

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Campus Innenstadt

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Steroidhormonrezeptoren sind positive
Prognostikoren für das Mammakarzinom – ist dies
universell anwendbar oder abhängig von der Fokalität?**



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

Vorgelegt von

Alaleh Zati Zehni

Aus

Berlin

2023

Meiner Familie

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Reinhold Tiling
	PD Dr. Dorit Di Gioia
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Theresa Vilsmaier
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	09.02.2023

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	8
1.1 EPIDEMIOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS.....	9
1.2 ÄTIOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS.....	10
1.3 PATHOMORPHOLOGISCHE FAKTOREN DES MAMMAKARZINOMS	12
1.3.1 <i>histologischer Typ</i>	12
1.3.2 <i>Grading</i>	13
1.3.3 <i>Stadieneinteilung nach TNM und UICC</i>	14
1.3.4 <i>Fokalität</i>	15
1.3.5 <i>Hormonrezeptorstatus</i>	17
1.4 THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER UNTERSUCHTEN REZEPTOREN	18
1.4.2 <i>Östrogenrezeptor</i>	18
1.4.3 <i>Progesteronrezeptor</i>	20
1.5 THERAPIEREGIME DES MAMMAKARZINOMS.....	21
1.5.2 <i>Endokrine Therapie des Mammakarzinoms</i>	22
1.6 PROGNOTISCHE UND PRÄDIKTIVE FAKTOREN DES MAMMAKARZINOMS.....	24
2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
3. MATERIAL UND METHODEN.....	26
3.3 AUSWAHL DES PATIENTENKOLLEKTIVS	26
3.4 VERWENDETE MATERIALIEN	27

3.4.1	<i>Gewebeproben</i>	27
3.4.2	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	28
3.4.3	<i>Reagenzien</i>	29
3.4.4	<i>Primärantikörper und Detektionssysteme</i>	30
3.5	IMMUNHISTOCHEMIE	30
3.5.2	<i>Scoring der Immunhistochemie</i>	34
3.6	STATISTISCHE METHODIK UND SOFTWARE	35
4.	ERGEBNISSE	36
4.3	ÖSTROGENREZEPTOR	36
4.3.2	<i>Unifokal</i>	36
4.3.3	<i>Multifokal/Multizentrisch</i>	37
4.4	PROGESTERONREZEPTOR.....	38
4.4.2	<i>Unifokal</i>	38
4.4.3	<i>Multifokal/Multizentrisch</i>	39
4.5	TRIPLE NEGATIVES MAMMAKARZINOM.....	40
4.5.2	<i>Unifokal</i>	40
4.5.3	<i>Multifokal/Multizentrisch</i>	41
5.	DISKUSSION	42
6.	AUSBLICK	45
7.	ZUSAMMENFASSUNG	48
8.	LITERATURVERZEICHNIS	49

9. ANHANG.....	57
9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	57
9.2 TABELLENVERZEICHNIS.....	58
9.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	59
9.4. DANKSAGUNG.....	60
10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	61
11. CURRICULUM VITAE	

1. Einleitung

Auch im Jahr 2020 ist das invasive Mammakarzinom, die häufigste maligne Tumorentität der Frau und das insgesamt zweithäufigste Malignom weltweit. Aufgrund der stetig steigenden Inzidenz und hohen Letalität, vor allem in den fortgeschrittenen Stadien, steht das Mammakarzinom im Vordergrund gynäko-onkologischen Forschung.

Das Hormonrezeptor positive Mammakarzinom macht weiterhin mit 75-80% Prozent den größten Teil aller Mammakarzinome aus. In den letzten Jahrzehnten konnten hier bereits große Fortschritte durch Neuerungen in den endokrinen Therapieregimen erzielt und somit die Letalität des Hormonrezeptor positiven Mammakarzinoms gesenkt werden.

Im Hinblick auf die Fokalität und Zentrität des Mammakarzinoms und deren Einfluss auf die Prognose sind die Meinungen zum jetzigen Zeitpunkt noch sehr divers. Multifokalität und/oder Zentrität wird zwar größtenteils in der Literatur als negativ korrelierend mit der Prognose beschrieben, nichtsdestotrotz gehört die Fokalität zum aktuellen Zeitpunkt nicht zu den etablierten Prognosefaktoren.

Somit ist folgendes bereits bekannt: das Hormonrezeptor positive Mammakarzinom hat vergleichsweise eine bessere Prognose als das Triple negative Mammakarzinom und ein unifokales Mammakarzinom eine bessere Prognose als ein multifokales/multizentrisches. Doch welchen prognostischen Einfluss haben die etablierten Hormonrezeptoren auf das unifokale und im Gegensatz dazu das multifokale und/oder multizentrische Mammakarzinom?

In dieser Arbeit wurden die zwei wesentlichsten Hormonrezeptoren, der Östrogen- und Progesteron Rezeptor, mit besonderem Augenmerk auf die Fokalität und Zentrität und deren Einfluss auf die Prognose analysiert. Um die Aussagekraft zu stärken und für einen besseren Vergleich zu sorgen, wurde das Triple negative Mammakarzinom nach den gleichen Gesichtspunkten ausgewertet. Die folgende Untersuchung soll als Grundlage für eine zielgerichtete und somit nebenwirkungsärmere Therapie des Hormonrezeptor positiven Mammakarzinoms dienen.

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Weltweit ist das Mammakarzinom (MK) laut Globocan mit geschätzten 2.2 Millionen Inzidenzfällen und 684 996 Todesfällen im Jahr 2020 die mit Abstand häufigste Tumorentität und Krebstodesursache der Frau [1]. Bei einer Geschlechterverteilung von 100:1 sind unter den Neuerkrankungen nur 1% männlichen Geschlechts.

In Deutschland erkrankten laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten zuletzt jährlich 69.000 Frauen am Mammakarzinom, hier betrug die Mortalität 22,8 [2]. Um das Ausmaß zu verdeutlichen, erkrankt jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom, das mittlere Erkrankungsalter bei Erstdiagnose beträgt 64 Jahre.

Insgesamt ist seit einigen Jahren eine rückläufige Tendenz der Inzidenz und Sterblichkeit der Erkrankung zu beobachten mit einer großen Divergenz im weltweiten Vergleich. Während in den entwickelten Ländern zwar vergleichsweise höhere Inzidenzraten aufgezeichnet werden, sind in den Entwicklungsländern weitaus höhere Sterberaten zu verzeichnen. Letzteres wird vor allem in den entwickelten Ländern wie Deutschland auf den Fortschritt in der sekundären Prävention mit der Einführung des Mammographie-Screenings für Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr, sowie den Neuerungen der adjuvanten systemischen Therapiemöglichkeiten zurückgeführt. Mit der Einführung des Mammographie-Screenings in Deutschland, je nach Region zwischen 2005 und 2009, kam es kurzzeitig in der entsprechenden Altersgruppe zu einem Anstieg der Neuerkrankungen. Der Rückgang der Letalität ist somit zum einen auf das frühere Erkrankungsstadium bei Erstdiagnose dank des Screenings und zum Anderen den stetig neuen Therapiemöglichkeiten zu begründen. Ein Langzeit Effekt auf die epidemiologische Entwicklung bleibt hier allerdings noch abzuwarten.

Bei ca. 30% aller Frauen mit einem Mammakarzinom ist eine familiäre Belastung nachzuverfolgen. Sind nahe Verwandte an einem Mamma- und / oder Ovarialkarzinom erkrankt, steigt das eigene Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken. Inzwischen wurden etliche Genmutationen mit einem erheblich höheren Erkrankungsrisiko nachgewiesen, die Mutationen der BRACA Gene sind jedoch weiterhin die am besten erforschten. Bei jeder 4. Patientin mit einer familiären Belastung lässt sich eine Mutation im BRCA-Gen (BRCA1 und BRCA2) identifizieren. Hierbei erkranken die Patientinnen im Durchschnitt meist 15-20 Jahre früher, bei einem Mutationsnachweis im BRCA1-Gen häufig an

einem Triple-negativen, schlecht differenzierten G3-Tumor und einem hohen Ki67-Proliferationsindex, einhergehend mit einer schlechteren Prognose [3].

1.2 Ätiologie des Mammakarzinoms

Während die Pathogenese des Mammakarzinoms beinahe gänzlich erforscht ist, bleiben bei Ätiologie noch einige Fragen offen, wobei am ehesten von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen wird. Es werden etliche Faktoren beschrieben, die das Risiko für das Auftreten eines Mammakarzinoms begünstigen. Zusammengefasst spielen hereditäre-, hormonelle- und sonstige Risikofaktoren sowie Risikoläsionen eine große Rolle bei der Entstehung des MK, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Neben dem weiblichen Geschlecht ist das Alter, als eine der beiden wichtigsten Risikofaktoren aufzuführen. Das mittlere Erkrankungsalter für das Mammakarzinom liegt bei 64 Jahren und somit einige Jahre unter dem Durchschnitt anderer Krebserkrankungen. Außerdem begünstigen Faktoren wie eine hohe Brustgewebisdichte, Diabetes mellitus Typ II, geringe körperliche Aktivität sowie Alkohol- und Nikotinabusus die Auftretenswahrscheinlichkeit eines Mammakarzinoms.

Wie oben bereits kurz angeschnitten, spielt die familiäre Belastung im Sinne eines hereditären Risikofaktors eine große Rolle. Hierzu zählen Keimbahnmutationen in DNA-Tumorsuppressorgenen wie dem BRCA1-, BRCA2 oder PALB2-Gen und Mutationen von Genen anderer erblich bedingter Krebs syndrome wie zum Beispiel das Li-Fraumeni-Syndrom aber auch eine familiäre Belastung ganz ohne Mutationsnachweis.

Risikoläsionen werden als Vorstufen des invasiven MK zusammengefasst mit unterschiedlichen pathologischen Eigenschaften und dem Ursprungsgewebe. Hierzu zählt die atypische duktale Hyperplasie, das duktale Carcinoma in Situ (DCIS), die flache epitheliale Atypie (FEA), die lobuläre intraepitheliale Neoplasie (LIN), sowie das intraduktale Papillom. Alle genannten Läsionen haben den Charakter einer Neoplasie gemeinsam, jedoch mit bedeutend unterschiedlichem Progressionsrisiko. Das DCIS grenzt sich hierbei als einzige obligate Präkanzerose von den anderen genannten Risikoläsionen ab. Wird ein DCIS nicht therapiert oder gar diagnostiziert, vergehen laut aktueller Datenlage im Durchschnitt 9,0 Jahre

bis dieses in ein invasives MK übergeht [4, 5]. Denn auch das Malignitätspotential des DCIS ist abhängig von diversen pathomorphologischen Faktoren wie dem Grading, der Größe, dem immunhistologischen Phänotyp sowie der Subtyp.

Gemäß dem Thema dieser Arbeit, wären an dieser Stelle noch die hormonellen Risikofaktoren aufzuzählen. Hier spielen die weiblichen Geschlechtshormone- das Östrogen und Progesteron – deren Konzentrationslevel dem weiblichen Zyklus unterliegt, die bedeutendste Rolle. Ein langer hormonell aktiver Zeitraum, wie eine frühe Menarche, späte Menopause und Nulliparität können das Risiko für das Auftreten eines Mammakarzinoms steigern. Mit jedem Lebensjahr, um das sich die Menopause nach hinten verschiebt, steigt das Risiko für das MK um 3%. So auch bei den Schwangerschaften: mit jeder Schwangerschaft sinkt das Mammakarzinom Risiko um 5-10%, bedeutend ist hier auch das Alter während der Gravidität [6, 7]. Neben den endogenen weiblichen Hormonen, sind auch die exogen zugeführten Hormone wie beispielsweise orale Kontrazeptiva und die Hormonersatztherapie (HRT) in der Menopause von großer Relevanz. Letzteres führte vor allem in den letzten Jahren zu kontroversen Diskussionen in Forschungskreisen mit dem Ziel der optimalen Risiko-Nutzenbewertung bei der Therapie klimakterischer Beschwerden [8]. Ein Konsens besteht darin, dass eine HRT mit einer Risikosteigerung für das Auftreten eines Mammakarzinoms einher geht. Allerdings muss hierbei zwischen einer Östrogen-Gestagen Therapie (EPT) und reinen Östrogen Therapie (ET), sowie zwischen einer systemischen und lokalen HRT unterschieden werden. Nicht nur die Zusammensetzung der HRT, sondern auch die Behandlungsdauer fallen bei der Risikoberechnung ins Gewicht. Das relative Risiko einer EPT als HRT liegt beispielsweise bei 1,26 und entspricht pro Anwendungsjahr 8 zusätzlichen MK pro 10.000 Frauen. Eine signifikante Risikoerhöhung wird erst nach einer Anwendungsdauer ab 3 bis 5 Jahren diskutiert und sinkt innerhalb von wenigen Jahren nach dem Absetzen der EPT. Im Vergleich zur EPT zeigt eine reine ET eine verhältnismäßig geringere Risikosteigerung.

1.3 Pathomorphologische Faktoren des Mammakarzinoms

1.3.1 HISTOLOGISCHER TYP

Die histologische Typisierung des Mammakarzinoms wird anhand der aktuellen, zuletzt 2019 erschienenen 5. Ausgabe der WHO-Klassifikation durchgeführt [9]. Die erste Ausgabe der WHO-Klassifizierung erschien im Jahr 1968, in der 10 histologische Typen des MK beschrieben wurden. Um den medizinischen Fortschritt zu verdeutlichen: 42 Jahre später unterteilt die WHO in der 5. Edition bereits 44 verschiedene histologische Subtypen des MK. Mit dem Ziel der bereits präoperativen histologischen Sicherung via Stanz- oder Vakuumbiopsie, soll die Klassifizierung der radiologisch-pathologischen Korrelation, der frühen Therapieplanung und der prognostischen Abschätzung dienen.

Die endgültige Festlegung des histologischen Typs wird dann anhand des entnommenen OP-Präparates vorgenommen, denn aufgrund der intratumoralen Heterogenität kann es hier zu Abweichungen kommen. Eine prognostische Relevanz hat vor allem die Abgrenzung zwischen einem gemischten und reinen speziellen Typen des Karzinoms. Letzteres liegt dann vor, wenn mindestens 90% des Tumors das jeweils spezialisierte Muster aufweisen wie beispielsweise das invasiv lobuläre Karzinom. Definitionsgemäß liegt ein gemischtes invasives Karzinom dann vor, wenn in 10-49% des Tumors kein einheitlich charakteristisches Muster nachgewiesen werden kann. Von einem invasiven Karzinom, kein spezieller Typ (NST) wird dann gesprochen, wenn das Karzinom in über 50% der Zellen ein nicht spezialisiertes Muster aufweist. Das NST macht mit bis zu 80% den weitaus häufigsten histologischen Tumortyp aus, gefolgt vom invasiv lobulären Karzinom, welches in 15% der invasiven MK zu identifizieren ist. Bezüglich der prognostischen Aussagekraft wird zum aktuellen Zeitpunkt davon ausgegangen, dass die NST's eine vergleichsweise schlechtere Prognose haben. Da hier die Evidenz noch unzureichend ist, zählt die histologische Typisierung des MK nicht zu den etablierten Prognosefaktoren.

