

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG  
PD DR. CLAUD LATTRICH  
FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE

**Untersuchung des prognostischen und prädiktiven Aussagewertes der  
GPER 1-Expression in Mammakarzinompatientinnen mit endokriner Therapie**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Eva Plätzer

2021

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG  
PD DR. CLAUDIUS LATTRICH  
FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE

**Untersuchung des prognostischen und prädiktiven Aussagewertes der  
GPER 1-Expression in Mammakarzinompatientinnen mit endokriner Therapie**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Eva Plätzer

2021

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Claus Lattrich
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Maximilian Burger
Tag der mündlichen Prüfung:	20.10.2022

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	5
1.1 Epidemiologische Aspekte und Risikofaktoren des Mammakarzinoms .....	5
1.2 Früherkennung, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms .....	8
1.3 Nachsorge des Mammakarzinoms .....	15
1.4 Aktueller Forschungsstand zum Östrogenrezeptor GPER 1 .....	15
1.5 Fragestellung .....	18
2. Material und Methoden .....	18
2.1 Patientinnenkollektiv .....	18
2.2 Gewebepräparation .....	23
2.3 Immunhistochemie (IHC) .....	23
2.4 Bewertung der immunhistochemischen Färbung von GPER 1 in Mammakarzinom-Gewebe .....	26
2.5 Statistik .....	28
2.6 Digitalisierung charakteristischer Fälle .....	29
3. Ergebnisse .....	30
3.1 GPER 1-Expression im Normalgewebe .....	30
3.2 GPER 1-Expression in Mammakarzinom-Gewebe .....	32
3.3 Patientinnencharakteristika .....	34
3.4 Vergleichende Analyse: GPER 1-Negativität vs. GPER 1-Positivität .....	36
3.4.1 Kollektivanalyse .....	36
3.4.2 Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier .....	42
3.5 Vergleichende Analyse der GPER 1-positiven Patientinnen: Tamoxifen® vs. Aromataseinhibitor .....	46
3.5.1 Kollektivanalyse .....	46
3.5.2 Überlebensanalyse mit Kaplan-Meier und Cox-Regression .....	52
3.6 Vergleichende Analyse der GPER 1-negativen Patientinnen: Tamoxifen® vs. Aromataseinhibitor .....	58
4. Diskussion .....	61

4.1 Spezifische Färbung der GPER 1-Expression .....	61
4.2 Semiquantitative Auswertung der GPER 1-Expression.....	63
4.3 Homogenität des Kollektivs und Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter.....	65
4.4 Überlebensanalysen.....	67
4.5 Prospektive Untersuchung des Überlebensvorteils.....	69
5. Zusammenfassung .....	71
6. Anhang .....	73
6.1 TNM-Klassifikation.....	73
6.2 Gradingssystem .....	75
6.3 Tabellenverzeichnis.....	76
6.4 Abbildungsverzeichnis.....	77
6.5 Abkürzungsverzeichnis.....	79
7. Quellenverzeichnis .....	82
8. Danksagung	

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologische Aspekte und Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit jährlich 1,4 Millionen Neuerkrankungen weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung und ebenso mit jährlich 460.000 Todesfällen weltweit die häufigste durch ein Malignom bedingte Todesursache der Frau (Jemal *et al.*, 2011). Epidemiologischen Untersuchungen zufolge entwickelt jede Frau im Laufe ihres Lebens mit einem Risiko von ca. 8 - 10% eine derartige maligne Erkrankung der Brust. Das sind in Deutschland etwa 71.000 Neuerkrankungen im Jahr (Robert-Koch-Institut, 2017). Die Inzidenz (Anzahl neu aufgetretener Krankheitsfälle pro 100.000 Personen pro Jahr) und Mortalität (Anzahl der Todesfälle pro 100.000 Personen pro Jahr) des Mammakarzinoms unterscheidet sich weltweit enorm. Dabei gelten Frauen mit weißer Hautfarbe, die aus den USA oder aus Europa stammen, als besonders gefährdet. Dagegen weisen Frauen aus Japan, den romanischen Ländern und Südamerika ein deutlich niedrigeres Risiko auf (Breckwoldt *et al.*, 2008). Die niedrigste Inzidenzrate wird derzeit in Ostafrika verzeichnet (19,3/100.000), Belgien dagegen dominiert im internationalen Vergleich mit der höchsten Rate an Neuerkrankungen (150/100.000) (Robert-Koch-Institut, 2017; WHO, Breast cancer, 2008). Zeitgleich konnte generell eine Abnahme der brustkrebsbedingten Mortalität für die USA und England dokumentiert werden (Jemal *et al.*, 2011) und auch in Deutschland lässt sich eine Reduktion der Brustkrebsmortalität verzeichnen. Gründe für diese Abnahme liegen zum Einen in der verbesserten Früherkennung und zum Anderen im postoperativen Einsatz von effektiven adjuvanten Therapiekonzepten (Berry *et al.*, 2005; Fasching *et al.*, 2010). Im Vergleich zu den EU-Ländern nimmt Deutschland sowohl bei der Brustkrebs-Neuerkrankungsrate (114,6/100.000) als auch im Hinblick auf die - Sterblichkeit (23/100.000) eine mittlere Position ein (Robert-Koch-Institut, 2017).

Mit einer Inzidenz von ca. 0,5 - 1,0% aller diagnostizierten Brustkrebsfälle tritt das Mammakarzinom auch bei Männern auf. In Deutschland werden jährlich ca. 600 neue Fälle an Brustkrebs bei Männern diagnostiziert. Da noch keine belastbaren Studien zu spezifischer Diagnostik, biologischen Parametern und zur Therapie des männlichen

Mammakarzinoms existieren, erfolgt die Behandlung von Männern mit Brustkrebs überwiegend in Anlehnung an die Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms bei postmenopausalen Frauen (Breckwoldt *et al.*, 2008; S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021).

Neben Erkrankungsalter und Menopausenstatus wurden in der Vergangenheit weitere Prognosefaktoren wie Tumorgroße, Nodalstatus, Vorhandensein einer Fernmetastasierung, Grading, Hormonrezeptorstatus und HER2-Status erkannt und mit der brustkrebsbedingten Mortalität korreliert (Kaufmann *et al.*, 2013).

Das Erkrankungsrisiko für das Mammakarzinom nimmt mit fortschreitendem Lebensalter kontinuierlich zu (Breckwoldt *et al.*, 2008), jedoch zeigt sich die Inzidenzrate zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auffällig steil ansteigend. Bei 40% aller neu erkrankten Frauen wird die Diagnose vor dem 60. Lebensjahr gestellt. Dies ist im Vergleich zu anderen Malignomen erstaunlich früh und kann nur mit der Existenz anderer dominierender Risikofaktoren erklärt werden (Giersiepen *et al.*, 2005) (siehe Tabelle 1). Eine genetische Prädisposition liegt bei 5% aller Fälle zugrunde, dabei deutet besonders das frühzeitige Auftreten (< 40 Jahre) bei direkten weiblichen Verwandten auf eine familiäre Erkrankung hin. Außerdem ist das Vorhandensein einer Mutation im BRCA1- bzw. BRCA2-Gen von großer Bedeutung für die Entstehung des erblich bedingten Brustkrebses. Mutationen in diesen und anderen prädisponierenden Hochrisikogenen bedingen 90% aller hereditären Mammakarzinome (Breckwoldt *et al.*, 2008).

Als primäre Präventivmaßnahmen treten insbesondere Maßnahmen in den Vordergrund, die von der WHO als Lifestyle-Interventionen bezeichnet werden. Dafür werden eindeutige Empfehlungen zu einer BMI-Reduktion auf Zielwerte zwischen 21 und 23 kg/m<sup>2</sup> ausgesprochen und auch eine Steigerung der körperlichen Aktivität auf 30 Minuten täglich werden in engem Zusammenhang mit einer Reduktion der brustkrebspezifischen Sterberate gesehen. Des Weiteren stellen die prophylaktische bilaterale Salpingoovarektomie (PBSO) und die prophylaktische bilaterale Mastektomie (PBM) eine präventive Option für diejenigen Frauen dar, welche aufgrund ihrer genetischen Prädisposition als Hochrisikofälle eingestuft wurden. Eine mögliche Risikoreduktion durch

die prophylaktische Gabe von Tamoxifen® konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021).

**Tabelle 1:** Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms

<b>Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms</b>		
<b>Risikofaktoren</b>	Risikoerhöhung gegenüber Normalkollektiv	Relatives Risiko (RR)
<b>Alter</b>	70% bei > 60 Jahre	
<b>Rasse<sup>a</sup></b>	Weißer > Schwarze > Japanerinnen > Chinesinnen > Südamerikanerinnen > Indianerinnen <sup>a</sup>	
<b>Sozioökonomische Faktoren</b>	Höherer sozioökonomischer Status	1,5 - 2,0
<b>Genetik</b>	Mutter mit Mammakarzinom < 40 Jahre	2,1
	Mutter mit Mammakarzinom 40–70 Jahre	1,5
	Schwester mit Mammakarzinom	2,3
	Schwester und Mutter mit Mammakarzinom	2,5
	Männer mit weiblichen Verwandten 1. Grades mit Mammakarzinom	1,8
<b>Ernährung</b>	Fetteiche Nahrung	1,12
	Alkohol > 24 g/Tag	1,4 - 1,7
<b>Anthropometrie</b>	Höheres Körpergewicht/Stammfett	
<b>Reproduktive Faktoren</b>	Frühe Menarche (< 12 Jahre)	2,0
	Späte Menopause (> 50 Jahre verglichen mit < 45 Jahre)	2,0
	Frühe ausgetragene Schwangerschaft (< 20 Jahre)	0,3
	Späte erste Schwangerschaft (> 35 Jahre)	1,5
<b>Hormone</b>	Orale Kontrazeptiva	1,1
	Hormonersatztherapie	1,69 - 2,2
<b>Bestrahlung</b>	Radiotherapie in Kindheit und Pubertät	4,0

<b>Benigne Brusterkrankungen</b>	Proliferierende Mastopathie mit Atypien	4,0 - 8,0
<b>Malignome in der Eigenanamnese</b>	Ovariakarzinom	2,0 - 3,0
	Endometriumkarzinom	1,3 - 2,0
<b>Mammakarzinom in der Eigenanamnese</b>	Carcinoma in situ	4,0 - 5,0
	Kontralateral bekanntes Mammakarzinom	5,0 - 10,0
<b>Dichte der Brust</b>	> 50%	5,0 - 12,0

<sup>a</sup> Rassistische Unterschiede aus den USA

Referenz: übernommen und modifiziert nach Kaufmann *et al.*, 2013

## 1.2 Früherkennung, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms

In Deutschland wurde nach Beschluss des Bundestages seit 2005 ein nationales Mammographie-Screening-Programm zur Früherkennung des Mammakarzinoms aufgebaut. Neben der regelmäßigen Tastuntersuchung durch einen Gynäkologen stellen die Mammographie sowie die Sonographie unverzichtbare bildgebende Verfahren zur frühen Identifizierung sowie zur differenzialdiagnostischen Abklärung abnormer bzw. verdächtiger Befunde dar (Breckwoldt *et al.*, 2008). Die Teilnahme am Nationalen Mammographiescreening wird allen Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr empfohlen (Giersiepen *et al.*, 2005; S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021). Die Mammographie verfügt über die höchste Sensitivität bei der Früherkennung sowie bei differenzialdiagnostischer Abklärung abnormer und verdächtiger Befunde, da schon kleinste Mikroverkalkungen, Verschattungen und diffuse Verdichtungen detektierbar sind (Breckwoldt *et al.*, 2008).

Ist ein unklarer Befund aufgefallen, stellt die Sonographie für die weitere Diagnostik die wichtigste Zusatzuntersuchung zur Mammographie und dem Tastbefund dar. Weitere diagnostische Verfahren sind die Magnetresonanztomographie und die Stanzbiopsie. Letztere muss zur weiteren Differenzierung unklarer bildgebender Befunde sowie zur histologischen Diagnosesicherung vorgenommen werden (Breckwoldt *et al.*, 2008).

Besteht klinisch der Verdacht auf ein bereits fortgeschrittenes Stadium (UICC- Stadium II mit erhöhtem Risiko, UICC-Stadium III und IV) bzw. auf eine schon bestehende Fernmetastasierung, wird in der aktuellen S3-Leitlinie prätherapeutisch die Durchführung von Staging-Untersuchungen empfohlen (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021). Da Fernmetastasen des Mammakarzinoms vorwiegend in Knochen, Leber und Lunge auftreten, besteht dieses Staging aus einer CT-Untersuchung von Thorax und Abdomen sowie einer Skelettszintigraphie (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021). In Zusammenschau der erhobenen Befunde kann entsprechend der Richtlinien der *Union internationale contre le cancer* (UICC) (siehe Tabelle 16 im Anhang; Pollock *et al.*, 2004) eine klinische Stadieneinteilung vorgenommen werden und ein entsprechendes therapeutisches Prozedere eingeleitet werden (Weyerstahl *et al.*, 2013).

Den betroffenen Patientinnen kann auf der Grundlage erhobener klinisch-pathologischer Parameter sowie unter Beachtung der jeweiligen Tumoreigenschaften ein individualisiertes Therapiekonzept vorgeschlagen werden. Dieses lässt sich aus operativen Therapieoptionen, lokaler Strahlentherapie, systemischer zytostatischer Therapie, Antikörpertherapie, aber auch endokrin wirksamen Medikamenten kombinieren (Weyerstahl *et al.*, 2013).

Im Regelfall kann Patientinnen bei Vorliegen eines hierfür günstigen Tumorgößen/Brustgrößen-Verhältnisses eine brusterhaltende Operation (BET) zur vollständigen Tumorentfernung angeboten werden. Der Großteil aller Mammakarzinome wird heute brusterhaltend operiert. Jede operative Intervention der Brust sollte bei präoperativ nachgewiesener Malignität sowie palpatorisch und sonographisch unauffälligen axillären Lymphknoten mit einer Sentinel-Lymphknotenentfernung (SNLB) kombiniert werden (Giersiepen *et al.*, 2005). Hierbei werden diejenigen präoperativ radioaktiv markierten Lymphknoten entnommen, die im Lymphabflussgebiet des Primärtumors an erster Stelle liegen (Breckwoldt *et al.*, 2008). Kann ein Befall der Wächter-Lymphknoten ausgeschlossen werden, so wird auf eine Axilladisektion verzichtet. Zeigen sich jedoch klinisch suspektere axilläre Lymphknoten oder findet sich in der histologischen Aufarbeitung ein Befall von drei oder mehr Wächterlymphknoten wird nach der aktuellen Leitlinie die Axilladisektion empfohlen. Diese umfasst die Entfernung

von mindestens zehn Lymphknoten aus Level I und II, bei intraoperativ tastbaren Lymphknoten sogar aus Level III (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021; Breckwoldt *et al.*, 2008). Neueste Erkenntnisse weisen daraufhin, dass bei Patientinnen mit T1- und T2-Tumoren und max. zwei befallenen Sentinel-Lymphknoten auf eine Axilladisektion verzichtet werden kann, da kein eindeutiger Überlebensvorteil für diese radikale Therapie nachgewiesen werden konnte (Janni *et al.*, 2014; Lyman *et al.*, 2014).

Bei Patientinnen mit ausgedehntem, Quadranten-übergreifendem intramammären Befund ist in ca. 75% der Fälle ein Brusterhalt nicht mehr möglich (Giersiepen *et al.*, 2005). In diesen Fällen erfolgt eine radikale Mastektomie mit Sentinel-Lymphknotenentfernung oder Axilladisektion und der Möglichkeit einer primären oder sekundären Brustrekonstruktion (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021).

Im Anschluss an eine brusterhaltende operative Therapie erfolgt regelhaft eine adjuvante Bestrahlung der Brust. Mit dieser Radiotherapie wird die Rate lokoregionärer und distanter Rezidive signifikant reduziert. Eine Radiotherapie nach Mastektomie ist nur bei fortgeschrittenem intramammären Befund bzw. Lymphknotenbefall indiziert (pT4, pT3 mit Risikofaktoren wie L1, G3, Prämenopausenstatus, Alter < 50 Jahre, R1/R2-Resektion und fehlender Möglichkeit der sanierenden Nachresektion, > 3 befallene Lymphknoten) (Breckwoldt *et al.*, 2008). Eine erweiterte axilläre Bestrahlung kann bei Patientinnen mit 1 - 2 befallenen Wächterlymphknoten erfolgen, sofern keine axilläre Dissektion durchgeführt wurde (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021).

Das Mammakarzinom wird als primär systemische Erkrankung mit lokaler Komponente angesehen, denn nach aktuellem Wissensstand können selbst kleinste invasive Karzinome nach radikaler Exzision und Bestrahlung eine distante Metastasierung bewirken. Deshalb müssen in die Primärbehandlung auch systemische adjuvante Therapien miteinbezogen werden (Kaufmann *et al.*, 2013).

Um die individuell effektivste systemische Therapie bestimmen zu können, ist eine genaue Kenntnis der Tumorbiologie nötig. Hierbei zählen der Hormonrezeptor- und der HER2-Staus zu den wichtigsten prognostischen und prädiktiven Markern (Weyerstahl *et al.*, 2013). Dabei gilt ein Tumor als Östrogen- oder Progesteronrezeptor-positiv, wenn nach immunhistochemischer Gewebefärbung mind. 1% der Tumorzellkerne positiv

reagieren (Remmele und Stegner, 1987). Die HER2-Positivität entspricht einer Proteinüberexpression, die immunhistochemisch ermittelt mindestens einen Score von 3+ aufweisen muss oder bei einem niedrigeren Score (2+) durch eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden muss (Untch *et al.*, 2006).

Die Empfehlung für eine Chemotherapie (CHT) besteht bei endokrin nicht oder nur fraglich sensitiven Tumoren, HER2-Expression, schlecht differenzierten Tumoren (G3), einem frühen Erkrankungsalter (< 35 Jahre) und nodal-positiven oder nodal-negativen Tumoren mit einem hohen Rezidivrisiko.

Der Nutzen einer Chemotherapie kann durch Verwendung von neueren Biomarkern wie Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA)/ Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) zusätzlich zum Östrogenrezeptor- und HER2-Status sowie durch bestimmte Genexpressionsalgorithmen evaluiert werden. In Deutschland werden derzeit drei kommerziell erhältliche Genexpressionstests angeboten, die von der ASCO für den praktischen Einsatz empfohlen werden (MammaPrint<sup>®</sup>, Onkotype DX<sup>®</sup>, EndoPredict<sup>®</sup>, Harris *et al.*, 2007). Der EndoPredict<sup>®</sup>-Genexpressionstest ermöglicht in Kombination mit Tumorgroße und Nodalstatus bei postmenopausalen ER-positiven und HER2-negativen Patientinnen, die ausschließlich mit einer endokrinen Therapie behandelt wurden, die Charakterisierung einer Niedrigrisikogruppe. Diese Gruppe hat ein 10-Jahres-Fernmetastasen-Risiko von 4%, sodass der mögliche zusätzliche Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie bei diesen Patientinnen kritisch hinterfragt werden kann (Simon *et al.*, 2009). Zum Onkotype DX<sup>®</sup>-Genexpressionstest wurde 2018 die prospektive randomisierte TailorX-Studie mit hohem Evidenzniveau publiziert. Sie verdeutlicht, dass bei Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem, HER2-negativem, nodal negativem Mammakarzinom mit mittlerem Metastasierungsrisiko laut Onkotype DX<sup>®</sup> *Breast Recurrence Score* (RS 11 - 25) eine alleinige adjuvante endokrine Therapie der Kombination einer adjuvanten Chemotherapie mit einer endokrinen Therapie nicht unterlegen ist (TailorX, Sparano *et al.*, 2018).

Für die zytostatische Therapie beim Mammakarzinom stehen mehrere effektive Regime zur Verfügung, bestehend aus Anthrazyklinen, Taxanen und Cyclophosphamid, die zeitlich simultan oder sequenziell über einen Zeitraum von 18 bis 24 Wochen verabreicht

werden können. Ist der Primärtumor zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits lokal weit fortgeschritten oder primär inoperabel (Tumorgroße > 5 cm, inflammatorisches Karzinom), so kann durch eine neoadjuvante Chemotherapie im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes eine Verkleinerung des Tumorumfanges angestrebt werden, um eine anschließende Operabilität zu ermöglichen. Ebenfalls kann durch diese Therapie eine brusterhaltende Entfernung derjenigen Tumoren erreicht werden, die vorher nur mittels einer Mastektomie operativ therapierbar gewesen wären (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021).

Eine weitere Rationale für die neoadjuvante Therapie bei triple-negativen oder HER2-positiven Mammakarzinomen ist die Möglichkeit der Therapieoptimierung, wenn zum Zeitpunkt der Operation noch invasive Tumorzellen nachweisbar sind.

Weist der Tumor eine HER2-Überexpression auf (20 - 25% der Mammakarzinomfälle), sollte die Patientin nach aktuellen Therapiestandards für ein Jahr mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab behandelt werden (Untch *et al.*, 2006). Handelt es sich um ein metastasiertes bzw. lokal fortgeschrittenes Mammakarzinom mit hohem Rezidivrisiko und HER2-positiv-Status, wird Trastuzumab in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper Pertuzumab als Dualblockade gegeben. Diese neo- bzw. adjuvante Behandlung wird in der Regel zeitgleich mit der Taxanphase der Chemotherapie begonnen (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021).

Etwa 80% aller Mammakarzinome exprimieren den Östrogen- und/ oder Progesteronrezeptor (ER, PR) und sind somit hormonsensibel. Durch die Behandlung dieser Brustkrebspatientinnen kann insbesondere durch den Einsatz der adjuvanten endokrinen Therapie die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs um relativ ca. 40% und die Wahrscheinlichkeit des Versterbens um relativ ca. 30% reduziert werden (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) *et al.*, 2011;21; Powles *et al.*, 2007). Diese günstigen Effekte der endokrinen Therapie sind unabhängig vom Alter der Patientin, dem Tumorstadium und der Vortherapie, sie werden jedoch nur bei ausreichender Therapieadhärenz realisiert.

Bei prämenopausalen Patientinnen wird eine Therapie mit Tamoxifen® für mindestens fünf Jahre durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen selektiven Östrogenrezeptormodulator (SERM), der im Mammakarzinomgewebe eine Hemmung des nukleären Östrogenrezeptors bewirkt, gleichzeitig aber auch Progesteronrezeptoren stimuliert (Kennecke *et al.*, 2006). Tamoxifen® wird mit einer Dosierung von 20 mg/Tag oral appliziert (Weyerstahl *et al.*, 2013).

In der adjuvanten endokrinen Therapie der postmenopausalen Mammakarzinompatientin mit einem hormonsensiblen Tumor galt bis zur Zulassung der Aromataseinhibitoren Tamoxifen® als Mittel der Wahl. Nach Empfehlung der aktuellen S3-Leitlinie sollte jedoch die adjuvante endokrine Therapie der postmenopausalen Patientin einen Aromatasehemmer (AI) enthalten, da Metaanalysen eine Überlegenheit der adjuvanten AI-Gabe allein oder in Sequenz mit Tamoxifen® im Vergleich zu Tamoxifen® allein bei postmenopausalen Frauen nachweisen konnten (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021; Weyerstahl *et al.*, 2013).

