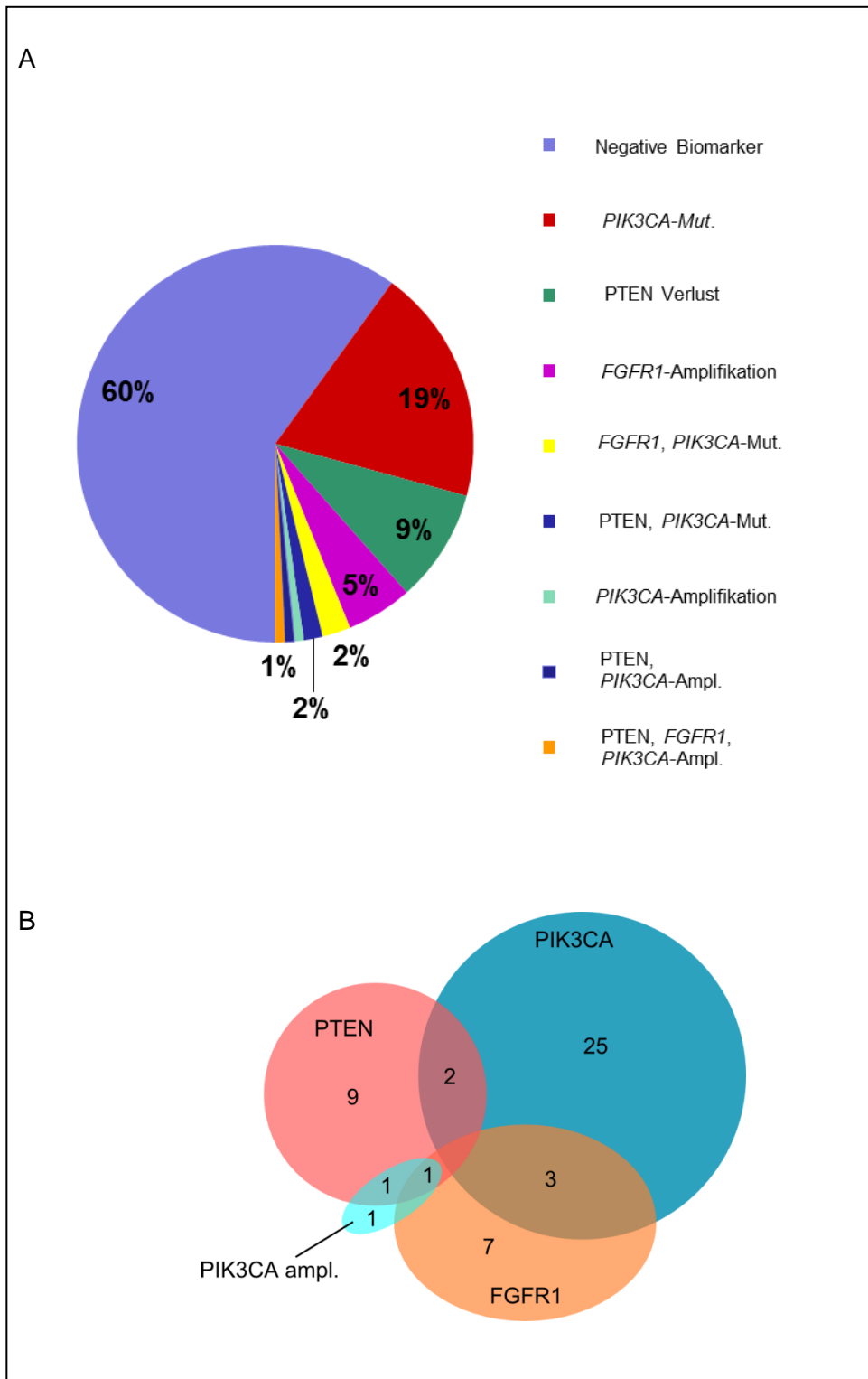
Legende: Absolute Verteilung und Koexpression der etablierten Biomarker
 Graphik modifiziert nach Welt *et al.* (Welt *et al.*, 2013)

3.4. Experimentelle Biomarker

3.4.1 Prävalenz der experimentellen Biomarker

Bei 52 von 131 analysierten Tumorproben (40%) konnte mindestens einer der experimentellen Biomarker nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich eine Häufung der experimentellen Biomarker in HR bzw. HER2/neu positiven Tumorproben. In dieser Subgruppe konnte in 88% der Fälle eine Expression eines der neuen Biomarker detektiert werden. Unter den experimentellen Biomarkern waren somatische Mutationen von *PIK3CA* am häufigsten vertreten (23%, Abb. 9A). Ein Verlust der PTEN-Expression konnte in 13% der Fälle, eine Amplifikation von *PIK3CA* in 3% und eine Amplifikation des *FGFR1* in 8% der Fälle nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei den HR- bzw. des HER2/neu-Rezeptors gab es auch bei den experimentellen Biomarkern eine Koexpression verschiedener Marker. (Abb. 9A und B).

Abb. 9 Verteilung der experimentellen Biomarker



Legende: A) Prozentuale Verteilung der experimentellen Biomarker; B) Absolute Verteilung und Überschneidungen der experimentellen Biomarker. Graphik modifiziert nach Welt *et al.* (Welt *et al.*, 2013)

3.4.2 Lokalisation der *PIK3CA*-Mutationen

PIK3CA-Mutationen konnten bei 30 Patientinnen in den sogenannten „hot-spot“-Regionen nachgewiesen werden (23%). Die häufigste Mutation betraf Exon 20 und führte zu einem Aminosäureaustausch im Bereich der Kinaseregion von p110 α an Position 1047 von Histidin zu Arginin (50%) (H1047R). Die anderen Mutationen betrafen Exon 9 und führten zu den Aminosäureaustauschen von Glutamat zu Lysin an Position 545 (E545K) (26,7%) oder an Position 542 (E542K) (13,3%).

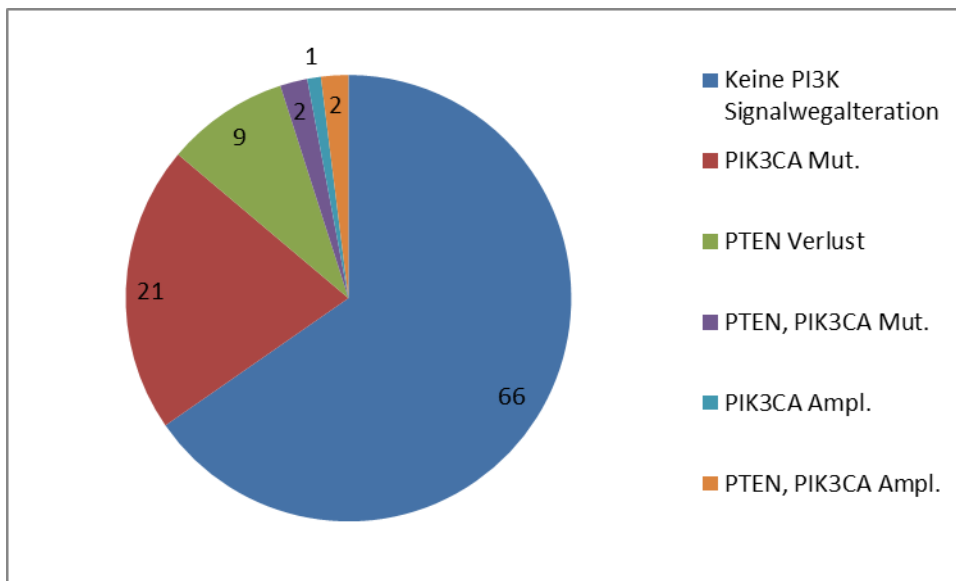
Tabelle 17: Aminosäuresubstitution der *PIK3CA*

Aminosäuresubstitution	Exon	%
H1047R	20	50,0
E545K	9	26,7
E542K	9	13,3
H1047L	20	10,0

3.4.3 Alterationen im PI3K/AKT Signalweg

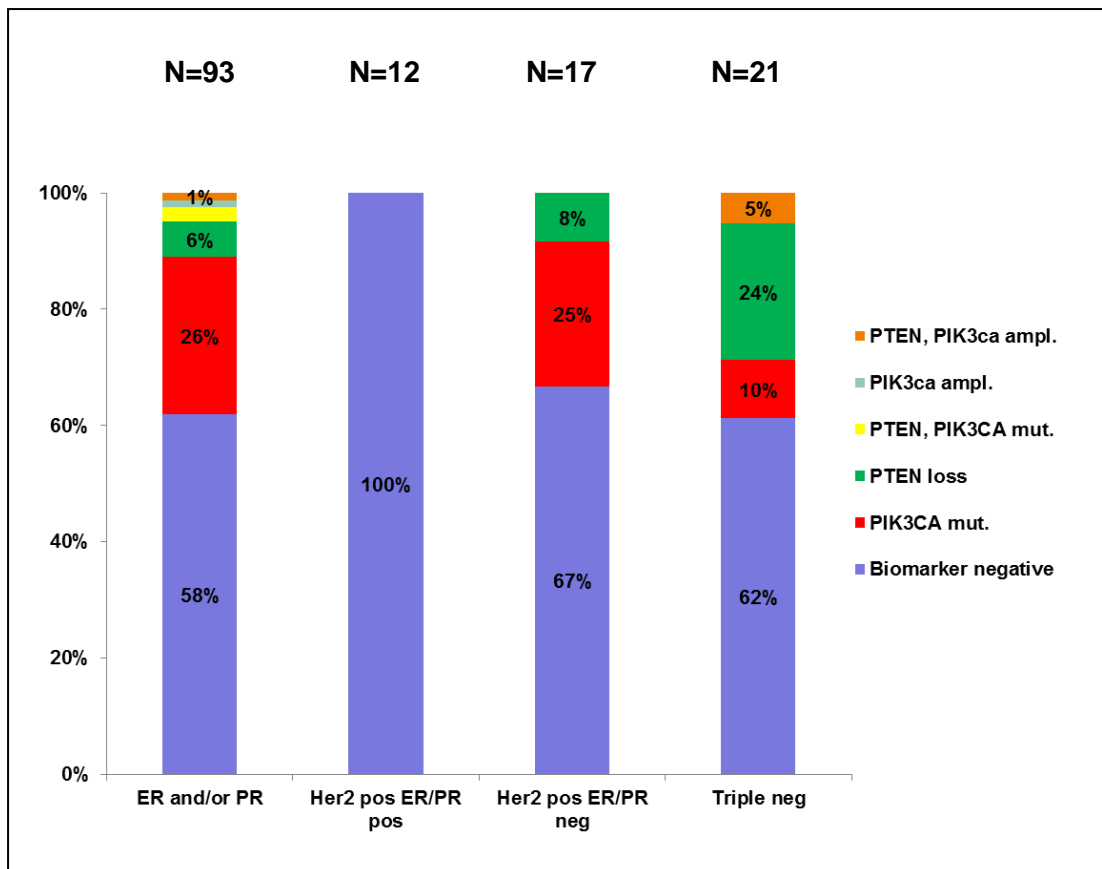
Ein besonderer Fokus der Studie lag auf Veränderungen, die zu einer Aktivierung des PI3K/AKT- Signalweges führen. Hierzu zählen *PIK3CA*-Mutationen oder -Amplifikationen sowie ein Verlust der PTEN Expression (Abb.1). Mindestens eine dieser Veränderungen wurde bei 35% der Patientinnen nachgewiesen (Abb. 10). Eine Mutation von *PIK3CA* ließ sich häufig in Hormonrezeptor-positiven (26%) und in HER2/neu-positiven (25%) Tumoren nachweisen (Abb.11). In triple negativen Tumoren (HR- und HER2/neu negativ) wurde diese Mutation vergleichsweise selten detektiert (10%). In diesen Karzinomen dominierte unter den experimentellen Biomarkern der Verlust der PTEN-Proteinexpression (24%). In Hormonrezeptor- bzw. HER2/neu-positiven Tumoren zeigte sich lediglich in 6-8% ein Verlust der PTEN-Expression. Auffallend ist, dass bei einer Koexpression von Hormonrezeptoren und HER2/neu keine Veränderungen im PI3K/AKT-Signalweg nachgewiesen werden konnten.

Abb. 10: Alterationen im PI3K/AKT Signalweg



Legende: *PIK3CA* Mut.: *PIK3CA*-Mutation, *PIK3CA* Ampl.: *PIK3CA*-Amplifikation, PTEN Verlust: Verlust der PTEN-Expression. Bedingt durch Rundungsfehler erhält man ein Gesamtergebnis von 101%. Graphik modifiziert nach Welt *et al.* (Welt *et al.*, 2013)

Abb.11: Alterationen im PI3K/AKT Signalweg in Bezug auf den Rezeptorstatus



Legende: Prozentuale Verteilung der Alterationen im PI3K/AKT Signalweg in Bezug auf den Rezeptorstatus. PIK3CA- mut.: *PIK3CA*-Mutation, PIK3CA ampl.: *PIK3CA*-Amplifikation, PTEN: Verlust der PTEN-Expression. Graphik modifiziert nach Welt *et al.* (Welt *et al.*, 2013)

3.4.4 Prävalenz der Biomarker im Tumorgewebe des Primarius und der Metastase

Mutationen der *PIK3CA* wurden statistisch signifikant häufiger in Tumorproben aus Metastasen (30%) als aus dem Primärtumor (13,5%) gefunden ($p=0,034$, Chi-Quadrat). Eine unregelmäßige Verteilung weiterer Biomarker (sowohl der etablierten, als auch der experimentellen) zeigte sich nicht ($p>0,05$; Tabelle 18).

Tabelle 18: Prävalenz der Biomarker in Primärtumoren und Metastasen

	Primärtumor		Metastase		p (χ -square)
	N	% positiv	N	% positiv	
Alle	52		70		
PR	30	57,7	35	50,0	0,320
ER	34	65,4	49	70,0	0,509
HR	37	71,2	52	74,3	0,700
HER2/neu+	13	25,0	15	21,4	0,629
HER2/neu-/HR+	28	53,8	45	64,3	0,308
HER2/neu+/HR+	9	17,3	6	8,6	0,249
HER2/neu+/HR-	4	7,7	9	12,9	0,441
Tripple negativ	11	21,2	9	12,9	0,221
FGFR1-Amplifikation	6	11,5	3	4,3	0,246
PIK3CA-Mutation	7	13,5	21	30	0,034*
PIK3CA-Amplifikation	1	1,9	2	2,9	0,471
PTEN Verlust	7	13,5	9	12,9	0,138

* Kennzeichnet statistisch signifikante Ergebnisse

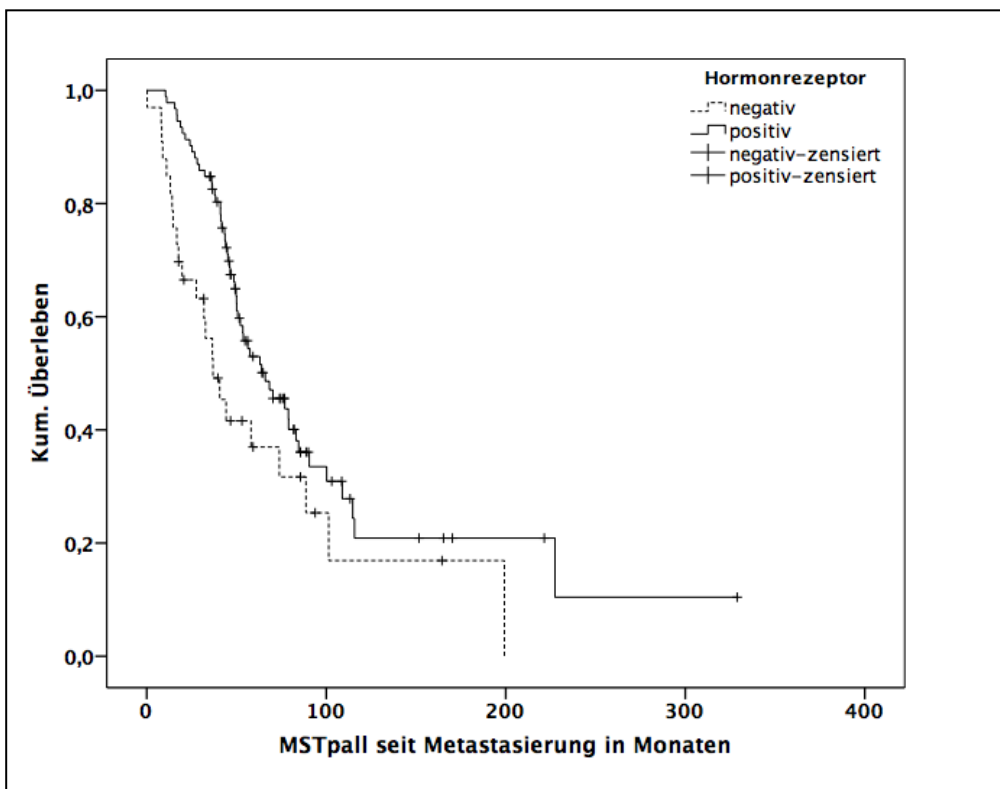
Legende: Tabelle modifiziert nach Welt *et al.* (Welt *et al.*, 2013)

3.5 Prognose in Abhängigkeit der Biomarker

3.5.1 Prognostische Bedeutung der Hormonrezeptorexpression

Patientinnen mit Hormonrezeptor positiven Tumoren hatten ein statistisch signifikant verlängertes medianes Überleben nach Eintritt einer Metastasierung (MST_{pall}) als Patientinnen mit Hormonrezeptor-negativen Tumoren (66 vs. 36,9 Monaten; $p=0,02$; log-rank) (Abb. 12). Dies entsprach einer Risikoreduktion an einem bestimmten Zeitpunkt zu versterben von 43% entsprechend einer Hazard Ratio von 0,57 (KI: 0,346-0,921; $p=0,028$) (Abb. 15).