1.3.2 GRADING

Laut aktueller S3-Leitlinie soll die Graduierung des invasiven MK nach dem von Elston und Ellis modifizierten Bloom-Richardson-System vorgenommen werden [10]. In diesem Scoringssystem werden drei Dignitätskriterien mit jeweils 1 bis 3 Punkten bewertet: das Ausmaß der Kernpolymorphien, der Anteil an tubulären Strukturen, sowie die Anzahl der Mitosen. Je nach Summenscore wird dann in G1 bis G3 unterteilt (Tabelle 1) [11]. Ähneln die Tumorzellen in ihren Eigenschaften noch sehr der Ursprungszelle und weisen ein langsames Wachstumsmuster auf, gelten sie als wenig aggressiv und gut differenziert (G1). Demgegenüber stehen die G3 Tumorzellen, welche undifferenziert sind, hohe Mitoseraten aufweisen und demzufolge besonders aggressiv sind [12]. Von besonderer Bedeutung für eine eventuelle neoadjuvante Therapie ist die präoperative Differenzierung zwischen einem G2 und G3 Tumor. Wie bei der histologischen Typisierung, besteht auch beim Grading das Risiko einer Differenz zwischen der gewonnenen Biopsie und dem vollständigen Operationspräparat.

Tabelle 1. Grading-System des invasiven MK nach Elston und Ellis [10]

Merkmale	Kriterien	Score	
Kernpolymorphien	Gering	1	
	Mittelgradig	2	
	Hochgradig	3	
Anteil tubulärer Strukturen	>75% des Gewebes	1	
	10-75% des Gewebes	2	
	<10% des Gewebes	3	
Anzahl der Mitosen	≤1/ Gesichtsfeld	1	
	2/ Gesichtsfeld	2	
	≥3/ Gesichtsfeld	3	
Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3-5	gering	G1	Gut differenziert
6-7	mäßig	G2	Mäßig differenziert
8-9	hoch	G3	Schlecht differenziert

1.3.3 STADIENEINTEILUNG NACH TNM UND UICC

Anhand der TNM-Klassifikation (Tumor-Node-Metastasis) werden die invasiven MK's international klassifiziert (Tabelle 2) [13, 14]. Die T Kategorie beschreibt hierbei die Tumorgröße. In Bezug auf Multifokalität und Multizentrität, soll laut aktueller S3-Leitlinie das Karzinom bei multiplen simultanen Tumoren der Brust mit der höchsten T-Kategorie klassifiziert werden. Simultane bilaterale Mammakarzinome hingegen werden getrennt klassifiziert. Die N Kategorie beschreibt die regionären Lymphknoten (LK). Hierzu zählen die ipsilateralen axillären, supra-und infraklavikulären Lymphknoten und die entlang der A. mammaria interna. Alle weiteren LK und Fernmetastasen werden unter der M Kategorie Metastasen klassifiziert. Entsprechend der drei TNM Kriterien wird das MK in der UICC-Klassifikation (Union for international cancer control) in die klinischen Stadien 0 bis IV eingeteilt.

Tabelle 2. TNM-Klassifikation und UICC-Stadieneinteilung des MK

UICC-Stadium	Tumorgröße (T)	Regionäre LK (N)	Fernmetastasen (M)
0	Tis (Carcinoma in situ)	N0 (keine regionären LK-Metastasen)	M0 (keine Fernmetastasen)
IA	T1 (≤ 2 cm)	N0	M0
IB	T0-1	N1mic	M0
IIA	T0-1	N1 (bewegliche Level I-II)	M0
IIB	T2 ($>2 - \leq 5$ cm)	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3 (>5 cm)	N0	M0
IIIA	T0-2	N2 (fixierte Level I-II LK)	M0
IIIB	T3	N1-2	M0
	T4 (jede Größe, Infiltration der Haut/Brustwand)	N0-2	M0
IIIC	Jedes T	N3 (Level III)	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1 (Fernmetastasen)

1.3.4 FOKALITÄT

Im letzten Jahrzehnt ist die Fokalität in Forschungskreisen in den Mittelpunkt gerückt und hier vor allem die Frage nach der prognostischen Bedeutung, der optimalen Diagnostik und Therapie [15-18]. Nichtsdestotrotz fehlt es weiterhin an einer standardisierten internationalen Definition der beiden MK Entitäten: multifokal und multizentrisch. Aus diesem Grund und der besseren Vergleichbarkeit, wurden in dieser Arbeit die multifokalen und multizentrischen MK Fälle zusammengefasst und den unifokalen MK Fällen gegenübergestellt. Bei der Datenerhebung haben wir uns an die Definition der aktuellen S3-Leitlinie gehalten. Hier beschreibt der Terminus Multifokalität das Vorhandensein von makroskopisch erkennbaren, getrennten Karzinomherden innerhalb eines Quadranten bzw. ein Abstand von weniger als 4 cm zwischen den Herden nach Faverly et al [4, 19]. Der Begriff Multizentrität wird laut Faverly et. al definiert als das Auftreten von Karzinomherden in mehr als einem Quadranten bzw. einem Abstand von mindestens 4 cm. Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung, bemängeln Autoren auch in der neusten Ausgabe unter anderem die unzureichende Beachtung der Fokalität in dem UICC TNM-Staging System für Mammakarzinome [13]. Hier wird vor allem die Tatsache kritisiert, dass die MK's mit mehr als einem Fokus zwar mit einer schlechteren Prognose einher gehen, dies jedoch weiterhin nicht zu den etablierten Prognosefaktoren des TNM-Staging Systems gehören [13, 20]. Dennoch hat die 8. Ausgabe eine wichtige Neuerung in der Klassifikation der Fokalität mit sich gebracht: demnach wird bei der Tumorgröße (T) multifokalen und/oder multizentrischen MK's der größte Tumordurchmesser gemessen und als modifiziert (m) beschrieben [14]. Bei der Diagnostik multifokaler und/oder multizentrischer MK's ist die Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie (KM-MRT, Abbildung 2) der Basisdiagnostik (Mammographie und Ultraschall) überlegen [11, 21, 22]. Laut S3-Leitlinie ist die Indikation eines KM-MRT kritisch zu stellen und erst nach Diskussion in einem interdisziplinären Tumorboard durchzuführen.

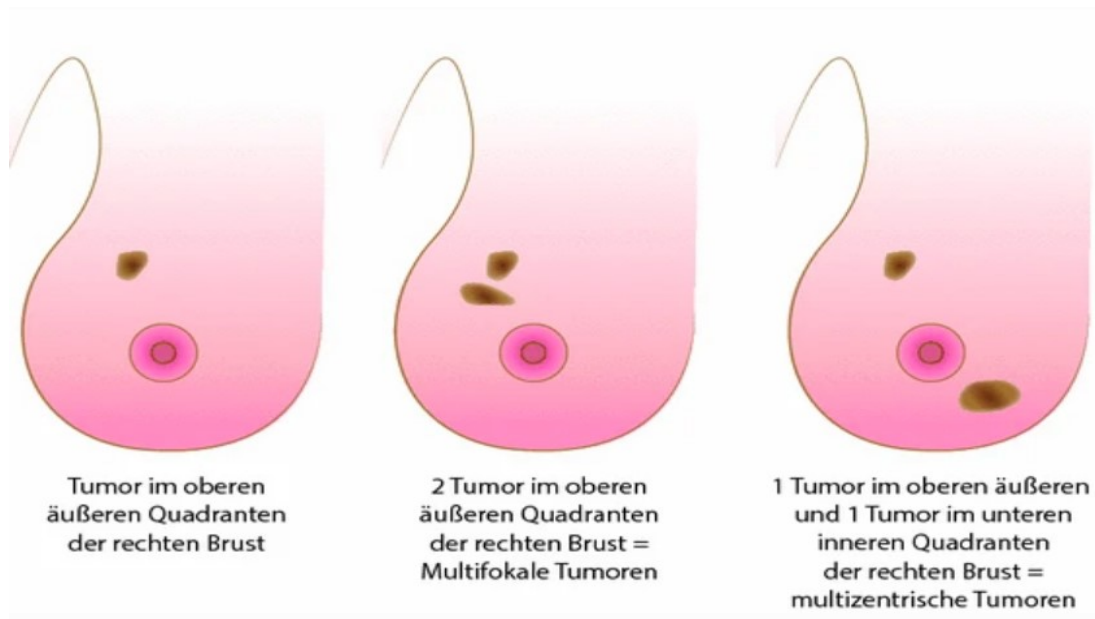


Abb. 1 Schematische Darstellung der Fokalität/Zentrität eines MK. Von links nach rechts ist ein unifokales, multifokales und multizentrisches MK abgebildet. Kopie aus [23]

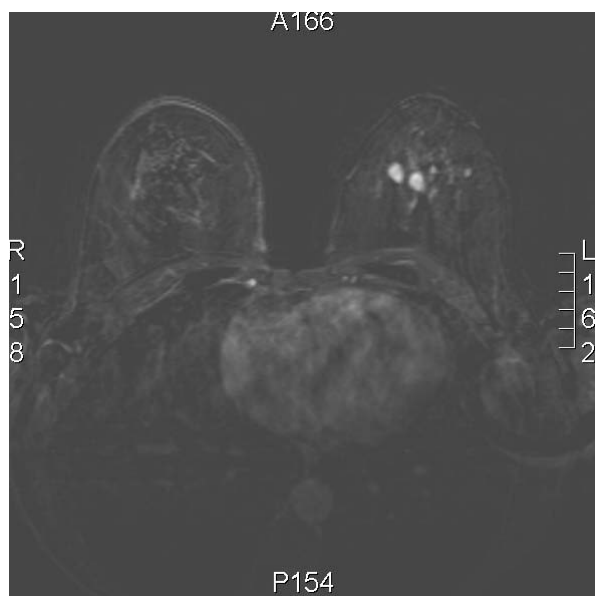


Abb. 2 Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie der Brust: multizentrisches MK links

1.3.5 HORMONREZEPTORSTATUS

Bereits bei der Primärdiagnostik des invasiven MK's erfolgt durch verschiedene immunhistochemische Verfahren die Bestimmung des Östrogen-, Progesteron- und Her2-Rezeptorstatus sowie des Ki-67 Proliferationsindex. Der Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) Status werden gemäß der Leitlinie der American Society of Clinical Oncology (ASCO) / College of American Pathologists (CAP) interpretiert [24]. Dabei wird der Prozentsatz und die Färbeintensität der positiven Tumorzellen nach folgendem Schema ausgewertet:

- ER/PR-negativ: <1% positive Tumorzellkerne
- ER/PR-gering positiv: 1-9% positive Tumorzellkerne
- ER/PR-positiv: $\geq 10\%$ positive Tumorzellkerne

Darüber hinaus können noch diverse Scoring-Systeme angewandt werden, wie unter anderem der unter 3.5.2 näher erläuterte Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner [25]. Für die Festlegung des Human epidermal Growth Factor Rezeptor 2 (Her2) Status können zwei Verfahren angewandt werden. Zum einen eine mittels Immunhistochemie nachgewiesene Protein-Überexpression mit einem maximalen Score von 3 oder einer anhand von In-situ nachgewiesenen Genamplifikation. Ein Triple negatives (TN) MK liegt dann vor, wenn der ER, PR und Her2 negativ sind. Zusätzlich kann immunhistochemisch der Ki67-Proliferationsindex bestimmt werden, bislang fehlt hier jedoch eine standardisierte Methodik. Ki-67 ist ein Protein, das im Zellkern sich teilender Zellen exprimiert wird und somit die Geschwindigkeit des Tumorwachstums demonstriert. Anhand dieser immunhistochemischen Analysen wird das MK in fünf molekulare Subtypen unterteilt, erstmals beschrieben im Jahr 2000 von Perou et al. (Tabelle 3.) [26]. Definiert durch die RNA-Expressionsprofile, werden unter Luminal-A Karzinomen, diejenigen mit einem positiven ER- und/oder PR-Status und einem niedrigem Ki67-Proliferationsindex zusammengefasst. Luminal-B Karzinome hingegen sind ebenfalls HR positiv mit geringer HR Expression und zeichnen sich mit einer hohen Proliferationsrate und häufig höherem Grading aus. Basal-like Karzinome entsprechen den Triple negativen Karzinomen mit einem negativen HR- und Her2- Status (Tabelle 3.). Diese Subtypisierung bildet im klinischen Alltag die wichtigste Grundlage sowohl für die Prognoseabschätzung als

auch für die systemische Therapiewahl. Die klinische Relevanz der molekularen Subtypen des MK soll im Abschnitt 1.5 näher erläutert werden.

Tabelle 3. Immunhistochemische molekulare Subtypisierung des invasiven MK

Subtyp		ER/PR-Status	Her2-Status	Ki-67-Proliferationsindex
Luminal A		+	-	niedrig
Luminal B	Her2-positiv	+	-	hoch
	Her2-negativ	+	+	Jeder Wert
Her2-positiv		-	+	Jeder Wert
Basal-like (TN)		-	-	Jeder Wert

+ = positiv; - = negativ

1.4 Theoretische Grundlagen der untersuchten Rezeptoren

Sowohl der Östrogen-, als auch der Progesteronrezeptor gehören als Steroidrezeptoren zu der Familie der nuklearen Rezeptoren. Steroidhormone sind lipophil und binden in ihrer jeweiligen Zielzelle im Zytoplasma, an das zu ihnen passende Rezeptorprotein, woraufhin der Hormon-Rezeptorprotein-Komplex in den Zellkern wandert (Translokation). Im Zellkern wird nun die Transkription bestimmter Gene indiziert oder gehemmt. Die hierdurch vermehrt oder vermindert synthetisierten Proteine sind dann verantwortlich für die eigentliche Zellantwort.

1.4.2 ÖSTROGENREZEPTOR

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass der Vollständigkeit halber in folgendem auch die Rolle des ER β in Kürze erläutert wird mit dem Hinweis, dass die Auswertungen in dieser Studie sich rein auf den ER α beziehen.

Bis zur Isolierung des ER β erstmalig im Prostata- und Ovargewebe der Ratte im Jahr 1996 durch Kuiper et. al., galt der ER α als einzige Form des Östrogenrezeptors [27]. Die humanen Östrogenrezeptoren werden von zwei verschiedenen Genen kodiert: der ER α befindet sich auf dem Chromosom 6q25, der ER β auf dem Chromosom 14q22-24 [28]. Der Östrogenrezeptor existiert also in zwei Isoformen, die große Homologien in der N-terminalen (95%) und Liganden-bindenden Domäne (55%) aufweisen, dem Östrogenrezeptor α (ER α) und Östrogenrezeptor β (ER β). Unterschiede dieser beiden Isoformen findet man in der Gewebs- und Zellspezifität, sowie der Affinität zu den jeweiligen Östrogenen. Während die höchste

Expression von ER α mRNA im Endometrium und in den Leydig-Zellen der Hoden nachgewiesen wurde, ist die Konzentration von ER β mRNA vor allem in Granulosazellen, Milchdrüsen und heranreifenden Spermatozyten am größten. Beide ER Subtypen sind vergleichbar häufig in Ovar, Lunge, Brustgewebe, Knochen, Gehirn und Urogenitaltrakt vorzufinden [29]. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, wird dieser aktiviert und kann dimerisieren. Daher kann es zur Bildung von ER Homodimeren (ER $\alpha\alpha$ oder ER $\beta\beta$) oder Heterodimeren (ER $\alpha\beta$) kommen. Bezüglich der Affinität der einzelnen Östrogensubstanzen, kann Östradiol (E2) als wichtigstes Östrogen sowohl den ER α als auch den ER β binden, während Östron (E1) vorzugsweise an den ER α und Östriol (E3) an den ER β binden. Die Östrogene unterscheiden sich jeweils in der Anzahl der OH-Gruppen des Hormons und führen somit zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Wirksamkeit: relative Wirkung E2 : E1 : E3 = 10 : 5 : 1 [30]. Östrogene spielen in der Ausprägung und Aufrechterhaltung der primären und sekundären Geschlechtsorgane eine essenzielle Rolle, so führen sie in gesundem Gewebe zur Entwicklung und Proliferation der Brustdrüse.