Ein Aromatasehemmer verhindert die Aromatisierung von Androgen zu Östrogen in Geweben wie Leber, Muskel und Fett, wodurch östrogensensiblen Zellen weniger Hormon zur Verfügung steht (Weyerstahl *et al.*, 2013). Durch diese Reduktion der Östrogenproduktion um bis zu 90% wird die wachstumsstimulierende Wirkung des Östrogens deutlich eingeschränkt (Geisler *et al.*, 1998; Lønning, 1998). Die alleinige Gabe eines Aromataseinhibitors bei der prämenopausalen Patientin ist kontraindiziert, dagegen ist die Kombinationstherapie mit GnRH-Analoga zur Suppression der ovariellen Östrogenproduktion möglich. Als Aromataseinhibitor stehen derzeit die nicht-steroidalen Substanzen Anastrozol® und Letrozol® und der steroidale Aromatasehemmer Exemestan® zur Verfügung. Dabei wird die Therapie mit einem AI in der Regel für fünf Jahre durchgeführt („upfront“) oder es kann nach zwei- bis dreijähriger Tamoxifen®-Gabe auf einen Aromataseinhibitor gewechselt werden („switch“) für die Gesamtdauer von fünf Jahren. In Fällen mit hohem Rezidivrisiko besteht auch die Möglichkeit fünf Jahre lang mit Tamoxifen® zu behandeln und darauf ein Fünf-Jahres-Intervall mit einem Aromatasehemmer anzuschließen („extended“) (Kaufmann *et al.*, 2013). Es liegen fünf große Phase-III-Studien (ATAC- und BIG-1-98-Studien, IES-031 und ABSCG-8/ARNO 95,

MA 17-Studie) vor, die die verschiedenen endokrinen Therapiekonzepte miteinander in ihrer Wirksamkeit vergleichen. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass eine alleinige AI-Therapie über fünf Jahre eine hohe Effektivität bei Mammakarzinompatientinnen mit einer Risikokonstellation und/oder invasiv lobulären Mammakarzinomen besitzt. Außerdem erwies sich die erweiterte Aromatasehemmertherapie („extended“, 5 Jahre Tamoxifen<sup>®</sup> gefolgt von 5 Jahren Letrozol) im Hinblick auf eine Reduktion der Rezidivrate vorteilhaft. Eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens (OS) und eine signifikante Reduktion der Mortalität konnten dadurch jedoch nicht erreicht werden. (Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2004; Goss *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2005; Jakesz *et al.*, 2005; Kaufmann *et al.*, 2013). Zwei weitere Studien (ATLAS-Studie, aTTom-Studie) fanden unter ER-positiven Patientinnen eine Verlängerung des rezidivfreien Überlebens und eine Reduktion der Mortalität um 50%, wenn Tamoxifen nicht nach 5 Jahren abgesetzt, sondern über 10 Jahre eingenommen wird. Dieser Vorteil zeigte sich allerdings erst in der zweiten Dekade nach Diagnosestellung (Davies *et al.*, 2013; Gray *et al.*, 2013).

Bei Vorliegen einer distanten Filialisierung bzw. eines lokoregionär weit fortgeschrittenen Tumorleidens ohne Möglichkeit einer R0-Resektion besteht eine palliative Situation, in der eine Heilung nicht mehr erreicht werden kann (Weyerstahl *et al.*, 2013). Nichts desto trotz kann der Patientin eine palliative Therapie in Form von systemischer Gabe von zytostatisch und endokrin wirkenden Medikamenten angeboten werden. Die Indikation zu einer Radiotherapie oder operativen Therapie von Fernmetastasen sollte individuell und in einem interdisziplinären Konsil gestellt werden (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021). Allerdings muss zu jedem Zeitpunkt eine Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen und die Lebensqualität der Patientin berücksichtigt werden. Für gewöhnlich ist die Verträglichkeit der Chemotherapie geringer als die einer Hormontherapie (Weyerstahl *et al.*, 2013).

### **1.3 Nachsorge des Mammakarzinoms**

Nach Abschluss der primären lokoregionären Therapie beginnt die Nachsorge mit Fokussierung auf die möglichst frühe Erkennung lokoregionaler Rezidive sowie Fernmetastasen. Die individuelle und risikoadaptierte Nachsorge umfasst einen Zeitraum von zehn Jahren und dient ebenfalls der Begleitung der Patientinnen bei Langzeittherapien. Hierbei sollen Nebenwirkungen und Spätfolgen der tumorspezifischen Therapie diagnostiziert und behandelt werden (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021). Eine adäquate Nachsorge ist deshalb von großer Bedeutung, da bei früher Detektion eines intramammären oder lokoregionären Rezidivs (5 - 8% der Mammakarzinomfälle) eine kurative Therapiechance besteht. Brustkrebspatientinnen haben zudem ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung eines kontralateralen Mammakarzinoms (RR 2,5-5) bzw. eines gynäkologischen Zweitmalignoms (Endometriumkarzinom RR 1,6, Ovarialkarzinom 1,5) (AGO e.V., 2018; Giersiepen *et al.*, 2005). Die Nachsorge umfasst eine Anamneseerhebung sowie eine sorgfältige körperliche Untersuchung. Jährlich erfolgt die Durchführung einer Mammographie der betroffenen und der kontralateralen Brust in Verbindung mit einer Mammasonographie. Eine intensivierete apparative und labortechnische Diagnostik wird dagegen nur symptomorientiert bei klinischer Auffälligkeit initiiert (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2012).

### **1.4 Aktueller Forschungsstand zum Östrogenrezeptor GPER 1**

Das steroidale Hormon Östrogen steuert in der menschlichen Physiologie sowohl die langsame Signaltransduktion mittels Veränderung der Proteinbiosynthese als auch die schnellen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden mittels sekundärer Botenstoffe. Das molekulare Korrelat der langsamen Signaltransduktion ist der schon lange bekannte Informationsaustausch mithilfe der nukleär lokalisierten Östrogenrezeptoren ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ), der zweitgenannte Mechanismus wird vermittelt über den membranständigen G-Protein

gekoppeltem Östrogenrezeptor GPER 1 (Dick *et al.*, 2002; Dopp *et al.*, 1999; Prossnitz *et al.*, 2007).

Die Expression der klassischen, nukleär lokalisierten Östrogen- und Progesteronrezeptoren stellt eine seit dem 20. Jahrhundert bis heute entscheidende biologische Eigenschaft des primären Mammakarzinoms dar und ist ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie. Es existiert aber keine zuverlässige Konkordanz zwischen dem Ansprechen des Tumors auf eine adjuvante endokrine Therapie und der Expression des klassischen Östrogenrezeptors (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005).

Der Rezeptor GPER 1 wurde im Jahr 2005 erstmals identifiziert (Thomas *et al.*, 2005) und seine Expression konnte in über der Hälfte der seiner Zeit untersuchten Mammakarzinomfälle nachgewiesen werden (Rae *et al.*, 2005). Nach seiner Charakterisierung konnte *in vitro* gezeigt werden, dass dieser Rezeptor eine Hemmung des Zellwachstums in Brustkrebszellen vermittelt (Ariazi *et al.*, 2010; Broselid *et al.*, 2013; Lubig *et al.*, 2012; Weißenborn *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu wies eine immunhistochemische Untersuchung an über 350 Mammakarzinom-Geweben den Rezeptor als ungünstigen Prognosefaktor aus, der mit einem erhöhten Risiko einer Brustkrebsmetastasierung assoziiert war (Filardo *et al.*, 2006). Außerdem konnte bewiesen werden, dass GPER 1 einen Heparin-gebundenen Wachstumsfaktor (HB-EGF) aktiviert, der wiederum epidermale Wachstumsfaktoren stimuliert (EGFR) und somit generell Zellwachstum fördert (Filardo *et al.*, 2002).

Nicht selten werden Resistenzen gegen die eingesetzten antihormonellen Therapeutika beobachtet. Vor diesem Hintergrund konnte *in vitro* in MCF 7-Zellen gezeigt werden, dass Tamoxifen® als Agonist am GPER 1 vermehrtes Tumorzellwachstum stimuliert und somit zur Entwicklung der erworbenen Tamoxifen®-Resistenz beiträgt (Ignatov *et al.*, 2010). Diese Erkenntnis konnte kurze Zeit später in einer immunhistochemischen Studie an Geweben von über 320 prä- und postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen bestätigt werden. In Zellversuchen hat sich herausgestellt, dass unter einer Tamoxifen®-Therapie die Expression von GPER 1 im Tumorgewebe zunimmt. Diese gesteigerte Expression war außerdem vergesellschaftet mit einem signifikant kürzeren rezidivfreien Überleben dieser Patientinnen im Vergleich zu denjenigen, die Aromatasehemmer

erhielten. Im Gegensatz dazu stellte die Expression von GPER 1 für diejenigen Patientinnen, bei denen Tamoxifen® nicht Bestandteil der endokrinen Therapie war, einen günstigen Prognosefaktor dar (Ignatov. *et al.*, 2011).

Neben der Untersuchung des Einflusses von GPER 1 im Mammakarzinom identifizierten Smith *et al.* GPER 1 als ungünstigen prognostischen Faktor im Endometriumkarzinom und Ovarialkarzinom (Smith *et al.*, 2007, 2009). Franco *et al.* wiesen eine vorhandene GPER 1-Proteinexpression in verschiedenen Keimzelltumoren des Hodens anhand von Zellanalysen nach (Franco *et al.*, 2011). Chan *et al.* fanden sowohl in Zellanalysen als auch in Mausstudien *in vivo* GPER 1 in Prostatakarzinomzellen und konnten diese GPER 1-Expression mit einer Hemmung des Tumorwachstums korrelieren (Chan *et al.*, 2010). Während im Ovarial- und Endometriumkarzinom GPER 1 als Risikofaktor für ein kürzeres Gesamtüberleben identifiziert werden konnte, wird GPER 1 bei Hodenkeimzelltumoren als mögliches therapeutisches Target diskutiert. Beim Prostatakarzinom kann GPER 1 möglicherweise sogar als Schutzfaktor angesehen werden. Ein prognostischer Marker gibt Aufschluss über den natürlichen Krankheitsverlauf, da er zum Zeitpunkt des Therapiebeginns bereits vorliegt und mit dem krankheitsfreien Überleben bzw. dem Gesamtüberleben in Abwesenheit einer Therapie assoziiert ist. Ein prädiktiver Marker dagegen erlaubt eine Einschätzung des Ansprechens auf eine spezifische Therapie (Kaufmann *et al.*, 2013). Für das primäre Mammakarzinom existieren bereits etablierte prognostische Marker wie Tumorgröße, histologischer Subtyp, Grading, Vorhandensein einer Fernmetastasierung, aber auch die tumorbiologischen Eigenschaften wie Rezeptorausstattung, HER2-Überexpression und die Proliferationsrate (Ki-67). Als prädiktive Marker für die endokrine Therapie beim Mammakarzinom sind derzeit lediglich der Östrogen- und Progesteronrezeptor in der klinischen Praxis etabliert. Neben der ER- und PR-Expression ist es vorstellbar, dass sich der membranständige Östrogenrezeptor GPER 1 ebenfalls als prognostischer bzw. prädiktiver Marker eignet.

## **1.5 Fragestellung**

Kann die Bestimmung der GPER 1-Expression im Tumorgewebe diejenigen Mammakarzinom-Patientinnen identifizieren, die von der Therapie mit einem Aromataseinhibitor mehr profitieren als von der Tamoxifen®-Einnahme?

Diese Studie hat zum Ziel diese Fragestellung retrospektiv an einem homogenen Kollektiv aus postmenopausalen, nur endokrin und operativ behandelten Mammakarzinom-Patientinnen zu untersuchen. Der Erkenntnisgewinn aus einer retrospektiven Analyse könnte Einfluss nehmen auf die klinische Entscheidungsfindung hinsichtlich der Wahl des adjuvanten endokrinen Therapieregimes für die postmenopausale Mammakarzinom-Patientin.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patientinnenkollektiv**

Die vorliegende retrospektive Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg befürwortet und unter Einhaltung nationaler Ethikrichtlinien durchgeführt. Es wurde Tumorgewebe von insgesamt 469 endokrin behandelten Mammakarzinom-Patientinnen hinsichtlich der GPER 1-Expression untersucht.

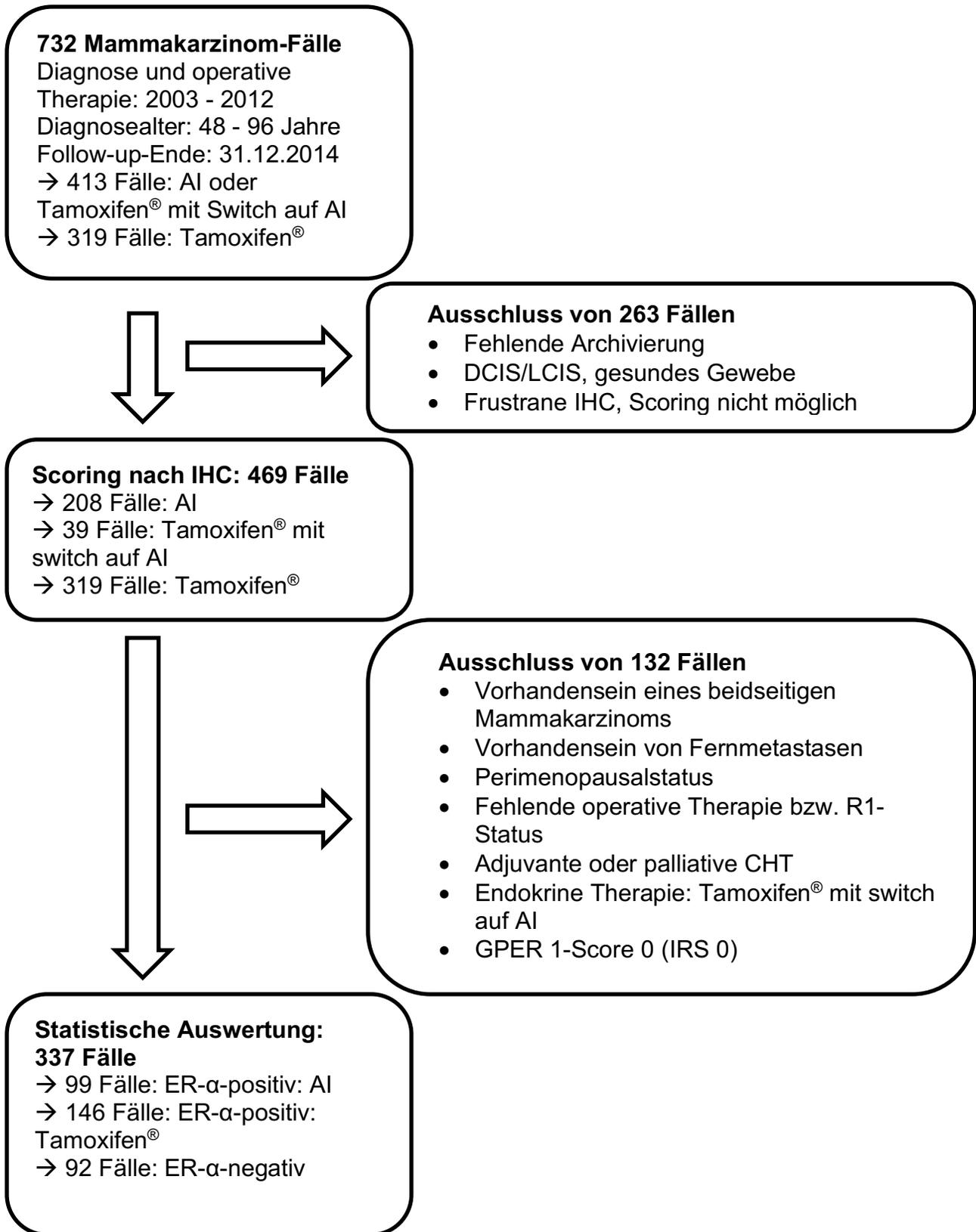
Im Rahmen der operativen Mammakarzinom-Therapie unterzogen sich alle in die Studie einbezogenen Patientinnen einer brusterhaltenden Therapie bzw. einer Ablatio mammae. Operiert wurden die Patientinnen in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Regensburg am Caritas-Krankenhaus St. Josef in Regensburg im Zeitraum von 2003 bis 2012. Das intraoperativ entnommene Tumorgewebe wurde nach der sofortigen Fixierung in neutral gepuffertem Formalin (4% Formaldehydlösung) in Paraffin eingebettet. Entsprechende Gewebeschnitte wurden am Institut für Pathologie der Universität Regensburg angefertigt und einem Pathologen zur Befundung vorgelegt. Die pathomorphologische Untersuchung beinhaltete die histologische Klassifikation anhand des TNM-Systems (siehe Anhang), die Beurteilung der Resektionsränder und

Sicherheitsabstände, die Festlegung des histologischen Typs und des Gradings (siehe Anhang) sowie die Bestimmung der biologischen Tumoreigenschaften (Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Her2/neu-Expression, Proliferationsindex Ki-67). Die angefertigten Paraffinblöcke sowie Gewebeschnitte wurden nach Abschluss der pathomorphologischen Beurteilung im Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Regensburg aufbewahrt und konnten für die Bestimmung der GPER 1-Expression dem Archiv entnommen werden.

Ausgehend von der Zielsetzung der Studie erfolgte eine strikte Selektion der für die GPER 1-Bestimmung in Frage kommenden Tumorgewebe bzw. Patientinnen für die Bildung eines möglichst homogenen Kollektivs. In Zusammenarbeit mit dem Tumorzentrum Regensburg e. V., An-Institut der Universität Regensburg, wurden gezielt nur solche postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen ausgewählt, die im Anschluss an die operative Behandlung eine rein endokrine adjuvante Tumorthherapie in Form von Tamoxifen® oder einem Aromataseinhibitor erhielten. Dabei erfolgte die Feststellung des Postmenopausenstatus der Patientinnen bei Diagnosestellung der Mammakarzinomkrankung nach gültiger Definition einer zwölf monatigen Blutungsfreiheit nach der letzten Menstruation (Breckwoldt *et al.*, 2008). Ausgeschlossen wurden Patientinnen, die eine sequenzielle endokrine Therapie (Tamoxifen® mit Wechsel auf Aromataseinhibitor) oder eine zytostatische Therapie erhielten, ein beidseitiges Mammakarzinom oder Metastasierung aufwiesen. Als Ausschlusskriterium wurden ebenfalls eine R1-Resektion sowie die Östrogenrezeptornegativität definiert (Abbildung 1).

Vor der statistischen Auswertung erfolgte erneut ein Ausschluss weiterer Patientinnen aufgrund frustraner immunhistochemischer Färbung, zu geringer oder fehlender invasiver Tumoranteile im untersuchten Gewebe oder fehlender GPER 1-Expression (Abbildung 1). Letztlich wurde Tumorgewebe von 337 Mammakarzinom-Patientinnen retrospektiv statistisch ausgewertet, 245 (72,7 %) Fälle wiesen eine GPER 1-Expression auf. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 48 und 96 Jahren. Bis zur jüngsten Erhebung des Follow-up am 31.12.2014 betrug der Beobachtungszeitraum 4 Monate bis 11,9 Jahre. Daraus

ergibt sich eine mittlere Follow-up-Zeit von 6,2 Jahren. Patientinnencharakteristika und pathomorphologische Tumoreigenschaften sind in Tabelle 2 aufgeführt.



**Abbildung 1:** Zusammenstellung des Patientinnen-Kollektivs mit Darstellung der Ausschlusskriterien. (AI: Aromataseinhibitor; IHC: Immunhistochemie; CHT: Chemotherapie; IRS: Immunoreaktiver Score)

**Tabelle 2:** Patientinnenkollektiv: Ein- und Ausschlusskriterien

<b>Anzahl der Patientinnen</b>	732 (Stand 10.11.2015)	
<b>Diagnosestellung</b>	2003 - 2012	
<b>Alter</b>	48 - 96 Jahre	
<b>Zeit des Follow-up</b>	Mittlere Follow-up-Zeit: 6,2 Jahre (Stand Ende 12/2014) Datenerhebung durch Tumorzentrum Regensburg e.V.	
	<b>Einschluss</b>	<b>Ausschluss</b>
<b>Menopausenstatus</b>	postmenopausal	perimenopausal
<b>Rezeptorstatus</b>	ER positiv PR positiv oder negativ HER2-Überexpression ja/nein	ER negativ
<b>Therapie</b>	Tamoxifen® oder AI („upfront“/„extended“) - neoadjuvant - adjuvant - palliativ Keine Chemotherapie Trastuzumab ja/nein BET oder Ablatio SNLB oder ALND Keine axilläre Operation Radiatio ja/nein	Tamoxifen® und AI („switch“) Chemotherapie Keine OP (nur Stanzbiopsie)
<b>Metastasierung</b>	nein	ja

Nach Abgleich der vorhandenen patientenbezogenen Daten mit den jeweiligen Registrierungsnummern aus dem Patientenverzeichnis des Universitätsklinikums Regensburg konnten die entsprechenden archivierten H&E-Schnitte (Hämatoxylin und Eosin gefärbt) dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg entnommen werden. Das Tumorzentrum Regensburg e.V. stellte für jede Patientin umfassende Follow-up-Daten zur Verfügung.