Abb. 12: Einfluss der Hormonrezeptoren auf das Gesamtüberleben seit Metastasierung (MST_{pall})

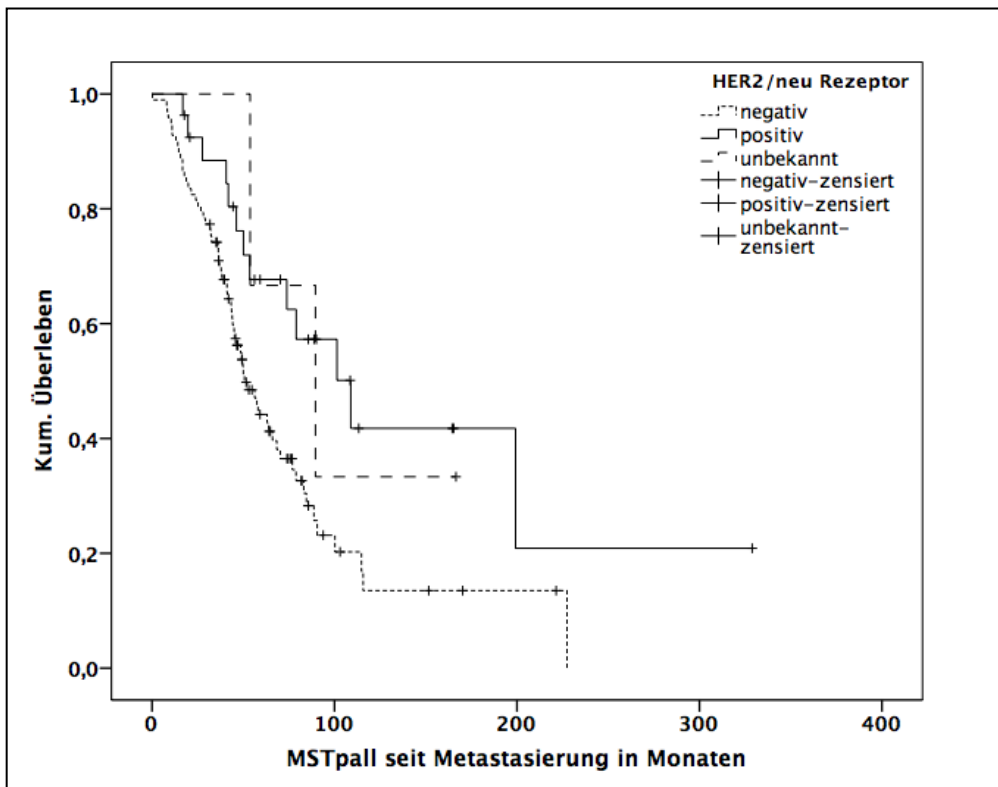


Legende: Kaplan-Meier Kurve des MST_{pall} in Bezug auf den Hormonrezeptorstatus. Medianes MST_{pall} : HR-negativ: 36,9 Monate. HR-positiv: 66,0 Monate; $p=0,02$ (Logrank)

3.5.2 Prognostische Bedeutung der HER2/neu-Rezeptor-expression

Patientinnen mit HER2/neu überexprimierenden Tumoren hatten ein statistisch signifikant verlängertes medianes Überleben (MST_{pall}) seit Metastasierung (108,9 vs. 50,7 Monate; $p=0,024$; Log rank). Dies entsprach einer Risikoreduktion an einem bestimmten Zeitpunkt zu versterben von 48% entsprechend einer Hazard Ratio von 0,527 (KI: 0,319-0,872; $p=0,013$) (Abb. 15). Bei unbekanntem HER2/neu-Rezeptorstaus betrug das MST_{pall} 89,6 Monate (Abb. 13).

Abb. 13: Einfluss der HER2/neu-Überexpression auf das Gesamtüberleben seit Metastasierung (MST_{pall})

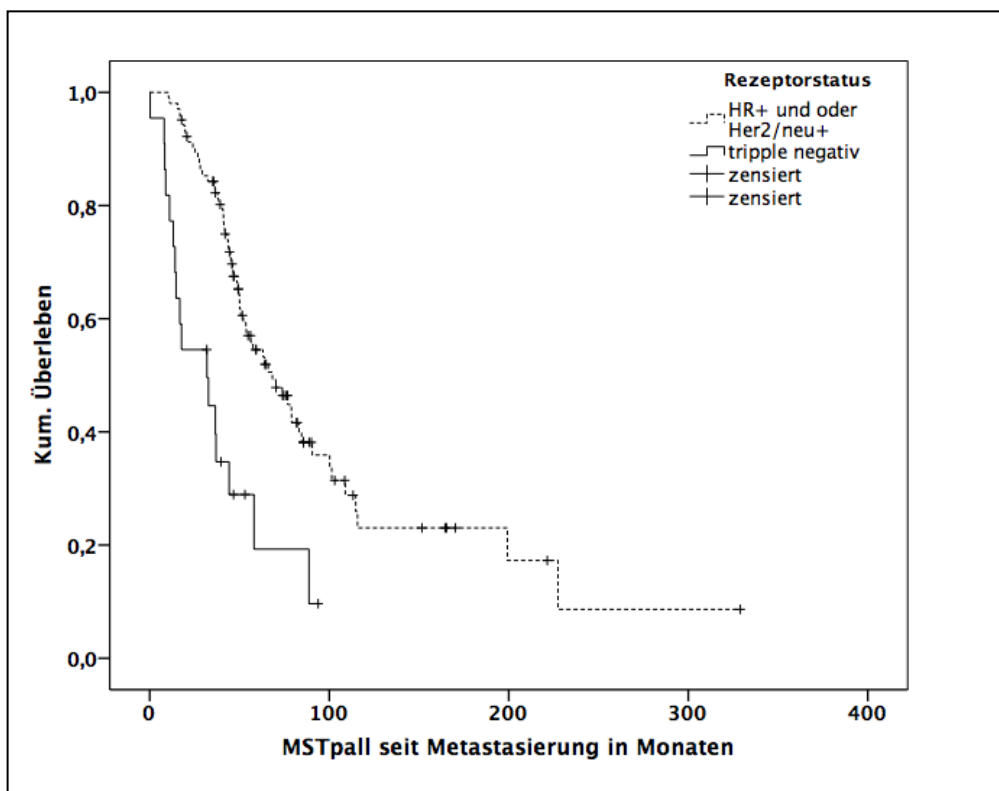


Legende: Kaplan-Meier Kurve des MST_{pall} in Bezug auf die HER2/neu-Überexpression: HER2/neu-negativ: 50,7 Monate. HER2/neu-positiv: 108,9 Monate. Unbekannt: 89,6 Monate, $p=0,024$ (Logrank)

3.5.3 Prognostische Bedeutung triple negativer-Tumoren

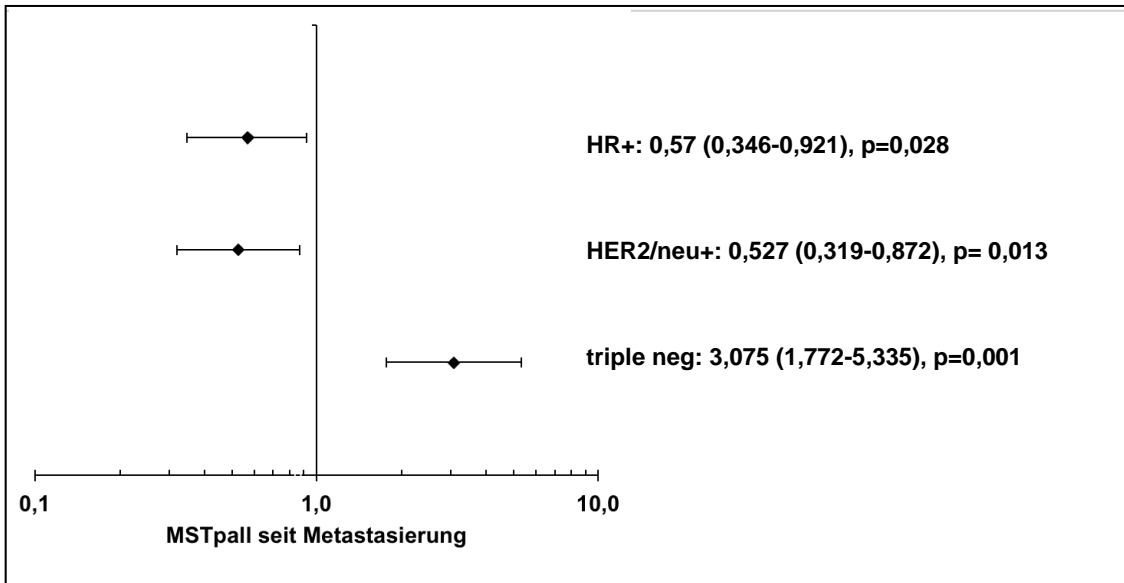
Patientinnen mit triple-negativen Tumoren hatten ein statistisch signifikant verkürztes medianes Überleben seit Metastasierung von 31,9 Monaten gegenüber Patientinnen mit HR positiven und/oder den HER2/neu-positiven Tumoren (65,3 Monaten; $p < 0,001$, Log-rank) (Abb.14). Dies entsprach einem dreifach erhöhten Risiko an einem bestimmten Zeitpunkt zu versterben entsprechend einer Hazard Ratio von 3,075 (KI: 1,772-5,335; $p < 0,001$) (Abb.15).

Abb. 14: Prognostische Bedeutung triple negativer-Tumoren auf das Gesamtüberleben nach Metastasierung (MST_{pall})



Legende: Kaplan-Meier Kurve des MST_{pall} in Bezug auf triple-negative Tumoren: triple neg.: 31,9 Monate. Nicht triple neg.: 65,3 Monate, $p < 0,001$ (Logrank)

Abb.15: Einfluss der etablierten Rezeptoren auf die Überlebenswahrscheinlichkeit

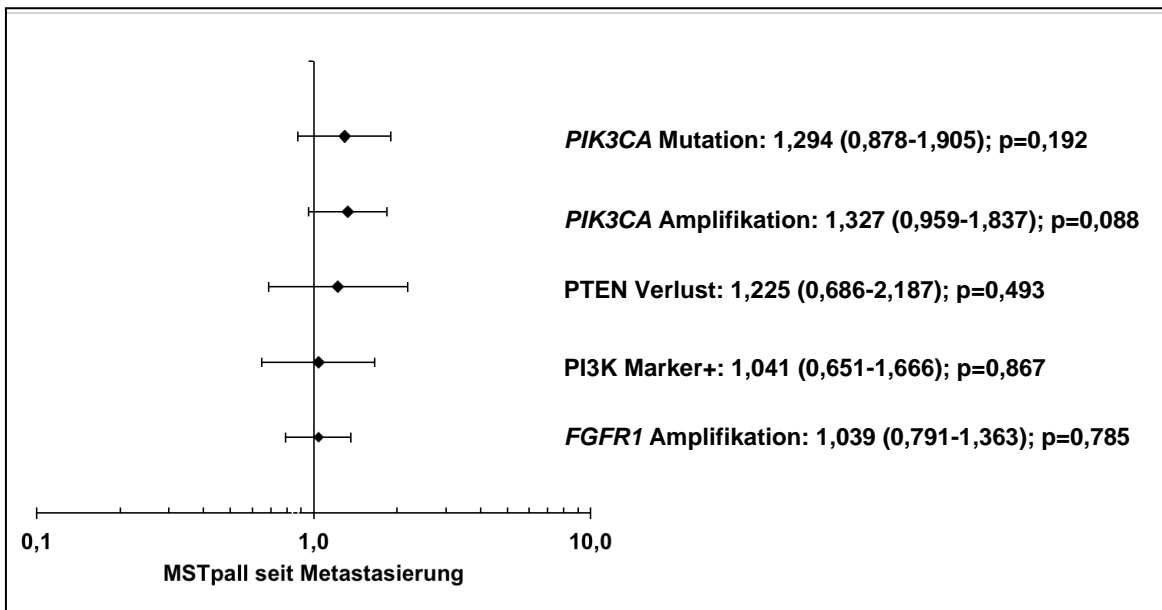


Legende: Forrest-plot der Hazard Ratios (HR) für das mediane Überleben seit Metastasierung (MST_{pall}) mit p-Werten der univariaten Cox-Regression.

3.5.4 Prognostische Bedeutung der experimentellen Biomarker

In der univariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich keine Beeinflussung des medianen Überlebens seit Metastasierung (MST_{pall}) durch einen der analysierten Biomarker. Einen Trend zu einem erhöhten Risiko an einem bestimmten Zeitpunkt zu versterben zeigten nur Patientinnen mit Tumoren, die eine *PIK3CA*-Amplifikation aufwiesen, entsprechend einer Hazard Ratio von 1,328 (KI: 0,959-1,837; p=0,088) (Abb. 16). Aufgrund der geringen Patientenzahl mit dieser Veränderung (N=3) sind die Ergebnisse jedoch mit Vorsicht zu betrachten.

Abb.16: Prognostische Bedeutung der experimentellen Biomarker

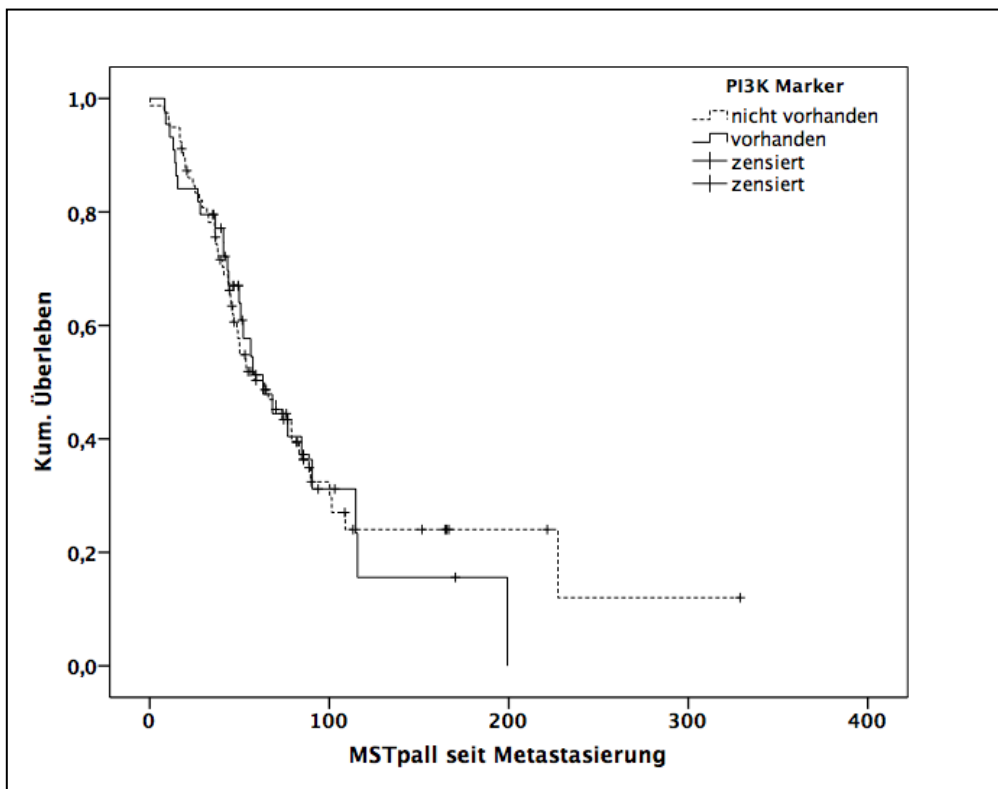


Legende: Forrest-plot der Hazard Ratios (HR) für das Überleben seit Metastasierung (MST_{pall}) mit p-Werten der univariaten Cox-Regression. PI3K-Marker beinhaltet *PIK3CA*-Mutation und –Amplifikation sowie PTEN-Verlust.