In entartetem Brustgewebe hingegen, ist der ER α in etwa zu 75% nachzuweisen und entfaltet seine kanzerogene Wirkung durch Steigerung der Zellproliferation und – Invasion maligner Zellen sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose [31]. Die Aktivierung des ER α erfolgt entweder klassisch Liganden gesteuert oder Liganden-unabhängig über Phosphorylierung des ER. Die Phosphorylierung findet dabei am Serinrest S118 induziert durch diverse Wachstumsfaktoren wie dem epidermal growth factor (EGF) über MAP-Kinasen oder durch Cytokin-gesteuerte Signalkaskaden wie beispielsweise über TNF α oder IL6-1 β am Serinrest S305 statt [31, 32].

Der ER β hingegen zeigt in der Karzinogenese des Mammakarzinoms anti-inflammatorische und anti-proliferative Effekte. Des Weiteren wurde ein inhibierender Effekt auf die Zellmotilität und Zellinvasion maßgeblich über Inhibierung des MAPK und PI3K Signalkaskaden in entartetem Gewebe beschrieben. So zeigt sich in frühen Phasen der Karzinogenese eine Verschiebung der ER α / ER β -Ratio, mit dem Resultat einer deutlich geringeren Nachweisbarkeit von ER β im Vergleich zum gesunden Gewebe [33, 34]. Im Gegensatz dazu, ist der ER α zu ca. 10% in gesundem und wie bereits erwähnt in bis zu 75% entartetem Brustdrüsengewebe vorzufinden [29]. Der ER α dient als Angriffspunkt für die endokrine Therapie über Selektive Östrogenrezeptor Modulatoren (SERM), Antiöstrogenen und Aromatase Inhibitoren. Demzufolge geht eine ER α Expression mit einer signifikant

geringeren Mortalität einher und zählt längst zu den etablierten prognostischen und prädiktiven Faktoren. Die Relevanz des ER β im Mammakarzinom bleibt trotz o.g. positiv beschriebener Effekte auf die Karzinogenese laut aktueller Studienlage noch unklar [35].

1.4.3 PROGESTERONREZEPTOR

Der PR wird, entgegen dem ER, von einem auf dem Chromosom 11q22-23 befindlichen Gen kodiert und ist im Zielgewebe in zwei Isoformen vertreten: dem PR-A und PR-B. Einziger Unterschied im Aufbau dieser beiden Rezeptorprotein-Isoformen besteht in 165 Aminosäuren, die der PR-B zusätzlich auf seinem N-terminalen Ende trägt [36]. Bezüglich der Funktionalität wurden diverse Unterschiede der beiden Isoformen nachgewiesen: während der PR-B größtenteils für die proliferativen Prozesse im Brustgewebe verantwortlich ist, werden dem PR-A mehrheitlich die ovariellen und uterinen Entwicklungs- und Funktionsprozesse zugeschrieben [37]. Progesteron spielt als Sexualhormon in der Aufrechterhaltung des weiblichen Zyklus und der Schwangerschaft eine Schlüsselrolle. In der weiblichen Brust ist Progesteron während der Pubertät für die Ausdifferenzierung der Drüsenläppchen und während einer Schwangerschaft für die Alveologese verantwortlich [38]. Seinen biologischen Effekt führt der PR, wie auch der ER, über unterschiedliche Wirkmechanismen aus. Das klassische Modell der Liganden-abhängigen Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Homodimerisierung, Translokation in den Zellkern und über Zwischenschritte letztendlich zu einer Translation der Zielgene [39]. Ferner ist eine indirekte Regulation der Gene über Modifikation der zytoplasmatischen MAP-Kinase-Kaskade bekannt [40]. Im entartetem Brustgewebe wird dem PR-B als potenterem Transkriptionsaktivator der beiden Isoformen eine übergeordnete Rolle der Zellproliferation zugeschrieben. Während der Einfluss des ER's auf das Mammakarzinom gut erforscht ist, bleiben beim PR trotz der Fortschritte in den letzten Jahrzehnten einige Fragen offen. Etliche Studien konnten bislang ein signifikant höheres MK Risiko belegen, wenn bei postmenopausalen Frauen in der HRT zusätzlich zum Östrogen synthetisiertes Progesteron (Progestin) eingesetzt wurde [41, 42]. Die Herausforderung bezüglich des PR's besteht hier vor allem an der Wirkung des endogenen Progesterons, sowie die Differenzierung des PR's als alleinstehender Rezeptor unabhängig vom Vorhandensein des ER α . Denn bekannt ist, dass der PR zum einen in ER α positiven MK-Zellen die Östrogen-vermittelte Proliferation und zum anderen die transkriptionale Aktivität des ER α inhibiert [43, 44].

1.5 Therapieregime des Mammakarzinoms

Bereits bei der Erstdiagnose ist das Mammakarzinom eine potentiell systemische Erkrankung, sodass neben den klassischen Therapiesäulen einer Tumorerkrankung – Operation, Bestrahlung und Chemotherapie – sich die Systemtherapie vor allem in den letzten Jahren zu einem essenziellen Bestandteil des multimodalen Therapiekonzeptes etabliert hat. Die personalisierten Therapiestrategien orientieren sich am Ausmaß der Erkrankung (pTNM), an der Tumorbilogie (Tabelle 3) und in der modernen Medizin zunehmend an der Genexpression, sowie den dynamischen Biomarkern. Letztes beinhaltet vor allem Faktoren wie die pCR (pathologic complete remission) und das Ki-67 Ansprechen auf neoadjuvante Therapien und beschreiben den Behandlungserfolg. Die Optionen der Systemtherapie beim MK sind mannigfaltig und beinhalten neben den konventionellen Chemotherapieregimen, die endokrine-Therapie (siehe 1.5.2), Antikörper-Therapie (Her2neu-AK: Trastuzumab, Pertuzumab; VEGF-AK: Bevacizumab), CDK4/6-Inhibitoren (Palbociclib, Ribociclib) und mTOR-Inhibitoren (Everolimus). Die Indikation und Auswahl der Systemtherapie wird anhand von Therapieziel (kurativ/palliativ), Tumorstadium (frühes-/metastasiertes MK), Therapiestadium (neoadjuvant/adjuvant), und Hormonstatus (prä-/peri-/postmenopausal) der Patientin individuell adjustiert, auf die im Näheren einzugehen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. In der klinischen Routine bilden die molekularen Subtypen des MK (Tabelle 3.) die bedeutendste Grundlage nicht nur für die Einschätzung der individuellen Prognose der Patientin, sondern für die Auswahl zielgerichteter Therapieansätze. Die optimale Systemtherapie (endokrine Therapie, Her2neu-zielgerichtete Ansätze) wird anhand dieser Subtypisierung appliziert. Aufgrund des thematischen Bezuges zu dieser Arbeit soll auf die endokrine Therapie im Folgenden näher eingegangen werden.

1.5.2 ENDOKRINE THERAPIE DES MAMMAKARZINOMS

Beim endokrin sensitivem MK (HR positiv) ist eine adjuvante endokrine Therapie prinzipiell immer indiziert. Die initial adjuvante Therapiedauer beträgt hierbei standardmäßig 5 Jahre, bei Erweiterung bis zu 15 Jahren. Laut AGO 2019 wird nach individueller Nutzen-Risiko-Abwägung in Abhängigkeit der Verträglichkeit und dem Rezidivrisiko eine weitere Verlängerung der Therapiedauer empfohlen [45]. Die endokrine Therapie der Wahl des frühen Mammakarzinoms bei prämenopausalen Patientinnen zur Senkung der Mortalität und Rezidivrate ist der selektive Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen mit 20g/Tag. Tamoxifen als Anti-Östrogen bindet als partieller Antagonist am ER und senkt konsekutiv die Proliferationsrate hormonabhängiger Gewebe. Hier konnten zwei randomisiert-kontrollierte Studien 2013 eine signifikante Senkung der Mortalität bei einer Anwendungsdauer von 10 Jahren belegen [46, 47]. Die bedeutendste unerwünschte Nebenwirkung, neben dem erhöhten Thromboembolie Risiko, einer verlängerten Tamoxifen Therapie ist mit einem absoluten Risiko von 0,5% die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms. Des Weiteren besteht die Option einer Kombination der Tamoxifentherapie mit einem GnRH-Analogon (Zoladex) zur Ovarialsuppression. Diese wird durch eine verminderte Ausschüttung von Gonadotropin bewirkt, wodurch die ovarielle Östrogensynthese unterdrückt wird. In der SOFT-Studie konnte ein signifikant Verbessertes DFS von absolut 4,3% (HR 0,76, $p=0,009$) beobachtet werden, wenn Tamoxifen mit einem GnRH-Analogon kombiniert wurde [48]. Nach bisheriger Datenlage wird eine GnRH-Analogon-Therapie zusätzlich zu Tamoxifen für 2 bis maximal 5 Jahren empfohlen. Nebenwirkungen der GnRH-Analoga sind vor allem klimakterische Beschwerden und ein erhöhtes Osteoporose Risiko.

Bei postmenopausalen Patientinnen mit einem frühen MK kommen neben der Tamoxifen Therapie, Aromatase-Inhibitoren (Anastrozol, Letrozol, Exemestan) zum Einsatz. Diese vermindern die Östrogenproduktion, in dem sie die Umwandlung von Androstendion zu Östron inhibieren. Hier wird eine sequenzielles Therapieschema mit beispielsweise Tamoxifen über 2,5-5 Jahren, gefolgt von einem Aromatase-Inhibitor empfohlen [45]. Sind die Patientinnen mit einen nodal-positiven Tumor oder einem invasiv-lobulären Karzinom diagnostiziert, wird eine upfront Aromatase-Inhibitor gefolgt von einer Tamoxifen-Therapie empfohlen [49]. Für die Behandlung von postmenopausalen Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem MK, ist nach Versagen einer Tamoxifen-Therapie

Fulvestrant zugelassen. Als reiner ER-Antagonist, der keine östrogene Restwirkung mehr besitzt, unterdrückt Fulvestrant die ER-Synthese. Fulvestrant 500mg wird in 4-wöchigem Abstand intramuskulär verabreicht. Die SWOG Studie konnte eine signifikante Überlegenheit, in Bezug auf das Gesamtüberleben, einer Kombinationstherapie von Fulvestrant und Anastrozol der alleinigen Anastrozol Therapie belegen [50, 51]. Aufgrund der stärker ausgeprägten Nebenwirkungen besitzen Gestagene (Medroxyprogesteronacetat, Megestrolacetat) derzeit einen nachrangigen Stellenwert und werden erst nach Einsatz aller anderen hormonellen Therapien zum Einsatz.

Der Rezeptorstatus beim MK kann sich während oder nach einer Therapie ändern. Daher hat eine Wiederholung der Bestimmung des Rezeptorstatus eine besondere Relevanz um gegebenenfalls eine Anpassung einer geplanten Therapie vorzunehmen oder aber neue Therapieoptionen aufbringen.

1.6 Prognostische und prädiktive Faktoren des Mammakarzinoms

Die Prognose des MK ist vor allem abhängig vom Tumorstadium bei der Erstdiagnose und der Tumorbiologie. Durch die bereits beschriebenen Fortschritte in der Früherkennungsdiagnostik und den multimodalen Therapieoptionen konnte die Prognose des MK in allen Stadien stark verbessert werden. Die 5-Jahresüberlebensrate bei Frauen beträgt 88%, bei männlichen MK Patienten ist das Gesamtüberleben etwas niedriger, hier leben nach 5 Jahren 77 von 100 erkrankten Patienten. Bei der 10-Jahresüberlebensrate ist es ähnlich, für Patientinnen beträgt diese 82% und für Patienten 65% [52]. Prognosefaktoren dienen der Vorhersage über den zu erwartenden weiteren individuellen Krankheitsverlaufes wie beispielsweise dem Rezidiv- oder Progressions-freien Überleben und dem Gesamtüberleben. Die Vorhersage kann je nach gewähltem Therapieschema beeinflusst werden. Hierzu zählen beim Mammakarzinom folgende Faktoren mit gesicherter klinischer Relevanz, die in den vorherigen Abschnitten eingehend erläutert wurden: das pTNM Staging (1.3.3), die histologische Klassifikation (1.3.1), das Grading nach Elston & Ellis (1.3.2), der Resektionsrandstatus nach primärer Operation (R1/R0), das Alter bei Erstdiagnose, der Hormonrezeptor-Status (1.3.5), der Her2neu-Status (6.0), der Proliferationsindex Ki-67 (1.3.5), histologisch nachgewiesener Einbruch in Lymph- und/oder Blutgefäße (L1/V1). In jüngster Zeit wurden zusätzlich zwei tumorassoziierte Invasionsfaktoren, der Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) und sein Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) bei nodal-negativem MK sowohl als prognostische als auch prädiktive Faktoren validiert (6.Ausblick). Eine Etablierung der Fokalität als prognostischer Faktor bleibt bislang ausstehend (1.3.5). Im Gegensatz zu prognostischen Faktoren, dienen die prädiktiven Faktoren der Vorhersage eines wahrscheinlichen Therapieerfolgs und tragen somit zu einer selektiveren Therapiewahl bei. Zu den wichtigsten prädiktiven Faktoren des MK zählen Merkmale der Tumorerkrankung wie der Steroidrezeptor-, Menopausen-, und Her2-Status [53]. Der HR-Status aufgrund der Vorhersage auf eine antihormonelle Therapie, eng verbunden damit der Menopausen-Status und der Her2-Status für das Ansprechen auf eine Herceptin Therapie. Neue Perspektiven zur Identifikation neuer Zielstrukturen für gezieltere tumorbiologische Therapieansätze werden im Abschnitt 7 dieser Arbeit diskutiert.

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle der Hormonrezeptoren, vor allem dem ER und PR als prognostische Faktoren beim Mammakarzinom ist bereits gut erforscht. HR positive MK gehen mit einer signifikant besseren Prognose einher. Geschuldet ist dieses bessere Gesamtüberleben nicht zuletzt der auf den jeweiligen Hormonrezeptorstatus individualisierten Systemtherapie [54]. Die Einführung des selektiven Östrogenmodulators Tamoxifen in der Adjuvanz beim HR positivem Mammakarzinom kann hier allen voran als Paradebeispiel dienen. So konnte durch die Addition von Tamoxifen in diesen Fällen die Rezidivrate um 41% und die Letalität um 34% gesenkt werden [55].

Auch an der prognostischen Relevanz der Fokalität des Mammakarzinoms wurde in den letzten Jahren ebenso mit Hochdruck geforscht. Nichtsdestotrotz konnte eine Etablierung der Fokalität als unabhängiger Prognostikator in den Leitlinien zum aktuellen Zeitpunkt nicht durchgesetzt werden. Zielsetzung dieser Arbeit ist es dementsprechend, die prognostische Bedeutung der etablierten HR unter Berücksichtigung Tumorfokalität neu zu evaluieren. Außerdem soll unterstrichen werden, dass die Tumorfokalität einen hoch relevanten Prognostischen Faktor darstellt und in Kombination mit den Hormonrezeptoren Eingang als prädiktiver Marker in die Therapieplanung finden sollte. Nur so kann die notwendige Systemtherapie effektiv individualisiert werden.

Dementsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit in einem Patientenkollektiv von 319 Patientinnen die Ausprägung der HR immunhistochemisch quantifiziert. Diese Ergebnisse wurden anschließend anhand von Subgruppen eingeteilt nach Fokalität analysiert (unifokal versus multifokal/multizentrisch) und mit klinisch-pathologischen Variablen (TNM-Staging, Grading) sowie dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben korreliert.