## **2.2 Gewebepräparation**

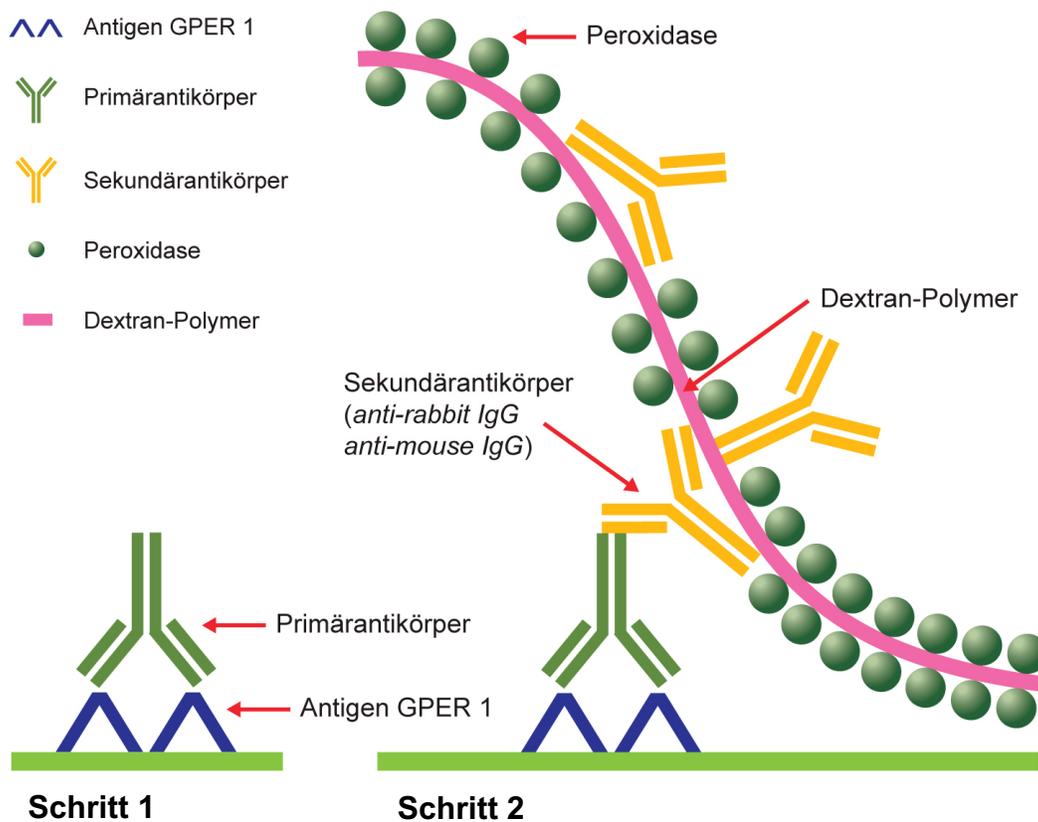
Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg wurden pro Fall alle vorhandenen H&E-Schnitte herausgesucht, von denen jeder einzelne H&E-Schnitt einen archivierten Paraffinblock repräsentiert. Diese Schnitte wurden zuerst auf das Vorhandensein von ausreichend malignem Tumorgewebe geprüft. Fälle mit beschriebenen Tumorgewebe, in denen dann jedoch lediglich Krebsvorstufen [ductales Carcinoma in situ (DCIS) bzw. lobuläres Carcinoma in situ (LCIS)] identifizierbar waren, wurden ausgeschlossen. Anschließend konnte pro Fall jeweils ein geeigneter Block mit in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe dem Archiv entnommen werden. Pro Fall wurden fünf 2 µm dicke Gewebeschnitte von einem medizinisch-technischen Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg mittels eines Rotationsmikrotoms (Leica Mikrosystems Wetzler GmbH, RM2255, 3976/02.2010) hergestellt. Diese wurden auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost® plus, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen) aufgezogen und zur Entfernung des Paraffins sowie zur Erreichung einer besseren Haftung des Gewebes am Objektträger für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank erwärmt.

## **2.3 Immunhistochemie (IHC)**

Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte in Xylol deparaffinisiert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol) für jeweils fünf Minuten rehydriert und in einem handelsüblichen Druckkochtopf in Citratpuffer (4 Min, 120 °C, 0.1 M Citratpuffer, pH 6,0) gekocht. Durch die starke Erhitzung wurde das Antigen (GPER 1) in seiner Tertiärstruktur denaturiert und somit für den im weiteren Verlauf applizierten Primärantikörper erkennbar. Nach mehreren Waschgängen in einer Tris-Puffer-Lösung (TBS, pH 7,6) wurde ein 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltiges Reagenz (dual endogenous enzyme block, S2003, Dako GmbH, Hamburg) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase und der alkalinen Phosphatase zu blockieren.

Nach einem erneuten Waschgang in Tris-Puffer wurde der Primärantikörper [GPR30(K-19)R, sc-48524-R, *rabbit polyclonal* IgG, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, 200 µg/ml, Verdünnung 1:400] aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dieser polyklonale Antikörper besitzt eine hohe Affinität zum zytoplasmatisch und membranös lokalisierten Östrogenrezeptor GPER 1. Die darauffolgende Applikation des hochaffinen sekundären Antikörpers mit gekoppeltem Detektionssystem (EnVision™ peroxidase polymer system, Dako) ermöglichte schließlich die Sichtbarmachung der Antikörpervermittelten Lokalisation des Östrogenrezeptors GPER 1. Hierfür wurde nach einem erneuten Waschgang in Tris-Puffer das Dextran-Polymer mit daran gebundenen Sekundärantikörpern (*anti-rabbit* IgG- und *anti-mouse* IgG-Spezifität) sowie ebenfalls daran gebundenen Meerrettichperoxidase-Enzymen für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen (Abbildung 2). Das im Anschluss verwendete chromogene Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB<sup>+</sup>; Dako) lieferte nach Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen braunen, in Wasser unlöslichen Farbstoff, innerhalb einer Reaktionszeit von 7,5 Minuten bei Raumtemperatur. Schließlich wurde eine Gegenfärbung mithilfe von Mayers Hämatoxylin (Institut für Pathologie der Universität Regensburg) vollführt, die in einer kräftigen Blaufärbung der Zellkerne resultierte.

Nach Abschluss der immunhistochemischen Färbung wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und in Xylol eingelegt. Um das Gewebe vor Verwesung und Kontamination zu schützen, wurden die Objektträger mit einem dünnen Eindeckglas hermetisch verschlossen, indem eine dazwischen aufgetragene Flüssigkeit als Haftmedium fungierte (Entellan®Neu, 1.07961.0500, MERCK KGaA, Darmstadt). Für die Negativkontrollen wurde kein Primärantikörper appliziert, stattdessen wurden die Gewebeschnitte lediglich mit der Antikörperverdünnungslösung (green antibody diluent, Dako) behandelt.



(Übernommen und modifiziert nach Taylor, Rudbeck und Sjørup, Education Guide – Immunohistochemical Staining Methods, 2013, 6. Edition)

**Abbildung 2: Schema der Polymer-basierten Färbemethode mit dem gegen GPER 1 gerichteten Primärantikörper GPR30(K-19)R** (*sc-48524-R, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology*). Das Detektionssystem (EnVision™ peroxidase polymer system, Dako) enthält ein Rückgrat aus einer Dextrankette, an die neben verschiedenen Meerrettichperoxidase-Molekülen auch *anti-rabbit* und *anti-mouse* spezifische IgG als Sekundärantikörper angeheftet sind.

## **2.4 Bewertung der immunhistochemischen Färbung von GPER 1 in Mammakarzinom-Gewebe**

Für die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Mammakarzinom-Fälle wurde der Remmele-Score (Remmele und Stegner, 1987) verwendet, welcher in der klinischen Routine für die Bewertung der nukleären Hormonrezeptorexpression beim Mammakarzinom bereits etabliert ist. Dieses semiquantitative Bewertungssystem basiert zum einen auf der Färbeintensität, zum anderen auf dem Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen. Die zytoplasmatische Färbeintensität wurde auf einer Skala von 0 bis 3 klassifiziert. Der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen wurde durch Auszählung der Zellen erzielt und reichte von 0 bis 4. Der finale *Immunoreactivity-Score* (IRS) berechnete sich aus der Multiplikation des Färbeintensitätswertes mit dem Wert, der dem Prozentsatz gefärbter Zellen entsprach. Daraus resultierte ein IRS zwischen 0 und 12 (Tabelle 3). Die immunhistochemischen Färbungen wurden unter einem Mikroskop (Leica Mikrosystems Wetzler GmbH, TYPE-519.511DMLB100T) mit der Hilfe und Unterstützung einer Pathologin des pathologischen Instituts des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg bewertet.

**Tabelle 3:** Remmele-Score

<b>Remmele-Score</b>			
<b>SI × P = IRS [0 - 12]</b>			
<b>Wert</b>	<b>SI (Staining Intensity)</b>	<b>P (Positivity)</b>	<b>Wert</b>
<b>0</b>	Keine Färbung	Keine Färbung	<b>0</b>
<b>1</b>	Schwache Färbung	1 - 10%	<b>1</b>
<b>2</b>	Mittelstarke Färbung	11 - 50%	<b>2</b>
<b>3</b>	Starke Färbung	51 - 80%	<b>3</b>
<b>-</b>	<b>-</b>	81 - 100%	<b>4</b>

IRS = *Immunoreactivity Score*, reicht von 0 (= negativ) bis 12 (= stark positiv)

(Übernommen von Remmele und Stegner, 1987)

Anhand eines definierten Cut-off-Wertes von IRS 0 vs. IRS 1 - 12 konnten alle untersuchten Fälle als GPER 1-negativ (IRS 0) oder GPER 1-positiv (IRS 1 - 12) bewertet werden. Des Weiteren wurden alle Fälle mit einem IRS zwischen 1 bis 4 als schwach, Fälle mit einem IRS zwischen 5 und 8 als mittel und Fälle mit einem IRS zwischen 9 und 12 als stark GPER 1-exprimierend klassifiziert. Diese Einteilung orientiert sich an der Bewertung der ER/PR-Expression durch Remmele und Stegner, aufgrund kleiner Fallzahlen für einen IRS von  $\geq 6$  wurden die mittel- und die stark-exprimierende Subgruppe zusammengefasst. Zuletzt erfolgt eine statistische Auswertung inkl. einer Korrelation der GPER 1 – Expression mit klinisch-pathologischen Tumoreigenschaften sowie dem Überleben der Patientinnen (*overall survival, relapse-free survival*) in Relation zur durchgeführten endokrinen Therapie (Tamoxifen®-Monotherapie vs. Aromatasehemmer-Monotherapie).

## 2.5 Statistik

Die statistische Auswertung im Hinblick auf die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte mithilfe von IBM SPSS® Statistics 20 (New York, USA). Die Verwaltung der generierten Daten erfolgte mit Microsoft Excel® 2011. Alle Daten wurden vor der Berechnung auf Vollständigkeit, Plausibilität und systematische Fehler überprüft.

Die verschiedenen tabellarisch aufgeführten Patientinnenvariablen (Tabelle 6 - 9) wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Tests auf statistische Unabhängigkeit überprüft. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Die Korrelation des ermittelten GPER 1-Status im Tumorgewebe der untersuchten Patientinnen mit klinischen Follow-up-Daten aus dem Tumorzentrum Regensburg e.V. wurde mithilfe von Überlebensanalysen untersucht. Dazu dienten die von Edward Kaplan und Paul Meier 1958 konzipierte Analyse nach Kaplan-Meier und die Regressionsanalyse nach Cox (Kundt *et al.*, 2018).

Als univariate Überlebensanalyse wurde die Methode nach Kaplan-Meier angewendet. Diese ermöglichte die Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit des untersuchten Patientinnenkollektivs über den Beobachtungszeitraum von 2003 bis 2014. Dabei wurde untersucht, ob das Ereignis (Tod einer Patientin) eingetreten ist oder nicht, für jedes weitere Eintreten des Ereignisses wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit fortlaufend neu berechnet. Die Methode nach Kaplan-Meier betrachtet dabei nur diesen einen Faktor (Tod einer Patientin). Analysiert wurde insgesamt die Zeitspanne vom Datum der Erstdiagnose bis zum Eintreten des Ereignisses bzw. bis Follow-up-Ende. Trat innerhalb des Beobachtungszeitraumes kein Ereignis auf, so wurden die Patientinnen als zensiert markiert. Auf der Ordinate wurde die kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit abgebildet. Die Abszisse zeigte das Überleben in Jahren. Ausgewertet ergaben sich charakteristische Überlebenskurven, dabei beschrieb jede Kurve den individuellen Verlauf einer der beiden Therapiegruppen (Tamoxifen® vs. Aromataseinhibitor). Bei Deckungsgleichheit der Kurven herrschte kein Unterschied zwischen beiden Therapieregimen, lief eine Kurve über einer anderen, repräsentierte sie eine bessere Therapie. Nach Integration der Fläche zwischen beiden Kurven war eine Beschreibung der Größe des Unterschieds möglich. Als Test auf Unabhängigkeit der

Überlebensverteilungen wurden zugehörige p-Werte mit dem Log Rank (Mantel Cox)-Test ermittelt.

Als multivariate Analyse wurde die Cox-Regression verwendet. Diese ermöglichte die Schätzung des Einflusses mehrerer Kovariablen gleichzeitig auf die Überlebensdauer. Konkret war dann mittels hazard-Funktion für jede der zwei Therapiegruppen (Tamoxifen® vs. Aromataseinhibitor) eine Berechnung des Risikos (hazard) für das Eintreten des festgelegten Ereignisses (Tod einer Patientin) möglich. Die Hazard Ratio wurde aus dem Quotienten der Hazard-Funktionen der beiden Therapiegruppen berechnet, wobei die Tamoxifen®-Gruppe als Referenzgruppe diente. Das Ergebnis wurde in Form einer Tabelle dargestellt, die neben der Hazard Ratio und deren 95%-Konfidenzintervall auch das entsprechende Signifikanzniveau (p-Wert) abbildet. Es wurden alle in der univariaten Überlebensanalyse signifikanten Kofaktoren in das Modell einbezogen und untersucht. Als Kofaktoren wurden die Variablen IRS der GPER 1-Expression, postoperatives Stadium, Grading, operative Therapie, Radiatio, Blutgefäß- und Lymphbahninvasion inkludiert.

## **2.6 Digitalisierung charakteristischer Fälle**

Nachdem die Gewebeproben aller in die retrospektive Analyse einbezogenen Fälle mikroskopisch begutachtet und mithilfe des Remmele-Scores ausgewertet worden waren, wurden charakteristische Immunfärbungen beispielhaft für ein membranöses, nukleäres, schwaches oder starkes zytoplasmatisches Färbemuster digitalisiert. Hierfür wurde ein Hochleistungsscanner (PathoScan Euromex, Arnhem, Niederlande) im Institut für Pathologie der Universität Regensburg verwendet.

### 3. Ergebnisse

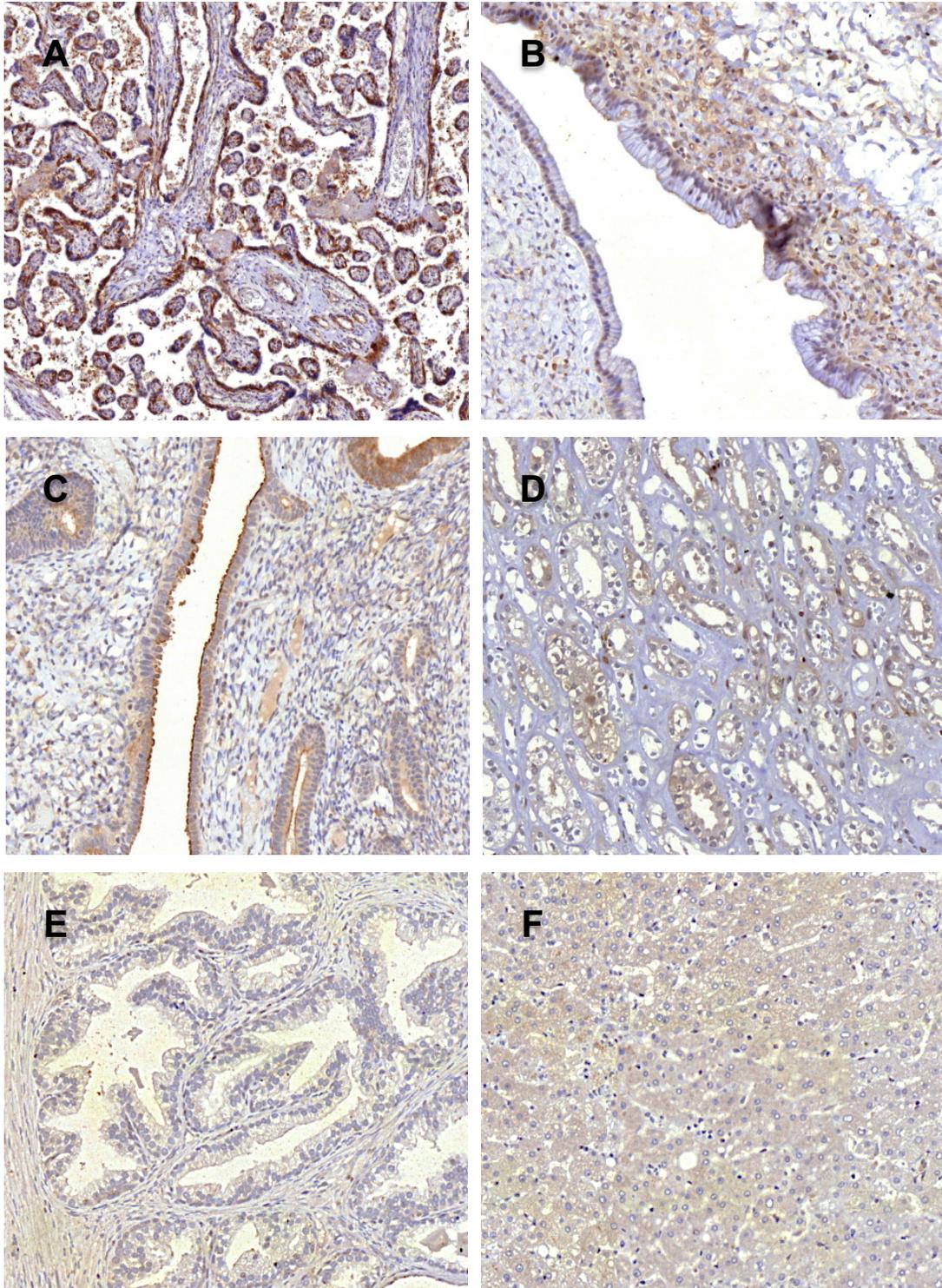
#### 3.1 GPER 1-Expression im Normalgewebe

Zur Verifizierung des gegen GPER 1 gerichteten, monospezifischen Antikörpers sowie der angewandten immunhistochemischen Färbemethode wurde zunächst die GPER 1-Expression in verschiedenen Normalgeweben evaluiert und mit bereits untersuchten Expressionsmustern verglichen. Hierbei zeigte sich in den untersuchten Geweben eine jeweils spezifische, zytoplasmatisch lokalisierte GPER 1-Färbung von schwacher bis starker Intensität wie in Tabelle 4 und Abbildung 3 dargestellt. Hepatozyten der Leber sowie Epithelzellen der Schilddrüse wiesen keine GPER 1-Expression auf.

**Tabelle 4:** GPER 1-Expression im Normalgewebe

Normalgewebe	GPER 1-Expression*
Plazenta	+++
Mamma	+++
Ovar	+
Endometrium	++
Prostata	+
Niere	+
Kolon	+
Leber	-
Milz (rote Pulpa/weiße Pulpa)	++/-
Schilddrüse	-

\***Expressionsintensität:** (-) keine Expression; (+) schwache Expression; (++) mittlere Expression; (+++) starke Expression

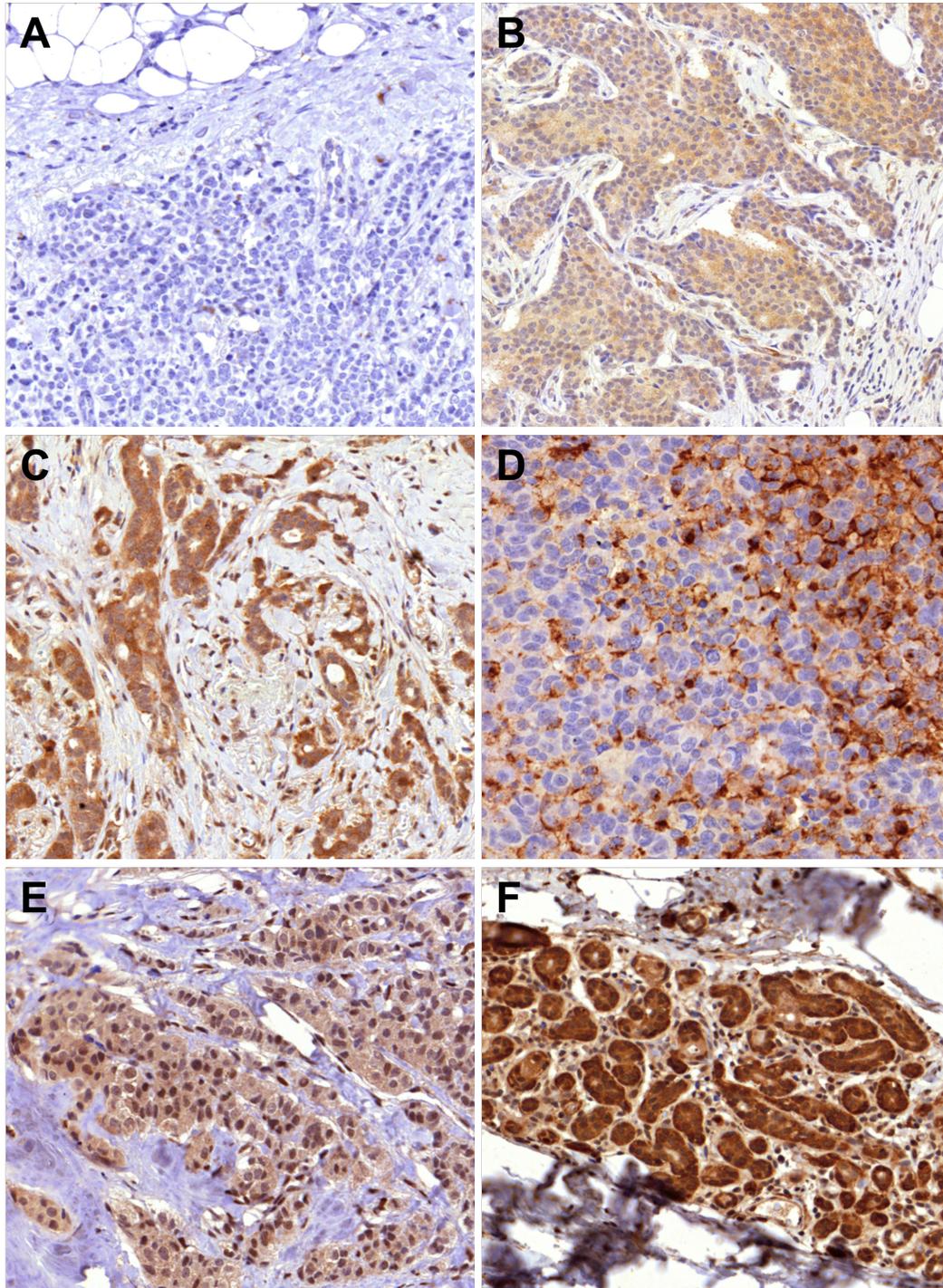


**Abbildung 3: Immunhistochemische Bestimmung der GPER 1-Expression in verschiedenen Normalgeweben (10-fache Vergrößerung).** (A) Plazenta mit starker zytoplasmatischer Färbung (+++) der Synzytiotrophoblastzellen; (B) Ovar mit schwacher zytoplasmatischer Färbung (+) der Stromazellen sowie teils Kernfärbung; (C) Endometrium mit zytoplasmatisch gefärbten Drüsenzellen und akzentuierter luminaler Färbung von moderater Intensität (++); (D) Niere mit schwacher zytoplasmatischer Färbung (+); (E) Prostata mit sehr schwacher zytoplasmatischer Färbung der Drüsenzellen (+); (F) Leber ohne GPER 1-Nachweis in den Hepatozyten (-).