3.5.5 Prognostische Bedeutung von Alterationen des PI3K/AKT-Signalweges

Da der besondere Fokus der Studie auf Alterationen des PI3K/AKT-Signalweges lag, wurden Patientinnen mit Tumoren, die Mutationen oder Amplifikationen von *PIK3CA* oder einen Verlust der PTEN-Expression aufzeigten, in einer Gruppe zusammengefasst und die prognostische Bedeutung dieser Alterationen herausgearbeitet. Patientinnen mit Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg hatten ein fast identisches medianes Überleben seit Metastasierung (MST_{pall}) wie Patientinnen ohne Alteration (63 vs. 64 Monate, p=0,867; Log rank) (Abb.17).

Abb. 17: Prognostische Bedeutung von Alterationen des PI3K-Signalweges



Legende: Kaplan-Meier Kurve des MST_{pall} in Bezug auf Alterationen des PI3K/AKT-Signalweges: positiver PI3K-Marker: 63,0 Monate; negativer PI3K-Marker: 64,0 Monate, $p=0,867$ (log rank). Positiver PI3K-Marker beinhaltet: *PIK3CA*-Mutationen und – Amplifikationen sowie PTEN-Verlust.

3.5.6 Prognostische Bedeutung von Alterationen des PI3K/AKT-Signalweges in verschiedenen Subgruppen

Um die prognostische Bedeutung der experimentellen Biomarker in Subgruppen mit bekannten prognostischen Markern zu analysieren, erfolgten separate Auswertungen in Patientinnen mit HR-positiven, HER2/neu-überexprimierenden und triple negativen Tumoren. Patientinnen mit HR-positiven Tumoren hatten ein verkürztes medianes Überleben seit Metastasierung (MST_{pall}), wenn gleichzeitig eine *PIK3CA*-Mutation vorlag, im Vergleich zu Patientinnen mit Tumoren ohne *PIK3CA*-Mutation (63 vs. 68,3 Monate; $p=0,001$, Log rank) (Tabelle 19). Dies entsprach einem 1,7-fach erhöhten Risiko an einem bestimmten Zeitpunkt zu versterben, entsprechend einer Hazard Ratio von 1,717 (KI 1,090-2,704; $p=0,020$). In der Subgruppe mit HR-positiven Tumoren hatte ebenfalls der *PIK3CA*-Amplifikationsstatus einen negativen Einfluss auf die Prognose. So zeigten Patientinnen mit HR-positiven Tumoren, bei denen gleichzeitig eine *PIK3CA*-Amplifikation

vorlag, ein deutlich verkürztes MST_{pall} als Patientinnen mit Tumoren ohne Nachweis einer Amplifikation (35,6 vs. 68,3 Monate; $p=0,003$) (Tabelle 19). Keine prognostische Bedeutung konnte für den Verlust der PTEN-Expression oder der *FGFR1*-Amplifikation in Patientinnen mit HR- positiven Tumoren beobachtet werden. Bei Patientinnen mit HER2/neu- überexprimierenden Tumoren zeigte sich eine prognostische Bedeutung der *PIK3CA*-Mutation. Patientinnen mit HER2/neu-überexprimierenden und *PIK3CA* mutierten Tumoren hatten jedoch ein verlängertes medianes MST_{pall} (199,2 vs 101,4 Monate; $p=0,001$) (Tabelle 19), wobei zu berücksichtigen ist, dass nur zwei Patienten mit Her2/neu-positiven Tumoren eine *PIK3CA* Mutation aufwiesen. Aufgrund der geringen Fallzahl war eine Auswertung für den *PIK3CA*-Amplifikationsstatus, den PTEN- Verlust und den *FGFR1*- Amplifikationsstatus in der Gruppe der Her2/neu- positiven Tumoren nicht möglich. In der Subgruppe der Patientinnen mit Tumoren, die entweder einen HR exprimierten und/oder den HER2/neu Rezeptor überexprimierten, hatten *PIK3CA*- Mutationen interessanter Weise ebenfalls einen positiven prognostischen Stellenwert. So hatten diese Patientinnen bei gleichzeitigem Vorliegen einer *PIK3CA*- Mutation ein verlängertes MST_{pall} von 76,9 Monaten gegenüber 70,3 Monaten ohne Nachweis einer Mutation ($p=0,001$, Log-rank) (Tabelle 19). *PIK3CA*-Amplifikationen hingegen hatten erneut einen negativen prognostischen Einfluss in dieser Patientensubgruppe. So hatten Patientinnen mit *PIK3CA*-amplifizierten Tumoren ein im Trend verkürztes MST_{pall} von 41,1 Monaten im Vergleich zu Patientinnen ohne Nachweis einer *PIK3CA*-Amplifikation (73,9 Monate; $p=0,113$, Log-rank) (Tabelle 19). Dies entsprach einem 1,5 fach erhöhten Risiko an einem bestimmten Zeitpunkt zu versterben entsprechend einer Hazard Ratio von 1,520 (KI 1,001-2,308; $p=0,05$). Weder ein Verlust der PTEN Expression noch eine *FGFR1*-Amplifikation hatte einen Einfluss auf das MST_{pall} in der Patientensubgruppe mit HR-Expression und/oder HER2/neu-Überexpression.

In der Subgruppe der Patientinnen mit triple negativen Mammakarzinomen hatten Patientinnen mit *PIK3CA*-Mutationen ein im Trend verkürztes MST_{pall} von 8,9 Monaten vs 31,9 Monaten ohne Nachweis einer *PIK3CA*-Mutation ($p=0,126$, Log-rank). Patientinnen mit „triple negativen“ Mammakarzinomen und gleichzeitiger *PIK3CA*-Amplifikation hatten ebenfalls ein im Trend verkürztes MST_{pall} von 8,3 Monaten im Vergleich zu Patientinnen ohne Amplifikation (17,7 Monaten, $p=0,051$, Log-rank). Die übrigen Marker PTEN-Verlust und *FGFR1*-Amplifikation hatten keine prognostische Wertigkeit bei Patientinnen mit einem „triple negativen“ Mammakarzinom.

Tabelle 19: Prognostische Bedeutung der experimentellen Biomarker in Subgruppen mit bekannten prognostischen Faktoren

	HR-positiv	HER2/neu-positiv	HR- und oder HER2/neu-positiv	triple neg.
PIK3CA-Mutation vs. Wildtyp	63 vs. 68,3 Monate; p=0,001*	199,2 vs. 101,4 Monate; p=0.001*	76,9 vs. 70,3 Monate, p=0,001*	8,9 vs. 31,9 Monate; p=0,126
HR (KI 95%)	1,717 (1,090-2,704); p=0,020*	2,171 (0,869-5,426); p=0,097	1,528 (0,973-2,398); p=0,066**	0,773 (0,356-1,681); p=0,516
PIK3CA Amplifikation vs. keine Amplifikation	35,6 vs. 68,3 Monate; p=0,003*	Nicht genügend Fälle mit PIK3CA-Amplifikation	41,1 vs. 73,9 Monate; p=0,113	8,3 vs. 17,7 Monate; p=0,051**
HR (KI 95%)	1,700 (1,158-2,496); p=0,007*		1,520 (1,001-2,308); p=0,050*	0,829 (0,456-1,505); p=0,537
PTEN-Verlust vs. kein Verlust	76,9 vs. 66,0 Monate; p=0,113	Nicht genügend Fälle mit PTEN-Verlust	76,9 vs. 70,3 Monate; p=0,103	n.a. (zu wenige Ereignisse)
HR (KI 95%)	1,690 (0,843-3,384); p=0,139		1,681 (0,832-3,397); p=0,148	1,332 (0,534-3,326); p=0,539
Pi3K-Marker vs. kein Marker	63,0 vs. 70,3 Monate; p=0,697	199,2 vs. 101,4 Monate; p=0.532	68,3 vs. 70,3 Monate; p=0,932	31,9 vs. 14,7 Monate; p=0,692

HR (KI 95%)	1,118 (0,639- 1,956); p=0,697	1,115 (0,569- 2,185); p=0,752	1,024 (0,599- 1,750); p=0,932	0,817 (0,301- 2,223); p=0,693
<i>FGFR1</i>-Amplifikation vs. keine Amplifikation	49,1 vs. 78,9 Monate; p=0,490	Nicht genügend Fälle mit <i>FGFR1</i> - Amplifikation	49,1 vs. 78,9 Monate; p=0,596	17,7 vs. 32,7 Monate; p=0,997
HR (KI 95%)	1,164 (0,855- 1,586); p=0,335		1,088 (0,805- 1,471); p=0,582	0,999 (0,471- 2,115); p=0,997

Legende: *statistisch signifikant, **Trend

3.6 Prädiktive Bedeutung der experimentellen Biomarker auf die Wirksamkeit verschiedener antitumorale Therapien

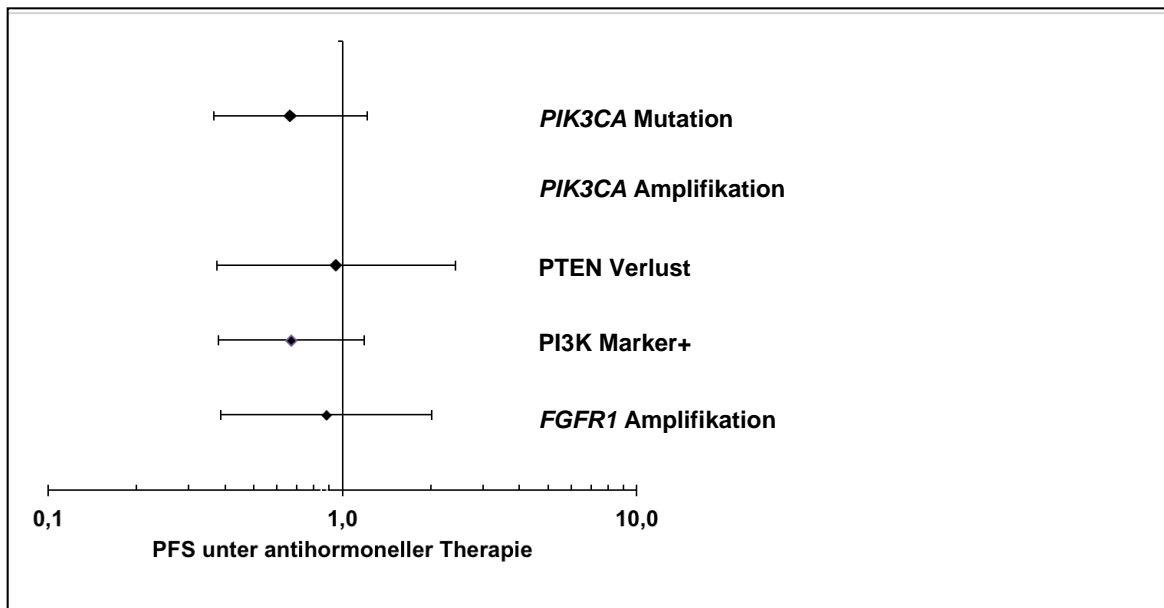
3.6.1 Antihormonelle Therapie

Um den Einfluss der verschiedenen Biomarker auf die Wirksamkeit einer antihormonellen Therapie zu untersuchen, wurden nur die Patientinnen ausgewählt, die in den durchgeführten Biomarkeranalysen einen positiven Hormonrezeptorstatus hatten und der Mutations-, Amplifikation- bzw. Expressionstatus des untersuchten Biomarkers analysiert werden konnte. Dies traf für 59 der 131 Patientinnen zu. Da häufig bei Progress unter einer antihormonellen Therapie ein Wechsel auf eine andere antihormonelle Substanz erfolgte, untersuchten wir sowohl das progressionsfreie Überleben (PFS) unter Erstlinientherapie als auch das Gesamt-PFS unter der antihormonellen Therapie. Keiner der untersuchten Marker hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf das PFS unter einer antihormonellen Therapie, wobei das Gesamt-PFS unter einer antihormonellen Therapie bei Patientinnen mit *PI3KCA*-mutierten Tumoren numerisch deutlich länger war als bei Patientinnen ohne Nachweis einer Mutation.

Tabelle 20: Prädiktive Bedeutung der experimentellen Biomarker auf eine antihormonelle Therapie

	PFS 1. Linie	HR 1. Linie (95% KI)	PFS gesamt	HR gesamt (95% KI)
<i>PIK3CA</i>-Mutation vs. Wildtyp	14,95 vs.10,0 Monate; p=0,355	0,756 (0,415- 1,375); p=0,359	23,98 vs.13,0 Monate; p=0,177	0,664 (0,365- 1,209); p=0,181
<i>PIK3CA</i>-Amplifikation vs. keine Amplifikation	Nicht genügend Fälle mit <i>PIK3CA</i> - Amplifikation			
PTEN-Verlust vs. kein Verlust	11,0 vs.10,0 Monate; p=0,235	0,564 (0,216- 1,478); p=0,244	13,01 vs.16,95 Monate; p=0,912	0,949 (0,373- 2,417); p=0,913
Pi3K-Marker vs. kein Marker	11,07 vs.10,02 Monate; p=0,644	0,876 (0,497- 1,543); p=0,646	22,97 vs.15,37 Monate; p=0,162	0,668 (0,378- 1,181); p=0,668
<i>FGFR1</i>-Amplifikation vs. keine Amplifikation	9,96 vs. 9,0 Monate; p=0,427	0,718 (0,315- 1,639); p=0,432	15,37 vs. 10,0 Monate; p=0,766	0,882 (0,386- 2,016); p=0,766

Abb.18: Prädiktive Bedeutung der experimentellen Biomarker auf eine antihormonelle Therapie



Legende: Forrest-plot der Hazard Ratios (HR) für das Progressionsfreie Überleben unter einer antihormonellen Therapien. PI3K-Marker beinhaltet *PIK3CA*-Mutation und – Amplifikation sowie PTEN-Verlust.

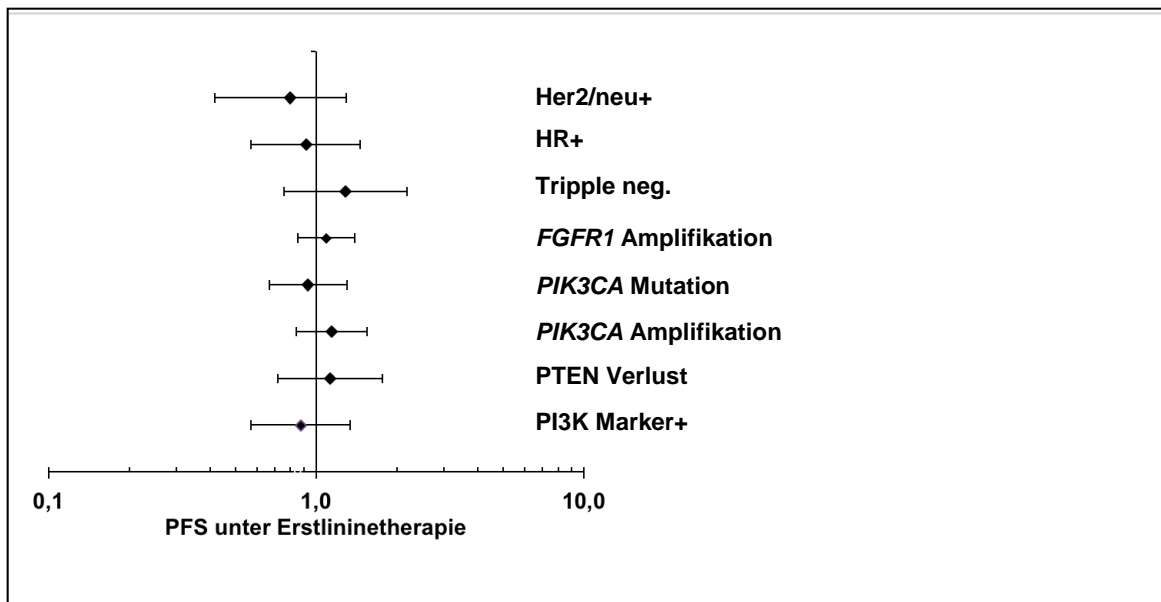
3.6.2 Erstlinienchemotherapie

Daten für das Progressionsfreie Überleben unter Erstlinienchemotherapie konnten für 99 der 131 Patientinnen (75,6%) erhoben werden. Die anderen Patientinnen wurden initial an einem auswärtigen Zentrum behandelt, so dass diese Daten nicht komplett vorlagen. In der univariaten Cox Regression konnte keine Beeinflussung des PFS unter Erstlinienchemotherapie durch einen der etablierten oder der neuen experimentellen Biomarker herausgearbeitet werden. Alle Hazard Ratios lagen um den Wert 1, so dass kein erhöhtes oder geringeres Risiko an einem bestimmten Zeitpunkt einen Progress zu erleiden in einer der Subgruppe beobachtet wurde (Tabelle 21 und Abb. 19).