3. Material und Methoden

3.3 Auswahl des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit setzt sich aus insgesamt 320 Patientinnen, die an einem invasiven Mammakarzinom erkrankt sind und in den Jahren zwischen 2000 und 2002 bei Erstdiagnose an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität in München behandelt wurden, zusammen. Zur Bestimmung der Fokalität wurde folgende Diagnostik angewendet: klinische Untersuchung von Mammae und Axillae, Mamma Sonographie sowie Mammographie. Ergänzend wurde bei indifferenten Befunden der konventionellen Diagnostik bei einigen Patientinnen ein Kontrastmittel-MRT der Mamma, eine Galaktrographie sowie eine Pneumozystographie durchgeführt. So entstand ein Gesamtkollektiv von insgesamt 320 Patientinnen, hiervon 173 Frauen mit einem unifokalen MK (Gruppe 1) und 147 Patientinnen mit einem multifokalem oder multizentrischen MK (Gruppe 2). Wie bereits erwähnt, wurden in dieser Arbeit zur besseren Vergleichbarkeit die multifokalen und multizentrischen MK Fälle in der Gruppe 2 zusammengefasst, en Detail besteht diese Gruppe aus 126 Patientinnen mit einem multifokalen und 21 Patientinnen mit einem multizentrischen MK. Der Hormonrezeptorstatus wurde durch immunhistochemische Färbungen der Tumorpräparate bestimmt, Tabelle 4 illustriert die Verteilung zwischen den beiden Gruppen. Patientinnen, bei denen die Fokalität oder der Hormonrezeptorstatus durch die o.g. Diagnostik weiterhin nicht eindeutig war, wurden ausgeschlossen. Tabelle 5 zeigt die Patientencharakteristika der untersuchten Kohorte.

Tabelle 4. Hormonrezeptorstatus des Gesamtkollektivs unterteilt nach Fokalität

Hormonrezeptorstatus	Unifokal N_{Total} (%)	Multifokal N_{Total} (%)
ER positiv	105 (42.6)	96 (39.0)
ER negativ	28 (11.4)	17 (7.0)
PR positiv	79 (32.1)	75 (30.4)
PR negativ	54 (21.9)	38 (15.4)
TN	15 (75.0)	5 (25.0)

Tabelle 5. Patientencharakteristika

Patientencharakteristika	n (%)
Alter (Jahre)	Median 58.0 Rang 69
Fokalität	Unifokal 173 (54.0) Multifokal 147 (45.9)
Histologischer Typ	NST 144 (49.8) Non-NST 154 (50.2)
Grading	G1 oder G2 107 (70.9) G3 44 (29.1)
pT	pT1 193 (66.8) pT2-pT4 96 (33.2)
pN	pN0 165 (57.5) pN1-pN3 122 (42.5)
pM	pM0 239 (78.1) pM167 (21.8)

3.4 Verwendete Materialien

3.4.1 GEWEBEPROBEN

Der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München liegt für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit ein positives Votum gemäß der Erklärung von Helsinki 1975 vor (LMU 048- 08, 18.03.2008).

Bei der Untersuchung kamen die intraoperativ entnommenen Gewebeproben des unter 3.3 beschriebenen Patientenkollektivs zur Verwendung. Das Tumorgewebe wurde im Institut für Pathologie der LMU histopathologisch beurteilt und in Paraffin eingebettet. An diesen Präparaten wurden, die in dieser Forschungsarbeit beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen vollzogen. Der Prozess der Konservierung wurde von Laboranten/-innen der Frauenklinik Maistraße der LMU München durchgeführt, wird jedoch der Vollständigkeit halber in Kürze beschrieben.

Um die Morphologie des Gewebes zu erhalten und eine spätere Analyse der Tumorpräparate zu ermöglichen, werden diese in einem ersten Schritt in einer pH neutralen Formalinlösung (NBF) fixiert. Die Formaldehyd Konzentration wird auf 4-10% mit anorganischen Salzen und destilliertem Wasser verdünnt, um einen neutralen pH-Wert von 7,4 zu erreichen. Formalin bindet durch Bildung von Methylbrücken basische Aminosäuren. Das entstandene Netz aus Formaldehyd- und Aminosäuren, stabilisiert die Strukturen und verhindert eine Denaturierung der Proteine. Das Volumenverhältnis von NBF zu Gewebe sollte mindestens 1:5 betragen und die Fixierungsdauer richtet sich nach der Präparatgröße, empfohlen wird für eine optimale Infiltrierung 1 Stunde pro Zentimeter Eindringtiefe. Im nächsten Schritt folgt die Paraffineinbettung des zu untersuchenden Gewebes. Dem Präparat wird nun das enthaltene Wasser durch ein Lösungsmittel Xylol entzogen. Xylol fungiert als Intermedium und wird anschließend durch das endgültige Einbettungsmedium Paraffin ersetzt. Dafür wird Paraffin durch Erhitzen auf 60 °C in einen flüssigen Aggregatzustand gebracht und auf das Gewebe in Form eines Blocks gegossen. Nach dem Abkühlen entstehen Paraffinblöcke, die in dieser Form jahrelang konserviert und weiterverarbeitet werden können. Bevor immunhistochemische Analysen durchgeführt werden können, wird der Paraffinblock im letzten Schritt durch ein Mikrotom auf 2-3 µm Scheiben geschnitten und für mikroskopische Untersuchungen auf einen Glasobjektträger aufgezogen.

3.4.2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 6. verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Kochfeld Typ THL 2597	Rommelsbacher, Dinkelsbühl, Deutschland
Lichtmikroskop Leitz, Diaplan	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Objektträger Superfrost Ultra Plus®	Menzel GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schnellkochtopf vitaFit®	Fissler GmbH, Deutschland

3.4.3 REAGENZIEN

Tabelle 7. verwendete Reagenzien

Name	Hersteller
Aqua destillata	Apotheke Innenstadt der LMU Klinik München
Carboxylol	Apotheke Innenstadt der LMU Klinik München
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Dako, Golstrup, Denmark
Ethanol	Apotheke Innenstadt der LMU Klinik München
Eukitt	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Normal Goat Serum	Abcam, Berlin, Germany
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Apotheke Innenstadt der LMU Klinik München
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na-Citrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Vector Laboratories, California, USA
Peroxidase	Apotheke Innenstadt der LMU Klinik München
Power Block	BioGenex, Fremont, USA
Saures Hämalaun nach Mayer	Apotheke Innenstadt der LMU Klinik München
Xylol	J.T. Baker, Dventer, Holland
30%iges H ₂ O ₂	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.4.4 PRIMÄRANTIKÖRPER UND DETEKTIONSSYSTEME

Tabelle 8. verwendete Primärantikörper und Detektionssysteme

Name	Hersteller
Anti-ER Rabbit IgG monoclonal ; Klon : EPR703(2)	Abcam (Bestell-Nr. ab79413; Lot.Nr.: GR95963-3)
Anti-PR Rabbit IgG monoclonal ; Klon : Y85	LS-Bio (Bestell-Nr. LS-C49471)
Detektionssystem für ER Vectastain Elite rabbit-IgG Kit	Linaris GmbH, Dossenheim, Deutschland Nr.PK-6101
Detektionssystem für PR ZytoChem Plus HRP Polymer System	ZytoMed Nr. POLHRP-100

3.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine mehrstufige Methode, bei der letztendlich durch Bildung eines spezifischen Antikörper-Antigen Komplexes mithilfe eines fluoreszierendes Markers Epitope sichtbar gemacht werden. Das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten IHC war es, die Expression des ER und PR in Mammakarzinom Gewebe nachzuweisen.

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Färbeprotokoll wurde initial von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jeschke erstellt und bereits für verschiedene Forschungsarbeiten, unter anderem die Studien von Ditsch et al. verwendet [56-58]. Es soll im Folgenden die einzelnen Schritte und zum besseren Verständnis einige Hintergründe erläutert werden.

Für die immunhistochemische Färbung ist eine entsprechende Vorbereitung der Paraffinschnitte notwendig. Dafür werden die Präparate insgesamt 20 Minuten lang in Xylol und anschließend in 100%igem Ethanol geschwenkt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase Aktivität, um Hintergrundfärbungen zu vermeiden, werden die Schnitte 20 Minuten lang in 3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol eingelegt. Zur Rehydrierung der Schnitte, werden sie jeweils 5 Minuten lang in einer absteigenden Reihe mit 100%, 80% und 50% Ethanol inkubiert und zum Schluss mit destilliertem Wasser gespült. Einige Fixationsmittel, unter anderem das hier verwendete Formalin, können Epitope maskieren und so eine optimale Antigen-Antikörper-Bindung reduzieren. Hierfür wird der Schnitt in einem

spezifischen Puffer erhitzt, die sogenannte Hitze-induzierte Epitoprückgewinnung. Dafür wurde der Schnellkochtopf vitafit® mit einer Pufferlösung mit einem Ziel pH-Wert von 6,0, bestehend aus Zitronensäure, Natrium-Citrat und destilliertem Wasser befüllt. In die kochende Lösung wurden die Schnitte eingestellt und 5 Minuten lang gekocht. Anschließend noch für 5 Minuten abgedampft und mit destilliertem Wasser und jeweils 2 Mal 2 Minuten mit Phosphat gepufferter Salzlösung gespült. Bevor die Schnitte mit den Primärantikörpern inkubiert werden können, wird ein Blockierungsserum über 30 Minuten hinzugegeben, um hinterher ein unspezifisches Binden der Antikörper an das Gewebe und somit Anfärben zu vermeiden. Die Blockierungslösung setzt sich zusammen aus einem Ziegenserum und PBS, das elektrostatische Ladungen im Gewebe sättigt und eine unspezifische hydrophobe Bindung von Immunglobulinen an Membranen oder Fettgewebe verhindert.

In dieser Arbeit wurde zur Visualisierung die indirekte Detektionsmethode als immunhistochemisches Verfahren angewandt: Nachdem das Blockierungsserum abgeschüttet wurde, werden die Schnitte im ersten Schritt über 16 Stunden bei 4 °C mit dem Primärantikörper – Anti-ER – verdünnt auf 1:400 und Anti-PR verdünnt auf 1:100 in PBS inkubiert. Darauf folgt ein erneutes auswaschen über 2 Mal 2 Minuten mit reinem PBS. Nachdem der unkonjugierte Primärantikörper das Antigen gebunden hat, folgt die Hinzugabe des Sekundärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist Biotin markiert und bindet den Primärantikörper. Nach 30-minütiger Einwirkungszeit, folgt wieder das waschen in PBS. Währenddessen wird die ABC-Lösung vorbereitet, die 30 min vor Gebrauch ruhen muss.

Das Prinzip der (Strept)Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode (Abbildung 3) basiert auf der chemischen Affinität von Streptavidin zu dem an den Sekundärantikörper gebundenen Biotin, das in dem Fall als sogenannter Link-Antikörper fungiert. Durch die biotinylierten Sekundärantikörper entsteht eine Signalamplifikation, da das Avidin vier möglichen Bindungsstellen besitzt, an denen der ABC-Komplex bindet. An dem Biotin-Avidin-Komplex ist das Enzym Peroxidase gekoppelt, welches nach Hinzugabe von H₂O₂ als Puffer und 3,3 Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen ein bräunliches Endprodukt katalysiert. In dieser Arbeit wurde das Vectastain Elite rabbit-IgG Kit der Firma Linaris verwendet. Nach einer Einwirkzeit von 2 Minuten werden die Schnitte jeweils 2 Mal für 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

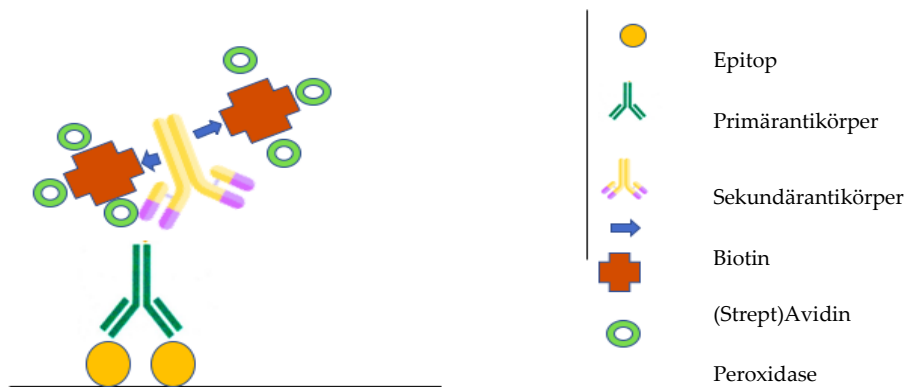
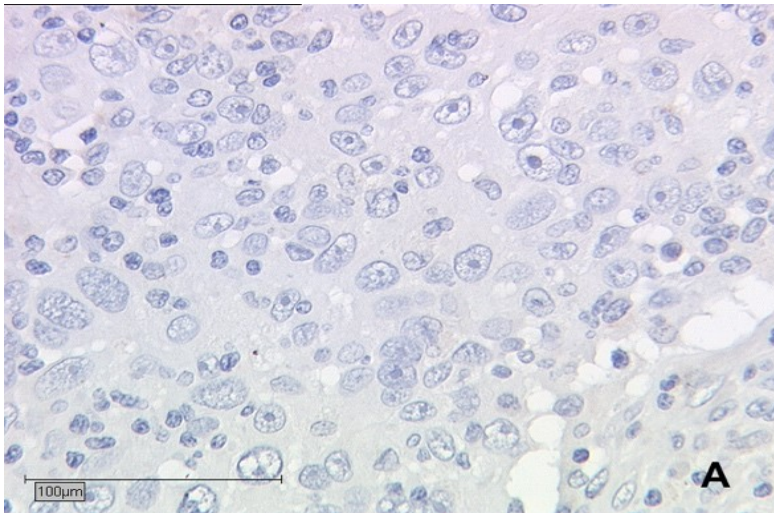


Abb. 3. Schematische Darstellung der ABC-Methode

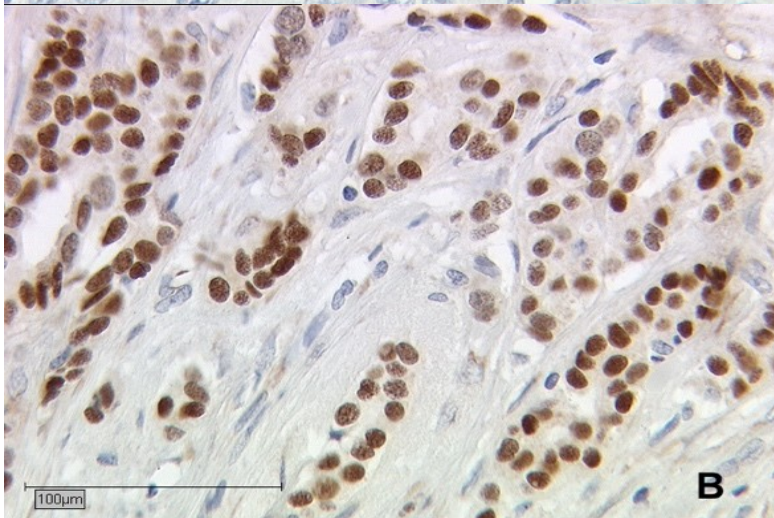
Nachdem die detektierten Epitope, die in dem Fall den ER und PR enthalten, markiert sind folgt die Gegenfärbung der nicht spezifisch gefärbten Areale. Hierfür wird häufig, wie auch in diesem Fall, der blaue Ausgangsstoff Hämatoxylin verwendet. Hämatoxylin ist ein Naturfarbstoff, der durch Extraktion aus dem Blauholzbaum gewonnen wird. Für die Färbung, wird sein Derivat das Hämalaun, nach Oxidation und Beisetzung mit einem Alaun, verwendet. Bei der Färbung mit Hämalaun nach Mayer ist ein stark saures Milieu erforderlich. Hämalaun kann somit durch seine stark positive Ladung die negativ geladenen Phosphatgruppen der nuklearen DNS binden, sodass vor allem Kerne intensiv in der typischen blau-violetten Farbe erscheinen. Nach 3 Minuten in der sauren Lösung werden die Schnitte 5 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gespült und gebläut.