Das in Tabelle 4 und Abbildung 3 dargestellte GPER 1-Expressionsmuster zeigte sich vergleichbar mit bereits bekannten Daten zur GPER 1-Expression auf Protein- und RNA-Ebene (Tissue expression of GPER 1 - Summary - The Human Protein Atlas, 2018), sodass die folgende Untersuchung der GPER 1-Expression in Mammakarzinom-Geweben auf der Grundlage eines validen immunhistochemischen Färbeprotokolls mit spezifischem GPER 1-Antikörper durchgeführt werden konnte. In den mitgeführten Negativ-Proben konnte jeweils GPER 1 nicht detektiert werden.

### **3.2 GPER 1-Expression in Mammakarzinom-Gewebe**

Formalin-fixierte und anschließend in paraffin-eingebettete Tumorgewebe von 337 Mammakarzinom-Patientinnen wurden unter Verwendung eines gegen GPER 1 gerichteten, monospezifischen Antikörpers immunhistochemisch gefärbt. Dabei konnte in über 60% der gefärbten Fälle eine GPER 1-Expression nachgewiesen werden. In der Mehrzahl der GPER 1-positiven Tumorgewebe wurde die GPER 1-Expression im Zytoplasma der invasiven Mammakarzinom-Zellen lokalisiert (Abbildung 4). Zudem imponierte in einem kleinen Anteil der Fälle ebenfalls eine membranöse bzw. nukleäre GPER 1-Expression. In der unmittelbaren Nachbarschaft von invasiven Mammakarzinom-Herden liegendes gesundes Brustdrüsengewebe wies vornehmlich eine im Vergleich zum Tumorgewebe deutlich kräftigere GPER 1-Expression auf (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Immunhistochemische Bestimmung der GPER 1-Expression in Mammakarzinom-Geweben und gesundem Mammaparenchym (20-fache Vergrößerung).** (A) Invasives Mammakarzinom ohne GPER 1-Expression (IRS 0). (B) Mäßig starke und (C) starke GPER 1-Expression (IRS 4 bzw. IRS 12). (D) Invasives Mammakarzinom mit prädominant membranöser und (E) nukleärer GPER 1-Expression. (F) Gesundes Mammaparenchym mit kräftiger GPER 1-Expression.

### 3.3 Patientinnencharakteristika

Nach der histologischen Bewertung der 337 eingeschlossenen Fälle nach dem etablierten Score von Remmele und Stegner konnten mit einem Cut-off von IRS 0 (negativ) vs. IRS 1 - 12 (positiv) 92 Fälle als negativ und 245 Fälle als positiv identifiziert werden (Tabelle 5). In dieser Arbeit wurde ab einem IRS von 1 von einer vorhandenen GPER 1-Expression ausgegangen.

**Tabelle 5:** Verteilung des Immunoreactivity Score (IRS)

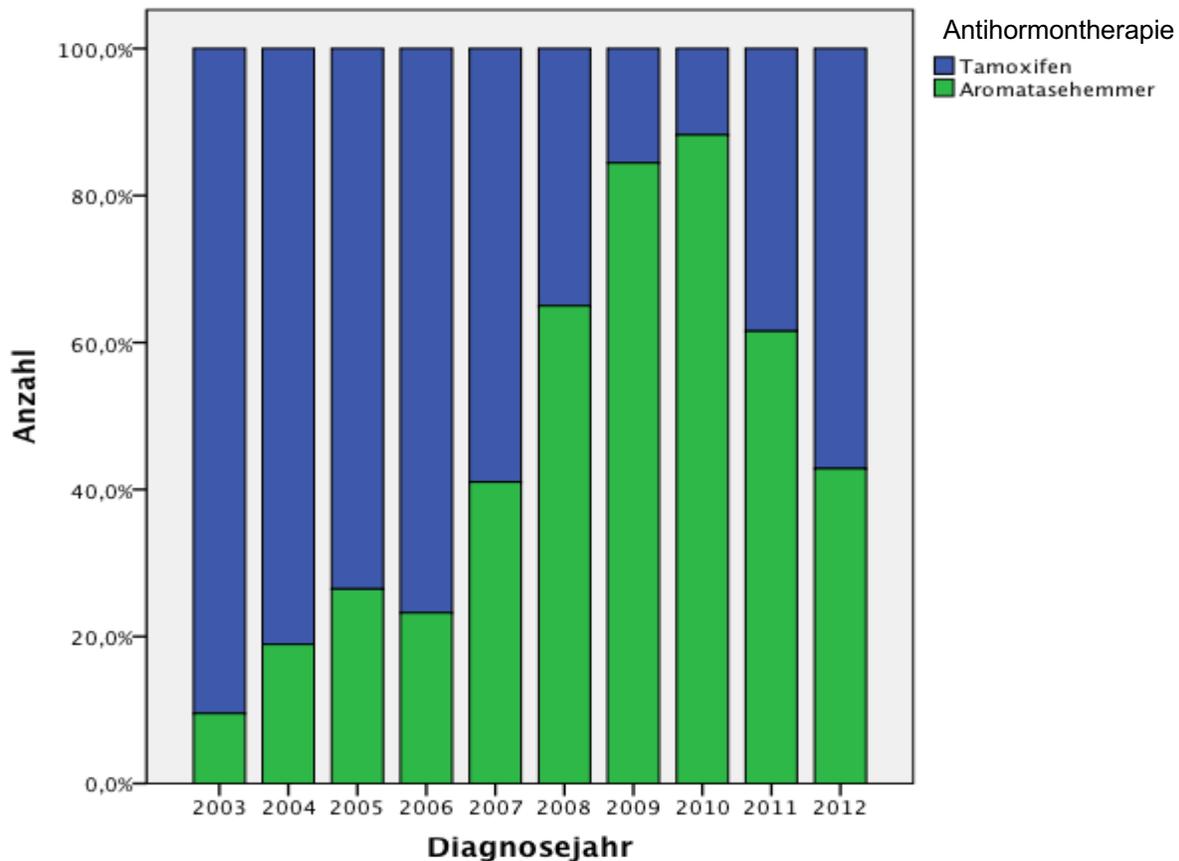
			Fallzahl	Fallzahl membranös	Fallzahl nukleär
IRS der GPER 1-Expression (zytoplasmatisch)	0		92	13	18
	1		19	1	2
	2		37	12	10
	3		23	5	7
	4		95	20	41
	6		35	6	13
	8		22	2	14
	9		6	0	2
	12		8	1	5
<b>Gesamt</b>			<b>337</b>	<b>60</b>	<b>112</b>

\*Rote Farbe: Cut-off IRS 0 vs. IRS 1 – 12

Ein zytoplasmatisches Färbemuster mit einem IRS zwischen 1 und 4 wurde als schwach GPER 1-positiv gewertet. Dagegen wurden Fälle mit einem IRS  $\geq 9$  als hochpositiv, Fälle zwischen IRS 6 und 8 wurden als intermediär positiv gewertet. Der prozentual am häufigsten vorkommende IRS war mit 28,2% der Wert 4, der am seltensten vertretene IRS war der Wert 9 (1,8%).

Für die Bewertung der GPER 1-Expression mithilfe des Remmele-Scores wurde allein die zytoplasmatische Immunfärbung berücksichtigt. Zusätzlich wurde auf ein membranöses

bzw. nukleäres Färbemuster geachtet. Membranöse und nukleäre Färbungen wurden nicht durch einen eigenen IRS quantifiziert, sondern nur als Zusatzqualität angegeben. So wiesen insgesamt 47 GPER 1-positive Fälle auch eine membranöse Färbung und 94 GPER 1-positive Fälle eine nukleäre Färbung auf. Unter den GPER 1-negativen Fällen (IRS 0) fanden sich 13 membranös und 18 nukleär gefärbte Mammakarzinome.



**Abbildung 5:** Antihormontherapie in Relation zum Diagnosejahr.

Bis zum Jahr 2006 wurden weniger als 30% aller Mammakarzinompatientinnen dieser Studie mit einem endokrinen aromatasehemmenden adjuvanten Therapieregime behandelt, anschließend stieg die Behandlungshäufigkeit auf bis zu knapp 90% im Jahr 2010 an. In den Jahren 2011 und 2012 war die klinische Anwendungshäufigkeit von Tamoxifen® im Vergleich zu Aromataseinhibitor annähernd gleich verteilt. Die Häufigkeit der Anwendung einer aromatasehemmenden Therapie sank ab 2011 also wieder auf < 60% (Abbildung 5).

## 3.4 Vergleichende Analyse: GPER 1-Negativität vs. GPER 1-Positivität

### 3.4.1 Kollektivanalyse

Die Tabellen 6 bis 9 geben einen Überblick über die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen klinisch-pathologischen Parameter sowie des Vitalstatus in Relation zur GPER 1-Expression.

**Tabelle 6:** Vergleich des GPER 1-Status in Relation zu Alter und pathologischen Parametern

Patientinnen-Charakteristika		GPER 1					
		negativ		positiv		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Diagnosealter</b>	< 60	13	14,1	46	18,8	59	17,5
	60 - 69	23	25,0	103	42,0	126	37,4
	70 - 79	36	39,1	69	28,2	105	31,2
	> 80	20	21,7	27	11,0	47	13,9
<b>Stadium UICC postoperativ</b>	I	49	53,3	160	65,3	209	62,0
	II	28	30,4	70	28,6	98	29,1
	III	15	16,3	15	6,1	30	8,9
<b>Grading</b>	G1	17	18,5	70	28,6	87	25,8
	G2	62	67,4	143	58,4	205	60,8
	G3	13	14,1	31	12,7	44	13,1
	GX/kA	0	0	1	0,4	1	0,3
<b>Blutgefäßinvasion</b>	V0	79	85,9	212	86,5	291	86,4
	V1	7	7,6	11	4,5	18	5,3
	VkA	6	6,5	22	9,0	28	8,3
<b>Lymphbahninvasion</b>	L0	65	70,7	182	74,3	247	73,3
	L1	21	22,8	42	17,1	63	18,7

	LkA	6	6,5	21	8,6	27	8,0
<b>Residualtumor lokal</b>	R0	92	100	245	100	337	100
<b>Residualtumor gesamt</b>	R0	92	100	245	100	337	100
<b>Gesamt</b>		<b>92</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>	<b>337</b>	<b>100</b>

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befand sich die Mehrheit der Patientinnen in einem Alter zwischen 60 und 79 Jahren (68,8%), 17,5% der Frauen waren zu diesem Zeitpunkt jünger als 60 Jahre, 13,9% waren 80 Jahre und älter. Des Weiteren wies das Kollektiv im Durchschnitt ein niedriges bzw. intermediäres UICC Stadium auf (I: 62,0%, II: 29,1%, III: 8,9%, IV: 0%) mit überwiegend einem Grading zwischen G1 und G2 (86,4%), weniger als 15% der Patientinnen hatten einen G3-Tumor. In der Mehrzahl der Fälle konnte keine Blutgefäß- bzw. Lymphbahninvasion gefunden werden (V0: 86,4%; L0: 73,3%). Basierend auf der Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter konnte für das Gesamtkollektiv aus ausschließlich endokrin behandelten Patientinnen ein prognostisch günstiges Profil festgestellt werden (Tabelle 6).

Zudem ergab die vergleichende Analyse in Relation zum GPER 1-Status, dass die Gruppe der GPER 1-positiven Patientinnen günstigere Einflussvariablen aufwies als die GPER 1-negative Gruppe. Während 14,1% aller GPER 1-negativen Patientinnen jünger als 60 Jahre alt waren und 21,7%  $\geq$  80 Jahre, haben 18,7% aller GPER 1-positiven Patientinnen das 60. Lebensjahr noch nicht erreicht und 11,0% waren  $\geq$  80 Jahre. Der Unterschied im Alter war signifikant ( $p=0,023$ ). Das postoperative Stadium betreffend befanden sich 53,3% der GPER 1-nicht-exprimierenden Fälle im Stadium I und 16,3% im Stadium III im Vergleich zu den GPER 1-exprimierenden Fällen, unter denen bei 65,3% Stadium I vorlag und lediglich bei 0,6% Stadium III ( $p=0,034$ ). Analog dazu wiesen 18,5% der GPER 1-negativen Mammakarzinomfälle eine gute Differenzierung auf (G1) während 28,6% der positiven GPER 1-Mammakarzinome mit G1 bewertet wurden ( $p=0,162$ ) (Tabelle 6).

Zusammenfassend ließ sich in der vergleichenden Analyse ein signifikanter Unterschied durch einen Chi-Quadrat-Test im Diagnosealter ( $p=0,023$ ), im UICC-Stadium ( $p=0,034$ ) und in der Blutgefäßinvasion ( $p=0,046$ ) feststellen, die übrigen Patientinnen-Charakteristika waren nicht signifikant.

**Tabelle 7:** Vergleich des GPER 1-Status in Relation zur Rezeptor-Expression

Tumorbiologie		GPER 1					
		negativ		positiv		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>HER2-Rezeptorstatus</b>	negativ	81	88,0	224	91,4	305	90,5
	positiv	8	8,7	19	7,8	27	8,0
	kA	3	3,3	2	0,8	5	1,5
<b>Östrogen-Rezeptorstatus</b>	positiv	92	100	245	100	337	100
<b>Progesteron-Rezeptorstatus</b>	negativ	13	14,1	26	10,6	39	11,6
	positiv	79	85,9	219	89,4	298	88,4
<b>GPER 1-IRS (klassiert)</b>	0	92	100,0	0	0,0	92	27,3
	1 - 4	0	0	174	71,0	174	51,6
	5 - 8	0	0	57	23,3	57	16,9
	9 - 12	0	0	14	5,7	14	4,2
<b>GPER 1-Färbung nukleär</b>	negativ	74	80,4	151	61,6	225	66,8
	positiv	18	19,6	94	38,4	112	33,2
<b>GPER 1-Färbung membranös</b>	negativ	79	85,9	198	80,8	277	82,2
	positiv	13	14,1	47	19,2	60	17,8
<b>Gesamt</b>		<b>92</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>	<b>337</b>	<b>100</b>

Da in die Studie ausschließlich endokrin behandelte Patientinnen eingeschlossen wurden, exprimierten alle Fälle einen nukleären Östrogenrezeptor, 88,4% auch einen nukleären Progesteronrezeptor. Mit Ausnahme weniger Fälle wies das Patientinnenkollektiv keine HER2-Überexpression auf (90,5%).

Unter den GPER 1-positiven Patientinnen stellten die GPER 1-schwach exprimierenden Fälle (IRS 1 - 4) die stärkste Subgruppe dar (174 Fälle, 71,0%), eine moderate Expression (IRS 5 - 8) wiesen 57 Fälle (23,3%) auf, eine starke Expression (IRS 9 - 12) jedoch nur 14 Fälle (5,7%). Unter den GPER 1-positiven Fällen zeigten 94 Fälle (38,4%) eine Kernfärbung und 47 Fälle (19,2%) eine membranöse Färbung. Besonders auffällig waren auch jene Fälle, die zytoplasmatisch zwar keine Färbung aufwiesen (IRS 0), somit nicht in die statistische Auswertung der GPER 1-positiven Fälle inkludiert wurden, jedoch eine nukleäre (18 Fälle, 5,3%) oder membranöse (13 Fälle, 3,5%) Färbung aufwiesen (Tabelle 7).

**Tabelle 8:** Vergleich des GPER 1-Status in Relation zur Therapie

Therapie		GPER 1					
		negativ		positiv		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Operation Mamma</b>	BET	59	64,1	202	82,4	261	77,4
	Ablatio	33	35,9	43	17,6	76	22,6
<b>Operation Lymphknoten</b>	SNLB	55	59,8	172	70,2	227	67,4
	ALND	35	38,0	70	28,6	105	31,2
	keine	2	2,2	3	1,2	5	1,5
<b>Radiatio</b>	Mamma	51	55,4	185	75,5	236	70,0
	Mamma + Axilla	7	7,6	7	2,9	14	4,2
	andere Radiatio	2	2,2	4	1,6	6	1,8
	keine	32	34,8	49	20,0	81	24,0
<b>Chemotherapie</b>	nein	92	100	245	100	337	100

<b>Antikörpertherapie (HER2)</b>	ja	1	1,1	0	0	1	0,3
	nein	91	98,9	245	100	336	99,7
<b>Antihormontherapie</b>	Tamoxifen®	44	47,8	146	59,6	190	56,4
	Aromatasehemmer	48	52,2	99	40,4	147	43,6
<b>Gesamt</b>		<b>92</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>	<b>337</b>	<b>100</b>

Unter allen analysierten Patientinnen konnten 77,4% brusterhaltend operativ behandelt werden, bei 67,4% erfolgte eine Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SNLB) und 31,2% erhielten eine Axilladisektion (ALND).

In Bezug auf die adjuvante Therapie zeigte sich folgende Verteilung: eine isolierte Bestrahlung der Mamma erfolgte bei 75,5% der GPER 1-positiven Patientinnen, bei den GPER 1-negativen Patientinnen nur bei 55,4%. Die Strahlentherapie stellt bei einer brusterhaltenden Therapie einen obligaten Bestandteil der adjuvanten Behandlung dar. Eine zusätzliche Bestrahlung der Axilla erhielten 2,9% der GPER 1-positiven, jedoch 7,6% der GPER 1-negativen Patientinnen. Bei den GPER 1-positiven Patientinnen wurde verhältnismäßig häufiger eine endokrine Therapie mit Tamoxifen® eingeleitet (59,6%), wohingegen in der Gruppe der GPER 1-negativen Fälle die Aromatasehemmer-Therapie mit 52,2% überwog (Tabelle 8).

Zusammenfassend ließ sich in der vergleichenden Analyse ein signifikanter Unterschied durch einen Chi-Quadrat-Test in der chirurgischen Therapie der Brust ( $p=0,001$ ), in der Radiatio ( $p=0,015$ ) und in der Antihormontherapie ( $p=0,001$ ) feststellen, die übrigen Therapie-Kriterien waren nicht signifikant.

**Tabelle 9:** Vergleich des GPER 1-Status in Relation zur Rezidivhäufigkeit und zum Überleben

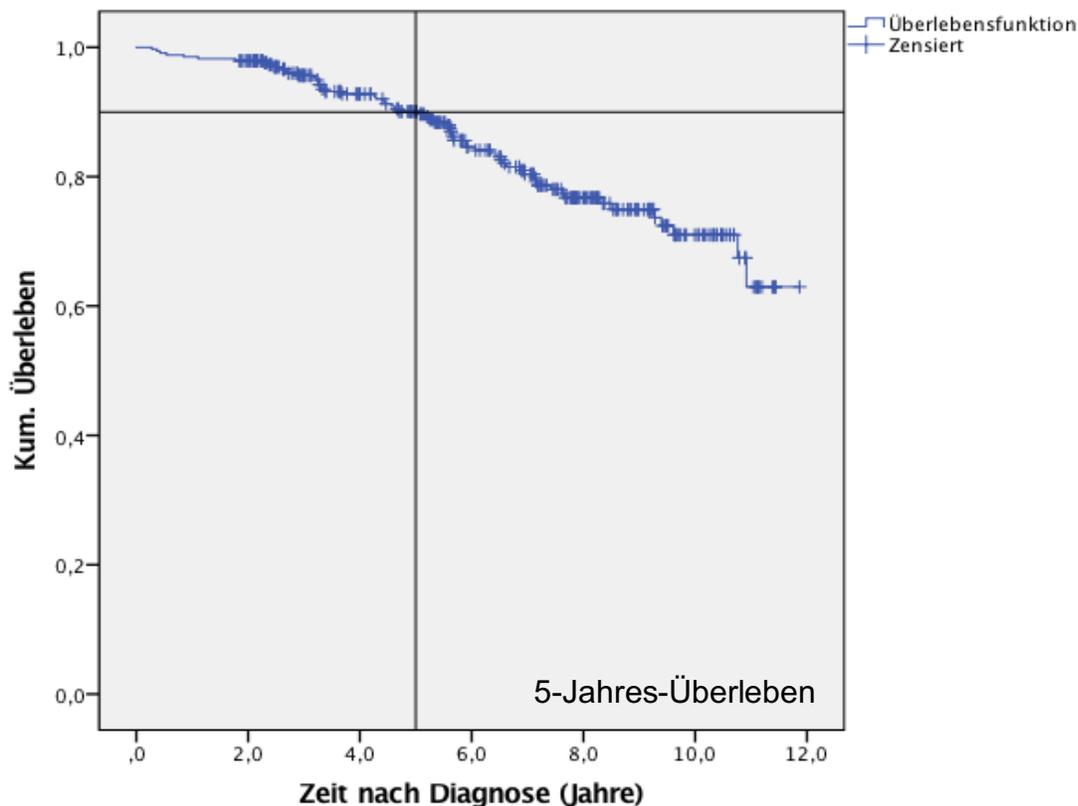
		GPER 1					
		negativ		positiv		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Life-Status</b>	lebt	69	75,0	206	84,1	275	81,6
	verstorben	23	25,0	39	15,9	62	18,4
<b>Rezidiv</b>	nein	88	95,7	227	92,7	315	93,5
	ja	4	4,3	18	7,3	22	6,5
<b>Tod und/oder Rezidiv</b>	nein	69	75,0	194	79,2	263	78
	ja	23	25,0	51	20,8	74	22
<b>Gesamt</b>		<b>92</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>	<b>337</b>	<b>100</b>

In der Gruppe der GPER 1-positiven Patientinnen lebten am Ende des Beobachtungszeitraums (31.12.2014) noch 84,1%, während nur 75,0% der GPER 1-negativen Fälle überlebten ( $p=0,158$ ). Unter der Einschränkung der niedrigen Rezidivfallzahlen fand sich in der GPER 1-positiven Gruppe eine höhere Rezidivrate mit 7,3% im Vergleich zu den GPER 1-negativen Fällen, die eine Rezidivrate von 4,3% aufwiesen (Tabelle 9).

Zusammenfassend ließ sich in der vergleichenden Analyse kein signifikanter Unterschied durch einen Chi-Quadrat-Test feststellen.