Tabelle 21: Progressionsfreies Überleben unter der Erstlinienchemotherapie

Marker	Hazard-Ratio	95% KI	p
HER2/neu-pos.	0,799	0,491-1,300	0,366
HR-pos.	0,916	0,572-1,467	0,715
Tripple neg.	1,289	0,759-2,188	0,347
<i>FGFR1</i> -Amplifikation	1,090	0,854-1,391	0,488
<i>PIK3CA</i> -Mutation	0,932	0,668-1,301	0,680
<i>PIK3CA</i> -Amplifikation	1,145	0,845-1,552	0,381
PTEN-Verlust	1,130	0,721-1,771	0,594
PI3K- Marker	0,876	0,571-1,344	0,545

Abb.19: Prädiktive Bedeutung der experimentellen und etablierten Biomarker auf eine Erstlinienchemotherapie



Legende: Forrest-plot der Hazard Ratios (HR) für das Progressionsfreie Überleben unter Erstlinienchemotherapien. PI3K-Marker beinhaltet *PIK3CA*-Mutation und –Amplifikation sowie PTEN-Verlust.

Da unterschiedliche Erstlinienchemotherapien bei den Patientinnen eingesetzt wurden, erfolgte noch eine separate Analyse nach Art der Erstlinienchemotherapie. Tabelle 22 zeigt die Anzahl der Patienten mit den verschiedenen Erstlinienchemotherapieprotokollen. Aufgrund der geringen Fallzahl in einigen Subgruppen erfolgte nur eine Auswertung für die Taxan- und Fluoropyrimidin-haltige Erstlinienchemotherapie mit oder ohne Bevacizumab.

Tabelle 22: Anzahl der Patienten in der Erstlinientherapie

Chemotherapie	Anzahl der Patientinnen	% des Gesamtkollektivs (N=131)	% der Patientinnen mit PFS-Daten (N=99)
Taxan	43	32,8	37,4
Fluoropyrimidin	50	38,2	48,5
Anthrazyklin	6	4,6	6,1
Bevacizumab + Taxan oder Fluoropyrimidin	44	33,6	43,4
Trastuzumab+/-Taxan	17	13,0	15,2

3.6.2.1 Fluoropyrimidin-haltige Chemotherapieprotokolle

Insgesamt erhielten 48 der Patientinnen eine Fluoropyrimidin-haltige Erstlinienchemotherapie. In der univariaten Cox Regression konnte ebenfalls kein Einfluss der etablierten oder der neuen experimentellen Biomarker auf das PFS unter Fluoropyrimidinhaltiger Erstlinienchemotherapie gezeigt werden (Tabelle 23).

Tabelle 23: Progressionsfreies Überleben unter Fluoropyrimidin-haltiger Erstlinienchemotherapie

Marker	Hazard-Ratio	95% KI	p
HER2/neu-pos.	0,898	0,373-2,162	0,810
HR-pos.	1,020	0,542-1,918	0,951
Tripple neg.	1,024	0,529-1,983	0,943
<i>FGFR1</i> -Amplifikation	1,194	0,832-1,714	0,336
<i>PIK3CA</i> -Mutation	0,904	0,545-1,500	0,696
<i>PIK3CA</i> -Amplifikation	1,195	0,767-1,861	0,432
PTEN-Verlust	1,240	0,663-2,319	0,502
PI3K- Marker	0,764	0,415-1,407	0,388

3.6.2.2 Taxanhaltige Chemotherapieprotkoll

Insgesamt erhielten 37 der Patientinnen eine Taxan-haltige Erstlinienchemotherapie. Keiner der etablierten oder neuen eperimentellen Biomarker hatten einen Einfluss auf das PFS in der univariaten Cox Regressionsanalyse (Tabelle 24).

Tabelle 24: Progressionsfreies Überleben unter Taxan-haltiger Erstlinienchemotherapie

Marker	Hazard-Ratio	95% KI	p
HER2/neu-pos.	1,269	0,595-2,707	0,537
HR-pos.	0,610	0,272-1,368	0,230
triple neg.	1,382	0,565-3,379	0,478
<i>FGFR1</i> -Amplifikation	0,969	0,667-1,409	0,870
<i>PIK3CA</i> -Mutation	1,070	0,622-1,839	0,807
<i>PIK3CA</i> -Amplifikation	1,171	0,707-1,939	0,541
PTEN-Verlust	0,829	0,408-1,681	0,602
PI3K-Marker	1,317	0,652-2,660	0,443

3.6.2.3 Bevacizumab-basierte Chemotherapieprotokolle

Insgesamt erhielten 44 Patientinnen eine Bevacizumab basierte Erstlinienchemotherapie, wobei 14 Patientinnen eine Kombination mit einem Taxan erhielten und 28 eine Kombination mit einem Fluoropyrimidin. Die restlichen Patientinnen hatten eine Kombination mit einem antihormonellen Medikament. Auch unter der Bevacizumab-basierten Erstlinienchemotherapie hatte keiner der etablierten oder neuen Biomarker einen prädiktive Wertigkeit.

Tabelle 25: Progressionsfreies Überleben unter Bevacizumab-basierter Erstlinienchemotherapie

Marker	Hazard-Ratio	95% KI	p
HER2/neu-pos.	0,327	0,042-2,514	0,283
HR-pos.	0,833	0,432-1,606	0,586
triple neg.	1,116	0,570-2,185	0,749
<i>FGFR1</i> -Amplifikation	1,931	0,537-6,506	0,288
<i>PIK3CA</i> -Mutation	0,655	0,335-1,279	0,215
<i>PIK3CA</i> -Amplifikation	1,415	0,428-4,674	0,569
PTEN-Verlust	0,833	0,377-1,840	0,651
PI3K- Marker	0,720	0,389-1,333	0,296

4. Diskussion

4.1 Patientencharakteristika

4.1.1 Patientencharakteristika

Das mediane Erkrankungsalter der Patientinnen bei Erstdiagnose ihrer Erkrankung lag in dieser retrospektiven Studie bei 50 Jahren. Dies ist etwa 10 Jahre geringer als das durchschnittliche Erkrankungsalter in Deutschland, welches aktuell bei 60 liegt (Giersiepen et al., 2005). Dies liegt sicher zum einen daran, dass insbesondere jüngere Patientinnen bewusst die Entscheidung treffen, sich an einem großen Zentrum wie dem Westdeutschen Tumorzentrum (WTZ) in Essen behandeln zu lassen. Zum anderen wurden in diese molekulare Biomarkerstudie nur Patientinnen eingeschlossen, die potenziell für eine frühe klinische Medikamentenstudie in Frage kamen. Ältere Patientinnen erfüllen häufig aufgrund von Komorbiditäten nicht die Einschlusskriterien klinischer Studien, so dass diese Patientinnen nicht berücksichtigt werden konnten. Der überwiegende Anteil der Mammakarzinome metastasierte metachron (77,9%). Durchschnittlich nach 5 Jahren erfolgte die Metastasierung vorwiegend ossär (bei 58 Patientinnen) und hepatisch (bei 45 Patientinnen). Dies entspricht auch den häufigsten Metastasierungslokalisationen im Durchschnittspatientenkollektiv mit Mammakarzinom. Die große Spannweite der Zeit zwischen Erstdiagnose und Metastasierung (von 0 bis 22,75 Jahren) impliziert den hohen Stellenwert der Nachsorge. Auch nach einer Therapie mit rezidivfreiem Intervall entstehen häufig Spätmetastasen nach 10 oder mehr Jahren. (Breckwoldt et al., 2007)

Die Verteilung des Tumorstadiums bei Erstdiagnose lag deutlich zu Gunsten der frühen Stadien: 70% der Mammakarzinome konnten entweder im T1- oder T2-Stadium erkannt werden. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich beim Lymphknoten- und Metastasierungsstatus. Initial wiesen 56,5% der Patientinnen entweder keinen (N0) oder ein nur gering fortgeschrittenen N-Status auf (N1). Eine Metastasierung bereits bei Erstdiagnose konnte nur in 16% der Fälle nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Mammakarzinom in den meisten Fällen vergleichsweise in einem frühen Stadium erkannt wird. Dies ist insbesondere den Screening-Programmen zu verdanken. Frauen, die nicht an Mammographie-Screening-Programmen teilnehmen, weisen in der Regel größere Tumoren auf. (Giersiepen et al., 2005)

Auch in dem für diese retrospektive Studie erfassten Patientenkollektiv gingen kleinere Tumoren mit einem geringen Nodal- und Fernmetastasierungsstadium einher. Dies entspricht den Ergebnissen der Fachliteratur und verdeutlicht den prognostischen Wert der Tumorgöße: Je größer der Tumordurchmesser, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven axillären Lymphknotenstatus und einer Fernmetastasierung. (Scharl, 2011)

Erwartungsgemäß wurde der überwiegende Anteil der Mammakarzinome histologisch als invasiv ductales Adenokarzinom klassifiziert (51,1% aller Fälle). Lediglich 9,9% der Patientinnen hatten ein invasiv lobuläres Adenokarzinom. Diese Verteilung der histologischen Subtypen entspricht in etwa der Verteilung aller Patientinnen mit neu diagnostiziertem Brustkrebs in Deutschland. In der vorliegenden Studie wurden vorwiegend mittel- und undifferenzierte Karzinome (G2 und G3) nachgewiesen (insgesamt 69,5%). Hochdifferenzierte Tumoren (G1), welche mit einer besseren Prognose vergesellschaftet sind, betrafen lediglich 3,1% der Fälle. Da in dieser Studie lediglich Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom eingeschlossen wurden, verdeutlichen diese Ergebnisse den Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und der Wahrscheinlichkeit einer Fernmetastasierung im Verlauf: Je undifferenzierter der Tumor vorliegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Fernmetastasierung.

Die aufgeführten Ergebnisse bestätigen, dass es sich in der vorliegenden Studie um ein repräsentatives Kollektiv von Patientinnen mit Mammakarzinom handelt.

4.1.2 Hormonrezeptor- und HER2/neu-Rezeptor

Insgesamt konnte bei etwa 65% der Patientinnen bei Erstdiagnose ein positiver Hormonrezeptorstatus und bei etwa 17% ein überexprimierter HER2/neu Rezeptor in den Tumoren nachgewiesen werden. Dies ist etwas geringer als in der Literatur beschrieben, wobei jedoch auch hier zu berücksichtigen ist, dass lediglich Patientinnen in die Auswertung eingeschlossen wurden, die im Verlauf eine Metastasierung entwickelten. Da die in dieser Studie durchgeführten molekularen Biomarkeranalysen präferentiell in dem Tumorgewebe durchgeführt wurden, welches zuletzt gewonnen wurde und zur Auswertung verfügbar war, wurden bei einigen Patientinnen entweder der Primärtumor oder eine Metastase analysiert. Bei der Hälfte der Patientinnen lagen Informationen bezüglich der Hormonrezeptoren als auch des HER2/neu-Rezeptors sowohl vom Primärtumor als auch von einer Metastase vor.

Die Expression der Hormonrezeptoren war in Tumorproben, die von Metastasen gewonnen wurden, mit 42% deutlich geringer als im Primärtumor. Ebenfalls zeigte sich eine geringere Expression des HER2/neu-Rezeptors in Metastasen von nur 12%. Dies verdeutlicht, dass es im Verlauf der Erkrankung zu einer Änderung der Tumoreigenschaften kommen kann. Insbesondere eine adjuvante anti-hormonelle Therapie oder HER2/neu-gerichtete Antikörpertherapie kann die Evolution Rezeptor-negativer Klone begünstigen. Da von etwa der Hälfte der Patientinnen Informationen bezüglich der analysierten Rezeptoren vom Primärtumor als auch einer Metastase vorlagen, erfolgte ein intra-individueller Vergleich der Rezeptorexpression.

In ungefähr 25% aller Fälle ließ sich eine Änderung des Hormonrezeptorstatus zwischen Primarius und Metastase feststellen (PR: 25,4%; ER: 24,2%). Ein Wechsel des HER2/neu-Rezeptorstatus konnte bei 15,1% aller Mammakarzinom-Patientinnen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Theorie einer klonalen Evolution bestimmter Tumorzellen im Verlauf der Erkrankung. Da jedoch nicht nur ein Verlust der Rezeptorexpression beobachtet wurde, sondern auch initial negative Tumoren gelegentlich eine Expression bestimmter Rezeptoren erst in der Metastasierung aufwiesen, sind sequentielle Rebiopsien im Falle einer metachronen Metastasierung zu empfehlen. Ein möglicher Wechsel des Rezeptorstatus wirkt sich auf das Therapieansprechen aus; insbesondere könnte eine Resistenz auf antihormonelle- und anti-HER2/neu-gerichtete Therapien auftreten. Andererseits eröffnen sich bei Patientinnen mit Rezeptor-positiven Tumoren weitere therapeutische Optionen.

Ein Wechsel des Hormonrezeptorstatus zwischen Primarius und Metastase ist bei bis zu 40% aller Patientinnen seit langem bekannt. (Brennan et al., 1979; Brunn Rasmussen et al., 1989) Die Diskordanz des HER2/neu-Rezeptors zeigt weitaus geringere und mit einer größeren Spannweite behaftete Ergebnisse. In der internationalen Fachliteratur treten Änderungen des HER2/neu-Rezeptors in 4-24% der Fälle auf. (Curtit et al., 2013; Liedtke et al., 2009; Niikura et al., 2012)

Curtit *et al.* zeigten 2009 in einer retrospektiven Studie eine hohe Diskordanz der Expression von Steroidrezeptoren bezogen auf Primarius und Metastase (ER 15%, PR 29%), während die Expression des HER2/neu-Rezeptor relativ konstant blieb (4%). Bei allen drei Rezeptoren erfolgte der Wechsel vorzugweise von positiv zu negativ. Zudem konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Chemotherapie, insbesondere mittels Anthrazyklinen, und dem Östrogenrezeptorwechsel nachgewiesen werden. Auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen Trastuzumab und der HER2/neu-Diskordanz wurde postuliert (5 von 8 Patientinnen). Des Weiteren war es irrelevant, ob die Metastasierung synchron oder metachron verlief. (Curtit et al., 2013)

Hingegen dessen fanden Niikura *et al.* keinen Zusammenhang zwischen einer Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab und einem veränderten HER2/neu-Rezeptorstatus. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass die Verabreichung einer systemischen Chemotherapie mit einer Änderung des Rezeptorstatus assoziiert ist. (Niikura *et al.*, 2012) Unterschiede zwischen diesen Studien könnten dadurch bedingt sein, dass in der Erstgenannten nur ein geringer Anteil an HER2/neu-Expressionswechsell beobachtet wurde (4%), während in der Letzteren 24% nachgewiesen werden konnten. Demnach lassen sich Verzerrungen aufgrund der geringen Fallzahl vermuten. Ein weiterer Grund könnte die Tatsache sein, dass seit 2005 die Mehrzahl der HER2/neu-positiven Patientinnen eine adjuvante Therapie mit Trastuzumab erhielten, sodass ein hoher Prozentsatz an Patientinnen mit Konversion unter Therapie mittels monoklonalen Antikörpers entstand. (Curtit *et al.*, 2013) Zudem gab es im Vergleich zu den Veröffentlichungen von Curtit *et al.* eine Gruppe, die eine alleinige Therapie mit Trastuzumab erhielt, sodass hier kein Einfluss durch eine zusätzlich verabreichte Chemotherapie entstand. (Niikura *et al.*, 2012) Unklar bleibt dennoch, ob der Verlust des positiven Rezeptorstatus in der Metastase ein Therapieansprechen, einen Resistenzmechanismus oder die Heterogenität des Mammakarzinoms reflektiert, in dem gleichzeitig Rezeptor-positive und –negative Bereiche vorliegen. Eine weitere Begründung könnte ein genetischer Drift oder eine klonale Selektion sein, die zu einer Änderung der Rezeptorexpression während der Tumorprogression führen. Zudem müssen falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse in der Rezeptoranalyse berücksichtigt werden. (Curtit *et al.*, 2013; Liedtke *et al.*, 2009; Niikura *et al.*, 2012)

Ebenso kontrovers diskutiert wird eine mögliche Auswirkung des Rezeptorwechsels in Bezug auf das Gesamtüberleben. Während einige Studien von einem verbesserten Überleben bei übereinstimmenden Rezeptorstatus zwischen Primärtumor und Metastase ausgehen (Liedtke *et al.*, 2009; Niikura *et al.*, 2012), konnte eine prospektive Studie keine Korrelation feststellen (Amir *et al.*, 2012). In einer multivariaten Analyse, in der das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Rezeptordiskordanz dargestellt wurde, konnten Niikura *et al.* ein signifikant längeres Gesamtüberleben der Patientinnen mit einem konkordanten HER2/neu-Rezeptorstatus zwischen Primarius und Metastase nachweisen. Unabhängig davon war eine vorausgegangene Therapie mit Trastuzumab. (Niikura *et al.*, 2012) Liedtke *et al.* gingen davon aus, dass die schlechte Prognose des diskordanten Rezeptorstatus mit dem eines konkordanten triple negativen Tumors vergleichbar sei. (Liedtke *et al.*, 2009) Interessant ist zudem die Frage, ob eine Veränderung im Rezeptorstatus das Therapieregime beeinflusst. In prospektiven Studien konnte in 20-31% eine Änderung der Therapie verzeichnet werden. (de Duenas *et al.*, 2014; Simmons

et al., 2009). In dem hier untersuchten Kollektiv zeigte sich keine Beeinflussung des Gesamtüberlebens seit Erstdiagnose, des krankheitsfreien Überlebens oder des medianen Überlebens seit Metastasierung durch eine Änderung des Rezeptorstatus (Daten nicht gezeigt, p alle $>0,05$ Log-rank). Patientinnen mit Tumoren, die in der metastasierten Krankheitssituation eine diskordante Hormonrezeptorexpression aufwiesen hatten zwar numerisch ein verkürztes medianes Überleben seit Metastasierung von nur 43,6 Monaten im Vergleich zu Patientinnen, die keine unterschiedliche Expression zwischen Primärtumor und Metastase aufwiesen (64,0 Monate). Dies war jedoch möglicherweise aufgrund der kleinen Fallzahl statistisch nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

Normalerweise wird die Diagnose des metastasierten Mammakarzinoms durch eine Kombination aus klinischen und radiologischen Zeichen gestellt. Nur in wenigen Fällen wird eine erneute Tumorbiopsie aus einer metachronen Metastase entnommen. (Simmons et al., 2009) Die oben aufgeführten Ergebnisse sollten Patienten sowie Ärzte ermutigen, Tumorproben neuer Metastasen zu entnehmen und eine erneute Rezeptoranalyse durchzuführen.