Im letzten Schritt wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Hilfe von Xylol aufgehellt. Mittels eines chemisch neutralen Eindeckmediums EUKITT®, welches mit einem Brechungsindex von 1,49, dem des Glases sehr nahe ist, werden die Schnitte geklebt, sind so jahrelang konservierbar und optimal Vorbereitet für mikroskopische Untersuchungen.

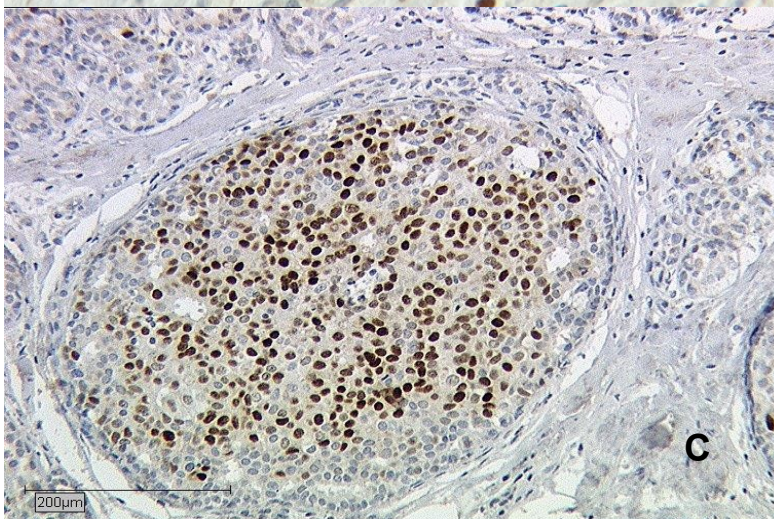
Zum Ausschluss unspezifischer Färbereaktionen und Beweis der Korrektheit des Färbemusters wurden selbstverständlich Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.



A) negativ Kontrolle der immunhistochemischen Färbung der malignen MK Zellen, 100-fache Vergrößerung



B) Immunhistochemische Färbung des ER's der malignen MK Zellen mit einem IRS 4, 100-fache Vergrößerung



C) Immunhistochemische Färbung des PR's der malignen MK Zellen mit einem IRS 4, 200-fache Vergrößerung

Abb. 4. Immunhistochemische Färbungen der malignen MK Zellen nach Inkubation mit dem primären Antikörper

3.5.2 SCORING DER IMMUNHISTOCHEMIE

Die Bewertung der Schnitte erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher mit einem Lichtmikroskop der Firma Leitz anhand des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Steger [25]. Mit Hilfe dieser immunhistochemischen Nachweismethode werden Hormonrezeptoren in den Zellkernen der Tumorzellen quantifiziert. Nach abgeschlossener IHC Färbung (Abschnitt 3.5) werden die Schnitte unter einem Mikroskop ausgewertet. Hierbei wird zum einen die Färbeintensität mit Werten von 0-3 bewertet und multipliziert mit dem Prozentanteil positiv gefärbter Zellen die mit Zahlen von 0-4 definiert wurden. In Tabelle 9 wird der IRS nach Remmele und Steger detailliert dargestellt, auch in dieser Arbeit für den ER und PR ein IRS Score > 2 als positiv definiert wurde.

Tab. 9 Immunreaktiver Score nach Remmele und Steger

Färbeintensität	Positiv gefärbte Zellen in %	IRS
0 – keine Reaktion	0 - keine	0-2: negativ
1 – schwache Reaktion	1 – weniger als 10%	3-4: schwach positiv
2 – mäßige Reaktion	2 – zwischen 10 und 50%	6-8: mäßig positiv
3 – starke Reaktion	3 – zwischen 51 und 80%	9-12: stark positiv
	4 – mehr als 80%	

3.6 Statistische Methodik und Software

Für die statistische Analyse dieser Arbeit wurde mit der Computer Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Inc., Chicago, IL, USA) Version 24.0 gearbeitet.

Das gesamte Patienten Kollektiv wurde auf prognostische Unterschiede der initial definierten Rezeptoren in Bezug auf die Fokalität untersucht. Hierfür wurde die Datenbank des gesamten Patientenkollektivs in zwei separate Untergruppen nach Fokalität unterteilt. Die Gruppe 1 beinhaltet alle Patientinnen mit der Diagnose eines unifokalen Mammakarzinoms und Gruppe 2 alle mit einem multifokalen und/oder multizentrischem Mammakarzinom. Die Unterteilung des Hormonrezeptorstatus wurde anhand des IRS-Scores vorgenommen. Sowohl der ER, als auch der PR wurden mit einem $IRS \geq 1$ als Rezeptor-positiv definiert. Hiermit wurden für jeden Rezeptor Analysen des Gesamt- und Rezidiv-freien Überlebens mithilfe von Kaplan-Meier Kurven visualisiert. Unter Anwendung des Chi-square des Log-rank Tests wurde die Signifikanz bestimmt. Die signifikanten Unterschiede der einzelnen Rezeptoren in Gruppe 1 und 2 in Bezug auf das TNM-Staging und WHO Grading wurden durch Anwendung von Boxplots und des parameterfreien Kruskal-Wallis-Tests festgelegt. Um zu untersuchen, ob die Rezeptoren unabhängige prognostische Marker sind, wurden multivariate Analysen per Cox-Regressionen durchgeführt.

Für das Signifikanzniveau aller statischen Tests dieser Arbeit wurde ein p -Werte mit $\leq 0,05$ definiert.

4. Ergebnisse

4.3 Östrogenrezeptor

4.3.2 UNIFOKAL

Die Expression des ER in der unifokalen Patientengruppe zeigte statistisch signifikante Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS), Rezidiv-freie Überleben (DFS), histopathologischem Grading und TNM Staging. Die Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigte, dass seine ER Expression statistisch signifikant mit einem bessrem OS korreliert, was mit einem p-Wert von 0,005 durch den Log-Rank Test bestätigt wurde (Abbildung 5). Bei der Betrachtung des histopathologischen Gradings der WHO und dem TNM Staging, zeigten unsere Analysen, dass diese Patientengruppe von einer ER Expression profitieren. Unter Anwendung von Boxplots und Kruskal-Wallis-Tests konnte bewiesen werden, dass Patientinnen mit unifokalem, ER positivem MK häufiger ein niedrigeres Tumor Grading (G1/G2 Absatz 1.3.2) als ein hohes Tumor Grading (G3/G4) aufweisen ($p = 0,029$). Zusätzlich zeigte diese Patientengruppe ein signifikant niedrigeres Risiko für das Auftreten von Metastasen, mit Boxplots und Kruskal-Wallis Tests wurde hierfür ein $p = 0,020$ für pM berechnet. Weder die primäre TumorgroÙe (pT $p = 0,267$), noch der Lymphknotenstatus (pN $p = 0,736$) wiesen signifikante Unterschiede bei Expression oder Fehlen des ER auf. Unterstrichen wurden die o.g. Ergebnisse, durch die multivariate Cox Regression, welche eine ER Expression in der unifokalen Patientengruppe als unabhängigen prognostischen Marker für das OS identifizierte (HR 0,282, 95%CI 0,114-0,698 $p = 0,006$) (Tabelle 10).

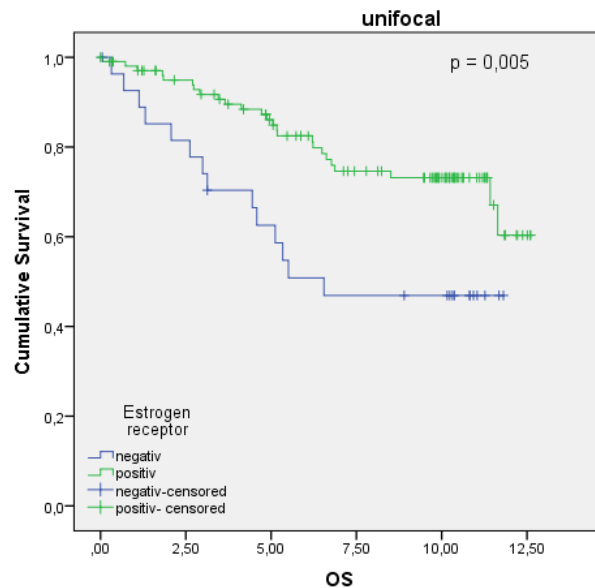


Abb. 5 Kaplan-Meier Überlebenskurve. Dargestellt ist das Gesamtüberleben in Jahren der Patientinnen mit unifokalem MK im Vergleich ER positiv (grün) und ER negativ (blau).

Variable	Koeffizient	HR (95%CI)	P-Wert
Alter	0,059	1,061 (1,023-1,100)	0,002
Grading	0,790	2,204 (0,987-4,923)	0,054
pT	-0,234	0,791 (0,560-1,118)	0,185
pN	0,552	1,737 (1,302-2,318)	0,000
pM	3,025	20,591 (5,681-74,640)	0,000
ER	-1,267	0,282 (0,114-0,698)	0,006

Tab. 10 Multivariate Cox-regression der Patientinnen mit unifokalem MK in Bezug auf das Gesamtüberleben

4.3.3 MULTIFOKAL/MULTIZENTRISCH

Im Gegensatz zur unifokalen Patientengruppe, konnten in der multifokalen/multizentrischen Patientengruppe keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den ER positiven und ER negativen Patientinnen in Bezug auf OS ($p=0,238$), DFS ($p=0,052$), histopathologische Grading ($p=0,262$) und allen drei Kategorien des TNM Stagings (pT $p=0,590$, pN $p=0,430$, pM $p=0,433$) nachgewiesen werden.

4.4 Progesteronrezeptor

4.4.2 UNIFOKAL

Eine PR Expression zeigte, ebenfalls wie der ER, einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Patientinnen mit einem unifokalem MK. Hierfür wurden die gleichen statistischen Analyseverfahren wie für die Auswertung des ER herangezogen. Die Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigte ein längeres OS der PR positiven Patientinnen in der unifokalen Gruppe, welches auch hier mit dem Log Rank Test und einem p -Wert von 0,012 statistisch bestätigt werden konnte (Abbildung 6). Nicht nur das OS, sondern auch das histopathologische Grading nach WHO und TNM Staging wiesen einen besseren Krankheitsverlauf bei Expression des PR's auf. Unter Anwendung von Boxplots konnte gezeigt werden, dass die unifokale Patientengruppe bei PR Expression häufiger im Grading einen gut differenzierten Tumor (G1) und im Staging keine Metastasen (pM0) aufwies, was statistisch mithilfe von Kruskal-Wallis Tests bestätigt werden konnte (G1 $p=0,007$ und pM0 $p=0,008$). Das rezidivfreie Überleben (DFS) mit einem p -Wert von 0,07, die Tumorgöße (pT $p=0,390$) und der Lymphknotenbefall (pN $p= 0,662$) zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede in dieser Patientengruppe bei Expression oder Fehlen des PR. Im Gegensatz zum ER, erwies sich der PR hingegen in Analyse mit multivariaten Cox-regression als abhängiger prognostischer Marker (HR 0,453, 95%CI 0,161-1,279, $p=0,135$) in der unifokalen Patientengruppe (Tabelle 11).

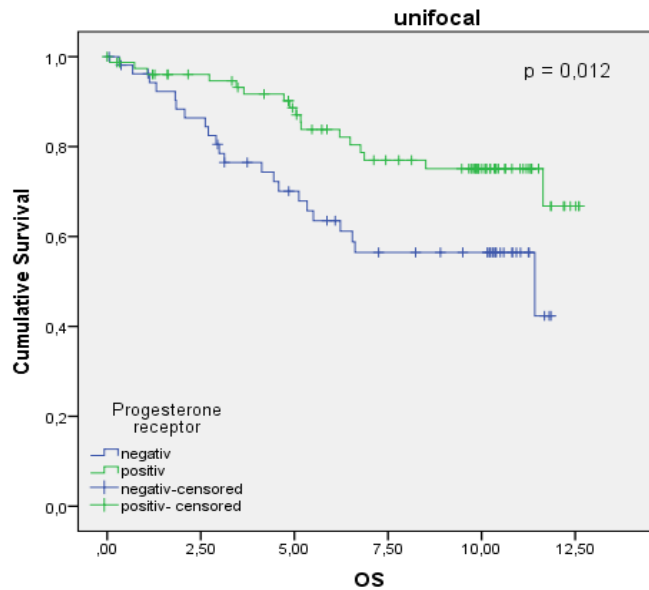


Abb. 6 Kaplan-Meier Überlebenskurve. Dargestellt ist das Gesamtüberleben in Jahren der Patientinnen mit unifokalem MK im Vergleich PR positiv (grün) und PR negativ (blau).

Variable	Koeffizient	HR (95%CI)	P-Wert
Alter	0,051	1,052 (1,015-1,091)	0,006
Grading	0,537	1,711 (0,720-4,066)	0,224
pT	-0,129	0,879 (0,624-1,237)	0,459
pN	0,418	1,519 (1,175-1,965)	0,001
pM	2,670	14,443 (4,203-49,634)	0,000
PR	-0,791	0,453 (0,161-1,279)	0,135

Tab. 11 Multivariate Cox-regression der Patientinnen mit unifokalem MK in Bezug auf das Gesamtüberleben

4.4.3 MULTIFOKAL/MULTIZENTRISCH

Passend zu den Ergebnissen der ER-Analyse konnten auch für den PR in der multifokal/multizentrischen Patientengruppe keine signifikanten Unterschiede berechnet werden (OS $p = 0,090$, DFS $p = 0,063$, Grading $p = 0,087$, pT $p = 0,830$, pN $p = 0,313$, pM $p = 0,484$).

4.5 Triple negatives Mammakarzinom

4.5.2 UNIFOKAL

Die Ergebnisse der Analysen der beiden o.g. Rezeptoren, dem ER und dem PR, wurden bestärkt durch die Auswertung der TN unifokalen MK Patientengruppe. Hier konnte aufgezeigt werden, dass die unifokalen TN MK Patientinnen, die definitionsgemäß ER, PR und Her2neu negativ sind, ein signifikant schlechteres OS aufweisen. Illustriert wurde auch in diesem Fall mit Hilfe von Kaplan-Meier Überlebenskurven (Abbildung 7) und berechnet ein p -Wert von 0,05 durch den Log-rank Test. Allerdings konnten keine in dieser Gruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede bezogen auf das DFS ($p = 0,952$), histopathologische Grading ($p = 0,317$), und das TNM Staging (pT $p = 0,656$, pN $p = 0,756$, pM $p = 0,302$), nach Anwendung von Boxplots und Kruskal-Wallis Tests berechnet werden.