### 3.4.2 Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier

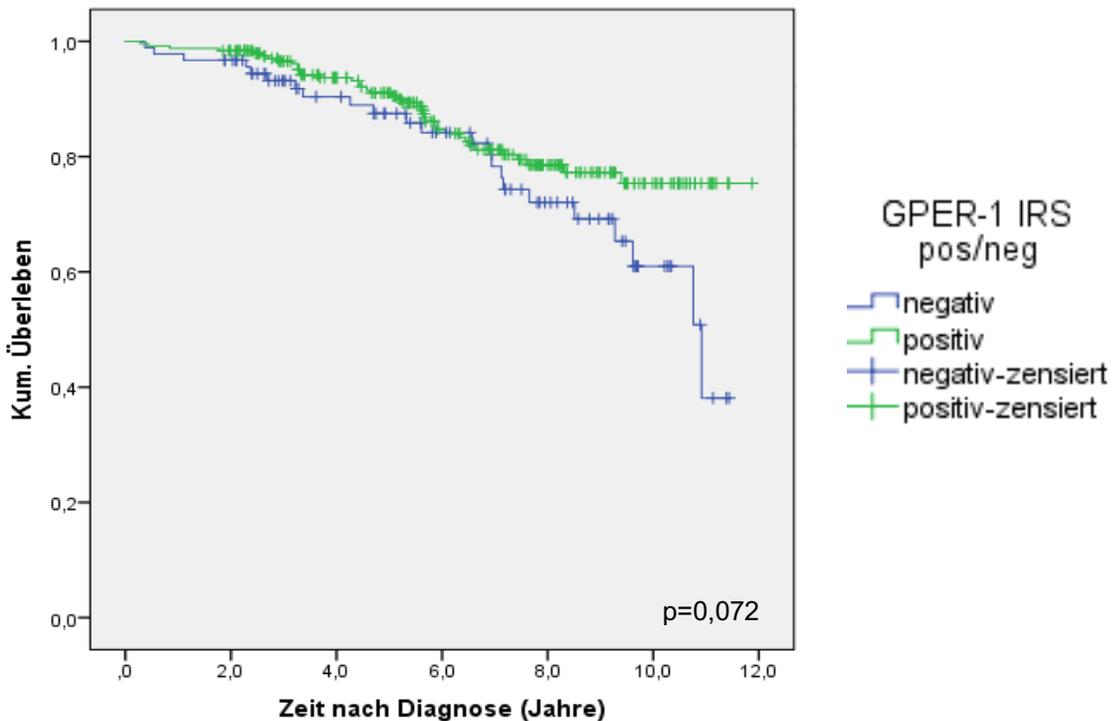
Das kumulative Überleben der GPER 1-positiven und GPER 1-negativen Patientinnen wurde mittels IBM SPSS® nach Kaplan-Meier in Relation zur erhaltenen endokrinen Therapie berechnet. Untersucht wurden das Gesamtüberleben (OS) und das rezidivfreie Überleben (RFS).



**Abbildung 6:** Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier.

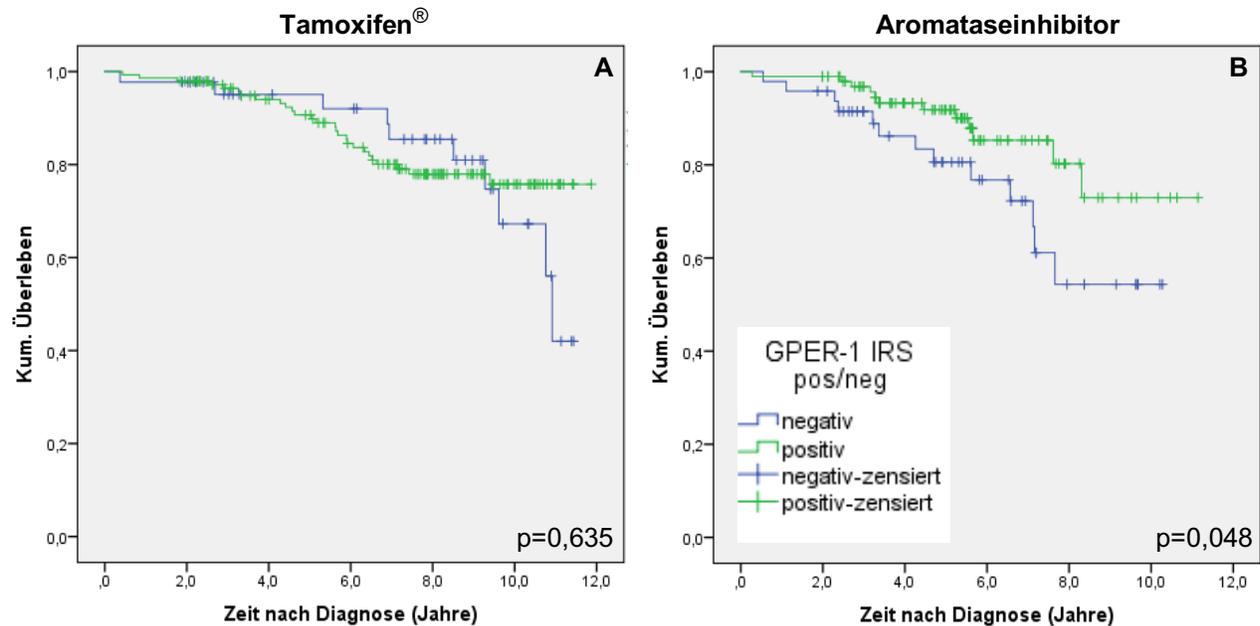
Die Abbildung 6 zeigt die allgemeine Überlebensfunktion des Gesamtkollektivs unabhängig der erhaltenen endokrinen Therapie und unabhängig des GPER 1-Status. In der Analyse waren 337 Fälle enthalten, die über maximal 12 Jahre beobachtet wurden. Bei 62 Patientinnen (18,4%) trat das Ereignis Tod ein. Zum Ende des Follow-up-Zeitraums lebten noch 275 Patientinnen (81,6%). Somit zeigte sich im untersuchten Gesamtkollektiv eine absolute 5-Jahres-Überlebensrate von 90% (Abbildung 6).

Die nach Kaplan-Meier berechnete kumulative Überlebensfunktion in Relation zum GPER 1-Status ergab ein kürzeres OS der GPER 1-negativen Patientinnen im Vergleich zur GPER 1-positiven Gruppe ( $p=0,072$ ) (Abbildung 7).



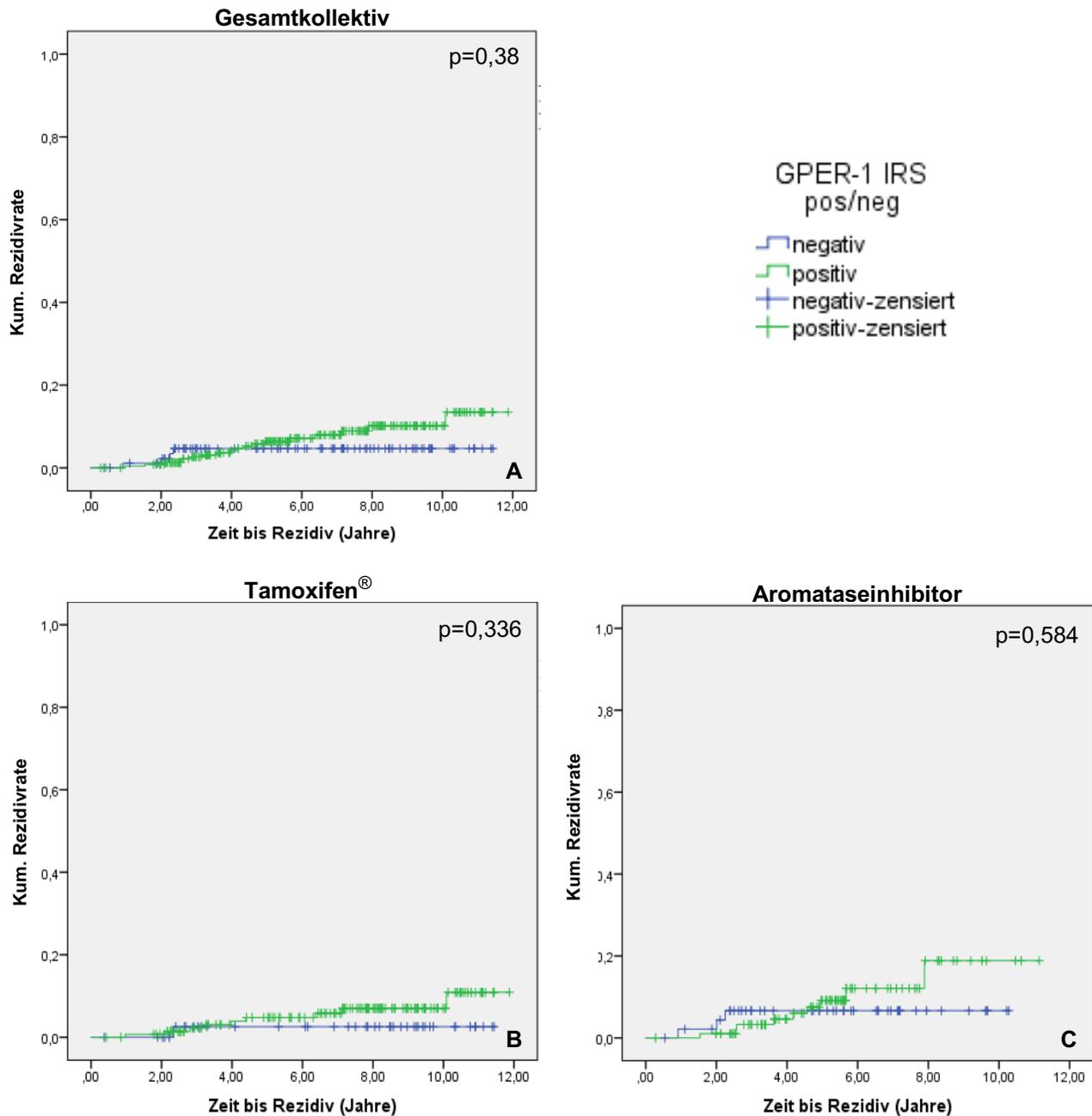
**Abbildung 7:** Kaplan-Meier-Funktion zum Vergleich des Gesamtüberlebens in Relation zum GPER 1-Status.

In der Subgruppe der Tamoxifen®-behandelten Patientinnen ( $n = 190$ ) fand sich kein signifikanter Unterschied im OS in Relation zum GPER 1-Status ( $p = 0,635$ ). Im Vergleich dazu war die Aromatasehemmer-Therapie ( $n = 147$ ) bei GPER 1-Negativität mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ( $p = 0,048$ ) (Abbildung 8, Grafik A und B).



**Abbildung 8:** Kaplan-Meier-Funktion zum Vergleich des Gesamtüberlebens bei Tamoxifen®-Monotherapie (A) bzw. Aromataseinhibitor-Therapie (B) in Relation zum GPER 1-Status.

Zur Berechnung der kumulativen Rezidivraten wurde das krankheitsfreie Intervall zwischen Erstdiagnose und Auftreten des Rezidivs als definiertes Ereignis betrachtet. Insgesamt fanden sich im beobachteten Kollektiv 22 Rezidive, davon 4 Rezidive unter den GPER 1-negativen Patientinnen und 18 unter den GPER 1-positiven Patientinnen. Für das Auftreten eines Rezidivs im Gesamtkollektiv erwies sich der GPER 1-Status als kein signifikanter Faktor ( $p = 0,38$ ) (Abbildung 9, Grafik A). Auch in den beiden untersuchten Therapiegruppen fand sich kein signifikanter Unterschied im RFS in Relation zum GPER 1-Status (Abbildung 9, Grafik B und C).



**Abbildung 9:** Kaplan-Meier-Funktion zum Vergleich der Rezidivraten im Gesamtkollektiv (A), bei Tamoxifen®-Monotherapie (B) bzw. Aromataseinhibitor-Therapie (C) in Relation zum GPER 1-Status.

## **3.5 Vergleichende Analyse der GPER 1-positiven Patientinnen: Tamoxifen® vs. Aromataseinhibitor**

### **3.5.1 Kollektivanalyse**

In die folgende Analyse wurden ausschließlich GPER 1-positive Fälle eingeschlossen, die in Relation zu beiden endokrinen Therapievarianten Tamoxifen® und Aromataseinhibitor untersucht wurden. Die Tabellen 10 – 13 geben einen Überblick über die Häufigkeitsverteilung der klinisch-pathologischen Parameter sowie über den Vitalstatus in Relation zur verabreichten endokrinen Therapie. Insgesamt bestand das GPER 1-positive Kollektiv aus 245 Fällen mit 146 Tamoxifen®-behandelten Patientinnen, die Aromataseinhibitor-Gruppe umfasste 99 Fälle. Zugehörige Signifikanzniveaus wurden mithilfe des Log-Rank-Tests ermittelt.

Im Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter der untersuchten Patientinnen fiel auf, dass die Gruppe mit Aromataseinhibitor-Monotherapie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht nur geringfügig älter war als die Gruppe mit Tamoxifen®-Monotherapie, sondern auch zusätzlich signifikant mehr prognostisch ungünstige Eigenschaften aufwies. Während 21,2% der Tamoxifen®-Patientinnen jünger als 60 Jahre und 9,6%  $\geq 80$  Jahre alt waren, haben 15,2% der Aromataseinhibitor-Patientinnen das 60. Lebensjahr noch nicht erreicht und 13,1% waren  $\geq 80$  Jahre ( $p = 0,372$ ).

**Tabelle 10:** Vergleich der endokrinen Therapie in Relation zu Alter und zu pathologischen Parametern bei GPER 1-Positivität

		Endokrine Therapie					
		Tamoxifen®		Aromatasehemmer		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Diagnosealter</b>	< 60	31	21,2	15	15,2	46	18,8
	60 - 69	64	43,8	39	39,4	103	42,0
	70 - 79	37	25,3	32	32,3	69	28,2
	> 80	14	9,6	13	13,1	27	11,0
<b>Stadium UICC postoperativ</b>	I	108	74,0	52	52,5	160	65,3
	II	32	21,9	38	38,4	70	28,6
	III	6	4,1	9	9,1	15	6,1
<b>TNM</b>	T1	108	74,0	51	51,5	159	64,9
	T2	22	15,1	18	18,2	40	16,3
	T3	1	0,7	1	1,0	2	0,8
	T4	1	0,7	2	2,0	3	1,2
	N+	14	9,6	27	27,3	41	16,7
<b>Grading</b>	G1	51	34,9	19	19,2	70	28,6
	G2	77	52,7	66	66,7	143	58,4
	G3	17	11,6	14	14,1	31	12,7
	GX/kA	1	0,7	0	0	1	0,4
<b>Blutgefäßinvasion</b>	V0	119	81,5	93	93,9	212	86,5
	V1	7	4,8	4	4,0	11	4,5
	VkA	20	13,7	2	2,0	22	9,0
<b>Lymphbahninvasion</b>	L0	107	73,3	75	75,8	182	74,3
	L1	19	13,0	23	23,2	42	17,1
	LkA	20	13,7	1	1,0	21	8,6

<b>Residualtumor lokal</b>	R0	146	100	99	100	245	100
<b>Residualtumor gesamt</b>	R0	146	100	99	100	245	100
<b>Gesamt</b>		<b>146</b>	<b>100</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>

Das postoperative UICC-Stadium betreffend befanden sich 74,0% der Tamoxifen®-Fälle im Stadium I, 21,9% im Stadium II und lediglich 4,1% im Stadium III im Vergleich zu den Aromataseinhibitor-Patientinnen, unter denen bei 52,5% Stadium I vorlag, bei 38,4% Stadium II und bei 9,1% Stadium III. Unter den Aromataseinhibitor-Patientinnen war die Stadienverteilung im Vergleich zu den Tamoxifen®-behandelten Patientinnen also signifikant hin zu höheren Stadien verschoben ( $p = 0,002$ ). Komparabel dazu zeigt das Grading ähnliche Ergebnisse. So wiesen in der Tamoxifen®-Gruppe 34,9% der Fälle eine gute Differenzierung (G1), 52,7% eine intermediäre Differenzierung (G2) und 11,6% eine schlechte Differenzierung (G3) auf. Im Vergleich dazu wurden in der Aromataseinhibitor-Gruppe 19,2% der Fälle mit G1 klassifiziert, 66,7% mit G2 und 14,1% mit G3. Dieser Unterschied im Grading war signifikant ( $p = 0,045$ ). Die vergleichende Analyse der Blutgefäß- und Lymphbahninvasion in Relation zur endokrinen Therapie ergab signifikant häufiger eine Blutgefäßinvasion ( $p = 0,006$ ) sowie signifikant mehr Lymphbahninvasionen ( $p = 0,001$ ) in der Aromataseinhibitor-Gruppe (Tabelle 10).

Zusammenfassend ließ sich in der vergleichenden Analyse ein signifikanter Unterschied durch einen Chi-Quadrat-Test im UICC-Stadium ( $p = 0,002$ ), im TNM-Stadium ( $p = 0,002$ ), im Grading ( $p = 0,045$ ), in der Blutgefäßinvasion ( $p = 0,006$ ) und in der Lymphbahninvasion ( $p = 0,001$ ) feststellen, die übrigen Patientinnen-Charakteristika waren nicht signifikant.

**Tabelle 11:** Vergleich der endokrinen Therapie in Relation zur Rezeptor-Expression bei GPER 1-Positivität

		Endokrine Therapie					
		Tamoxifen®		Aromatasehemmer		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>HER2-Rezeptorstatus</b>	negativ	135	92,5	89	89,9	224	91,4
	positiv	10	6,8	9	9,1	19	7,8
	kA	1	0,7	1	1,0	2	0,8
<b>Östrogenrezeptorstatus</b>	positiv	146	100	99	100	245	100
<b>Progesteronrezeptorstatus</b>	negativ	17	11,6	9	9,1	26	10,6
	positiv	129	88,4	90	90,9	219	89,4
<b>GPER 1-IRS (klassiert)</b>	1 - 4	92	63,0	82	82,8	174	71,0
	5 - 8	40	27,4	17	17,2	57	23,3
	9 - 12	14	9,6	0	0	14	5,7
<b>GPER 1-Färbung nukleär</b>	negativ	76	52,1	75	75,8	151	61,6
	positiv	70	47,9	24	24,2	94	38,4
<b>GPER 1-Färbung membranös</b>	negativ	126	86,3	72	72,7	198	80,8
	positiv	20	13,7	27	27,3	47	19,2
<b>Gesamt</b>		<b>146</b>	<b>100</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>

In den beiden Therapiegruppen fanden sich keine relevanten Unterschiede in Bezug auf die Expression der Rezeptoren (Tabelle 11). In der Aromataseinhibitor-Gruppe wurde im Rahmen des GPER 1-Scorings kein IRS-Wert zwischen 9 und 12 vergeben, gleichzeitig war der Prozentsatz der Fälle mit schwach positivem IRS zwischen 1 und 4 deutlich höher als in der Tamoxifen®-Gruppe (IRS 1 - 4: 82,2% vs. 63,0%). In beiden Therapiegruppen wurden unabhängig von der hier gewerteten zytoplasmatischen GPER 1-Expression auch Fälle mit nukleärer sowie membranöser GPER 1-Färbung registriert (Tabelle 11).

**Tabelle 12:** Vergleich der endokrinen Therapie in Relation zur lokalen Tumorbehandlung bei GPER 1-Positivität

		Endokrine Therapie					
		Tamoxifen®		Aromatasehemmer		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Operation Mamma</b>	BET	123	84,2	79	79,8	202	82,4
	Ablatio	23	15,8	20	20,2	43	17,6
<b>Operation Lymphknoten</b>	SNLB	94	64,4	78	78,8	172	70,2
	ALND	51	34,9	19	19,2	70	28,6
	keine	1	0,7	2	2,0	3	1,2
<b>Radiatio</b>	Mamma	116	79,5	69	69,7	185	75,5
	Mamma + Axilla	0	0	7	7,1	7	2,9
	andere Radiatio	1	0,7	3	3,0	4	1,6
	keine	29	19,9	20	20,2	49	20,0
<b>Chemotherapie</b>	nein	146	100	99	100	245	100
<b>Antikörpertherapie</b>	nein	146	100	99	100	245	100
<b>Gesamt</b>		<b>146</b>	<b>100</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>

Während 20,2% der Aromataseinhibitor-Patientinnen einer lokalen Tumorthherapie in Form einer Ablatio mammae unterzogen wurden, war dies bei 15,8% der Tamoxifen®-Patientinnen der Fall. Es fiel eine ungleiche Verteilung im Hinblick auf die Rate an Axilladissektionen mit 19,2% in der AI-Gruppe im Vergleich zu 34,9% in der Tamoxifen®-Gruppe auf. Dies lässt sich vor dem Hintergrund der Implementierung der Sentinel-Node-Biopsie in die S3-Leitlinie Mammakarzinom im Jahr 2000 und der endokrinen Therapie mit Aromataseinhibitoren im Jahr 2006 (Abbildung 6) plausibel erklären (Shaapveld *et al.*, 2005; S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2006). Entsprechend der definierten Ausschlusskriterien (Abbildung 1) erhielt keine der untersuchten Patientinnen eine

Chemo- bzw. Antikörpertherapie (Tabelle 12).

Zusammenfassend ließ sich in der vergleichenden Analyse ein signifikanter Unterschied durch einen Chi-Quadrat-Test in der chirurgischen Therapie der Axilla ( $p = 0,021$ ) und in der Radiatio ( $p = 0,005$ ) feststellen, die übrigen Patientinnen-Charakteristika waren nicht signifikant.

**Tabelle 13:** Vergleich der endokrinen Therapie in Relation zur Rezidivhäufigkeit und zum Überleben bei GPER 1-Positivität

		Endokrine Therapie					
		Tamoxifen®		Aromatasehemmer		Gesamt	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Life-Status</b>	lebt	119	81,5	87	87,9	206	84,1
	verstorben	27	18,5	12	12,1	39	15,9
<b>Rezidiv</b>	nein	137	93,8	90	90,9	227	92,7
	ja	9	6,2	9	9,1	18	7,3
<b>Tod und/oder Rezidiv</b>	nein	114	78,1	80	80,8	194	79,2
	ja	32	21,9	19	19,2	51	20,8
<b>Gesamt</b>		<b>146</b>	<b>100</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>

In Bezug auf den Vital- bzw. Rezidivstatus der GPER 1-positiven Patientinnen ließ sich konstatieren, dass im Beobachtungszeitraum 18,5% der mit Tamoxifen® therapierten Patientinnen verstorben sind im Vergleich zu 12,1% der Aromataseinhibitor-Patientinnen ( $p = 0,181$ ). Die Rezidivrate war in beiden Therapiegruppen in etwa gleich verteilt, deren Aussagekraft war bei jeweils 9 Rezidiven pro untersuchter Gruppe jedoch nur eingeschränkt zu werten.

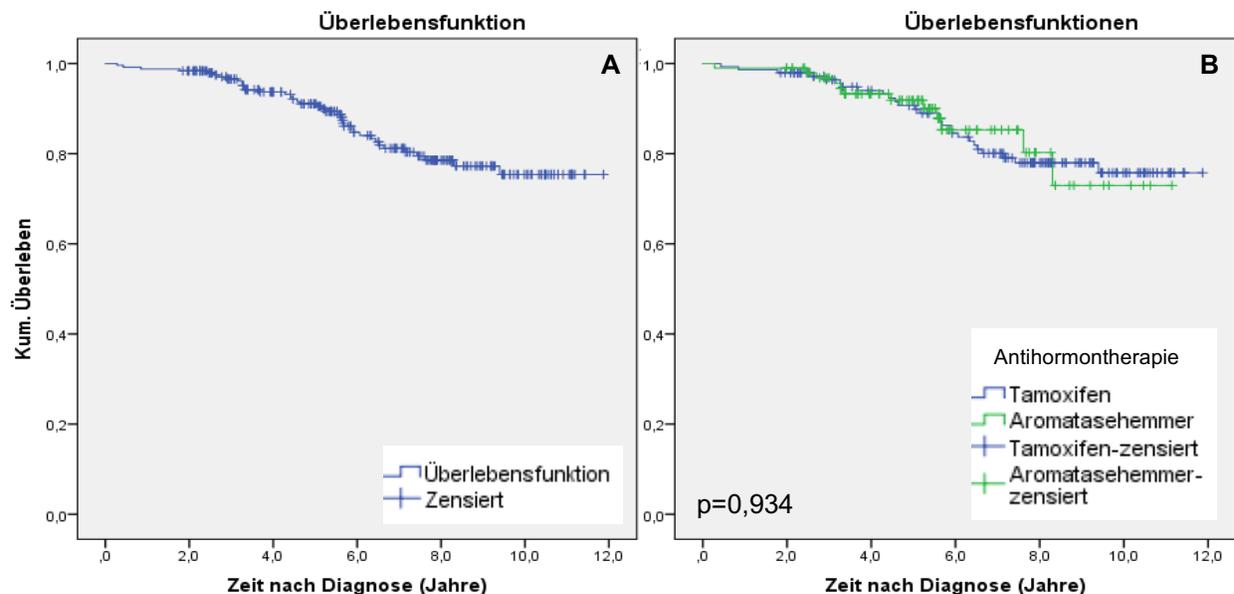
In Anbetracht der signifikant ungünstigeren prognostischen Charakteristika der Aromataseinhibitor-Subgruppe fällt die ungefähre Gleichverteilung der Tod- bzw. Rezidivereignisse in den Vergleichsgruppen mit darüberhinaus festzustellendem Trend

hin zu einem besseren Überleben in der Aromataseinhibitor-Subgruppe auf (Tabelle 13, Abbildung 9).