4.2 Biomarkeranalyse

4.2.1 Durchführbarkeit

Wegen insuffizienten Tumormaterials konnten nicht im gesamten Patientenkollektiv alle molekularen Marker analysiert werden. Diese Ausgangssituation muss in der folgenden Evaluation berücksichtigt werden. Insbesondere die Bewertung des Biomarkers *FGFR1* und die *PIK3CA*-Amplifikation kann nur eingeschränkt beurteilt werden, da die *in-situ*-Hybridisierung nur bei 119 Patientinnen (91%) ein Ergebnis erzielte. Insgesamt war die Durchführbarkeit aller Analysen jedoch sehr befriedigend und lag bei über 90%. Das hier ausschließlich archivierte Tumorproben analysiert wurden und keine neuen Biopsien entnommen wurden, zeigt dass auch ein erweitertes molekulares Tumorprofil in der Routinediagnostik implementiert werden kann.

4.2.2 Verteilung der etablierten Biomarker

Die Analyse der etablierten Biomarker anhand der zuletzt entnommenen Tumorproben ergab eine erwartungsgemäße Verteilung. Der Östrogenrezeptor war in 67% der Fälle

positiv. In 52% der Fälle konnte eine Expression des Progesteronrezeptors nachgewiesen werden. In der Mehrzahl der Fälle trat der PR gemeinsam mit dem ER auf. Lediglich in 5% konnte ein alleingiger Progesteronrezeptorstatus aufgezeigt werden. HER2/neu-positive Tumoren präsentierten sich in 22% aller Fälle und überwiegend in Kombination mit einem positiven Hormonrezeptor (55%). Die etablierten Biomarker sind in der internationalen Fachliteratur seit langem Bestandteil verschiedener Untersuchungen. Ein positiver Östrogenrezeptor kann bei 50-85% aller Mammakarzinome nachgewiesen werden. Die PR-Expression ist abhängig von der ER-Expression des Tumors, sodass lediglich in 5% ein PR bei fehlendem ER auftritt. (Donegan, 1992) Der Nachweis des Wachstumsfaktorrezeptors HER2/neu sowie der Hormonrezeptoren ist heutzutage ein etablierter Bestandteil der Diagnostik und sie unterstützen als prädiktive Faktoren die Therapieentscheidung. In 20-30% zeigt sich der HER2/neu-Rezeptor überexprimiert. Zudem wird eine geringere Steroidrezeptorexpression bei positiven HER2/neu-Status beschrieben. (Konecny et al., 2003) Letzteres konnte bei unserem Patientenkollektiv nicht bestätigt werden: In 55% der HER2/neu positiven Tumoren konnte gleichzeitig mindestens einer der beiden Hormonrezeptoren nachgewiesen werden. Das liegt möglicherweise daran, dass in dem hier untersuchten Kollektiv lediglich Patientinnen mit metastasierter Erkrankung eingeschlossen wurden.

4.3 Experimentelle Biomarker

4.3.1 Verteilung der experimentellen Biomarker

In 40% der Mammakarzinomfälle wurde einer der experimentellen Biomarker nachgewiesen. Bei Vorliegen eines etablierten Biomarkers wie Expression der HR oder HER2/neu verdoppelte sich dieser Anteil auf 88%. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Expression der untersuchten Marker mit den etablierten Rezeptoren korrelieren. Die häufigste Alteration stellte die somatische Mutation von *PIK3CA* dar (23% der Fälle). Insgesamt konnten bei 35% der Patientinnen Veränderungen im PI3K/AKT-Signalweg festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erkenntnissen verschiedener Studien überein und deutet auf die Signifikanz einer routinierten Bestimmung von Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg hin. (Castaneda et al., 2010),(Berns et al., 2007)

Lediglich in 2% der Fälle ließ sich eine gleichzeitige Mutation von *PIK3CA* und ein Verlust des Tumorsuppressors PTEN nachweisen. Während *PIK3CA* für das Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung der Zellen verantwortlich ist und die

Phosphorylierung von Phosphatidylinositol katalysiert, agiert PTEN als Phosphatase und hemmt somit den Signalweg. (Castaneda et al., 2010) Ein möglicher Grund der geringen Überschneidung könnte nach Saal *et al.* sein, dass nach Mutation von *PIK3CA* oder einem Verlust von PTEN ein verringerter Selektionsdruck für das jeweils andere Gen, von einer Veränderung betroffen zu sein, bestünde. (Saal et al., 2005) Während die meisten Studien keine Koexistenz zeigen (Berns et al., 2007; Lopez-Knowles et al., 2010; Saal et al., 2005), postulieren Pérez-Tenorio *et al.* eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem PTEN-Verlust und der Mutation von *PIK3CA*. (Perez-Tenorio et al., 2007) Interessanterweise konnte kein gleichzeitiges Vorliegen einer *PIK3CA*-Amplifikation mit einer somatischen Mutation von *PIK3CA* nachgewiesen werden. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen von Wu *et al.*, der von einem parallelen Auftreten in 4 von insgesamt 92 Mammakarzinomfällen berichtet. Eine signifikante Korrelation zwischen somatischen Mutationen und der Amplifikation von *PIK3CA* wurde jedoch nicht festgestellt ($p=0,054$). (Wu et al., 2005) Eine mögliche Begründung für das Ausschließen der *PIK3CA*-Mutation bei bestehender Amplifikation könnte das allgemein seltene Auftreten der Amplifikation sein (in unserer Studie bei drei Patientinnen), was zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen kann. Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse sind weitere Studien mit einer größeren Patientenzahl nötig, um die Assoziation zwischen der *PIK3CA*-Mutation und –Amplifikation zu prüfen. Insgesamt lässt sich jedoch zusammenfassen, dass die Amplifikation von *PIK3CA* eine untergeordnete Rolle in der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges darstellt. (Wu et al., 2005)

Der Verlust des PTEN-Proteins wurde bei 13% aller Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nachgewiesen. Im Vergleich zur Fachliteratur liegt der Wert geringfügig unter dem allgemeinen Durchschnittswert (24%), welcher mit einer hohen Spannweite von 4-48% behaftet ist. (Lopez-Knowles et al., 2010) Gründe für die hohen Differenzen zwischen den Ergebnissen liegen womöglich in den verschiedenen Methoden des PTEN-Protein-Nachweises mittels Immunhistochemie. Es gibt keine standardisierten Methoden, sodass verschiedene Antikörper eingesetzt und verschiedene Bewertungs-Scores zur Klassifizierung verwendet werden und die Grenzwerte differieren. Demnach ist ein Vergleich verschiedener Studien hinsichtlich der PTEN-Expression schwierig. (Jensen et al., 2012) Bei 11 Patientinnen (8%), die in diese Studie eingeschlossen wurden, wurde eine Amplifikation von *FGFR1* nachgewiesen. Obgleich die *in situ* Hybridisierung wegen insuffizienten Tumormaterials lediglich in 91% der Fälle eine Analyse zuließ (*FGFR1*- und/oder *PIK3CA*-Amplifikation), steht dieses Ergebnis im Einklang mit der aktuellen Literatur. (Andre et al., 2014)

4.3.2 Lokalisation der *PIK3CA*-Mutation

Die somatische Mutation von *PIK3CA* stellte die häufigste Veränderung der experimentellen Biomarker dar (23%). Die Hälfte aller Mutationen führten zu einer Aminosäuresubstitution von H1047R mit Arginin (Exon 20). Im Bereich des Exons 9 führte der überwiegende Anteil der Mutationen zu einem Austausch von E545K (26,7%) und E542K (13,3%) mit Lysin. Insgesamt ließen sich somit 90% aller detektierten *PIK3CA*-Mutationen in diesen 3 vorherrschenden Regionen, den so genannten „hot-spots“, nachweisen. Ähnliche Ergebnisse liefert die internationale Fachliteratur in der ungefähr 80% aller Mutationen in den o.g. Bereichen nachzuweisen sind und zu einer Aminosäuresubstitution von H1047R, E545K und E542K führen. (Castaneda et al., 2010; Di Cosimo et al., 2009)

4.3.3 Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg

In 35% aller Mammakarzinom-Fälle konnten Veränderungen im PI3K/AKT-Signalweg detektiert werden. Die Mutation von *PIK3CA* ließ sich überwiegend in Tumoren nachweisen, in denen mindestens einer der Steroidrezeptoren gleichzeitig vorlag (ER und/ oder PR, 26%). Diese Tumoren werden nach Konsensuskonferenz von St. Gallen von 2011 zu den Luminal-A bzw. -B Typen gezählt. (Untch et al., 2011) Die Differenzierung zwischen diesen molekularen Mammakarzinomsubtypen ist unter anderem abhängig von der Proliferationsrate Ki-67, welche in der Analyse nicht berücksichtigt wurde. Eine weitere Assoziation konnte zu HER2/neu-positiven Karzinomen gestellt werden (25%). Lag sowohl ein negativer Hormon- als auch negativer HER2/neu-Rezeptor vor (triple negativ), wurden lediglich in 10% *PIK3CA*-Mutationen diagnostiziert. Saal *et al.* konnten bereits 2005 in einer Studie über 292 nicht metastasierte Mammakarzinompatientinnen eine hohe Korrelation zwischen der *PIK3CA*-Mutation und einem positiven Östrogen- sowie Progesteronrezeptor nachweisen. Auch hinsichtlich des HER2/neu-Status wurde eine signifikante Assoziation beschrieben. Der Mutationsnachweis konnte umso häufiger gestellt werden, wenn einer der etablierten Biomarker vorlag. (Saal et al., 2005) Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Stemke-Hale *et al.*: In einer Analyse, die 547 Patientinnen einschloß, fanden sie Korrelationen zwischen *PIK3CA*-Mutationen und einem positiven Hormonrezeptorstatus in 34,5% und mit HER2/neu-positiven Tumoren in 22,7% aller Fälle. In triple negativen Tumoren wurden lediglich in 8,3% Mutationen des *PIK3CA*-Gens festgestellt. (Stemke-Hale et al., 2008) Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schließen, dass insbesondere bei Vorliegen einer der etablierten Biomarker der Nachweis eine *PIK3CA*-Mutation oftmals erbracht werden

kann. In diesen Fällen könnte eine zielgerichtete Therapie, die in den PI3K/AKT-Signalweg eingreift, Nutzen erbringen. Zudem legt es die Vermutung nahe, dass Mutationen von *PIK3CA* insbesondere in diesen Tumoren eine entscheidende Rolle in der Tumorphathogenese spielen. (Stemke-Hale et al., 2008)

In den triple negativen Karzinomen dominierte unter den experimentellen Markern der Verlust der PTEN-Proteinexpression (24%). Dieses Ergebnis ist insbesondere im Hinblick auf eine zielgerichtete molekulare Therapie interessant, da triple negative Mammakarzinome weder eine Angriffsstelle für antihormonelle noch für anti-HER2/neu-Therapeutika bieten. In lediglich 6-8% konnte der PTEN-Verlust in Hormonrezeptor- bzw. HER2/neu-positiven Tumoren detektiert werden. In der internationalen Fachliteratur wird der Zusammenhang zwischen dem Verlust von PTEN und Hormon- bzw. HER2/neu-Rezeptoren kontrovers diskutiert. López-Knowles *et al.* untersuchten 292 Brustkrebspatientinnen und konnten einen Verlust von PTEN in 28% feststellen. Unter diesen 28% zeigte sich eine signifikante Korrelation bezüglich triple negativer Tumore. (Lopez-Knowles et al., 2010) Hingegen dessen konnten Pérez-Tenorio *et al.* nur einen Zusammenhang hinsichtlich eines negativen HER2/neu-Rezeptorstatus, nicht aber in Bezug auf einen negativen Hormonrezeptorstatus nachweisen. Zudem wird von einer statistisch signifikanten Korrelation zu *PIK3CA*-Mutationen berichtet. (Perez-Tenorio et al., 2007)

Auffallend ist, dass keine Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg bei Patientinnen mit gleichzeitigem Nachweis von HER2/neu- und Hormonrezeptoren vorlagen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese Gruppe die geringste Patientenzahl aufwies: Lediglich 12 der 131 Patientinnen zeigten sowohl einen positiven Steroid- als auch HER2/neu-Rezeptorstatus.

4.3.4 Expression der Biomarker im Primarius und der Metastase

Die Mutationen von *PIK3CA* wurden statistisch signifikant häufiger in Tumorproben aus dem Bereich einer Metastase (30%) als in Biopsien des Primarius (13,5%) festgestellt, während die restlichen Biomarker eine gleichmäßige Verteilung zeigten. Vermutet werden kann, dass Mutationen des *PIK3CA*-Gens erst in fortgeschrittenen Erkrankungen auftreten. Eine weitere Interpretation der Ergebnisse wäre eine Veränderung des Biomarkerstatus zwischen Primärtumor und Metastase in der Tumorphathogenese, d.h. die Veränderung könnte sowohl von der Mutation zum Wildtyp als auch umgekehrt stattfinden. Eine Diskordanz zwischen Primärtumor und Metastase wurde, wie zuvor

beschrieben, bereits bei den etablierten Markern gezeigt (HR und HER2/neu). Da in dieser Studie lediglich eine Probe im Hinblick auf die neuen Marker untersucht wurde (entweder der Primärtumor oder eine Metastase), ist ein direkter Vergleich bezüglich einer möglichen Änderung des Mutationsstatus nicht durchführbar. Dupont Jensen *et al.* konnten in einer Analyse von 104 Mammakarzinom-Patientinnen einen Vergleich zwischen Alterationen im Primärtumor und der zugehörigen Metastase ziehen. In 45% der 101 untersuchten Primärtumore konnten sie eine *PIK3CA*-Mutation feststellen. Mehr als die Hälfte der entsprechenden Metastasen wiesen die Mutation des *PIK3CA*-Gens auf (55 von 103 Metastasen). Eine Änderung des Mutationsstatus, vorwiegend vom Wildtyp zur Mutation, konnte in nahezu einem Drittel der Patientinnen verzeichnet werden. Als mögliche Begründung wird die Heterogenität der Primärtumore angesehen, in denen kleine Areale der mutierten Subklone neben nicht mutierten Arealen vorliegen und so der Analyse entgehen. Durch einen Selektionsvorteil könnten diese Subklone proliferieren und im Verlauf metastasieren. Auch eine Mutation während der Tumorgenese im Rahmen der onkogenen Progression wird als möglicher Grund angegeben. (Dupont Jensen *et al.*, 2011) Die Tatsache, dass Mutationen des *PIK3CA*-Gens bereits in *in situ* Läsionen auftreten (Castaneda *et al.*, 2010), spricht allerdings eher für die erst genannte Theorie.