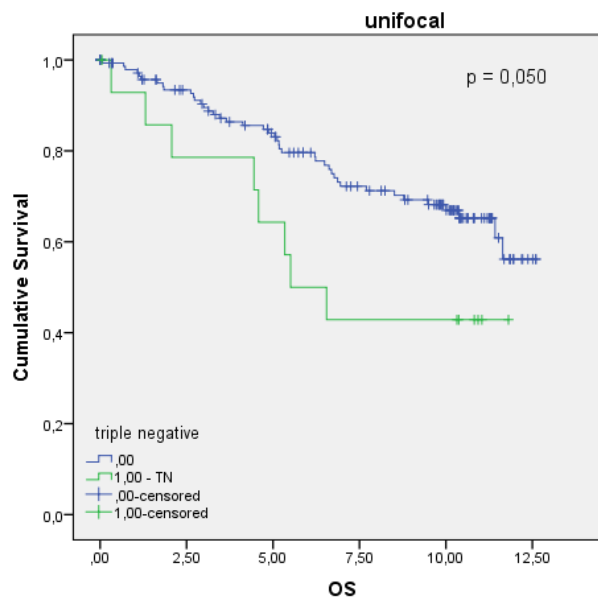


Abb. 7 Kaplan-Meier Überlebenskurve. Dargestellt ist das Gesamtüberleben in Jahren der Patientinnen mit unifokalem MK im Vergleich TN (grün) und HR positiv (blau).

4.5.3 MULTIFOKAL/MULTIZENTRISCH

Bei der statistischen Auswertung der TN multifokalen/multizentrischen Kohorte, konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das OS $p = 0.556$, histopathologische Grading $p = 0.247$, und das TNM Staging (pT $p = 0.874$, pN $p = 0.130$, pM $p = 0.98$) durch Log-Rank Tests berechnet werden. Interessanterweise zeigten die Analysen mittels Kaplan-Meier bei Patientinnen mit multifokalem/multizentrischem MK ein verkürztes DFS, welches mit einem p -Wert von 0,019 sich als statistisch signifikant erwies (Abbildung 8).

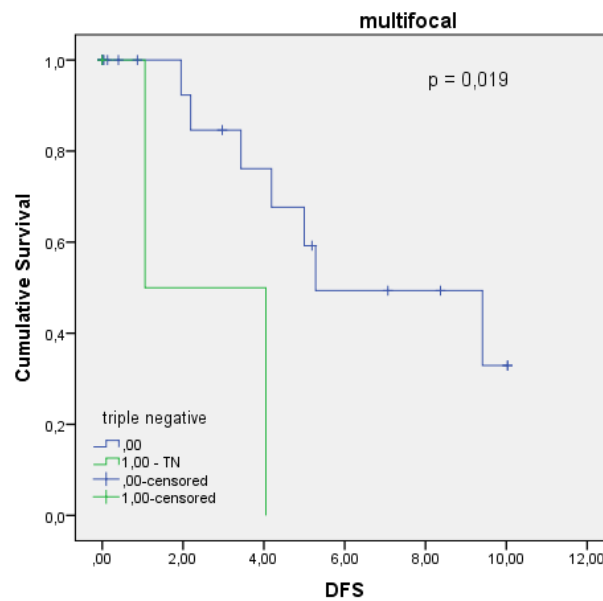


Abb. 8 Kaplan-Meier Überlebenskurve. Dargestellt ist das Gesamtüberleben in Jahren der Patientinnen mit multifokalem/multizentrischem MK im Vergleich TN (grün) und HR positiv (blau).

5. Diskussion

In dieser Dissertation wurde, die prognostische Bedeutung der etablierten Steroidhormonrezeptoren differenziert auf die beiden MK Entitäten – unifokal versus multifokal/multizentrisch analysiert. Beide untersuchten Steroidrezeptoren, der ER und PR zeigten einen signifikant positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf, jedoch nur in der unifokalen Patientengruppe. In der multifokal/multizentrische Kohorte konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Prognose bei Expression der HR nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten mit der Auswertung der TN Patientenkohorte unterstrichen werden. Hier wiesen Patientinnen mit einem TN unifokalem MK ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben auf. Interessanterweise konnte nur bei den Patientinnen mit einem TN MK auch in der multifokal/multizentrischen Kohorte ein statistisch signifikanter Unterschied beschrieben werden: TN multifokal/multizentrische MK zeigten eine höhere Rezidivrate im Vergleich zu HR positiven Patientinnen. Darüber hinaus konnte in unseren Analysen nur der ER als unabhängiger Prognostikator für das Gesamtüberleben identifiziert werden.

In einer Größenordnung von ca. 30% werden bei der Diagnose eines MK multifokale und/oder multizentrische MK detektiert. Beschrieben wurde dies in den Studien 1997 von Buchberger et al [59] und 2005 bestätigt von Gundry et al [60], wo in 20,6% der Fälle Multifokalität und in 11,1% Multizentrität vorlag. In unserem Patientenkollektiv fand sich bei 45,9% der untersuchten Patientinnen multifokal und oder multizentrische MK. Die Repräsentativität unseres Kollektives ist diesbezüglich eingeschränkt, da um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen der uni- und multifokalen/multizentrischen Kohorte zu erzielen einige Patientinnen mit einem unifokalen MK blind nicht in das Kollektiv eingeschlossen wurden. Bezüglich des Krankheitsverlaufes und damit einhergehend der Prognose, belegen etliche Studien einheitlich eine ausgeprägte Korrelation zwischen Multifokalität/Multizentrität und ein erhöhtes für das Auftreten einer Lymphknotenbeteiligung (pN) [17, 61-63]. Weissenbacher et al beschrieben ein signifikant häufigeres Auftreten eines Lokalrezidivs und Fernmetastasen (pM) in der multifokalen als in der unifokalen MK Gruppe. In multivariaten Analysen identifizierten sie die Multifokalität/-zentrität als unabhängigen Prognostikator mit einem signifikant negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,016$), Lokalrezidiv ($p=0,001$) und Fernmetastasen ($p=0,038$) und verlangten bereits 2010 die Hinzunahme der Fokalität zu den

etablierten prognostischen Faktoren des MK [20]. Fushimi et al waren bezüglich dieser Aussage zurückhaltender. In ihrer Analyse zeigte die Multifokalität/-zentrität allein keine prognostische Auswirkung auf das Überleben, erst als die pT-Stage der einzelnen Tumorfoki zu einem höheren pT-Staging addiert wurden, konnten sie ein signifikant schlechteres Rezidiv-freies Überleben ($p=0,043$) errechnen. Somit deklarierten sie die Fokalität als abhängigen prognostischen Marker für das Überleben, da erst nach Adaptation des pT-Stagings jenes eine statistische signifikante Auswirkung auf die Prognose zeigte [64]. Die vorliegende Arbeit kann zu dieser Debatte nicht suffizient beitragen, da die Daten nicht nach dem alleinigen Aspekt der Fokalität in Bezug auf die Prognose analysiert wurden. Dennoch wurde nach bestem Wissen bislang in keiner Studie die prognostische Bedeutung der HR auf die jeweilige MK Entität, der Fokalität beschreiben.

Eine zielgerichtete, auf den Patienten optimal zugeschnittene Therapie hat heutzutage bei der Behandlung des MK die oberste Priorität. Demzufolge ist der Zugewinn an detaillierten Informationen der molekularen Biomarker nicht nur als prognostische, sondern vielmehr in der Rolle als prädiktiver Marker unverzichtbar und Gegenstand aktueller Forschung. Zu dieser Fragestellung konzipierten Nicolini et al eine Studie, in der sie den PR bei ER positiven Patientinnen als zusätzlichen prädiktiven Faktor identifizierten [65]. Auch Nordenskjold et al konnten 2016 in einer randomisierten Studie mit 2738 Patientinnen einen positiven Nutzen einer adjuvanten Tamoxifen Therapie bei ER- und PR-Expression belegen, wohingegen kein Langzeiteffekt bei reiner ER Expression und PR Negativität des Tumorgewebes, in Bezug auf das OS und DSF gefunden wurde [66]. Hingegen beschreibt die European Group on Tumor Markers (EGTM) in einer Metaanalyse von 20 randomisierten klinischen Studien ($n=21457$) den PR in primärem MK als nicht unabhängigen prädiktiven Faktor für eine adjuvante Tamoxifen Therapie. Dennoch konnten bei hohen PR-Expressions Leveln eine höhere Therapieansprechrates und ein längeres OS für Patientinnen mit fortgeschrittenem MK beobachtet werden [67]. Der primäre Wert der Steroidhormonrezeptoren besteht also in der Rolle als prädiktiver Biomarker für eine endokrine Therapie. Nichtsdestominder konnten beide, sowohl der ER als auch der PR, sich als prognostischer Marker etablieren. Etliche Studien bislang konnten bei ER- und PR positiven Patientinnen ein besseres Outcome vor allem in den ersten 5-7 Jahren nach Erstdiagnose im Vergleich zu TN oder HR-negativen Patientinnen belegen [68-70]. In unserer Studie erwies sich in der multivariaten Analyse einzig der ER als unabhängiger Faktor in Bezug auf das Gesamtüberleben. Eine PR Expression war

zwar in der unifokalen Patientengruppe signifikant mit einem besserem Gesamtüberleben assoziiert, konnte in der multivariaten Cox-Regression jedoch nur als abhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben nach Adjustierung an Faktoren wie Alter, Grading und Staging berechnet werden. Trotz der diskrepanten Datenlage bezüglich der prädiktiven und prognostischen Bedeutung des PR's ist laut Literatur und Leitlinie die Bestimmung des ER und PR im MK-Gewebe obligat. Bezüglich des Zeitpunktes der Festlegung des Rezeptorstatus und dementsprechenden Einsatz der endokrinen Therapie sind die Empfehlungen der bedeutenden Institutionen unstimmg. Die ASCO empfiehlt bei einer Divergenz des HR-Status zwischen dem primär – und metastasierten Tumor, den Rezeptorstatus des fortgeschrittenen Karzinoms für die weitere Therapieansätze zu verwenden [71]. Demgegenüber wird sowohl von der European Society for Medical Oncology (ESMO) als auch von dem National Comprehensive Cancer Network (NCCN) eine Anwendung endokriner Therapie empfohlen, sobald eine Biopsie einen Rezeptor positiven Nachweis erbringt [72, 73]. Ein Konsens diesbezüglich erscheint überaus relevant, in einer Metaanalyse, die insgesamt 4200 MK Patientinnen einschloss, konnte für den ER-Status eine Diskordanz von 20% zwischen dem primär- und metastasierten Tumor nachgewiesen werden. Für den PR-Status diesbezüglich sogar von 33% [74]. Es bleibt weiterhin von großem Interesse, wie und ob die prädiktive und prognostische Aussagekraft des ER's und PR's in den jeweiligen Tumorfoki relativiert. Hierzu bedarf es weiterer Forschung und Analysen.

6. Ausblick

Längst hat sich neben den HR, der Her2neu -Rezeptor als prädiktiver und prognostischer Marker für das MK in den Leitlinien und im klinischen Alltag etabliert. Er gehört zu den transmembranären Wachstumsfaktor-Rezeptoren, lokalisiert auf dem Chromosom 17q12 und vermittelt seine Wirkung über eine Tyrosin-Signalkaskade an den Zellkern. Eine Steigerung der Mitose, Neoangiogenese, Inhibition der Apoptose, Tumorzellmigration und Invasion sind das Resultat einer Her2 Überexpression [75, 76]. Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung konnten unzählige Arbeiten für das Her2-positive MK einen schlechteren Outcome im DFS und OS aufzeigen. Derzeit umstritten wird, wie bei den HR's, die reine prognostische Aussagekraft des Her2neu-Rezeptors, da diese seit dem routinemäßigen Einsatz von Anti-Her2 Therapien kaum mehr zu bestimmen ist. Demgegenüber steht die unvermeidliche Relevanz des Her2-Rezeptors als prädiktiver Marker. Bei Her2-Rezeptor positiven MK zeigt die Hinzunahme einer zielgerichtete Anti-Her2neu Therapie (Trastuzumab) zu einer adjuvanten Chemotherapie in zahlreichen Studien ein verbessertes Therapieansprechen und Outcome [77-79].

Auch die in Abschnitt 1.6 erwähnten tumorassozierten Proteolysefaktoren uPA und PAI werden in der aktuellen Literatur hinsichtlich ihres prognostischen und prädiktiven Nutzens für das HR-positive, Her2neu- und nodal-negative MK diskutiert. Look et al konnten 2002 eine statistisch signifikante Korrelation von hohen uPA und PAI Konzentrationen mit erhöhtem Metastasierungsrisiko, einem kürzeren OS und hiermit einen prognostische Bedeutung dieser beiden Marker belegen [80]. Harbeck et al untersuchten im selben Jahr die beiden Biomarker hinsichtlich ihres prädiktiven Nutzens [81]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit hohen uPA/PAI Werten im Primärtumor deutlich mehr von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren, im Gegensatz zu Patientinnen mit niedrigen uPA/PAI Konzentrationen. Auch die 10-Jahres Nachbeobachtungsstudie derselben Forschungsgruppe konnte diese Ergebnisse bestärken [82]. Es konnte eine Niedrigrisiko Gruppe definiert werden, in der Patientinnen mit niedrigen uPA/PAI Werten kaum von einer adjuvanten Chemotherapie prognostisch profitieren würden. Entgegen der ASCO-Empfehlungen wurde der uPA/PAI Biomarker nicht in die aktuellste Version der S3-Leitlinie aufgenommen. Grund hierfür ist vor allem die fehlende Übertragbarkeit auf die gegenwärtigen Behandlungsstandards [4].

Mit dem Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschlusses im Juni 2019 und in Zukunft mit Sicherheit weiter an Bedeutung zunehmend, sind Biomarker-basierte Tests für das MK hinsichtlich ihrer prognostischen und prädiktiven Aussagekraft in das Zentrum der Forschung gerückt. Genexpressionsanalysen untersuchen mithilfe von cDNA-Microarrays das Expressionsmuster tausender Gene im MK. Sie sind Gegenstand der individualisierten Medizin, bei der genomische Merkmale genutzt werden um die Therapie zu optimieren. Aufgezählt werden die vier in Deutschland am häufigsten verwendeten Multigentests, die größtenteils unterschiedliche Gen Panels zur Grundlage haben: Oncotype DX®, EndoPredict®, MammaPrint® und Prosigna®. Sogar in der aktuellsten S3-Leitlinie konnten sich die o.g. Multigentests mit Einschränkungen als prädiktiver Marker etablieren. Genexpressionsanalysen sollen demnach bei HR-positiven, Her2- und nodal-negativen MK nur dann herangezogen werden, wenn die konventionellen Prognosefaktoren einschließlich Ki-67 keine eindeutige Entscheidung bezüglich einer adjuvanten Chemotherapie erlauben. Seit Januar 2020 werden klinisch validierte Multigentests von den gesetzlichen Krankenkassen als Regelleistung anerkannt. Mit der TransATAC Studie konnte die prognostische Aussagekraft dreier Genexpressionstests (Oncotype DX®, EndoPredict®, Prosigna®) unterstrichen werden. Alle drei Analyseverfahren identifizierten eine Niedrigrisikogruppe hinsichtlich eines DFS in den ersten 10 Jahren nach Erstdiagnose bei nodalnegativer Erkrankung [83]. Dementgegen untersuchte die OPTIMA Studie prospektiv in einem Patientenkollektiv mit einem frühen ER positiven und Her2 negativen MK zwischen einer Chemotherapie gefolgt von einer endokrinen Therapie nach Risikoabschätzung sechs unterschiedlicher Multigentests [84]. Die Ergebnisse zeigten eine nur mäßige Übereinstimmung der Tests bezogen auf die Risikoeinteilung und Bestimmung des molekularen Subtyps. Demzufolge bemängeln die Autoren, dass unterschiedliche Tests für die Patientinnen zu verschiedenen Risikoeinteilung führen und somit divergenten Therapieempfehlungen. Hinsichtlich des Einsatzes einzelner Genexpressionstests besteht also noch weiterer Forschungsbedarf mit größerer Evidenz und längeren Nachbeobachtungszeiten.