Zusammenfassend ließ sich in der vergleichenden Analyse kein signifikanter Unterschied durch einen Chi-Quadrat-Test feststellen.

### 3.5.2 Überlebensanalyse mit Kaplan-Meier und Cox-Regression

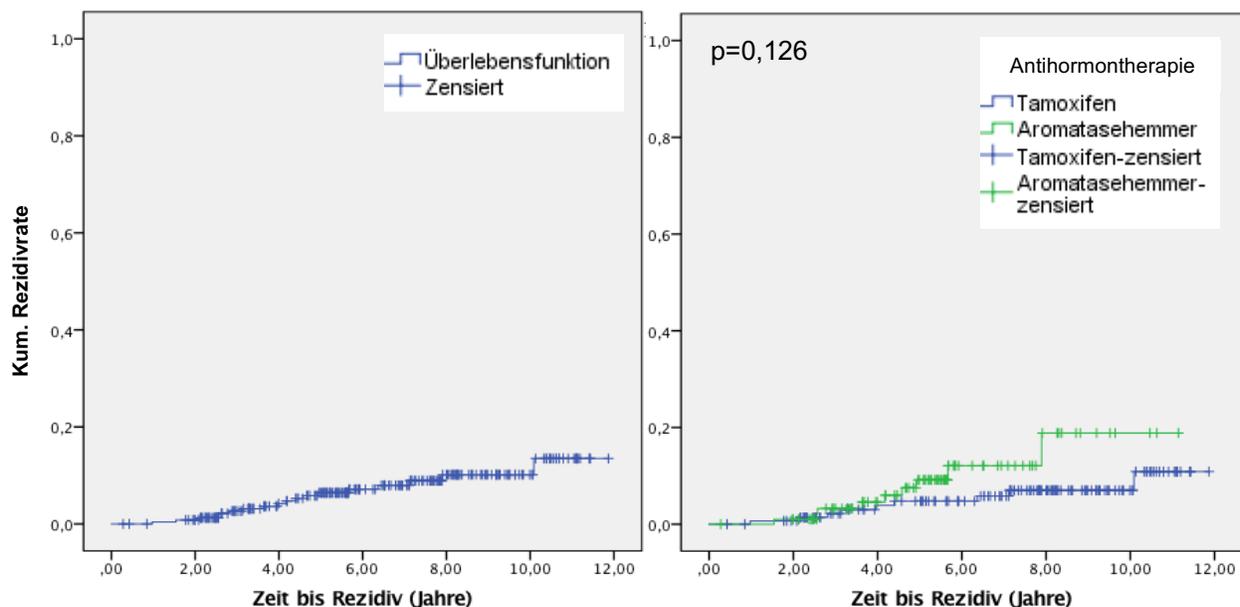
Das kumulative Überleben der GPER 1-positiven Patientinnen wurde nach Kaplan-Meier über einen Beobachtungszeitraum von 12 Jahren analysiert (Abbildung 10). Als Ereignis wurde der Tod einer Patientin definiert und die Zeitspanne zwischen dem Datum der Erstdiagnose bis zum Eintreten des Ereignisses berechnet. Trat im Beobachtungszeitraum kein Ereignis auf, so blieb der Fall zensiert in der Überlebensfunktion erhalten.



**Abbildung 10:** Kaplan-Meier-Überlebensfunktion zum Vergleich des Gesamtüberlebens der GPER 1-positiven Patientinnen (A) und in Relation zur endokrinen Therapie (B).

Im Kollektiv der GPER 1-positiven Patientinnen (n = 245) wurde bis zum Ende des Beobachtungszeitraums bei 39 Fällen das definierte Ereignis Tod einer Patientin beobachtet (Abbildung 10). In Relation zum applizierten endokrinen Therapieregime fand sich kein signifikanter Unterschied im OS ( $p = 0,934$ ) zwischen der Tamoxifen®-Gruppe (n = 146, blauer Graph) und der Aromataseinhibitor-Gruppe (n = 99, grüner Graph).

Für die Berechnung der kumulierten Rezidivraten wurde das Tumorrezidiv als Ereignis definiert und die Zeitspanne zwischen Erstdiagnose und Eintreten des Ereignisses untersucht. Trat im Beobachtungszeitraum kein Ereignis auf, so blieb der Fall zensiert in der Rezidivanalyse erhalten. In der Gegenüberstellung der beiden endokrinen Therapieregime (Abbildung 11) zeigte der Log-Rank-Test keinen signifikanten Unterschied in der Rezidivhäufigkeit auf ( $p = 0,126$ ).



**Abbildung 11:** Kaplan-Meier-Funktion zum Vergleich der Rezidivraten der GPER 1-positiven Patientinnen (A) und in Relation zur endokrinen Therapie (B).

In der multivariaten Analyse mittels Cox-Regression wurden die beiden endokrinen Therapiegruppen durch Adjustierung der Kofaktoren miteinander verglichen. Dabei wurde der Einfluss jedes einzelnen Kofaktors (endokrine Aromataseinhibitor-Therapie, Diagnosealter, GPER 1-Expression, UICC-Stadium, Grading, Operation, Radiatio, Lymphbahn- und Blutgefäßinvasion) auf das Gesamtüberleben überprüft.

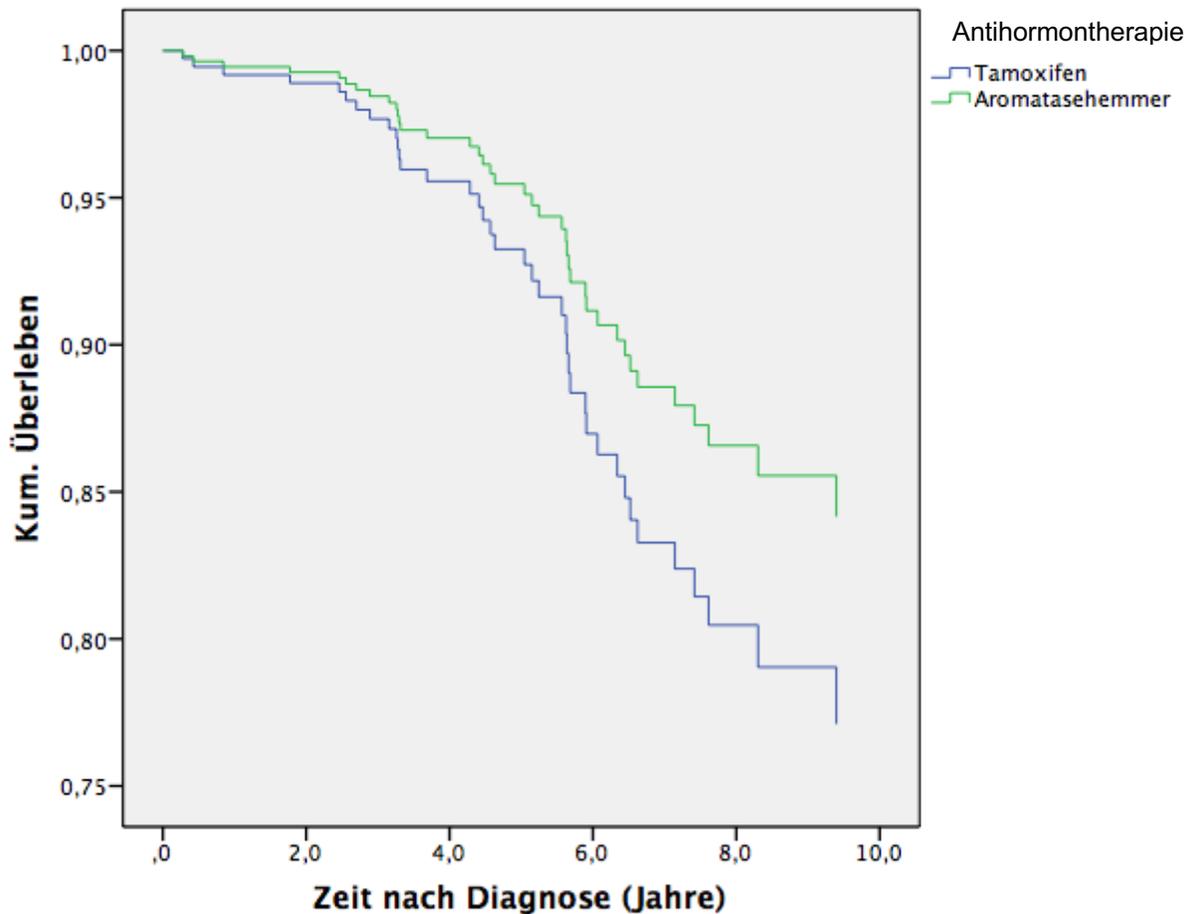
Hier erwiesen sich in der untersuchten Gruppe der GPER 1-positiven Patientinnen zwei Kofaktoren als unabhängige Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben. Der Kofaktor Diagnosealter über 80 Jahre (HR, 12,130; 95%-KI, 2,341 - 62,845;  $p = 0,003$ ) sowie der Kofaktor keine Radiatio (HR, 3,392; 95%-KI, 1,071 - 10,748;  $p = 0,038$ ) wurden mit einem signifikant höheren Risiko zu versterben assoziiert (Tabelle 14).

Die Einflussfaktoren Diagnosezeitraum von 60 – 69 Jahren bzw. 70 - 79 Jahren (60 – 69 J.: HR, 2,605; 95%-KI, 0,572 – 11,873;  $p = 0,216$ ; 70 - 79 J.: HR, 4,390; 95%-KI, 0,912 - 21,140;  $p = 0,065$ ) und UICC-Stadium II und III (UICC II: HR, 1,342; 95%-KI, 0,585 – 3,079;  $p = 0,081$ ; UICC III: HR, 3,393; 95%-KI, 0,589 - 13,396;  $p = 0,081$ ) waren vergesellschaftet mit einem höheren Risiko zu versterben. Die brusterhaltende operative Therapie war mit einem niedrigeren Risiko zu versterben assoziiert (HR, 0,343; 95%-KI, 0,098 - 1,201;  $p = 0,094$ ).

Die Therapie mit einem Aromataseinhibitor erwies sich in der multivariaten Analyse nach Adjustierung für Diagnosealter, UICC-Stadium, Grading, Radiatio und Blutgefäß- sowie Lymphbahnnvasion als günstiger Einflussfaktor auf das OS mit einer Hazard Ratio von 0,663 im Vergleich zur Therapie mit Tamoxifen®. Dieser günstige Einfluss auf das OS erreichte das Signifikanzniveau nicht (HR, 0,663; 95% KI, 0,282 - 1,562;  $p = 0,348$ ; Tabelle 14; Abbildung 12).

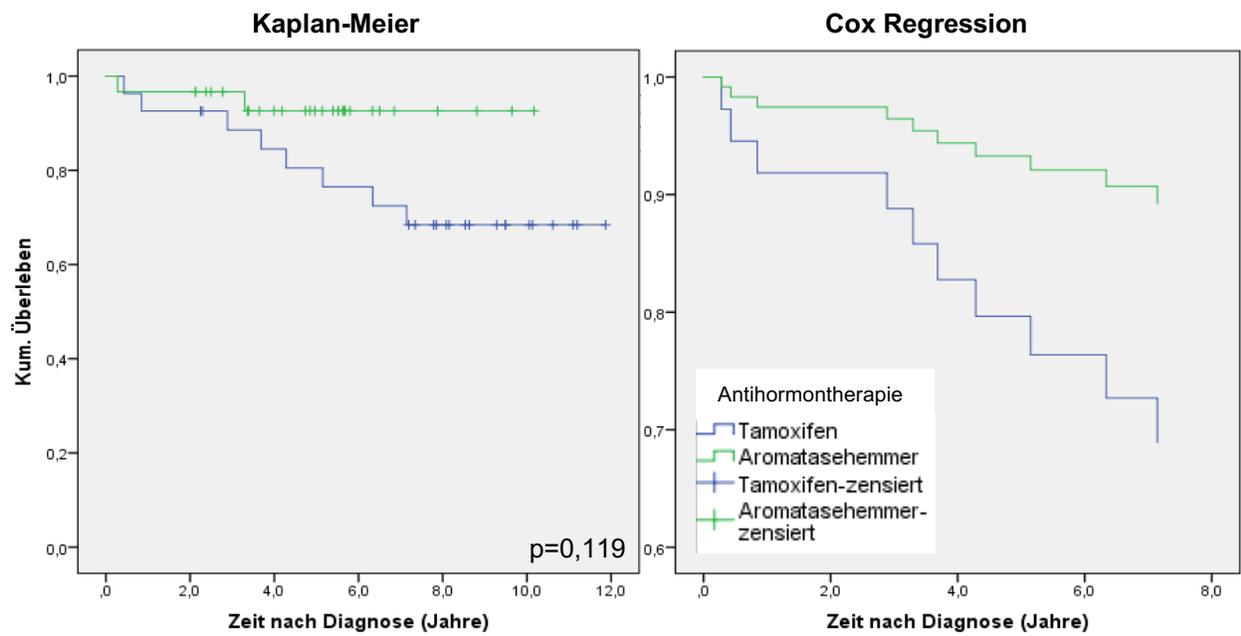
**Tabelle 14:** Cox-Regressionsanalyse der GPER 1-positiven Patientinnen für das Gesamtüberleben

Kofaktor	Signifikanz p	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall	
			Min.	Max.
<b>Aromataseinhibitor vs. Tamoxifen®</b>	<b>0,348</b>	<b>0,663</b>	<b>0,282</b>	<b>1,562</b>
Diagnosealter 60 - 69 J. vs. < 60 J.	0,216	2,605	0,572	11,873
Diagnosealter 70 - 79 J. vs. < 60 J.	0,065	4,390	0,912	21,140
Diagnosealter > 80 J. vs. < 60 J.	0,003	12,130	2,341	62,845
Stadium UICC II vs. UICC I	0,487	1,342	0,585	3,079
Stadium UICC III vs. UICC I	0,081	3,393	0,859	13,396
Grading G2 vs. G1	0,913	1,047	0,460	2,380
Grading G3 vs. G1	0,573	0,694	0,195	2,471
BET vs. Ablatio	0,094	0,343	0,098	1,201
Radiatio Mamma + Axilla vs. Radiatio Mamma	0,146	2,981	0,683	13,017
Andere Radiatio vs. Radiatio Mamma	0,402	2,914	0,239	35,541
Keine Radiatio vs. Radiatio Mamma	0,038	3,392	1,071	10,748
Blutgefäßinvasion vs. keine Blutgefäßinvasion	0,574	1,576	0,322	7,704
Lymphbahninvasion vs. keine Lymphbahninvasion	0,646	0,797	0,304	2,094



**Abbildung 12:** Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens der GPER 1-positiven Patientinnen in Relation zur endokrinen Therapie.

Die dargestellten Ergebnisse zugrunde legend wurden weitere Subgruppenanalysen durchgeführt. Insbesondere zeigte sich ein Vorteil der Aromataseinhibitor-Therapie gegenüber der Tamoxifen<sup>®</sup>-Therapie für die Subgruppe der 60- bis 79-jährigen Patientinnen mit UICC-Stadium II - III (n = 57). In dieser Subgruppe trat in 10 Fällen das definierte Ereignis Tod einer Patientin auf. Hierbei ergab die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse keinen statistisch signifikanten Unterschied (p = 0,119) der Aromataseinhibitor-Patientinnen im Vergleich zu Tamoxifen<sup>®</sup> behandelten Patientinnen. Die Cox-Regressionsanalyse zeigte in dieser beschriebenen Subgruppe einen Vorteil zugunsten der Aromataseinhibitor-Therapie mit einer Hazard Ratio von 0,306 (HR, 0,306; 95%-KI, 0,064 - 1,472; p = 0,139; Abbildung 13).

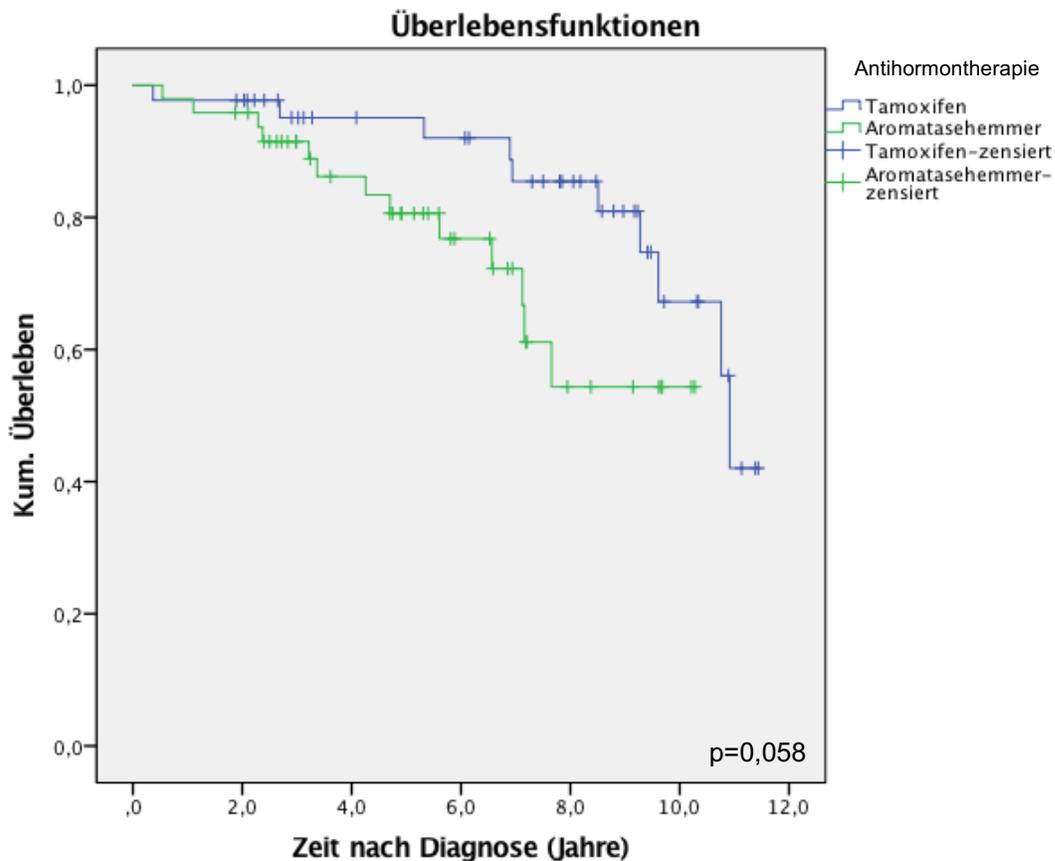


**Abbildung 13:** Kaplan-Meier-Überlebensanalyse und Cox-Regressionsanalyse der GPER 1-positiven Patientinnen zwischen 60 - 79 Jahren mit UICC-Stadium II - III in Relation zur endokrinen Therapie.

### 3.6 Vergleichende Analyse der GPER 1-negativen Patientinnen: Tamoxifen® vs. Aromataseinhibitor

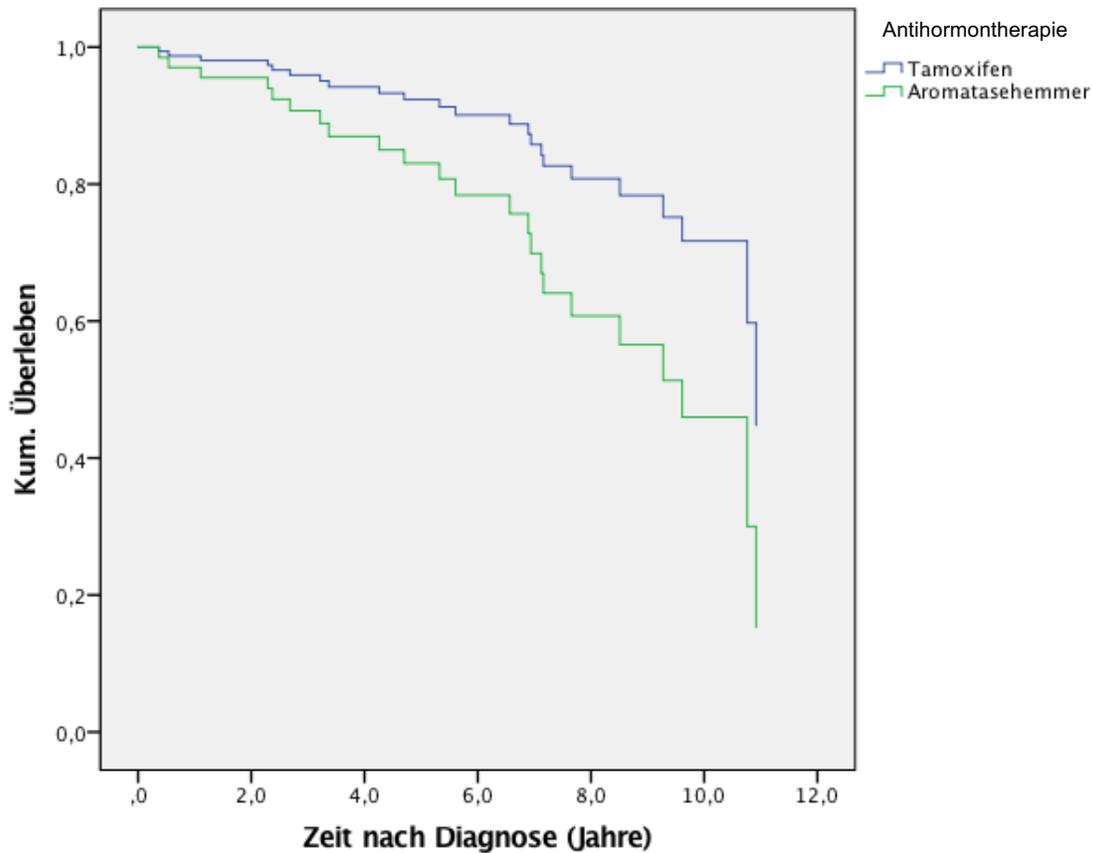
Analog zur differenzierten Untersuchung der GPER 1-exprimierenden Fälle erfolgte eine statistische Auswertung des Gesamtüberlebens bei GPER 1-Negativität in Relation zur erhaltenen endokrinen Therapie.