Auch wenn die Gründe der Diskordanz zwischen Primärtumor und Metastase noch unklar sind, sollte es sowohl Patientinnen als auch die behandelnden Ärzte ermutigen, die Metastase(n) erneut hinsichtlich ihres Biomarkerstatus zu analysieren. Insbesondere im Hinblick auf den Einsatz zielgerichteter Therapien ist es entscheidend, den aktuellen molekularpathologischen Status der Metastasen zu kennen.

4.4. Prognose in Abhängigkeit der Biomarker

4.4.1 Prognostische Bedeutung des Hormonrezeptor-Status auf das Gesamtüberleben

Erwartungsgemäß war das Vorliegen von Hormonrezeptoren mit einem deutlich signifikant verlängerten Gesamtüberleben vergesellschaftet. Patientinnen mit positivem Steroidrezeptor wiesen ein nahezu doppelt so langes Überleben auf, im Vergleich zu denjenigen, deren Tumor weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren exprimierten. Das Risiko an einem bestimmten Zeitpunkt an Brustkrebs zu versterben war annähernd halb so groß im Vergleich zu Patientinnen mit HR-negativen Tumoren (Hazard-

Ratio=0,57). Seit langem ist der prognostische Wert der Hormonrezeptoren bekannt. Da rezeptorpositive Zellen als differenziert gelten, wird ihnen eine günstige Tumorbiologie zugesprochen. Eine frühere Rezidiventwicklung wird vermehrt in Steroidrezeptornegativen Tumoren beobachtet. (Schmitt et al., 1997) Zudem ist der Rezeptornachweis entscheidend für die Wahl einer geeigneten Therapie, sodass er zusätzlich als prädiktiver Faktor anerkannt ist. (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2005) Endokrine Therapeutika können gezielt an die Östrogen- und Progesteronrezeptoren binden und die Zellen so im Wachstum hemmen.

4.4.2 Prognostische Bedeutung des HER2/neu-Rezeptor-Status auf das Gesamtüberleben

In der vorliegenden Untersuchung war der Wachstumsfaktorezeptor HER2/neu signifikant mit einer verbesserten Prognose assoziiert im Vergleich zu Patientinnen mit Tumoren, die einen negativen HER2/neu-Status aufwiesen. Das Gesamtüberleben verlängerte sich bei diesen Patientinnen um mehr als das Doppelte, während sich das Letalitätsrisiko nahezu halbierte (Hazard-Ratio=0,527). Nach aktueller Lehrmeinung geht der HER2/neu-Rezeptor mit einem aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung einher. (Konecny et al., 2003) Die prognostische Bedeutung wird allerdings seit Entdeckung des Wachstumsfaktorrezeptors diskutiert. In den meisten Untersuchungen konnte ihm kein unabhängiger prognostischer Wert zugeschrieben werden. (Scharl, 2011) Ein verbessertes Gesamtüberleben ließe sich in dieser Studie durch zielgerichtete Therapien mittels rekombinanten humanen anti-HER2/neu-Antikörper Trastuzumab oder dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib erklären. Trastuzumab senkt in der adjuvanten Therapie bei Patientinnen mit HER2/neu-Rezeptor positiven Tumoren das Rezidivrisiko des Mammakarzinoms eindeutig. (Dahabreh et al., 2008) In einer retrospektiven Studie über 256 Brustkrebspatientinnen konnten Razis *et al.* ebenfalls eine signifikant höhere Überlebenschance bei HER2/neu-Überexpression nachweisen. (Razis et al., 2011). In der metastasierten Erkrankungssituation existieren neben Trastuzumab und Lapatinib mit T-DM1 und Pertuzumab weitere gegen den HER2/neu-Rezeptor gerichtete Medikamente, die in der Therapie eingesetzt werden können. Auch dies könnte das verlängerte Gesamtüberleben in dieser Subgruppe erklären.

4.4.3 Prognostische Bedeutung triple negativer Tumoren auf das Gesamtüberleben

In dieser retrospektiven Studie zeigt sich eine starke negative prognostische Wertigkeit für triple negative Tumoren mit deutlich verkürztem Gesamtüberleben nach Eintreten einer Metastasierung. Es zeigte sich ein statistisch signifikant verkürztes medianes Gesamtüberleben von 31,9 Monaten im Vergleich zu Patientinnen deren Mammakarzinom wenigstens einen der drei Rezeptoren exprimierte (ER, PR, HER2/neu). Letzteres Patientengut wies ein medianes Gesamtüberleben von 65,3 Monaten auf. Das Risiko an einem bestimmten Zeitpunkt an Brustkrebs zu versterben, erhöhte sich bei diesen Patientinnen auf das dreifache (Hazard-Ratio=3,075). Per Definition werden in triple negativen Tumoren keine Östrogen-, Progesteron und HER2/neu-Rezeptoren exprimiert. Dieser Subtyp tritt in 10-20% aller Mammakarzinome auf und zeigt in den überwiegenden Fällen ein aggressives Wachstumsmuster. Eine Assoziation zu G3-Tumoren und ein vermehrtes Auftreten bei jüngeren Patientinnen wurden beschrieben. Zudem bergen diese Karzinome ein erhöhtes Rezidivrisiko in den ersten 2 bis 3 Jahren und sind mit einem verringerten Gesamtüberleben assoziiert. (Bauernfeind, 2011) Durch das völlige Fehlen der genannten Rezeptoren sind sowohl antihormonelle als auch gegen HER2/neu-gerichtete Therapiemaßnahmen wirkungslos. Demnach ist die Chemotherapie in diesen Fällen die effizienteste Therapieform.

4.4.4 Prognostische Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges für das Gesamtüberleben

Beim Vergleich der Patientinnen hinsichtlich Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg, wurde kein prognostischer Einfluss auf das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation beobachtet. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl in der Kombination aus der *PIK3CA*-Mutation und -Amplifikation sowie dem Verlust von PTEN, als auch in der Analyse der einzelnen Marker mittels Cox-Regressionsanalyse. Die Wirkung der in der vorliegenden Studie analysierten Biomarker auf das Gesamtüberleben wird in der internationalen Fachliteratur kontrovers diskutiert. Saal *et al.* fanden in einer 2005 veröffentlichten Studie über 295 Mammakarzinom-Patientinnen keine signifikanten Assoziationen zwischen *PIK3CA*-Mutationen und dem krankheitsfreien Überleben, rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben. Als mögliche Ursache dafür, dass die Mutation keine Aussage hinsichtlich einer Prognose zulässt, nennen sie die gleichzeitige Korrelation zwischen der *PIK3CA*-Mutation und Faktoren, die mit einer verbesserten Prognose behaftet sind sowie mit denen, die ein vermindertes Gesamtüberleben bedingen. Beispielsweise können

Mutationen sowohl in HR-positiven Tumoren, welche eine gute Prognose haben, als auch in Lymphknoten- und HER2/neu-positiven Mammakarzinomen, die mit einer schlechten Prognose behaftet sind, nachgewiesen werden. Dennoch räumen Saal *et al.* ein, dass ihre Kohorte von 295 Primärtumoren nicht optimal für Überlebensanalysen gewählt wurde, da die Patientinnen zum einen verschiedene Therapien erhielten und zum anderen die mediane Beobachtungszeit relativ kurz war. (Saal *et al.*, 2005) In einer weiteren Arbeit wurde lediglich in der univariaten Analyse eine Assoziation zum Gesamtüberleben nachgewiesen. In der multivariaten Analyse, die den Lymphknotenstatus, das Grading den PR- und HER2/neu-Status mit einbezog, konnte dieser Zusammenhang nicht mehr bestätigt werden. (Lopez-Knowles *et al.*, 2010)

Andere Arbeiten konnten hingegen eine schlechtere Prognose bei vorliegender Alteration im PI3K/AKT-Signalweg feststellen. In einer Studie von Berns *et al.* wurde ein verkürztes Gesamtüberleben bei Patienten, die zuvor eine Antikörper-basierte Therapie mittels Trastuzumab erhielten und bei denen gleichzeitig eine *PIK3CA*-Mutation oder ein Verlust von PTEN vorlag, nachgewiesen. Eine statistische Signifikanz konnte allerdings nur bei Kombination beider Veränderungen gezeigt werden. Zusätzlich wurde dargelegt, dass der PI3K/AKT-Weg einen unabhängigen Risikofaktor mit nahezu verdoppelten Progressionsrisiko darstellt (Hazard-Ratio=1,9). Bei Analyse der einzelnen Marker konnte wiederum keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Demzufolge wird eine kombinierte Analyse von PTEN und *PIK3CA* empfohlen, um Aussagen über das Progressionsrisiko nach Trastuzumab-Therapie treffen zu können. (Berns *et al.*, 2007) Da diese Untersuchung lediglich eine Kohorte von 55 Patientinnen umfasst, die zusätzlich anhand einer vorausgegangenen Therapie mittels Trastuzumab vorselektiert wurde, ist diese wegen limitierter statistischer Aussagekraft nicht ausreichend repräsentativ.

In einer großen Kohorte von 509 operierten Brustkrebs-Patienten mit einem medianen Beobachtungszeitraum von 12,8 Jahren konnte ein signifikant längeres Progressionsfreies Überleben (PFS) nach primärer Operation und ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben bei vorliegender *PIK3CA*-Mutation nachgewiesen werden. (Kalinsky *et al.*, 2009) Ein möglicher Grund könnte beispielsweise eine erhöhte Sensitivität der mutierten Zellen gegenüber Chemotherapien und antihormonellen Therapien sein. Eine andere Erklärung wäre ein generell geringes onkogenes Potential der *PIK3CA*-Mutationen, oder eine Aktivierung von kompensatorisch wirkenden negativen „Feedback“-Schleifen, die die onkogene Aktivierung des Signalweges teilweise aufheben könnten. (Di Cosimo *et al.*, 2009; Kalinsky *et al.*, 2009)

4.4.5 Einfluss des PI3K/AKT-Signalweges auf das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von den etablierten Biomarkern

Während in unserer Kohorte von 131 Mammakarzinom-Patientinnen kein Einfluss des PI3K/AKT-Signalweges hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Überlebenschancen zu verzeichnen war, ließen sich statistisch signifikante Ergebnisse in Subgruppen der Patientinnen mit den etablierten Biomarkern HR und Her2/neu nachweisen. In der Gruppe der Hormonrezeptor-positiven Patientinnen konnte ein Überlebensnachteil bei gleichzeitigem Vorliegen der *PIK3CA*-Mutation oder der -Amplifikation festgestellt werden. Bei *PIK3CA*-amplifizierten, HR-positiven Patientinnen halbierte sich das Gesamtüberleben nahezu. Patientinnen, die wenigstens einen der etablierten Biomarker exprimierten (ER/PR/HER2/neu), zeigten ein nahezu doppelt so langes Gesamtüberleben bei fehlender *PIK3CA*-Amplifikation. Interessanterweise konnte in dieser Patientengruppe ein Überlebensvorteil bei *PIK3CA*-Gen-Mutation nachgewiesen werden. Patientinnen mit HER2/neu-überexprimierenden und *PIK3CA*-mutierten Tumoren hatten ebenfalls ein verlängertes medianes Überleben, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, dass nur zwei Patientinnen mit Her2/neu-positiven Tumoren eine *PIK3CA*-Mutation aufwiesen. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut die Unklarheit der in der Fachliteratur stark diskutierten Zusammenhänge des PI3K/AKT-Signalweges in Bezug auf das Gesamtüberleben. Scheinbar wirken sich bei positivem Hormonrezeptorstatus Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg negativ auf das Überleben aus, während bei nicht triple negativen Tumoren (unter Einbeziehung HER2/neu-positiver Tumoren) *PIK3CA*-Mutationen prognostisch günstig zu sein scheinen.

In einer Arbeit von Li *et al.*, in der 250 primäre Mammakarzinome in Bezug auf den prognostischen Wert der *PIK3CA*-Mutation analysiert wurden, konnte eine Assoziation zu einem verringerten Gesamtüberleben dargelegt werden. Insbesondere galt dies für Östrogenrezeptor-positive und HER2/neu-negative Tumoren. In einer multivariaten Analyse, die das histologische Grading, den Lymphknotenstatus, die Tumorgöße und die *TP53*-Mutation berücksichtigte, konnte die Mutation von *PIK3CA* lediglich unter den HER2/neu-negativen Tumoren einen statistisch signifikanten, unabhängigen prognostischen Wert erlangen. (Li *et al.*, 2006)

Stemke-Hale *et al.* konnten in einer Analyse in einer homogenen Gruppe von 157 Hormonrezeptor-positiven Patientinnen, die mit Tamoxifen behandelt wurden, keinen signifikanten Zusammenhang zwischen *PIK3CA*-Mutationen und dem rezidivfreien

Überleben, sowie dem Gesamtüberleben feststellen. (Stemke-Hale et al., 2008) Da Mutationen des *PIK3CA*-Gens gehäuft in Hormonrezeptor-positiven Tumoren auftreten, spiegelt die Studie ein repräsentatives Patientengut wider. Dennoch könnte sich der selektive Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen eventuell auf den prognostischen Wert ausgewirkt haben, sodass dies in weiteren Untersuchungen geprüft werden sollte.

In der Arbeit von Pérez-Tenorio *et al.* wurde eine Assoziation zwischen *PIK3CA*-Mutationen und einem positiven Östrogen- sowie negativen HER2/neu-Rezeptor festgestellt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen der *PIK3CA*-Genmutation ein annähernd halbiertes Lokalrezidivrisiko, nicht aber bezüglich dem Eintreten einer Fernmetastasierung bestand. Der Verlust des PTEN-Proteins hatte weder Auswirkungen auf das Lokalrezidivrisiko, noch auf das Eintreten einer Fernmetastasierung. (Perez-Tenorio et al., 2007)

Der Verlust von PTEN sowie die Amplifikation von *FGFR1* hatte in allen Subgruppen der 131 Mammakarzinom-Patientinnen keine prognostische Wertigkeit. In einer Gruppe von 240 HER2/neu-positiven Brustkrebspatientinnen konnten Jensen *et al.* lediglich für die *PIK3CA*-Mutationen und für die erhöhte PI3K/AKT-Signalwegaktivität, welche definiert wurde als PTEN-Verlust und/oder *PIK3CA*-Mutation, ein signifikant vermindertes Überleben aufzeigen, während ein alleiniger Verlust des PTEN-Proteins keine signifikanten Auswirkungen auf das Gesamtüberleben hatte. Da annähernd alle Patientinnen die identische adjuvante Therapie aus Cyclophosphamid, Epirubicin und 5-Fluorouracil, sowie Trastuzumab erhielten, konnte eine aussagekräftige Analyse erstellt werden. (Jensen et al., 2012) Vergleichbare Ergebnisse lieferten Berns *et al.*, die in der kombinierten Analyse der *PIK3CA*-Mutation und des PTEN-Verlustes (aktivierter PI3K/AKT-Signalweg) eine signifikant verminderte Zeit bis zur Krankheitsprogression feststellen konnten. Zudem wurde eine Trastuzumab-Resistenz bei Patientinnen mit einem aktivierten PI3K/AKT-Signalweg postuliert. (Berns et al., 2007) Razis *et al.* verglichen in einer retrospektiven Studie über 256 Mammakarzinompatientinnen, die mit Trastuzumab therapiert wurden, die Korrelation zwischen HER2/neu, PTEN-Verlust sowie dem *PIK3CA*-Mutationsstatus mit dem Gesamtüberleben. Bei HER2/neu-positiven Patientinnen konnte sowohl in der uni- als auch in der multivarianten Analyse ein erhöhtes Letalitätsrisiko bei gleichzeitigem PTEN-Verlust dargelegt werden. (Razis et al., 2011) Die Amplifikation von *FGFR1*, welche in etwa 10% aller Mammakarzinome nachgewiesen werden kann, ist im Allgemeinen mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Sie gilt als unabhängiger prognostischer Marker für ein vermindertes Überleben, insbesondere bei Patientinnen mit Östrogenrezeptor-negativem Brustkrebs. (Elbauomy Elsheikh et al.,

2007) Zudem gehen viele Autoren von einer Resistenz gegenüber Tamoxifen bei vorliegender *FGFR1*-Amplifikation aus. (Andre et al., 2015)

4.5 Progressionsfreies Überleben

4.5.1 Progressionsfreies Überleben unter antihormoneller Therapie

Keiner der untersuchten Marker hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Progressionsfreie Überleben (PFS) unter einer antihormonellen Therapie. Zwar war das Gesamt-PFS unter einer antihormonellen Therapie bei Patientinnen mit *PIK3CA*-mutierten Tumoren numerisch deutlich länger als bei Patientinnen ohne Nachweis einer Mutation, doch auch dieses erreichte keine statistische Signifikanz.