Der stetige Zugewinn an Informationen der Molekularbiologie des MK führt zu einem detaillierteren Verständnis des komplexen Tumorgeschehens. Heutzutage ist es sogar mithilfe verschiedener Genexpressionsanalysen möglich, die Expressionsmuster von Proteinen und den kodierenden Genen der individuellen Patientinnen zu erstellen und somit ein gezieltes Therapiekonzept zu erstellen. Mit dem Nachweis des Her2-neu Rezeptors und dem darauf

basierenden erfolgreichen Einsatz von Trastuzumab hat die Bedeutung prädiktiver Faktoren eine neue Bedeutung gewonnen. Unsere Studie konnte einen statistisch signifikanten Unterschied der prognostischen Aussagekraft der etablierten Hormonrezeptoren in Bezug auf die Fokalität belegen. Weitere Studien bezüglich einer prädiktiven Relevanz dieser untersuchten Korrelation und dementsprechend angepasster Therapie sind erforderlich.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der prognostische Einfluss der etablierten Hormonrezeptoren auf das unifokale versus multifokale und / oder multizentrische Mammakarzinom untersucht. An einem Patientenkollektiv von 320 an einem Mammakarzinom erkrankten Frauen konnten mittels immunhistochemischer Färbungen die Hormonrezeptorexpression und durch Bildgebungen die Fokalität evaluiert werden. Diese Daten wurden anhand statistischer Analysen ausgewertet und zeigten signifikante Zusammenhänge bezüglich der Krankheitsprognose. Als relevante Prognostikatoren wurden in dieser Studie etablierte Prognosemarker wie das Gesamtüberleben, Rezidivfreie Überleben, das TNM-Staging und Grading als Endpunkte festgesetzt und untersucht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression nur in unifokalem Mammakarzinom statistisch signifikant mit einer verbesserten Prognose einher gehen. In der Multivariaten Analyse konnte zudem der Östrogenrezeptor in der unifokalen Gruppe als unabhängiger Marker für das Gesamtüberleben identifiziert werden. Bei an einem multifokalen und/oder multizentrischen Mammakarzinom erkrankten Patientinnen konnte kein prognostischer Einfluss, weder bei einer Östrogen- noch bei einer Progesteronreptorexpression, analysiert werden. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu stärken wurden die Daten der Patientinnen mit einem Triple negativen Mammakarzinom ausgewertet. Hier konnte ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben in der unifokalen Kohorte aufgezeigt werden.

Diese Daten sollen zur aktuellen Diskussion der prognostischen Relevanz der Fokalität beim Mammakarzinom beitragen und am Beispiel der Hormonrezeptorexpression helfen diese differenziert zu betrachten. Ziel aller ist eine Optimierung der individualisierten Therapie der Mammakarzinom Patienten. Mit diesem Anreiz wurden bereits Neuerungen hinsichtlich weiterer prädiktiver und prognostischer Marker bereits in der Diagnostik etabliert, wie beispielsweise molekular-genetische Blutuntersuchungen oder andere Biomarker. Weitere Studien zu dem Thema dieser Arbeit bleiben abzuwarten, um eine Etablierung der Fokalität als weiteren Prognosemarker des Mammakarzinoms zu realisieren.

8. Literaturverzeichnis

1. Observatory, T. G. C. breast cancer fact sheet
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
2. (RKI), Z. f. K. Brustkrebs
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html
3. Chen, H.; Wu, J.; Zhang, Z.; Tang, Y.; Li, X.; Liu, S.; Cao, S.; Li, X., Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 909.
4. Onkologie, L. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLk_S3_Mammakarzinom_2020-02.pdf
5. Collins, L. C.; Tamimi, R. M.; Baer, H. J.; Connolly, J. L.; Colditz, G. A.; Schnitt, S. J., Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: results from the Nurses' Health Study. *Cancer* **2005**, *103*, (9), 1778-84.
6. Sun, Y. S.; Zhao, Z.; Yang, Z. N.; Xu, F.; Lu, H. J.; Zhu, Z. Y.; Shi, W.; Jiang, J.; Yao, P. P.; Zhu, H. P., Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci* **2017**, *13*, (11), 1387-1397.
7. Dall, G. V.; Britt, K. L., Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Front Oncol* **2017**, *7*, 110.
8. (DGGG), D. G. f. G. u. G. Peri- und Postmenopause Diagnostik und Interventionen
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-062l_S3_HT_Perio-Postmenopause-Diagnostik-Interventionen_2021-01.pdf
9. Cserni, G., Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica* **2020**, *112*, (1), 25-41.
10. Elston, C. W.; Ellis, I. O., Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; *19*; 403-410. *Histopathology* **2002**, *41*, (3A), 151-2, discussion 152-3.
11. Schoub, P. K., Understanding indications and defining guidelines for breast magnetic resonance imaging. *SA J Radiol* **2018**, *22*, (2), 1353.
12. Bloom, H. J.; Richardson, W. W., Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* **1957**, *11*, (3), 359-77.

13. Cserni, G.; Chmielik, E.; Cserni, B.; Tot, T., The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch* **2018**, *472*, (5), 697-703.
14. Sawaki, M.; Shien, T.; Iwata, H., TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn J Clin Oncol* **2019**, *49*, (3), 228-231.
15. Weissenbacher, T.; Hirte, E.; Kuhn, C.; Janni, W.; Mayr, D.; Karsten, U.; Rack, B.; Friese, K.; Jeschke, U.; Heublein, S.; Dian, D.; Ditsch, N., Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: differences in the expression of E-cadherin suggest differences in tumor biology. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 361.
16. Masannat, Y. A.; Agrawal, A.; Maraqa, L.; Fuller, M.; Down, S. K.; Tang, S.; Pang, D.; Kontos, M.; Romics, L.; Heys, S. D., Multifocal and multicentric breast cancer, is it time to think again? *Ann R Coll Surg Engl* **2020**, *102*, (1), 62-66.
17. Milulescu, A.; Di Marino, L.; Peradze, N.; Toesca, A., Management of Multifocal-Multicentric Breast Cancer: Current Perspective. *Chirurgia (Bucur)* **2017**, *112*, (1), 12-17.
18. Lang, Z.; Wu, Y.; Li, C.; Li, X.; Wang, X.; Qu, G., Multifocal and Multicentric Breast Carcinoma: A Significantly More Aggressive Tumor than Unifocal Breast Cancer. *Anticancer research* **2017**, *37*, (8), 4593-4598.
19. Faverly, D. R.; Burgers, L.; Bult, P.; Holland, R., Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma in situ: clinical implications. *Semin Diagn Pathol* **1994**, *11*, (3), 193-8.
20. Weissenbacher, T. M.; Zschage, M.; Janni, W.; Jeschke, U.; Dimpfl, T.; Mayr, D.; Rack, B.; Schindlbeck, C.; Friese, K.; Dian, D., Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *122*, (1), 27-34.
21. Prochowski Iamurri, A.; Ponziani, M.; Macchini, M.; Fogante, M.; Pistelli, M.; De Lisa, M.; Berardi, R.; Giuseppetti, G. M., Evaluation of Multifocality and Multicentricity With Breast Magnetic Resonance Imaging in Each Breast Cancer Subtype. *Clin Breast Cancer* **2018**, *18*, (2), e231-e235.
22. Bakhtavar, K.; Saran, M.; Behzadifar, M.; Farsi, M., Magnetic resonance mammography in comparison with mammography in the discovery of multifocal, multicentric and bilateral lesions of breast cancer. *Electron Physician* **2017**, *9*, (8), 5083-5087.
23. Schütz, F., Sohn, C., *Brusterhaltende Operation . In: Erste Hilfe bei Brustkrebs*. Springer, Berlin: Heidelberg, 2018.
24. Allison, K. H.; Hammond, M. E. H.; Dowsett, M.; McKernin, S. E.; Carey, L. A.; Fitzgibbons, P. L.; Hayes, D. F.; Lakhani, S. R.; Chavez-MacGregor, M.; Perlmutter, J.; Perou, C. M.; Regan, M. M.; Rimm, D. L.; Symmans, W. F.; Torlakovic, E. E.; Varella, L.; Viale, G.; Weisberg, T. F.; McShane, L. M.; Wolff, A. C., Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol* **2020**, *38*, (12), 1346-1366.

25. Remmele, W.; Stegner, H. E., [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* **1987**, 8, (3), 138-40.
26. Perou, C. M.; Sorlie, T.; Eisen, M. B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Rees, C. A.; Pollack, J. R.; Ross, D. T.; Johnsen, H.; Akslen, L. A.; Fluge, O.; Pergamenschikov, A.; Williams, C.; Zhu, S. X.; Lonning, P. E.; Borresen-Dale, A. L.; Brown, P. O.; Botstein, D., Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**, 406, (6797), 747-52.
27. Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A., Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (12), 5925-30.
28. Balfe, P.; McCann, A.; McGoldrick, A.; McAllister, K.; Kennedy, M.; Dervan, P.; Kerin, M. J., Estrogen receptor alpha and beta profiling in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* **2004**, 30, (5), 469-74.
29. Jia, M.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, J. A., Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2015**, 29, (4), 557-68.
30. Stefan Silbernagl, A. D., Taschenatlas Physiologie **2012**, 7., 292 - 318.
31. Siersbaek, R.; Kumar, S.; Carroll, J. S., Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor alpha function in breast cancer. *Genes Dev* **2018**, 32, (17-18), 1141-1154.
32. Anbalagan, M.; Rowan, B. G., Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* **2015**, 418 Pt 3, 264-72.
33. Catley, M. C.; Birrell, M. A.; Hardaker, E. L.; de Alba, J.; Farrow, S.; Haj-Yahia, S.; Belvisi, M. G., Estrogen receptor beta: expression profile and possible anti-inflammatory role in disease. *J Pharmacol Exp Ther* **2008**, 326, (1), 83-8.
34. Brandenberger, A. W.; Tee, M. K.; Jaffe, R. B., Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, 83, (3), 1025-8.
35. Haldosen, L. A.; Zhao, C.; Dahlman-Wright, K., Estrogen receptor beta in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* **2014**, 382, (1), 665-672.
36. Graham, J. D.; Yager, M. L.; Hill, H. D.; Byth, K.; O'Neill, G. M.; Clarke, C. L., Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **2005**, 19, (11), 2713-35.
37. Mulac-Jericevic, B.; Mullinax, R. A.; DeMayo, F. J.; Lydon, J. P.; Conneely, O. M., Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* **2000**, 289, (5485), 1751-4.

38. Graham, J. D.; Clarke, C. L., Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* **1997**, 18, (4), 502-19.
39. Obr, A. E.; Edwards, D. P., The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* **2012**, 357, (1-2), 4-17.
40. Boonyaratanakornkit, V.; Scott, M. P.; Ribon, V.; Sherman, L.; Anderson, S. M.; Maller, J. L.; Miller, W. T.; Edwards, D. P., Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* **2001**, 8, (2), 269-80.
41. Lee, S.; Kolonel, L.; Wilkens, L.; Wan, P.; Henderson, B.; Pike, M., Postmenopausal hormone therapy and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. *Int J Cancer* **2006**, 118, (5), 1285-91.
42. Beral, V.; Million Women Study, C., Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **2003**, 362, (9382), 419-27.
43. Zheng, Z. Y.; Bay, B. H.; Aw, S. E.; Lin, V. C., A novel antiestrogenic mechanism in progesterone receptor-transfected breast cancer cells. *J Biol Chem* **2005**, 280, (17), 17480-7.
44. Mohammed, H.; Russell, I. A.; Stark, R.; Rueda, O. M.; Hickey, T. E.; Tarulli, G. A.; Serandour, A. A.; Birrell, S. N.; Bruna, A.; Saadi, A.; Menon, S.; Hadfield, J.; Pugh, M.; Raj, G. V.; Brown, G. D.; D'Santos, C.; Robinson, J. L.; Silva, G.; Launchbury, R.; Perou, C. M.; Stingl, J.; Caldas, C.; Tilley, W. D.; Carroll, J. S., Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer. *Nature* **2015**, 523, (7560), 313-7.
45. Thill, M.; Jackisch, C.; Janni, W.; Muller, V.; Albert, U. S.; Bauerfeind, I.; Blohmer, J.; Budach, W.; Dall, P.; Diel, I.; Fasching, P. A.; Fehm, T.; Friedrich, M.; Gerber, B.; Hanf, V.; Harbeck, N.; Huober, J.; Kolberg-Liedtke, C.; Kreipe, H. H.; Krug, D.; Kuhn, T.; Kummel, S.; Loibl, S.; Luftner, D.; Lux, M. P.; Maass, N.; Mobus, V.; Muller-Schimpfle, M.; Mundhenke, C.; Nitz, U.; Rhiem, K.; Rody, A.; Schmidt, M.; Schneeweiss, A.; Schutz, F.; Sinn, H. P.; Solbach, C.; Solomayer, E. F.; Stickeler, E.; Thomssen, C.; Untch, M.; Wenz, F.; Witzel, I.; Wockel, A.; Ditsch, N., AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer: Update 2019. *Breast Care (Basel)* **2019**, 14, (4), 247-255.
46. Davies, C.; Pan, H.; Godwin, J.; Gray, R.; Arriagada, R.; Raina, V.; Abraham, M.; Medeiros Alencar, V. H.; Badran, A.; Bonfill, X.; Bradbury, J.; Clarke, M.; Collins, R.; Davis, S. R.; Delmestri, A.; Forbes, J. F.; Haddad, P.; Hou, M. F.; Inbar, M.; Khaled, H.; Kielanowska, J.; Kwan, W. H.; Mathew, B. S.; Mittra, I.; Muller, B.; Nicolucci, A.; Peralta, O.; Pernas, F.; Petruzelka, L.; Pienkowski, T.; Radhika, R.; Rajan, B.; Rubach, M. T.; Tort, S.; Urrutia, G.; Valentini, M.; Wang, Y.; Peto, R.; Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter Collaborative, G., Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* **2013**, 381, (9869), 805-16.
47. Richard G. Gray , D. R., Kelly Handley , Sarah Jane Bowden , Philip Perry , Helena Margaret Earl, Christopher John Poole , Tom Bates , Shan Chetiyawardana , John A. Dewar

- , Indrajit Nalinika Fernando , Robert Grieve , Jonathan Nicoll , Zenor Rayter , Anne Robinson , Asad Salman , John Yarnold , Sarah Bathers , Andrea Marshall , Martin Lee
aTTom: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, 31, (18).
48. Bernhard, J.; Luo, W.; Ribi, K.; Colleoni, M.; Burstein, H. J.; Tondini, C.; Pinotti, G.; Spazzapan, S.; Ruhstaller, T.; Puglisi, F.; Pavesi, L.; Parmar, V.; Regan, M. M.; Pagani, O.; Fleming, G. F.; Francis, P. A.; Price, K. N.; Coates, A. S.; Gelber, R. D.; Goldhirsch, A.; Walley, B. A., Patient-reported outcomes with adjuvant exemestane versus tamoxifen in premenopausal women with early breast cancer undergoing ovarian suppression (TEXT and SOFT): a combined analysis of two phase 3 randomised trials. *Lancet Oncol* **2015**, 16, (7), 848-58.
 49. Metzger Filho, O.; Giobbie-Hurder, A.; Mallon, E.; Gusterson, B.; Viale, G.; Winer, E. P.; Thurlimann, B.; Gelber, R. D.; Colleoni, M.; Ejlertsen, B.; Debled, M.; Price, K. N.; Regan, M. M.; Coates, A. S.; Goldhirsch, A., Relative Effectiveness of Letrozole Compared With Tamoxifen for Patients With Lobular Carcinoma in the BIG 1-98 Trial. *J Clin Oncol* **2015**, 33, (25), 2772-9.
 50. Mehta, R. S.; Barlow, W. E.; Albain, K. S.; Vandenberg, T. A.; Dakhil, S. R.; Tirumali, N. R.; Lew, D. L.; Hayes, D. F.; Gralow, J. R.; Linden, H. H.; Livingston, R. B.; Hortobagyi, G. N., Overall Survival with Fulvestrant plus Anastrozole in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* **2019**, 380, (13), 1226-1234.
 51. Mehta, R. S.; Barlow, W. E.; Albain, K. S.; Vandenberg, T. A.; Dakhil, S. R.; Tirumali, N. R.; Lew, D. L.; Hayes, D. F.; Gralow, J. R.; Livingston, R. B.; Hortobagyi, G. N., Combination anastrozole and fulvestrant in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* **2012**, 367, (5), 435-44.
 52. Barnes, B. K., Klaus; Nowossadeck, Enno; Schönfeld, Ina; Starker, Anne; Wienecke, Antje; Wolf, Ute, Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland **2016**.
 53. Harbeck, N.; Aigner, M.; Kuschel, B.; Kiechle, M., Mammakarzinom - prognostische und prädiktive Faktoren. *Der Onkologe* **2002**, 8, (8), 808-816.
 54. Draganescu, M.; Carmocan, C., Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucur)* **2017**, 112, (4), 413-417.
 55. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2005**, 365, (9472), 1687-717.
 56. Ditsch, N.; Mayr, D.; Lenhard, M.; Strauss, C.; Vodermaier, A.; Gallwas, J.; Stoeckl, D.; Graeser, M.; Weissenbacher, T.; Friese, K.; Jeschke, U., Correlation of thyroid hormone, retinoid X, peroxisome proliferator-activated, vitamin D and oestrogen/progesterone receptors in breast carcinoma. *Oncol Lett* **2012**, 4, (4), 665-671.