Von den insgesamt 337 in die Auswertung eingeschlossenen Patientinnen wurden 92 Fälle als GPER 1-negativ identifiziert, von diesen erhielten 44 Patientinnen Tamoxifen® und 48 Patientinnen einen Aromataseinhibitor.



**Abbildung 14:** Kaplan-Meier-Überlebensfunktion zum Vergleich des Gesamtüberlebens der GPER 1-negativen Patientinnen in Relation zur endokrinen Therapie.

Das definierte Ereignis Tod trat unter den Tamoxifen®-behandelten Patientinnen in 10 Fällen auf, unter den Aromataseinhibitor-Patientinnen in 13 Fällen. Der Log-Rank-Test bestätigte einen Unterschied der beiden Überlebenskurven nahe am Signifikanzniveau mit  $p = 0,058$  (Abbildung 14). Bei GPER 1-Negativität war in der Kaplan-Meier-Analyse die Tamoxifen®-Therapie mit einem Überlebensvorteil assoziiert.



**Abbildung 15:** Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens der GPER 1-negativen Patientinnen in Relation zur endokrinen Therapie.

Im Rahmen der multivariaten Analyse wurden die Kofaktoren Diagnosealter, UICC-Stadium, Grading, operative Therapie, Radiatio, Lymphbahn- und Blutgefäßinvasion in die Gleichung eingeschlossen (Tabelle 15). Nach deren Adjustierung zeigte sich in der Auswertung der GPER 1-negativen Fälle die Aromataseinhibitor-Therapie als unabhängiger ungünstiger Einflussfaktor auf das OS. Patientinnen hatten ein nahezu 5-

fach höheres Risiko zu versterben im Vergleich zu den Patientinnen mit einer Tamoxifen®-Therapie (HR, 4,901; 95%-KI, 1,315 - 18,270; p = 0,018; Abbildung 15).

**Tabelle 15:** Cox-Regressionsanalyse der GPER 1-negativen Patientinnen für das Gesamtüberleben

	<b>Signifikanz p</b>	<b>Hazard Ratio</b>	<b>95,0% Konfidenzintervall</b>	
			<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>Aromataseinhibitor vs. Tamoxifen®</b>	<b>0,018</b>	<b>4,901</b>	<b>1,315</b>	<b>18,270</b>
Stadium UICC II vs. UICC I	0,458	1,658	0,437	6,288
Stadium UICC III vs. UICC I	0,203	0,259	0,032	2,074
Grading G2 vs. G1	0,251	0,457	0,120	1,741
Grading G3 vs. G1	0,083	0,170	0,023	1,259
BET vs. Ablatio	0,408	0,505	0,100	2,550
Radiatio Mamma + Axilla vs. Radiatio Mamma	0,269	3,354	0,391	28,735
Andere Radiatio vs. Radiatio Mamma	0,352	4,030	0,214	75,730
Keine Radiatio vs. Radiatio Mamma	0,261	0,460	0,119	1,780
Blutgefäßinvasion vs. keine Blutgefäßinvasion	0,551	0,535	0,069	4,169
Lymphbahninvasion vs. keine Lymphbahninvasion	0,003	14,243	2,496	81,288

## 4. Diskussion

In dieser Studie wurde retrospektiv die Expression von GPER 1 in Bezug auf die Art der adjuvanten endokrinen Therapie in 337 postmenopausalen invasiven Mammakarzinom-Patientinnen untersucht und die Ergebnisse mit dem Überleben der Patientinnen korreliert.

### 4.1 Spezifische Färbung der GPER 1-Expression

GPER 1 lässt sich in vielen verschiedenen Normalgeweben nachweisen, jedoch ist die grundlegende Funktion dieses östrogensensitiven Rezeptors weiterhin Gegenstand der Forschung. Vermutet wird seine Bedeutung bei der Regulierung von Zell-Proliferation und –Wachstum (Mizukami, 2010; Prossnitz *et al.*, 2007; Prossnitz *et al.*, 2008). Ebenso unklar ist die genaue Lokalisation des Rezeptors. Diskutiert wird sowohl die zelluläre Plasmamembran als Hauptsitz, als auch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Funakoshi *et al.*, 2006; Otto *et al.*, 2008; Revankar, *et al.*, 2005).

Analog zu der bereits im *Human Protein Atlas* beschriebenen GPER 1-Expression in verschiedenen Normalgeweben (Tissue expression of GPER 1 - The Human Protein Atlas, 2018) konnten in dieser Studie vergleichbare Färbemuster in zahlreichen gesunden Geweben, wie in Abbildung 3 und 4 gezeigt, detektiert werden. Dabei fanden sich sowohl membranöse als auch zytoplasmatische Immunfärbungen. Vor allem ausgeprägt zeigte sich diese Expression in geschlechtshormon-sensitiven Geweben wie Plazenta, Ovar, Endometrium, Mamma und Prostata aber auch in Niere, Kolon, roter Milzpulpa und in den kleinen Gallengängen ließ sich eine schwache Expression feststellen. Hepatozyten zeigten keine GPER 1-Expression. Abweichend von der im *Human Protein Atlas* beschriebenen schwachen GPER 1-Expression in der Schilddrüse, konnte in dieser Studie keine GPER 1-Expression im Schilddrüsengewebe nachgewiesen werden.

Auch in anderen Studien wurde ein ähnliches GPER 1 Färbemuster beschrieben. So wurden Endometrium (Gao *et al.*, 2011), Myometrium (Maiti *et al.*, 2011) und proximales Tubulusepithel (Cheng *et al.*, 2011; Lindsey *et al.*, 2011) als Gewebe mit einer

membranösen GPER 1-Expression beschrieben. Filardo *et al.* sowie Ignatov *et al.* beschrieben in ihren immunhistochemischen Analysen gesundes Mammaepithel als GPER 1 positiv (Filardo *et al.*, 2006; Ignatov *et al.*, 2013).

Zellexperimentelle Studien wiesen mithilfe von Western Blot und RT-PCR ebenfalls das Vorhandensein von subzellulären GPER 1-Peptidfragmenten und von GPER 1-RNA in Brustdrüsenzellen und anderen Normalgeweben nach (GTEx Portal, 2018; Tissue expression of GPER 1 - The Human Protein Atlas, 2018).

GPER 1 ist als membranständiger G-Protein assoziierter Rezeptor charakterisiert worden (Filardo *et al.*, 2012). Analog dazu wurde in verschiedenen Forschungsgruppen in immunhistochemischen Studien GPER 1 in der zellulären Plasmamembran von Endometrium (Gao *et al.*, 2011), Myometrium (Maiti *et al.*, 2011), renalem Epithel (Cheng *et al.*, 2011; Lindsey *et al.*, 2011), Neuronen des Hippocampus (Funakoshi *et al.*, 2006) und Fisch-Oozyten (Pang *et al.*, 2008; Peyton *et al.*, 2011) lokalisiert. Nichtsdestotrotz wurden Ergebnisse immunhistochemischer Analysen publiziert, die ein überwiegend intrazelluläres Verteilungsmuster des Rezeptors in Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen beschreiben (Edward *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2007, Smith *et al.*, 2009). Nach aktuellem Kenntnisstand erscheint es jedoch nicht ungewöhnlich, einen membranös lokalisierten Rezeptor immunhistochemisch auch im Zytoplasma zu detektieren. Diese intrazelluläre Rezeptor-Retention könnte den langsamen Austritt des Rezeptors während der Rezeptor-Biosynthese als Folge von multiplen regulatorischen Prozessen im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Netzwerk widerspiegeln und auch Ausdruck der Rezeptor-Abwärts-Regulation während der Rezeptor-Wiederaufnahme sein (Filardo *et al.*, 2012). GPER 1 wird mit einer relativ kurzen Halbwertszeit von weniger als 30 Minuten an der Zellmembran abgebaut (Cheng *et al.*, 2011). Trotz der membranösen Rezeptor-Lokalisation ist es deshalb nicht verwunderlich, dass GPER 1 immunhistochemisch deutlich häufiger zytoplasmatisch zu detektieren ist.

Aufgrund der Kongruenz zu publizierten GPER 1-Färbemustern konnte davon ausgegangen werden, dass der Nachweis der GPER 1-Expression in dieser Studie

mithilfe des affinitätsgesäuberten GPER 1-Peptid-Antikörpers auf einer spezifischen immunhistochemischen Färbung beruhte.

## 4.2 Semiquantitative Auswertung der GPER 1-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde Gewebe ohne sichtbare immunhistochemische Färbung als GPER 1 negativ gewertet. Eine vorhandene GPER 1-Expression bezog sich auf eine zytoplasmatische Anfärbbarkeit. Es ist zu hinterfragen, ob bei Gewebe mit einer schwachen GPER 1-Färbung tatsächlich von einer vorhandenen GPER 1-Expression auf Proteinebene auszugehen ist oder ob diese Gewebe aufgrund einer diskreten Hintergrundfärbung der Zellen eher als GPER 1-negativ zu bewerten sind. Beim nukleären Östrogenrezeptor (ER) bedingten erst klinische Erfahrungen über einen langen Zeitraum eine Cut-off-Festlegung. In den Empfehlungen von St. Gallen 2001 wurde erstmals der Grenzwert für Rezeptorpositivität auf 10% festgelegt (Goldhirsch *et al.*, 2001). Heute wird daher im Rahmen der Hormonrezeptor-Bestimmung ein IRS-Wert  $\geq 3$  für den nukleären Östrogenrezeptor als positiv interpretiert und damit als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie angesehen (Goldhirsch *et al.*, 2005). Ignatov *et al.* bewerteten die GPER 1-Expression mit einem immunhistochemischen Score (IHC) von 0 bis 9 Punkten. Dabei definierten sie den Cut-off für eine positive GPER 1-Expression bei  $\geq 3$  Punkten (Ignatov *et al.*, 2011). Sowohl Filardo *et al.* als auch Smith *et al.* bewerteten GPER 1 mit einem Score von 0 bis 3 Punkten (H-Score) und betrachteten nur Tumorgewebe mit einer GPER 1-Expression  $\geq 2$  Punkten als positiv (Filardo *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009). In der Literatur besteht folglich Einigkeit darüber, dass eine schwache positive GPER 1-Färbung keiner tatsächlich bestehenden GPER 1-Expression entspricht. Diese Arbeiten stehen in Diskrepanz zur hier gewählten methodischen Bewertung. Da noch kein etablierter Score zur Bewertung der GPER 1-Expression besteht und um eine mögliche Verzerrung der Ergebnisse im Rahmen der statistischen Auswertung zu vermeiden, wurde hier das ursprüngliche Bewertungsschema des Remmele-Scores angewendet und der Cut-off-Wert für eine GPER 1-Positivität bei IRS  $\geq 1$  angesetzt. Vergleichbar zur stattgefundenen Cut-off-

Anpassung bei der Bewertung des nukleären Östrogenrezeptors bedarf es möglicherweise auch hier valider klinischer Erfahrungswerte bezüglich des Ansprechens auf eine adjuvante endokrine Therapie bei GPER 1-Positivität, um einen adäquaten Cut-off-Wert für den GPER 1-Rezeptor zu etablieren.

Darüber hinaus muss auch bedacht werden, ob der von Remmele und Stegner 1987 entwickelte und klinisch etablierte Immunoreactivity Score adäquat für die Bewertung der GPER 1-Expression ist oder nicht zumindest Anpassungsbedarf besteht (Remmele und Stegner, 1987). In der vorliegenden Arbeit stellte sich die Gruppe der Patientinnen mit einer positiven GPER 1-Expression zwischen einem IRS von 1 bis 4 als größte Untergruppe heraus. Diese Gruppe umfasste 174 Fälle, insgesamt wiesen 245 Fälle eine GPER 1-Positivität auf. In der Gruppe der schwach positiven Fälle imponierten sehr inhomogene Färbeintensitäten. Sowohl ein Fall mit 100% gefärbten Tumorzellen mit schwacher Färbeintensität (Positivity x Staining Intensity = 4 x 1), als auch ein Fall mit 50% gefärbten Tumorzellen mit einer mittleren Färbeintensität (Positivity x Staining Intensity = 2 x 2) erhält einen IRS von 4. In Zusammenschau der ausgewerteten Mammakarzinomfälle müsste jedoch der zweitgenannte Fall subjektiv einen höheren IRS erhalten als der erstgenannte Fall. Mathematisch unmöglich ist bei der Berechnung nach Remmele und Stegner ein IRS von 5. Dieser erscheint jedoch genau für solche Fälle angemessen.

### 4.3 Homogenität des Kollektivs und Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter

In diese Studie wurde ein Kollektiv aus nur postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen mit rein endokriner Therapie einbezogen und retrospektiv analysiert. Weitere Ausschlusskriterien wie R1-Resektion, der Erhalt einer sequentiellen endokrinen Therapie, ER-Negativität, das Vorhandensein eines beidseitigen Mammakarzinoms oder von distanten Filiae garantieren ein sehr homogenes Kollektiv. Außerdem nicht berücksichtigt wurde eine frustrane immunhistochemische Färbung und zu geringe oder fehlende invasive Tumoranteile im untersuchten Gewebe.

Neben der angeführten immunhistochemischen Studie von Ignatov *et al.* aus dem Jahr 2011 existieren nur wenige weitere Untersuchungen, welche sich mit GPER 1 in Brustkrebsgewebe und antihormoneller Therapie befassen (Ignatov *et al.*, 2011). Bisher wurde noch in keiner publizierten Studie ein homogenes Kollektiv aus nur postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen mit rein endokriner Therapie untersucht. Die Stärke des untersuchten Kollektivs ist also seine Homogenität.

Die Tabellen 6 bis 9 geben die Eigenschaften des Patientinnenkollektivs wider. Das Gesamtkollektiv aus GPER 1-positiven und negativen Patientinnen ist mit prognostisch günstigen Einflussvariablen verknüpft. Das Diagnosealter liegt mehrheitlich zwischen 60 und 79 Jahren, zudem zeigt sich überwiegend ein Grading von G1 bis G2 und ein UICC-Stadium von I bis II. Unter allen analysierten Patientinnen konnten 77,4% brusterhaltend operiert werden, 67,4% der Patientinnen erhielten eine Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SNLB). Am Ende der Datenerhebung lebten 81,6% der Patientinnen, 6,5% entwickelten ein Rezidiv und 18,4% verstarben.

Alle in diese Studie eingeschlossenen Patientinnen wurden mit einer endokrinen Therapie entweder mit Tamoxifen<sup>®</sup> oder mit einem Aromataseinhibitor behandelt. Tamoxifen<sup>®</sup> erhielt im Jahr 1970, die ersten Aromataseinhibitoren wie Anastrozol (Arimidex<sup>®</sup>) dagegen erhielten erst ab 1996 die Marktzulassung (Fachinformation Online Tamoxifen<sup>®</sup> ratiopharm<sup>®</sup>, 2017; Fachinformation Online Arimidex<sup>®</sup>, 2014). Aufgrund von Studienergebnissen aus fünf großen Phase-III-Studien (ATAC- und BIG-I-98-Studien, IES-031 und ABSCG-8/ARNO 95, MA 17-Studie), die die verschiedenen endokrinen

Therapiekonzepte miteinander in ihrer Wirksamkeit verglichen, wurde in der S3-Leitlinien Mammakarzinom im Jahr 2006 die Indikation zur adjuvanten endokrinen Therapie mit Aromataseinhibitoren spezifiziert (Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2004; Goss *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2004, Howell *et al.*, 2005; Jakesz *et al.*, 2005; Kaufmann *et al.*, 2005, 2013; S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2006). Damit lässt sich erklären, dass im definierten Kollektiv in den Jahren 2003 bis 2006 nur wenige Patientinnen einen Aromatasehemmer erhielten (< 20%, Abbildung 5). Im Verlauf des Untersuchungszeitraums zeigt sich ein Abfall in der Behandlungshäufigkeit mit Tamoxifen® zugunsten eines Anstiegs der Aromataseinhibitor-Therapie (Abbildung 5).

In der Detailanalyse zeigten diejenigen Patientinnen, bei denen immunhistochemisch eine GPER 1-Positivität nachweisbar war, günstigere klinisch-pathologische Parameter im Vergleich zu den GPER 1-negativen Patientinnen. So war die GPER 1-positive Gruppe nicht nur im Mittel jünger, sondern wies auch ein niedrigeres UICC-Stadium und Grading auf (Tabelle 6 - 9). Unter den ausschließlich GPER 1-positiv identifizierten Patientinnen zeigte sich eine vergleichbare Verteilung bezüglich der unterschiedlichen endokrinen Therapie. Mit einem Aromataseinhibitor wurden 99 Patientinnen behandelt, 146 Patientinnen erhielten Tamoxifen®. Es lässt sich feststellen, dass im Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter die Gruppe mit Aromataseinhibitor-Monotherapie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht nur älter war als die Gruppe mit Tamoxifen®-Monotherapie, sondern auch zusätzlich mehr prognostisch ungünstige Eigenschaften aufwies (Tabelle 10 - 13). Die Gruppe der Patientinnen mit Aromataseinhibitor-Monotherapie zeigte signifikant häufiger ein höheres UICC-Stadium sowie ein höheres Grading und erhielt demzufolge auch häufiger eine Ablatio bzw. Axilladisektion.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich das untersuchte Kollektiv aufgrund seiner homogenen Zusammensetzung sowie der Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter hinreichend dafür eignet, um den Einfluss der endokrinen Therapie auf das Überleben der GPER 1-positiven Mammakarzinom-Patientin zu untersuchen.

## 4.4 Überlebensanalysen

Laut Krebsregisterbericht des Robert-Koch-Instituts beträgt die absolute 5-Jahres-Überlebensrate über alle Mammakarzinom-Stadien 79% (Robert-Koch-Institut, 2017). Die 5-Jahres-Überlebensrate des in dieser Studie untersuchten Patientinnenkollektivs betrug 90%. Diese überdurchschnittlich gute Überlebensrate kam durch die strenge Selektion der eingeschlossenen Mammakarzinompatientinnen zustande und spiegelt deren positiven prognostischen Eigenschaften wider (Abbildung 6).

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in OS und RFS zwischen GPER 1-positiven und GPER 1-negativen Patientinnen nachweisen (OS:  $p = 0,072$ ; RFS:  $p = 0,38$ ; Abbildung 7 und Abbildung 9A). GPER 1 eignet sich somit im Gegensatz zu dem ER- bzw. PR-Status also nicht als prognostischer Marker.

Des Weiteren ließ sich in unserer Untersuchung kein signifikanter Unterschied im OS zwischen den GPER 1-positiven Patientinnen mit Tamoxifen<sup>®</sup>-Therapie und den GPER 1-negativen Patientinnen mit Tamoxifen<sup>®</sup>-Therapie finden (OS:  $p = 0,635$ ; Abbildung 8A). In Analogie zu den hier dargestellten Ergebnissen konnten Ignatov *et al.* ebenfalls keinen Vorteil für das Gesamtüberleben von Patientinnen unter Tamoxifen<sup>®</sup>-Therapie in Bezug auf die GPER 1-Expression nachweisen. Jedoch zeigten die publizierten Ergebnisse ein signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben der GPER 1-positiven Patientinnen unter adjuvanter Tamoxifen<sup>®</sup>-Therapie (Ignatov *et al.*, 2011). Dies ließ sich in unserer Studie nicht nachweisen (RFS:  $p = 0,336$ ; Abbildung 9B). Als mögliche Ursache für diese Diskrepanz kann einerseits das für diese Studie streng selektierte Kollektiv mit günstigen prognostischen Eigenschaften und daraus resultierender niedriger Rezidivrate angesehen werden. Andererseits sind die beiden Studien aufgrund differierender Scoringsysteme für die GPER 1-Expression nur eingeschränkt vergleichbar. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Überlebensunterschied im OS der GPER 1-positiven Patientinnen mit AI-Therapie im Vergleich zu den GPER 1-negativen Patientinnen mit AI-Therapie ( $p = 0,048$ ; Abbildung 8B). Die Kombination aus GPER 1-Positivität und Aromataseinhibitor-Therapie scheint also einen Überlebensvorteil zu bringen.

In der Untersuchung der GPER 1-positiven Patientinnen in Abbildung 10 und 11 ließ sich kein signifikanter Unterschied in OS und RFS zwischen Tamoxifen®-behandelten Patientinnen und AI-behandelten Patientinnen finden (OS:  $p = 0,934$ ; RFS:  $p = 0,126$ ). Der gleichartige Verlauf im OS erstaunt, da sich Patientinnen mit AI-Therapie in unserer Kollektivanalyse als das deutlich kränkere Kollektiv darstellten und sich dieser Unterschied im OS im Vergleich zum Tamoxifen®-behandelten gesünderen Kollektiv aufzeigen lassen müsste. Schlussfolgernd muss es Faktoren geben, die dem AI-behandelten Kollektiv trotz seiner klinisch-pathologischen Parameter zu einem dem Tamoxifen®-Kollektiv vergleichbaren Gesamtüberleben verhelfen.

Die Bewertung der Aromataseinhibitor-Therapie als möglichen Einflussfaktor auf das OS der GPER 1-positiven Patientinnen erfolgte mittels Cox-Regressionsanalyse. In dieser ließ sich für GPER 1-positive Patientinnen mit Aromataseinhibitor-Therapie im Vergleich zur Tamoxifen®-Therapie eine Reduktion des Risikos frühzeitig zu versterben um 34% feststellen. Dieser Überlebensvorteil war jedoch bei einem Signifikanzniveau von  $p = 0,348$  nur als Trend zu werten.

In einer Subgruppenanalyse wurden explizit Diagnosealter und das UICC-Stadium weiter untersucht, da aufgrund der Signifikanzen und Trends, diese den plausibelsten Einfluss vermuten ließen. Die Korrelation aus GPER 1-Positivität und Altersklasse 60 - 79 Jahre sowie UICC-Stadium II - III lieferte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der beiden endokrinen Therapien (Abbildung 13).

Bei GPER 1-Negativität scheint eine Tamoxifen®-Therapie einen Überlebensvorteil im Vergleich zur Aromataseinhibitor-Therapie zu bringen. So zeigte sich in der Kaplan-Meier-Analyse unter den GPER 1-negativen Patientinnen ein Vorteil im OS nahe am Signifikanzniveau ( $p = 0,058$ ) zugunsten einer Tamoxifen®-Therapie (Abbildung 15). Zusätzlich zeigte das adjustierte Cox-Regressionsmodell ein fünffach erhöhtes Risiko im OS bei Aromatase-Hemmung im Vergleich zur Tamoxifen®-Therapie (HR, 4,901; 95%-KI, 1,315 - 18,270;  $p = 0,018$ ; Abbildung 16). Hieraus lässt sich ableiten, dass GPER 1-negative Patientinnen nicht von einer Aromataseinhibitor-Einnahme profitieren. In Anbetracht bereits publizierter Ergebnisse von Ignatov *et al.*, die die GPER 1-Expression als Risikofaktor für die Entstehung der erworbenen Tamoxifen®-Resistenz identifiziert

haben (Ignatov *et al.*, 2011), ist zu vermuten, dass bei fehlender GPER 1-Expression Tamoxifen® seine tumorwachstumshemmende Wirkung entfalten kann. Dieser Zusammenhang spiegelt sich in dem signifikant besseren Überleben der hier untersuchten GPER 1-negativen Patientinnen unter Tamoxifen®-Therapie wider.