In einer retrospektiven uni- sowie multivarianten Analyse verglichen Ramirez-Ardila *et al.* das Progressionsfreie Überleben zwischen ER-positiven metastasierten Brustkrebspatientinnen, welche entweder mit Tamoxifen, oder mit Aromatasehemmern (AI) behandelt wurden, mit dem PFS unbehandelter, nodalnegativer Patientinnen. Sowohl die unbehandelten, nodalnegativen Patientinnen (insgesamt 342) als auch diejenigen, welche in der Erstlinientherapie mit Tamoxifen behandelt wurden (447 Patientinnen) zeigten keine Assoziation zwischen dem *PIK3CA*-Mutationsstatus und dem PFS. Lediglich unter einer Erstlinientherapie mit einem Aromataseinhibitor zeigte sich eine statistisch signifikante Verlängerung des Progressionsfreien Überlebens für Patientinnen mit *PIK3CA*-Mutation. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Gruppe der Patientinnen, die mit einem Aromataseinhibitor behandelt wurden, mit 84 Patientinnen vergleichsweise klein war. Ein möglicher Zusammenhang auf das erhöhte PFS könnte die Tatsache sein, dass Mutationen des PI3K/AKT-Signalweges insbesondere in Luminal-A Tumoren vorkommen, welche aufgrund der günstigen Prognosefaktoren (HR+, HER2/neu-, G1/G2) mit einem geringerem Rezidivrisiko vergesellschaftet sind. (Ramirez-Ardila et al., 2013) Sabine *et al.* konnten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen einer Tamoxifentherapie und einer Therapie mit einem Aromataseinhibitor (Exemestan) zeigen. Zu beachten ist jedoch, dass Ramirez-Ardila *et al.* Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs betrachteten, während Sabine *et al.* 9776 postmenopausale Frauen mit Hormonrezeptor-positiven, nicht metastasierten Tumoren in die Studie einschlossen. (Sabine et al., 2014) Auch Beelen *et al.* konnten in einer Studie mit 563 Patientinnen mit

Östrogenrezeptor-positiven Tumoren keinen Einfluss einer *PIK3CA*-Mutation oder einem Verlust von PTEN auf eine adjuvante Tamoxifentherapie zeigen. (Beelen et al., 2014)

4.5.2 Progressionsfreies Überleben unter Erstlinienchemotherapie

Bezüglich des Progressionsfreien Überlebens (PFS) unter Erstlinienchemotherapie konnte keine Beeinflussung durch einen der molekularen Marker festgestellt werden. Das Risiko eine Progression zu erleiden entsprach annähernd dem aller Mammakarzinompatientinnen bis zum vorgegeben Zeitpunkt unter Erstlinienchemotherapie in der metastasierten Erkrankungssituation. Da verschiedene Chemotherapieregime angewendet wurden, erfolgte noch eine separate Analyse unter den am häufigsten applizierten Regimen. Hierzu zählten Fluoropyrimidin-haltige, Taxan-haltige und Bevacizumab-haltige Protokolle. In keiner der verschiedenen Erstlinienprotokolle konnte eine prädiktive Wertigkeit der neuen molekularen Biomarker herausgearbeitet werden. Auch die bereits etablierten Biomarker, Hormonrezeptor- und HER2/neu Rezeptorstatus, beeinflussten nicht das PFS unter Erstlinienchemotherapie. Aufgrund der jeweils kleinen Fallzahlen in den verschiedenen Subgruppen ist dies jedoch nur eingeschränkt auswertbar. Während *in vitro* Ergebnisse auf eine verminderte Sensitivität gegenüber verschiedener Chemotherapeutika wie beispielsweise Paclitaxel, Doxorubicin oder 5-FU hinweisen, lässt sich dies *in vivo* nicht bestätigen. Lietke *et al.* haben in einer Analyse mit 140 Brustkrebspatientinnen im Stadium II und III gezeigt, dass die Mutation von *PIK3CA* keine veränderte Sensitivität gegenüber einer Anthracyclin- bzw. Taxan-basierter neoadjuvanter Chemotherapie bedingt. Zu beachten ist jedoch, dass die Ergebnisse aus einer Patientenpopulation mit nicht metastasiertem Stadium stammen. (Liedtke et al., 2009)

5. Zusammenfassung

In der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms spielen prognostische und prädiktive Biomarker eine zunehmende Rolle. Ziel der Arbeit war es daher, Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom besser zu klassifizieren, um ihnen zukünftig eine präzise, personalisierte Tumortherapie anbieten zu können. Neben den bereits etablierten Biomarkern wie Hormon- und HER2/neu-Rezeptorstatus lag ein besonderer Fokus auf der Analyse des Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT (PI3K/AKT)- Signalweges. Hierfür wurden Tumorproben von 131 Patientinnen immunhistochemisch und molekularpathologisch analysiert und die Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf korreliert. Insgesamt scheinen Alterationen im PI3K/AKT- Signalweg (*PIK3CA*-Mutation und -Amplifikation sowie Verlust von PTEN) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Mammakarzinoms zu spielen, da in 35% der Patientinnen Veränderungen nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise zeigte sich ein Verlust von PTEN insbesondere in triple negativen Tumoren. Dies könnte zukünftig eine mögliche Zielstruktur bei dieser prognostisch ungünstigen Patientenpopulation darstellen. In der Gesamtpopulation der retrospektiven Studie hatten Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg keinen prognostischen Einfluss auf das Gesamtüberleben. In den Subgruppen der Patientinnen mit HR- und/oder HER2/neu positiven Tumoren hingegen zeigte sich eine prognostische Wertigkeit. Patientinnen mit HR-positiven Tumoren hatten ein verkürztes Gesamtüberleben bei gleichzeitigem Vorliegen einer *PIK3CA*-Mutation oder -Amplifikation. Patientinnen mit HR- und/oder HER2/neu-positiven Tumoren ohne Nachweis einer *PIK3CA*-Amplifikation hatten eine nahezu doppelt so langes Gesamtüberleben. Interessanterweise war der Nachweis einer *PIK3CA*-Mutation in dieser Patientensubgruppe prognostisch günstig. Dies zeigte sich auch bei Patientinnen mit HER2/neu Überexpression unabhängig des HR-Status. Scheinbar wirken sich bei positivem HR-Status Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg negativ auf das Überleben aus, während bei nicht triple negativen Tumoren (unter Einbeziehung HER2/neu-positiver Tumoren) *PIK3CA*-Mutationen prognostisch günstig zu sein scheinen. Zusammenfassend konnte die prognostische Wertigkeit von Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg nicht eindeutig gezeigt werden. Bei Patientinnen mit HR-positiven Tumoren scheinen Alterationen im PI3K/AKT-Signalweg einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben zu haben. Hier benötigt es weitere prospektive Studien in einem größeren Patientenkollektiv. Auch wenn die experimentellen Biomarker keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Progressionsfreie Überleben (PFS) unter Chemo- bzw. Hormontherapien zeigte, ist deren prädiktive Bedeutung insbesondere im Hinblick auf neue, zielgerichtete Therapeutika in weiteren Studien zu überprüfen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahn, P. H., Vu, H. T., Lannin, D., Obedian, E., DiGiovanna, M. P., Burtness, B., Haffty, B. G. (2005). Sequence of radiotherapy with tamoxifen in conservatively managed breast cancer does not affect local relapse rates. *J Clin Oncol* 23, 17-23.
2. Amir, E., Miller, N., Geddie, W., Freedman, O., Kassam, F., Simmons, C., Oldfield, M., Dranitsaris, G., Tomlinson, G., Laupacis, A., Tannock, I. F., Clemons, M. (2012). Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 30, 587-592.
3. Andre, F., Bachelot, T., Commo, F., Campone, M., Arnedos, M., Dieras, V., Lacroix-Triki, M., Lacroix, L., Cohen, P., Gentien, D., Adelaide, J., Dalenc, F., Goncalves, A., Levy, C., Ferrero, J. M., Bonnetterre, J., Lefeuvre, C., Jimenez, M., Filleron, T., Bonnefoi, H. (2014). Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol*
4. Andre, F., Cortes, J. (2015). Rationale for targeting fibroblast growth factor receptor signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 150, 1-8.
5. Armstrong, K., Eisen, A., Weber, B. (2000). Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 342, 564-571.
6. Baselga, J., Cortes, J., Kim, S. B., Im, S. A., Hegg, R., Im, Y. H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A., Clark, E., Benyunes, M. C., Ross, G., Swain, S. M., Group, C. S. (2012). Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *New England journal of medicine* 366, 109-119.
7. Baselga, J., Swain, S. M. (2010). CLEOPATRA: a phase III evaluation of pertuzumab and trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 10, 489-491.
8. Bauernfeind, I. (2011): *Manual Mammakarzinome (Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge)* (Vol. 13. Auflage). München: W. Zuckschwerdt Verlag.
9. Beaver, J. A., Park, B. H. (2012). The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Future Oncol* 8, 651-657.
10. Beelen, K., Opdam, M., Severson, T. M., Koornstra, R. H., Vincent, A. D., Wesseling, J., Muris, J. J., Berns, E. M., Vermorcken, J. B., van Diest, P. J., Linn, S. C. (2014). PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2, and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 16, R13.
11. Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., Linn, S. C., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., Beijersbergen, R. L., Mills, G. B., van de Vijver, M. J., Bernards, R. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12, 395-402.

12. Breckwoldt, M., Kaufmann, M.,Pfleiderer, A. (2007). Gynäkologie und Geburtshilfe, Maligne Tumorgen der Mamma. 5. Auflage, 241-260.
13. Brennan, M. J., Donegan, W. L.,Appleby, D. E. (1979). The variability of estrogen receptors in metastatic breast cancer. *Am J Surg* 137, 260-262.
14. Brunn Rasmussen, B.,Kamby, C. (1989). Immunohistochemical detection of estrogen receptors in paraffin sections from primary and metastatic breast cancer. *Pathol Res Pract* 185, 856-859.
15. Carlomagno, C., Perrone, F., Gallo, C., De Laurentiis, M., Lauria, R., Morabito, A., Pettinato, G., Panico, L., D'Antonio, A., Bianco, A. R.,De Placido, S. (1996). c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 14, 2702-2708.
16. Castaneda, C. A., Cortes-Funes, H., Gomez, H. L.,Ciruelos, E. M. (2010). The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29, 751-759.
17. Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, E., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., MacKinnon, E., McGale, P., McHugh, T., Peto, R., Taylor, C., Wang, Y.,Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 366, 2087-2106.
18. Coates, A. S., Winer, E. P., Goldhirsch, A., Gelber, R. D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B.,Senn, H. J. (2015). Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 26, 1533-1546.
19. Cristofanilli, M., Turner, N. C., Bondarenko, I., Ro, J., Im, S. A., Masuda, N., Colleoni, M., DeMichele, A., Loi, S., Verma, S., Iwata, H., Harbeck, N., Zhang, K., Theall, K. P., Jiang, Y. Q., Bartlett, C. H., Koehler, M.,Slamon, D. (2016). Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 17, 425-439.
20. Curtit, E., Nerich, V., Mansi, L., Chaigneau, L., Cals, L., Villanueva, C., Bazan, F., Montcuquet, P., Meneveau, N., Perrin, S., Algros, M. P.,Pivot, X. (2013). Discordances in estrogen receptor status, progesterone receptor status, and HER2 status between primary breast cancer and metastasis. *The Oncologist* 18, 667-674.
21. Dahabreh, I. J., Linardou, H., Siannis, F., Fountzilas, G.,Murray, S. (2008). Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *The oncologist* 13, 620-630.
22. de Duenas, E. M., Hernandez, A. L., Zotano, A. G., Carrion, R. M., Lopez-Muniz, J. I., Novoa, S. A., Rodriguez, A. L., Fidalgo, J. A., Lozano, J. F., Gasion, O. B., Carrascal, E. C., Capilla, A. H., Lopez-Barajas, I. B., Mateu, M. M., de Ceballos Reyna, M. H., Ferrando, A. O., Janez, N. M., Ballerini, V. C., Torres, A. A., Catalan, G., Saenz, J. A., Menjon, S.,Gonzalez-Angulo, A. M. (2014). Prospective evaluation of the conversion

rate in the receptor status between primary breast cancer and metastasis: results from the GEICAM 2009-03 ConvertHER study. *Breast Cancer Res Treat* 143, 507-515.

23. Di Cosimo, S., Baselga, J. (2009). Phosphoinositide 3-kinase mutations in breast cancer: a "good" activating mutation? *Clin Cancer Res* 15, 5017-5019.
24. Donegan, W. L. (1992). Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer* 70, 1755-1764.
25. Dupont Jensen, J., Laenkholm, A. V., Knoop, A., Ewertz, M., Bandaru, R., Liu, W., Hackl, W., Barrett, J. C., Gardner, H. (2011). PIK3CA mutations may be discordant between primary and corresponding metastatic disease in breast cancer. *Clin Cancer Res* 17, 667-677.
26. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687-1717.
27. Elbauomy Elsheikh, S., Green, A. R., Lambros, M. B., Turner, N. C., Grainge, M. J., Powe, D., Ellis, I. O., Reis-Filho, J. S. (2007). FGFR1 amplification in breast carcinomas: a chromogenic in situ hybridisation analysis. *Breast Cancer Res* 9, R23.
28. Ellis, M. J., Tao, Y., Luo, J., A'Hern, R., Evans, D. B., Bhatnagar, A. S., Chaudri Ross, H. A., von Kameke, A., Miller, W. R., Smith, I., Eiermann, W., Dowsett, M. (2008). Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst* 100, 1380-1388.
29. Elston, C. W., Ellis, I. O. (2002). 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. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology* 41, 151-152, discussion 152-153.
30. Euhus, D. (2012). Managing the breast in patients who test positive for hereditary breast cancer. *Ann Surg Oncol* 19, 1738-1744.
31. Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., Jeong, J. H., Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *New England journal of medicine* 347, 1233-1241.
32. Fisher, B., Anderson, S., Tan-Chiu, E., Wolmark, N., Wickerham, D. L., Fisher, E. R., Dimitrov, N. V., Atkins, J. N., Abramson, N., Merajver, S., Romond, E. H., Kardinal, C. G., Shibata, H. R., Margolese, R. G., Farrar, W. B. (2001). Tamoxifen and chemotherapy for axillary node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-23. *J Clin Oncol* 19, 931-942.
33. Gerber, B., Muller, H., Reimer, T., Krause, A., Friese, K. (2003). Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 79, 265-276.
34. Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., Skarlos, D., Campone, M., Davidson, N., Berger, M., Oliva, C., Rubin, S. D., Stein, S., Cameron, D. (2006).

Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *New England journal of medicine* 355, 2733-2743.

35. Giersiepen, K., Heitmann, C., Janhsen, K., Lange, C. (2005): Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25: Brustkrebs. Berlin: Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt.
36. Holli, K., Hietanen, P., Saaristo, R., Huhtala, H., Hakama, M., Joensuu, H. (2009). Radiotherapy after segmental resection of breast cancer with favorable prognostic features: 12-year follow-up results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 27, 927-932.
37. Jensen, J. D., Knoop, A., Laenkholm, A. V., Grauslund, M., Jensen, M. B., Santoni-Rugiu, E., Andersson, M., Ewertz, M. (2012). PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol* 23, 2034-2042.
38. Kalinsky, K., Jacks, L. M., Heguy, A., Patil, S., Drobnjak, M., Bhanot, U. K., Hedvat, C. V., Traina, T. A., Solit, D., Gerald, W., Moynahan, M. E. (2009). PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 15, 5049-5059.
39. Kaufmann, M., Hortobagyi, G. N., Goldhirsch, A., Scholl, S., Makris, A., Valagussa, P., Blohmer, J. U., Eiermann, W., Jackesz, R., Jonat, W., Lebeau, A., Loibl, S., Miller, W., Seeber, S., Semiglazov, V., Smith, R., Souchon, R., Stearns, V., Untch, M., von Minckwitz, G. (2006). Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol* 24, 1940-1949.
40. Konecny, G., Pauletti, G., Pegram, M., Untch, M., Dandekar, S., Aguilar, Z., Wilson, C., Rong, H. M., Bauerfeind, I., Felber, M., Wang, H. J., Beryt, M., Seshadri, R., Hepp, H., Slamon, D. J. (2003). Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 142-153.
41. Krag, D. (1999). Current status of sentinel lymph node surgery for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 302-303.
42. Kreienberg, R., Kopp, I., Albert, U. S., Follmann, M., et al. (2012). [Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms]. Web Page.
43. Leslie, N. R., Downes, C. P. (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *The Biochemical journal* 382, 1-11.
44. Li, S. Y., Rong, M., Grier, F., Iacopetta, B. (2006). PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat* 96, 91-95.
45. Liedtke, C., Broglio, K., Moulder, S., Hsu, L., Kau, S. W., Symmans, W. F., Albarracin, C., Meric-Bernstam, F., Woodward, W., Theriault, R. L., Kiesel, L., Hortobagyi, G. N., Pusztai, L., Gonzalez-Angulo, A. M. (2009). Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann Oncol* 20, 1953-1958.
46. Look, M. P., van Putten, W. L., Duffy, M. J., Harbeck, N., Christensen, I. J., Thomssen, C., Kates, R., Spyrtos, F., Ferno, M., Eppenberger-Castori, S., Sweep, C.