57. Heublein, S.; Mayr, D.; Meindl, A.; Kircher, A.; Jeschke, U.; Ditsch, N., Vitamin D receptor, Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma are overexpressed in BRCA1 mutated breast cancer and predict prognosis. *J Exp Clin Cancer Res* **2017**, *36*, (1), 57.
58. Ditsch, N.; Toth, B.; Mayr, D.; Lenhard, M.; Gallwas, J.; Weissenbacher, T.; Dannecker, C.; Friese, K.; Jeschke, U., The association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. *J Histochem Cytochem* **2012**, *60*, (2), 121-9.
59. Buchberger, W.; DeKoekkoek-Doll, P.; Obrist, P.; Dunser, M., [Value of MR tomography in inconclusive mammography findings]. *Radiologe* **1997**, *37*, (9), 702-9.
60. Gundry, K. R., The application of breast MRI in staging and screening for breast cancer. *Oncology (Williston Park)* **2005**, *19*, (2), 159-69; discussion 170, 173-4, 177.
61. Tresserra, F.; Rodriguez, I.; Garcia-Yuste, M.; Grases, P. J.; Ara, C.; Fabregas, R., Tumor size and lymph node status in multifocal breast cancer. *Breast J* **2007**, *13*, (1), 68-71.
62. Lynch, S. P.; Lei, X.; Chavez-MacGregor, M.; Hsu, L.; Meric-Bernstam, F.; Buchholz, T. A.; Zhang, A.; Hortobagyi, G. N.; Valero, V.; Gonzalez-Angulo, A. M., Multifocality and multicentricity in breast cancer and survival outcomes. *Ann Oncol* **2012**, *23*, (12), 3063-9.
63. Cabioglu, N.; Ozmen, V.; Kaya, H.; Tuzlali, S.; Igci, A.; Muslumanoglu, M.; Kecer, M.; Dagoglu, T., Increased lymph node positivity in multifocal and multicentric breast cancer. *J Am Coll Surg* **2009**, *208*, (1), 67-74.
64. Fushimi, A.; Yoshida, A.; Yagata, H.; Takahashi, O.; Hayashi, N.; Suzuki, K.; Tsunoda, H.; Nakamura, S.; Yamauchi, H., Prognostic impact of multifocal and multicentric breast cancer versus unifocal breast cancer. *Surg Today* **2018**.
65. Nicolini, A.; Ferrari, P.; Duffy, M. J., Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Semin Cancer Biol* **2018**, *52*, (Pt 1), 56-73.
66. Nordenskjold, A.; Fohlin, H.; Fornander, T.; Lofdahl, B.; Skoog, L.; Stal, O., Progesterone receptor positivity is a predictor of long-term benefit from adjuvant tamoxifen treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2016**, *160*, (2), 313-322.
67. Duffy, M. J.; Harbeck, N.; Nap, M.; Molina, R.; Nicolini, A.; Senkus, E.; Cardoso, F., Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer* **2017**, *75*, 284-298.
68. Khoshnoud, M. R.; Fornander, T.; Johansson, H.; Rutqvist, L. E., Long-term pattern of disease recurrence among patients with early-stage breast cancer according to estrogen receptor status and use of adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **2008**, *107*, (1), 71-8.
69. Barnes, D. M.; Millis, R. R.; Gillett, C. E.; Ryder, K.; Skilton, D.; Fentiman, I. S.; Rubens, R. D., The interaction of oestrogen receptor status and pathological features with adjuvant treatment in relation to survival in patients with operable breast cancer: a retrospective study of 2660 patients. *Endocr Relat Cancer* **2004**, *11*, (1), 85-96.

70. Ouyang, Y.; Li, D.; Pater, J. L.; Levine, M., The importance of temporal effects in evaluating the prognostic impact of joint ERPR expression in premenopausal women with node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2005**, *92*, (2), 115-23.
71. Van Poznak, C.; Somerfield, M. R.; Bast, R. C.; Cristofanilli, M.; Goetz, M. P.; Gonzalez-Angulo, A. M.; Hicks, D. G.; Hill, E. G.; Liu, M. C.; Lucas, W.; Mayer, I. A.; Mennel, R. G.; Symmans, W. F.; Hayes, D. F.; Harris, L. N., Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* **2015**, *33*, (24), 2695-704.
72. Carlson, R. W., NCCN breast cancer clinical practice guidelines in oncology: an update. *J Natl Compr Canc Netw* **2003**, *1* Suppl 1, S61-3.
73. Cardoso, F.; Costa, A.; Norton, L.; Senkus, E.; Aapro, M.; Andre, F.; Barrios, C. H.; Bergh, J.; Biganzoli, L.; Blackwell, K. L.; Cardoso, M. J.; Cufer, T.; El Saghir, N.; Fallowfield, L.; Fenech, D.; Francis, P.; Gelmon, K.; Giordano, S. H.; Gligorov, J.; Goldhirsch, A.; Harbeck, N.; Houssami, N.; Hudis, C.; Kaufman, B.; Krop, I.; Kyriakides, S.; Lin, U. N.; Mayer, M.; Merjaver, S. D.; Nordstrom, E. B.; Pagani, O.; Partridge, A.; Penault-Llorca, F.; Piccart, M. J.; Rugo, H.; Sledge, G.; Thomssen, C.; Van't Veer, L.; Vorobiof, D.; Vrieling, C.; West, N.; Xu, B.; Winer, E., ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2)dagger. *Ann Oncol* **2014**, *25*, (10), 1871-1888.
74. Aurilio, G.; Disalvatore, D.; Pruneri, G.; Bagnardi, V.; Viale, G.; Curigliano, G.; Adamoli, L.; Munzone, E.; Sciandivasci, A.; De Vita, F.; Goldhirsch, A.; Nole, F., A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer* **2014**, *50*, (2), 277-89.
75. Loibl, S.; Gianni, L., HER2-positive breast cancer. *Lancet* **2017**, *389*, (10087), 2415-2429.
76. Krishnamurti, U.; Silverman, J. F., HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol* **2014**, *21*, (2), 100-7.
77. Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **2001**, *344*, (11), 783-92.
78. Hurvitz, S. A.; Hu, Y.; O'Brien, N.; Finn, R. S., Current approaches and future directions in the treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer treatment reviews* **2013**, *39*, (3), 219-29.
79. Figueroa-Magalhaes, M. C.; Jelovac, D.; Connolly, R.; Wolff, A. C., Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast* **2014**, *23*, (2), 128-136.
80. Look, M. P.; van Putten, W. L.; Duffy, M. J.; Harbeck, N.; Christensen, I. J.; Thomssen, C.; Kates, R.; Spyrtatos, 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., Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **2002**, *94*, (2), 116-28.
81. Harbeck, N.; Kates, R. E.; Look, M. P.; Meijer-Van Gelder, M. E.; Klijn, J. G.; Kruger, A.; Kiechle, M.; Janicke, F.; Schmitt, M.; Foekens, J. A., Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res* **2002**, *62*, (16), 4617-22.
82. Harbeck, N.; Schmitt, M.; Meisner, C.; Friedel, C.; Untch, M.; Schmidt, M.; Sweep, C. G.; Lisboa, B. W.; Lux, M. P.; Beck, T.; Hasmuller, S.; Kiechle, M.; Janicke, F.; Thomssen, C.; Chemo, N. S. G., Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer* **2013**, *49*, (8), 1825-35.
83. Buus, R.; Sestak, I.; Kronenwett, R.; Ferree, S.; Schnabel, C. A.; Baehner, F. L.; Mallon, E. A.; Cuzick, J.; Dowsett, M., Molecular Drivers of Oncotype DX, Prosigna, EndoPredict, and the Breast Cancer Index: A TransATAC Study. *J Clin Oncol* **2021**, *39*, (2), 126-135.
84. Bartlett, J. M.; Bayani, J.; Marshall, A.; Dunn, J. A.; Campbell, A.; Cunningham, C.; Sobol, M. S.; Hall, P. S.; Poole, C. J.; Cameron, D. A.; Earl, H. M.; Rea, D. W.; Macpherson, I. R.; Canney, P.; Francis, A.; McCabe, C.; Pinder, S. E.; Hughes-Davies, L.; Makris, A.; Stein, R. C.; Optima, T. M. G., Comparing Breast Cancer Multiparameter Tests in the OPTIMA Prelim Trial: No Test Is More Equal Than the Others. *J Natl Cancer Inst* **2016**, *108*, (9).

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

(Strept)Avidin-Biotin-Complex	ABC
Atypische duktale Hyperplasie	ADH
Amercian Society of Clinical Oncology	ASCO
College of Amercian Pathologists	CAP
Duktales Carcinoma in situ	DCIS
Flache epitheliale Atypie	FEA
Hormonrezeptor	HR
Hormonersatztherapie	HRT
Human epidermal Growth Factor 2 Rezeptor	Her2
Immunhistochemie	IHC
Kontrastmittelmagnetresonanztomographie	KM-MRT
Lobuläre intraepitheliale Neoplasie	LIN
Mammakarzinom	MK
Neutral buffered formalin	NBF
Kein spezieller Typ	NST
Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1	PAI-1
Pathologic complete remission	pCR
Progesteronrezeptor	PR
Östrogenrezeptor	ER
Östrogentherapie	ET
Östrogen-Gestagen Therapie	EPT
Triple negativ	TN
Tumor-Node-Metastasis	TNM
Union for international cancer control	UICC
Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator	uPA

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Grading-System des invasiven Mammakarzinoms nach Elston und Ellis Stand modifizierten Bloom-Richardson-System aus 1991
Tabelle 2	TNM-Klassifikation und UICC-Stadien Einteilung des Mammakarzinoms 8. Auflage Stand 2017
Tabelle 3	Immunhistochemische molekulare Subtypisierung des invasiven Mammakarzinoms
Tabelle 4	Hormonrezeptorstatus des Gesamtkollektivs unterteilt nach Fokalität
Tabelle 5	Patientencharakteristika des Gesamtkollektivs
Tabelle 6	verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien
Tabelle 7	verwendete Reagenzien
Tabelle 8	verwendete Primärantikörper und Detektionssysteme
Tabelle 9	Immunreaktiver Score nach Remmele und Steger
Tabelle 10	Multivariate Cox-regression der Patientinnen mit unifokalem Mammakarzinom in Bezug auf das Gesamtüberleben für den ER
Tabelle 11	Multivariate Cox-regression der Patientinnen mit unifokalem MK in Bezug auf das Gesamtüberleben für den PR

9.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Schematische Darstellung der Fokalität/Zentrität des Mammakarzinoms. Von links nach rechts ist ein unifokales, multifokales und multizentrisches Mammakarzinom abgebildet [23]
- Abbildung 2** Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie der weiblichen Brust: multizentrisches MK links
- Abbildung 3** Schematische Darstellung der (Strept)Avidin-Biotin-Complex-Methode
- Abbildung 4** Immunhistochemische Färbungen der malignen Mammakarzinom Zellen nach Inkubation mit dem primären Antikörper
- Abbildung 5** Kaplan-Meier Überlebenskurve. Dargestellt ist das Gesamtüberleben in Jahren der Patientinnen mit unifokalem MK im Vergleich ER positiv und ER negativ.
- Abbildung 6** Kaplan-Meier Überlebenskurve. Dargestellt ist das Gesamtüberleben in Jahren der Patientinnen mit unifokalem MK im Vergleich PR positiv und PR negativ.
- Abbildung 7** Kaplan-Meier Überlebenskurve. Dargestellt ist das Gesamtüberleben in Jahren der Patientinnen mit unifokalem MK im Vergleich TN und HR positiv.
- Abbildung 8** Kaplan-Meier Überlebenskurve. Dargestellt ist das Gesamtüberleben in Jahren der Patientinnen mit unifokalem MK im Vergleich TN und HR positiv.

9.4. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt all denen, die mich bei der Vollendung der Promotion unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben:

Angefangen bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke, dem ich diese Arbeit verdanke. Danke lieber Udo für die Konzeptionierung dieses interessanten Promotionsthemas, Deiner unermüdlichen Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses dieser und aller darauffolgenden Forschungsarbeiten. Ich schätze mich überaus glücklich, einen Mentor wie Dich zu haben!

Besonders hervorheben möchte ich die Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Theresa Vilsmaier, die mich als Betreuerin und Freundin durch alle Höhen und Tiefen begleitet und motiviert hat. Weitere gemeinsame Arbeiten sind das Resultat dieser Synergie. Wir sind ein Team der ganz besonderen Art und Weise!

Frau Christina Kuhn möchte ich für die geduldige Einführung in die Welt des Forschungslabors der Maistraße danken. Bei Fragen rund um den Materialteil war Sie vor allem in den frühen Phasen eine unentbehrliche Hilfe.

Prof. Dr. med. Thomas Kolben möchte ich an dieser Stelle für seine unermüdliche Motivation danken. Danke Tomi, für Deine Hartnäckigkeit, ich weiß Du verfolgst mein bestes Interesse.

Prof. Dr. med. Sven Mahner danke ich für die Möglichkeit, als Studentin meine Promotion an der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der LMU zu beginnen und als Ärztin an derselben abzuschließen. Vielen Dank für das besonders nette Arbeitsumfeld, dass Sie kreieren und Ihre stets wohlwollend professionelle Unterstützung.

Meinem Partner Sven-Niclas Jacob kann ich nicht genug danken und somit danke ich Dir für alles! In jeder Lebenssituation bist Du mein Fels in der Brandung.

Meiner Familie danke ich für ihre liebevolle, immerwährende und bedingungslose Unterstützung. Mama und Papa Ihr habt mich zu dem Menschen gemacht der ich heute bin - Euch möchte ich diese Arbeit widmen!

10. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Zati zehni, Alaleh

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Steroidhormonrezeptoren sind positive Prognostikatoren für das Mammakarzinom – ist dies universell anwendbar oder abhängig von der Fokalität?

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

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 02.06.2022

Alaleh Zati zehni

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