- G., Ulm, K., Peyrat, J. P., Martin, P. M., Magdelenat, H., Brunner, N., Duggan, C., Lisboa, B. W., Bendahl, P. O., Quillien, V., Daver, A., Ricolleau, G., Meijer-van Gelder, M. E., Manders, P., Fiets, W. E., Blankenstein, M. A., Broet, P., Romain, S., Daxenbichler, G., Windbichler, G., Cufer, T., Borstnar, S., Kueng, W., Beex, L. V., Klijn, J. G., O'Higgins, N., Eppenberger, U., Janicke, F., Schmitt, M., Foekens, J. A. (2002). Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 94, 116-128.
47. Lopez-Knowles, E., O'Toole, S. A., McNeil, C. M., Millar, E. K., Qiu, M. R., Crea, P., Daly, R. J., Musgrove, E. A., Sutherland, R. L. (2010). PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer* 126, 1121-1131.
48. McGuire, W. L., Clark, G. M. (1992). Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 326, 1756-1761.
49. Miller, A. B., Hoogstraten, B., Staquet, M., Winkler, A. (1981). Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 47, 207-214.
50. Moebus, V., Jackisch, C., Lueck, H. J., du Bois, A., Thomssen, C., Kurbacher, C., Kuhn, W., Nitz, U., Schneeweiss, A., Huober, J., Harbeck, N., von Minckwitz, G., Runnebaum, I. B., Hinke, A., Kreienberg, R., Konecny, G. E., Untch, M. (2010). Intense dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide compared with conventionally scheduled chemotherapy in high-risk primary breast cancer: mature results of an AGO phase III study. *J Clin Oncol* 28, 2874-2880.
51. Niikura, N., Liu, J., Hayashi, N., Mittendorf, E. A., Gong, Y., Palla, S. L., Tokuda, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Hortobagyi, G. N., Ueno, N. T. (2012). Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol* 30, 593-599.
52. Perez-Tenorio, G., Alkhorji, L., Olsson, B., Waltersson, M. A., Nordenskjold, B., Rutqvist, L. E., Skoog, L., Stal, O. (2007). PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 13, 3577-3584.
53. Perez, E. A., Romond, E. H., Suman, V. J., Jeong, J. H., Davidson, N. E., Geyer, C. E., Jr., Martino, S., Mamounas, E. P., Kaufman, P. A., Wolmark, N. (2011). Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol* 29, 3366-3373.
54. Ramirez-Ardila, D. E., Helmijr, J. C., Look, M. P., Lurkin, I., Ruigrok-Ritstier, K., van Laere, S., Dirix, L., Sweep, F. C., Span, P. N., Linn, S. C., Foekens, J. A., Sleijfer, S., Berns, E. M., Jansen, M. P. (2013). Hotspot mutations in PIK3CA associate with first-line treatment outcome for aromatase inhibitors but not for tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 139, 39-49.
55. Razis, E., Bobos, M., Kotoula, V., Eleftheraki, A. G., Kalofonos, H. P., Pavlakis, K., Papakostas, P., Aravantinos, G., Rigakos, G., Efstratiou, I., Petraki, K., Bafaloukos, D., Kostopoulos, I., Pectasides, D., Kalogeras, K. T., Skarlos, D., Fountzilias, G. (2011). Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 128, 447-456.

56. Riede, U. N., Werner, M., Schaefer, H. E. (2004). Allgemeine und spezielle Pathologie. 5, 973-980.
57. Robert, N. J., Dieras, V., Glaspy, J., Brufsky, A. M., Bondarenko, I., Lipatov, O. N., Perez, E. A., Yardley, D. A., Chan, S. Y., Zhou, X., Phan, S. C., O'Shaughnessy, J. (2011). RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 29, 1252-1260.
58. Royce, M. E., Osman, D. (2015). Everolimus in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer-Basic and Clinical Research* 9
59. Saal, L. H., Holm, K., Maurer, M., Memeo, L., Su, T., Wang, X., Yu, J. S., Malmstrom, P. O., Mansukhani, M., Enoksson, J., Hibshoosh, H., Borg, A., Parsons, R. (2005). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 65, 2554-2559.
60. Sabine, V. S., Crozier, C., Brookes, C. L., Drake, C., Piper, T., van de Velde, C. J., Hasenburg, A., Kieback, D. G., Markopoulos, C., Dirix, L., Seynaeve, C., Rea, D. W., Bartlett, J. M. (2014). Mutational analysis of PI3K/AKT signaling pathway in tamoxifen exemestane adjuvant multinational pathology study. *J Clin Oncol* 32, 2951-2958.
61. Scharl, A. (2011): Kommission Mamma der AGO e.V.: Aktuelle Empfehlungen zur Prävention, Diagnostik und Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome. Germering/München: W. Zuckschwerdt Verlag München.
62. Schmitt, M., Thomssen, C., Ulm, K., Seiderer, A., Harbeck, N., Hofler, H., Janicke, F., Graeff, H. (1997). Time-varying prognostic impact of tumour biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer. *Br J Cancer* 76, 306-311.
63. Schoppmann, S. F., Bayer, G., Aumayr, K., et al. (2004). Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg* 240(2), 306-312.
64. Simmons, C., Miller, N., Geddie, W., Gianfelice, D., Oldfield, M., Dranitsaris, G., Clemons, M. J. (2009). Does confirmatory tumor biopsy alter the management of breast cancer patients with distant metastases? *Ann Oncol* 20, 1499-1504.
65. Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A. M., Lluch, A., Neve, R. M., Kuo, W. L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., Sahin, A., Symmans, W. F., Pusztai, L., Nolden, L. K., Horlings, H., Berns, K., Hung, M. C., van de Vijver, M. J., Valero, V., Gray, J. W., Bernards, R., Mills, G. B., Hennessy, B. T. (2008). An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 68, 6084-6091.
66. Untch, M., Gerber, B., Möbus, V., Schneeweiss, A., Thomssen, C., von Minckwitz, G. (2011). St.-Gallen-Konferenz 2011 zum primären Mammakarzinom: Meinungsbild deutscher Experten (Zürich 2011) Zurich Consensus: Statement of German Experts on St. Gallen Conference 2011 on Breast Cancer (Zurich 2011). *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie 2011* 8(2), 106-115.

67. van der Groep, P., van der Wall, E., van Diest, P. J. (2011). Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)* 34, 71-88.
68. Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D. Y., Dieras, V., Guardino, E., Fang, L., Lu, M. W., Olsen, S., Blackwell, K., Group, E. S. (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 367, 1783-1791.
69. Veronesi, U., Cascinelli, N., Mariani, L., Greco, M., Saccozzi, R., Luini, A., Aguilar, M., Marubini, E. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 347, 1227-1232.
70. Welt, A., Tewes, M., Aktas, B., O, O. H., Wiesweg, M., Ting, S., Reis, H., Worm, K., Richly, H., Hense, J., Palmer, M. R., Lee, B. H., Wendling, J., Kossow, J., Scheulen, M. E., Lehnerdt, C., Kohl, M., Derks, C., Skottky, S., Haus, U., Schmid, K. W., Kimmig, R., Schuler, M., Kasper, S. (2013). Preemptive tumor profiling for biomarker-stratified early clinical drug development in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 142, 81-88.
71. Wittekind, C., Meyer, H. J. (2010): UICC TNM Klassifikation maligner Tumoren (Vol. 7. Auflage). New York: Wiley & Sons.
72. Wolff, A. C., Hammond, M. E., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P. L., Hanna, W. M., Langer, A., McShane, L. M., Paik, S., Pegram, M. D., Perez, E. A., Press, M. F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S. E., Tubbs, R., Vance, G. H., van de Vijver, M., Wheeler, T. M., Hayes, D. F., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 131, 18-43.
73. Wu, G., Xing, M., Mambo, E., Huang, X., Liu, J., Guo, Z., Chatterjee, A., Goldenberg, D., Gollin, S. M., Sukumar, S., Trink, B., Sidransky, D. (2005). Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, R609-616.
74. Yuan, T. L., Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-5510.
75. Zagouri, F., Sergentanis, T. N., Chrysikos, D., Zografos, C. G., Filipits, M., Bartsch, R., Dimopoulos, M. A., Psaltopoulou, T. (2013). Pertuzumab in breast cancer: a systematic review. *Clin Breast Cancer* 13, 315-324.
76. Zemzoum, I., Kates, R. E., Ross, J. S., Dettmar, P., Dutta, M., Henrichs, C., Yurdseven, S., Hofler, H., Kiechle, M., Schmitt, M., Harbeck, N. (2003). Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 21, 1022-1028.
77. Ziegler, A., Lange, S., Bender, R. (2007a). Survival analysis: Cox regression. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 132 Suppl 1, e42-44.

78. Ziegler, A., Lange, S., Bender, R. (2007b). Survival analysis: properties and Kaplan-Meier method. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946) 132 Suppl 1, e36-38.

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung (TNM-Klassifikation) nach UICC Nr. VII	S. 13
Tabelle 2: Lymphknotenstatus	S. 13
Tabelle 3: Fernmetastasen	S. 14
Tabelle 4: Die derzeit relevanten molekularen Mammakarzinomsubtypen	S. 19
Tabelle 5: Biomarkeranalyse	S. 32
Tabelle 6: Primer der <i>PIK3CA</i> -Mutationsanalyse	S. 34
Tabelle 7: Patientencharakteristika	S. 36
Tabelle 8: Tumorstadium des Primärtumors	S. 37
Tabelle 9: Lymphknotenstatus des Primärtumors	S. 37
Tabelle 10: Fernmetastasen bei Erstdiagnose	S. 37
Tabelle 11: Metachrone Metastasierung	S. 38
Tabelle 12: Histologie des Primärtumors	S. 39
Tabelle 13: Grading des Primärtumors	S. 39
Tabelle 14: Rezeptoren-Wechsel	S. 40
Tabelle 15: Therapie	S. 40
Tabelle 16: Überlebenszeiten	S. 41
Tabelle 17: Aminosäuresubstitution	S. 48
Tabelle 18: Prävalenz der Biomarker in Primärtumoren und Metastasen	S. 51
Tabelle 19: Prognostische Bedeutung der experimentellen Biomarker in Subgruppen mit bekannten prognostischen Faktoren	S. 59
Tabelle 20: Prädiktive Bedeutung der experimentellen Biomarker auf eine antihormonelle Therapie	S. 61
Tabelle 21: Progressionsfreies Überleben unter der Erstlinienchemotherapie	S. 63
Tabelle 22: Anzahl der Patienten in der Erstlinientherapie	S. 64
Tabelle 23: Progressionsfreies Überleben unter Fluoropyrimidin-haltiger Erstlinienchemotherapie	S. 65
Tabelle 24: Progressionsfreies Überleben unter Taxan-haltiger Erstlinienchemotherapie	S. 66
Tabelle 25: Progressionsfreies Überleben unter Bevacizumab-basierter Erstlinienchemotherapie	S. 67

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: PI3K Signalweg nach (Castaneda et al., 2010)	S. 11
Abb. 2: Medianes krankheitsfreie Überleben (DFS)	S. 41
Abb. 3: Gesamtüberleben seit Erstdiagnose (OS)	S. 42
Abb. 4: Medianes Überleben seit Metastasierung (MST_{pall})	S. 42
Abb. 5: Medianes krankheitsfreies Überleben	S. 43
Abb. 6: Medianes Gesamtüberleben nach Metastasierung	S. 44
Abb. 7: Durchführbarkeit der Biomarkeranalysen	S. 45
Abb. 8: Verteilung der etablierten Biomarker	S. 46
Abb. 9 Verteilung der experimentellen Biomarker	S. 47
Abb. 10: Alterationen im PI3K/AKT Signalweg	S. 49
Abb.11: Alterationen im PI3K/AKT Signalweg in Bezug auf den Rezeptorstatus	S. 50
Abb. 12: Einfluss der Hormonrezeptoren auf das Gesamtüberleben seit Metastasierung (MST_{pall})	S. 52
Abb. 13: Einfluss der HER2/neu-Überexpression auf das Gesamtüberleben seit Metastasierung (MST_{pall})	S. 53
Abb. 14: Prognostische Bedeutung triple negativer-Tumoren auf das Gesamtüberleben nach Metastasierung (MST_{pall})	S. 54
Abb.15: Einfluss der etablierten Rezeptoren auf die Überlebenswahrscheinlichkeit	S. 55
Abb.16: Prognostische Bedeutung der experimentellen Biomarker	S. 56
Abb. 17: Prognostische Bedeutung von Alterationen des PI3K-Signalweges	S. 57
Abb.18: Prädiktive Bedeutung der experimentellen Biomarker auf eine antihormonelle Therapie	S. 62
Abb.19: Prädiktive Bedeutung der experimentellen und etablierten Biomarker auf eine Erstlinienchemotherapie	S. 63

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AI	Aromataseinhibitoren
AKT	Gen der Proteinkinase B
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BAX	Bcl-2 associated X protein
BRCA1 und BRCA2	Breast Cancer 1 und 2
CCND1	Cyclin-D1
CDH1	Cadherin 1
CISH	Chromogener-in-situ-Hybridisierung
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil
C-MYC	kodiert für den Transkriptionsfaktor MYC
CDK4/6-Inhibitor	Cyclin-dependent kinases 4 and 6-Inhibitor
CR	Complete remission
CTX	Chemotherapie
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DFS	Disease free survival
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EGF(R)	Epidermal Growth Factor (Rezeptor)
ELF4E	Eukaryoter Translations-Initiationsfaktor 4E
ER	Östrogenrezeptor
FASL	Fas ligand
FISH	Fluoreszenz- in-situ-Hybridisierung
G	Grading
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
ICH	Immunhistochemie
INT-2	Entspricht FGF-3, fibroblast growth factor 3
ISH	In-situ-hybridisierung
KFÜ	Krebs-Früherkennungsrichtlinie
Ki-67	Kiel 67 - Proliferationsmarker
K-RAS	Kirsten rat sarcoma
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ

MSTpall	Median Survival Time (palliative)
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NM23	Nucleoside diphosphate kinase 1
OS	Overall survival
P21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
P27KIP1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PARP	Poly (ADP-ribose)-Polymerase
PD	Progressive disease
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PFS	Progression Free Survival
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinasen
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PIP2	Phosphatidylinositol-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-Trisphosphat
PR	Partial remission
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
R	Resektionsstatus
RB1	Retinoblastom-Protein
RBD	RAS-bindenden Domäne
RTX	Radiotherapie
S6K	Ribosomale p70S6 Kinase
SD	Stable disease
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
SISH	Silber-in-situ-Hybridisierung
T-DM1	Trastuzumab Emtansin
Tis	Carcinoma in situ
TNM	Tumor Nodes Metastases
TP-53	Tumor Protein P53
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA/PAI-1	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ und sein Inhibitor PAI-1
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A

WHO
WTZ

Weltgesundheitsbehörde
Westdeutschen Tumorzentrum

8. Danksagung

Die Erstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit wäre ohne einige Personen, die mich auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben, nicht möglich gewesen:

Danken möchte ich daher dem Direktor der Inneren Klinik (Tumorforschung), Herrn Professor Dr. med. M. Schuler, in dessen Klinik ich die Dissertation verfassen konnte.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Univ.-Prof. Dr. med. S. Kasper, der mich durch seine exzellente Betreuung und Hilfestellung bei allen aufkommenden Fragen maßgeblich unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich dem Direktor der Frauenklinik Prof. Dr.med. K. R. Kimmig danken, der mir einen Teil der Patientendaten zur Verfügung gestellt hat.

Zu guter Letzt gilt der abschließende und besondere Dank meiner Familie und insbesondere meinen Eltern. Sie haben mir meinen Weg durch Ihre Unterstützung, Ihren Stolz und Ihren Rückhalt in vielerlei Hinsicht erleichtert.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.