Die in dieser Studie untersuchte Fragestellung basierte auf bereits im Vorfeld durchgeführte Zellanalysen, die Tamoxifen® als GPER 1-Agonist und Tumorwachstumsstimulator identifiziert haben (Filardo *et al.*, 2000; Ignatov *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2005; Vivacqua *et al.*, 2006). Davon ausgehend scheint angesichts der Ergebnisse dieser Studie tatsächlich nun auch *in vivo* die adjuvante AI-Therapie im Vergleich zur Tamoxifen®-Therapie einen Überlebensvorteil für GPER 1-positive, rein endokrin behandelte Patientinnen zu bedeuten. Folglich kann der GPER 1-Expression möglicherweise eine prädiktive Aussagekraft in Bezug auf die Wahl der endokrinen Therapie zugeschrieben werden.

#### **4.5 Prospektive Untersuchung des Überlebensvorteils**

Die Erkenntnisse aus dieser erstmalig durchgeführten retrospektiven Analyse legen nahe, dass die GPER 1-Expression ein wichtiger Parameter für die klinische Entscheidungsfindung in Bezug auf die Wahl des adjuvanten endokrinen Therapieregimes für die postmenopausale Mammakarzinom-Patientin darstellt. So konnte gezeigt werden, dass Mammakarzinom-Patientinnen zwischen 60 und 79 Jahren und UICC-Stadium  $\geq$  II mit GPER 1-Expression von der Therapie mit einem Aromataseinhibitor mehr profitieren als von der Tamoxifen®-Einnahme. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass das Überleben der GPER 1-exprimierenden postmenopausalen Mammakarzinom-Patientin durch die Vermeidung einer Tamoxifen®-Resistenz verlängert werden kann. Infolge der für diese Studie sorgfältig gewählten Ausschlusskriterien konnte allerdings ein nur relativ kleines homogenes Kollektiv mit einer relativ hohen 5-Jahres-Überlebensrate von 90% bei einer mittleren Follow-up-Zeit von 6,2 Jahren untersucht werden. Dies hat zur Folge, dass ein Überlebensvorteil für GPER 1-

positive Patientinnen mit AI-Therapie lediglich nahe des Signifikanzniveaus gefunden werden konnte. Für eine valide statistische Auswertung des rezidivfreien Überlebens erwies sich die Fallzahl als zu gering. Daher sollten zukünftige Untersuchungen auf der Basis eines prospektiven Studiendesigns an einem größeren rein endokrin behandelten Kollektiv aus postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen erfolgen, um die oben dargestellten Ergebnisse zu verifizieren. Für den Nachweis der GPER 1-Expression in Paraffin-eingebettetem Mammakarzinomgewebe ist die hier verwendete immunhistochemische Detektionsmethode sicherlich praktikabel, valide und reproduzierbar. Im Rahmen der Auswertung der GPER 1-Expression kann zusätzlich der Cut-off-Wert für GPER 1-Positivität von  $IRS \geq 1$  bezüglich einer Veränderung hin zu höheren IRS-Werten evaluiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist mit jährlich 1,4 Millionen Neuerkrankungen weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung und ebenso mit jährlich 460.000 Todesfällen weltweit die häufigste durch ein Malignom bedingte Todesursache der Frau (Jemal *et al.*, 2011). Die Entschlüsselung molekularer Mechanismen der Brustkrebsentstehung und –ausbreitung hat im vergangenen Jahrzehnt das Primärmanagement und die Behandlung dieser Tumorerkrankung verändert. Dennoch stellt der Hormonrezeptorstatus (Expression der nukleären Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  und des Progesteronrezeptors) eine seit dem 20. Jahrhundert bis heute entscheidende biologische Eigenschaft des primären Mammakarzinoms dar und ist prädiktiv für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie (Knight *et al.*, 1980).

Der membranständige, G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor GPER 1, welcher in über der Hälfte der Mammakarzinome exprimiert wird und den nicht-genomischen Signalweg des Östrogens vermittelt, wurde im Jahr 2005 erstmals charakterisiert (Thomas *et al.*, 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass Tamoxifen<sup>®</sup>, ein in der endokrinen Therapie mit am häufigsten verwendeter Antagonist an den nukleären Östrogenrezeptoren, als Agonist am GPER 1 vermehrtes Tumorzellwachstum zu stimulieren vermag. Mit Tamoxifen<sup>®</sup> behandelte, GPER 1-positive Patientinnen wiesen ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben auf im Vergleich zu denjenigen, die Aromatasehemmer erhielten (Ignatov *et al.*, 2010; Ignatov *et al.*, 2011).

In dieser retrospektiven Studie wurde die Expression von GPER 1 immunhistochemisch im Mammakarzinom-Gewebe von 337 postmenopausalen Patientinnen evaluiert und in Relation zur endokrinen Therapie mit der Gesamtüberlebensrate sowie dem rezidivfreien Überleben korreliert. Unter den Patientinnen, die einen Aromataseinhibitor im Rahmen der endokrinen Therapie erhielten, hatten diejenigen Frauen mit nachgewiesener GPER 1-Expression in der Analyse nach Kaplan-Meier ein signifikant längeres Gesamtüberleben im Vergleich zu den Patientinnen im GPER 1-negativen Kollektiv ( $p = 0,048$ ). Im Vergleich der GPER 1-positiven Patientinnen zeigte sich zwar kein statistisch signifikanter Überlebensvorteil, jedoch aber ein Trend zugunsten der Aromataseinhibitor-Therapie im

Vergleich zu Tamoxifen® ( $p = 0,348$ ). In der Gruppe der GPER 1-negativen Patientinnen fand sich hingegen in der multivariaten Analyse ein signifikantes, fünffach erhöhtes Risiko zu versterben für diejenigen Frauen, die einen Aromataseinhibitor erhielten im Vergleich zu den Mammakarzinom-Patientinnen mit Tamoxifen®-Therapie (HR, 4,901; 95%-KI, 1,315 - 18,270;  $p = 0,018$ ).

Diese Studie untersucht erstmals die Bedeutung der GPER1-Expression in einem homogenen Kollektiv aus rein endokrin behandelten, postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen im Hinblick auf das Überleben in Relation zum gewählten endokrinen Therapeutikum (Aromataseinhibitor vs. Tamoxifen®). Sie zeigt, dass GPER 1 durchaus eine prädiktive Aussagekraft besitzt und dass bei der Wahl des endokrinen Therapieregimes für die Behandlung des hormonsensitiven Mammakarzinoms neben dem Menopausenstatus und dem individuellen Risikoprofil der Patientin auch die GPER 1-Expression eine entscheidende Bedeutung zu haben scheint.

## 6. Anhang

### 6.1 TNM-Klassifikation

Tabelle 16: TNM-Klassifikation nach UICC Kriterien

<b>T - Tumorausdehnung</b>	
<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>Tis (DCIS)</b>	Duktales Carcinoma in situ
<b>Tis (LCIS)</b>	Lobuläres Carcinoma in situ
<b>Tis (Paget)</b>	M- Paget der Mamille ohne nachweisebaren Tumor
<b>T1</b>	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	T1 mic      Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	T1a            Mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
	T1b            Mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
	T1c            Mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
<b>T2</b>	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
<b>T3</b>	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
<b>T4</b>	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, soweit unter T4a bis T4b beschrieben
	T4a            Ausdehnung auf Brustwand
	T4b            Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut) oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust
	T4c            Kriterien 4a und 4b gemeinsam
	T4d            Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
<b>N – Regionäre Lymphknoten</b>	
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z.B. vor klinischer Klassifikation bioptisch entfernt)
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen

<b>N1</b>	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten (nachgewiesen durch Wächterlymphknotenuntersuchung)	
<b>N2</b>	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in <i>Abwesenheit</i> klinisch erkennbarer axillärer Lymphknoten	
	N2a	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
	N2b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen (nachgewiesen durch Wächter-Lymphknotenuntersuchung)
<b>N3</b>	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria in <i>Abwesenheit</i> klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen oder Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder der Lymphknoten entlang der A. mammaria interna	
	N3a	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
	N3b	Metastase(n) in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen (nachgewiesen durch Schildwächterlymphknotenuntersuchung)
	N3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
<b>M - Fernmetastasen</b>		
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen	
<b>M1</b>	Fernmetastasen	

**T** (Primärtumor), **N** (regionale Lymphknoten), **M** (Metastase)

**Referenz:** übernommen von Wittekind und Meyer, 2010.

## 6.2 Gradingssystem

Tabelle 17: Grading des Mammakarzinoms

	<b>Kriterien</b>		<b>Scorewerte</b>
<b>Tubulusbildung</b>	> 75%		1
	10 - 75%		2
	< 10%		3
<b>Kernpolymorphie</b>	gering		1
	mäßig		2
	stark		3
<b>Mitoserate *</b> (Mitosen/10 HPF)	SFZ 25	SFZ 20	
	0 -10	0 - 8	1
	11 - 20	9 - 16	2
	> 20	> 16	3
Summenscore: 3 bis 9			
<b>Summenscore</b>	<b>Grading</b>		<b>Definition</b>
3, 4, 5	G1		gut differenziert
6, 7	G2		mäßig differenziert
8, 9	G3		schlecht differenziert
*Die angegebenen Mitosen beziehen sich auf die Diagnostik-Mikroskope Leica DMLB und Leica DMI mit dem 40x-Objektiv und 10xOkularen mit der Sehfeldzahl (SFZ) 25 bzw. 20. <i>High Power Field</i> (Hauptgesichtsfeld, HPF)			

**Referenz:** übernommen von Elston und Ellis, 1991

### 6.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms
- Tab. 2: Patientinnenkollektiv: Ein- und Ausschlusskriterien
- Tab. 3: Remmele-Score
- Tab. 4: GPER 1-Expression im Normalgewebe
- Tab. 5: Verteilung des Immunoreactivity Score (IRS)
- Tab. 6: Vergleich des GPER 1-Status in Relation zum Alter und zu pathologischen Parametern
- Tab. 7: Vergleich des GPER 1-Status in Relation zur Rezeptor-Expression
- Tab. 8: Vergleich des GPER 1-Status in in Relation zur Therapie
- Tab. 9: Vergleich des GPER 1-Status in Relation zur Rezidivhäufigkeit und zum Überleben
- Tab. 10: Vergleich der endokrinen Therapie in Relation zum Alter und zu pathologischen Parametern bei GPER 1-Positivität
- Tab. 11: Vergleich der endokrinen Therapie in Relation zur Rezeptor-Expression bei GPER 1-Positivität
- Tab. 12: Vergleich der endokrinen Therapie in Relation zur lokalen Tumorbehandlung bei GPER 1-Positivität
- Tab. 13: Vergleich der endokrinen Therapie in Relation zur Rezidivhäufigkeit und zum Überleben bei GPER 1-Positivität
- Tab. 14: Cox-Regressionsanalyse der GPER 1-positiven Patientinnen für das Gesamtüberleben
- Tab. 15: Cox-Regressionsanalyse der GPER 1-negativen Patientinnen für das Gesamtüberleben
- Tab. 16: TNM-Klassifikation
- Tab. 17: Grading

## 6.4 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Zusammenstellung des Patientinnen-Kollektivs mit Darstellung der Ausschlusskriterien. (AI: Aromataseinhibitor; ICH: Immunhistochemie; CHT: Chemotherapie; IRS: Immunoreaktiver Score)
- Abb. 2: Schema der Polymer-basierten Färbemethode mit dem gegen GPER 1 gerichteten Primärantikörper GPR30(K-19)R (*sc-48524-R*, *rabbit polyclonal* IgG, Santa Cruz Biotechnology). Das Detektionssystem (EnVision™ peroxidase polymer system, Dako) enthält ein Rückgrat aus einer Dextrankette, an die neben verschiedenen Meerrettichperoxidase-Molekülen auch *anti-rabbit* und *anti-mouse* spezifische IgG als Sekundärantikörper angeheftet sind.
- Abb. 3: Immunhistochemische Bestimmung der GPER 1-Expression in verschiedenen Normalgeweben (10-fache Vergrößerung)
- Abb. 4: Immunhistochemische Bestimmung der GPER 1-Expression in Mammakarzinom-Geweben und gesundem Mammaparenchym (20-fache Vergrößerung)
- Abb. 5: Antihormontherapie in in Relation zum Diagnosejahr.
- Abb. 6: Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier
- Abb. 7: Kaplan-Meier-Funktion zum Vergleich des Gesamtüberlebens in Relation zum GPER 1-Status
- Abb. 8: Kaplan-Meier-Funktion zum Vergleich des Gesamtüberlebens bei Tamoxifen®-Monotherapie (A) bzw. Aromataseinhibitor-Therapie (B) in Relation zum GPER 1-Status
- Abb. 9: Kaplan-Meier-Funktion zum Vergleich der Rezidivraten im Gesamtkollektiv (A), bei Tamoxifen®-Monotherapie (B) bzw. Aromataseinhibitor-Therapie (C) in Relation zum GPER 1-Status
- Abb. 10: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion zum Vergleich des Gesamtüberlebens der GPER 1-positiven Patientinnen (A) und in Relation zur endokrinen Therapie (B)

- Abb. 11: Kaplan-Meier-Funktion zum Vergleich der Rezidivraten der GPER 1-positiven Patientinnen (A) und in Relation zur Therapie (B)
- Abb. 12: Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens der GPER 1-positiven Patientinnen in Relation zur endokrinen Therapie
- Abb. 13: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse und Cox-Regressionsanalyse der GPER 1-positiven Patientinnen zwischen 60-79 Jahren mit UICC-Stadium II-III in Relation zur endokrinen Therapie
- Abb. 14: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion zum Vergleich des Gesamtüberlebens der GPER 1-negativen Patientinnen in Relation zur endokrinen Therapie
- Abb. 15: Cox-Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens der GPER 1-negativen Patientinnen in Relation zur endokrinen Therapie

## 6.5 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABSCG-8	Austrian Breast – and Colorectal Cancer Study Group
AI	Aromataseinhibitor
<i>al.</i>	<i>alii</i> (deutsch: weitere)
ALND	Axilladissektion
ARNO 95	Arimidex® versus Nolvadex®
ATAC	Anastrozol® Tamoxifen® Alone or in Combination
BET	Brusterhaltende Tumorentfernung
BIG-I-98	Breast International Group
BRCA1/2	Mutierte Tumorsuppressorgene
bzw.	beziehungsweise
<i>ca.</i>	zirka
CHT	Chemotherapie
cm	Zentimeter
DAB <sup>+</sup>	3,3'-Diaminobenzidin
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
Dr.	Doktor
EBCTCG	Early breast cancer trialists' collaborative group
ER	Östrogenrezeptor
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Östrogenrezeptor $\beta$
e.V.	Eingetragener Verein
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Grading
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GP <sub>ER</sub> 1	G-Protein coupled estrogen receptor 1
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HER2	Epidermal growth factor receptor

H&E	Hämatoxylin und Eosin
HPF	Haupt Gesichtsfeld
HR	Hazard ratio
HRP	Meerrettichperoxidase
IES 031	Intergroup Exemestane Study
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunoreactivity-Score
kA	keine Angabe
KI	Konfidenzintervall
Ki-67	Proliferationsindex
kum	kumuliert
L	Lymphbahninvasion
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LK	Lymphknoten
M	Molar
M	Fernmetastasen
MCF 7	Michigan Cancer Foundation – 7 (Brustkrebs-Zelllinie)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
Min.	Minuten
max	maximal
mm	Milimeter
N	Regionäre Lymphknotenmetastasen
n	Anzahl
neg.	negativ
OP	Operation
OS	Overall survival
P	Positivity
p-Wert	Probability, Signifikanzwert

pAb	Polyklonaler Antikörper
PBSO	bilaterale Salpingoovarektomie
PBM	bilaterale Mastektomie
pH	Potentia hydrogenii
pos.	positiv
PR	Progesteronrezeptor
Priv.-Doz.	Privat-Dozent
Prof.	Professor
R	Residualtumor
RFS	Rezidiv-freies Überleben
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid
RR	Relatives Risiko
RS	Recurrence Score
RT-PCR	Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion
SERM	selektiven Östrogenrezeptormodulator
SFZ	Sehfeldzahl
SI	Staining Intensity
SN	Sentinel-Lymphknoten
SNLB	Sentinel-Lymphknotenbiopsie
T	Tumorausdehnung
TBS	Trispuffer-Lösung
TNM	Klassifikation zum Staging von Tumoren
UICC	Union for International Cancer Control
V	Blutgefäßinvasion
v.a.	vor allem
vs.	versus
zw.	zwischen
°C	Grad Celsius
%	Prozent

## 7. Quellenverzeichnis

Ariazi, E. A., Brailoiu, E., Yerrum, S., Shupp, H. A., Slifker, M. J., Cunliffe, H. E., Black, M.A., Donato, A.L., Arterburn, J.B., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Dun, N.J., Jordan, V. C. (2010). The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, 70(3), 1184–1194. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3068>

Berry, D. A., Cronin, K. A., Plevritis, S. K., Fryback, D. G., Clarke, L., Zelen, M., Mandelblatt, J. S., Yakovlev, A. Y., Habbema, J. D. F., Feuer, E. J., Cancer Intervention and Surveillance Modeling Network (CISNET) Collaborators. (2005). Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353(17), 1784–1792. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050518>

Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, Thürlimann, B., Keshaviah, A., Coates, A. S., Mouridsen, H., Mauriac, L., Forbes, J. F., Paridaens, R., Castiglio, M., Gelber, R., Rabaglio, M., Smith, I., Wardley, A., Price, K. N., Goldhirsch, A. (2005). A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353(26), 2747–2757. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052258>

Breckwoldt, M., Kaufmann, M., Goetz, M., Pfeleiderer, A., Gätje, R. (2008). Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme, Stuttgart, Deutschland. 5. Auflage. 241-246. 9783131676559/p/000000009951464505

Broselid, S., Cheng, B., Sjostrom, M., Lovgren, K., Klug-De Santiago, H. L. P., Belting, M., Jirstrom, K., Malmstrom, P., Olde, B., Bendahl, P.O., Hartman, L., Fernö, M. Leeb-Lundberg, L. M. F. (2013). G Protein-Coupled Estrogen Receptor Is Apoptotic and Correlates with Increased Distant Disease-Free Survival of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 19(7), 1681–1692. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2376>

Chan, Q. K. Y., Lam, H.-M., Ng, C.-F., Lee, A. Y. Y., Chan, E. S. Y., Ng, H.-K., Ho, S. M., Lau, K.-M. (2010). Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G2 cell-cycle arrest. *Cell Death and Differentiation*, 17(9), 1511–1523. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.20>

Cheng, S.B., Graeber, C.T., Quinn, J.A., Filardo, E.J. (2011). Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids* 76,892–896 <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.018>

Cheng, S.-B., Quinn, J. A., Graeber, C. T., Filardo, E. J. (2011). Down-modulation of the G-protein-coupled Estrogen Receptor, GPER, from the Cell Surface Occurs via a *trans*-Golgi-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22441–22455. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.224071>

Coombes, R. C., Hall, E., Gibson, L. J., Paridaens, R., Jassem, J., Delozier, T., Jones S.E., Alvarez I., Bertelli G., Ortmann O., Coates A.S., Bajetta E., Dodwell D., Coleman R.E., Fallowfield L.J., Mickiewicz E., Andersen J., Lønning P.E., Cocconi G., Stewart A., Stuart N., Snowdon C.F., Carpentieri M., Massimini G., Bliss J.M., van de Velde C.; Intergroup Exemestane Study. (2004). A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350(11), 1081–1092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040331>

Coombes R.C., Hall E., Snowdon C.F., Bliss J.M. (2004). The Intergroup Exemestane Study: a randomized trial in postmenopausal patients with early breast cancer who remain disease-free after two to three years of tamoxifen—updated survival analysis, SABCS 2004, No 3.

Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V., Abraham, M., Medeiros Alencar, V., Badran, A., Bonfill, X., Bradbury, J., Clarke, M., Collins, R., Davies, S.R., Delmestri, A., Forbes J.F., Haddad, P., Hou, M.F., Inbar, M., Khaled, H., Kielanowska, J., Kwan, W.H., Mathew, B.S., Müller, B., Nicolucci, A., Peralta, O., Pernas, F., Petruzella, L., Pienkowski, T., Rajan, B., Rubach, M. T., Tort, S., Urrutia, G., Valentini, M., Wang, Y., Peto, R. (2013). 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*, 381(9869), 805–816. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61963-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61963-1)

Dick, G. M. (2002). The pure anti-oestrogen ICI 182,780 (Faslodex™) activates large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 136(7), 961–964. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704807>

Dopp, E., Vollmer, G., Hahnel, C., Grevesmühl, Y., Schiffmann, D. (1999). Modulation of the intracellular calcium level in mammalian cells caused by 17β-estradiol, different phytoestrogens and the anti-estrogen ICI 182780. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 68(1–2), 57–64. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(98\)00158-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(98)00158-7)

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)*, 365(9472), 1687–1717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0)

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies, C., Godwin, J., Gray, R., Clarke, M., Cutter, D., Darby S., McGale P., Pan H. C., Taylor C., Wang Y. C., Dowsett M., Ingle J., Peto, R. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England)*, 378(9793), 771–784.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60993-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60993-8)

Elston, C. W., Ellis, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403–410.

Fasching, P. A., Fehm, T., Janni, W., Kümmel, S., Lüftner, D., Lux, M. P., & Maass, N. (2010). Aktuelle Therapie der Patientin mit einem Mammakarzinom. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 70(11), 875–886.  
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1250437>

Filardo, E. J. (2002). Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80(2), 231–238.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00190-X](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00190-X)

Filardo, Edward J., Graeber, C. T., Quinn, J. A., Resnick, M. B., Giri, D., DeLellis, R. A., Steinhoff, M. M., Sabo, E. (2006). Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(21), 6359–6366.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0860>

Filardo, Edward J., Thomas, P. (2012). Minireview: G Protein-Coupled Estrogen Receptor-1, GPER-1: Its Mechanism of Action and Role in Female Reproductive Cancer, Renal and Vascular Physiology. *Endocrinology*, 153(7), 2953–2962.  
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1061>

Filardo, E.J., Quinn, J. A., Bland, K. I., Frackelton, A. R. J. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*, 14, 1649-1660

Franco, R., Boscia, F., Gigantino, V., Marra, L., Esposito, F., Ferrara, D., Pariante, P., Botti, G., Caraglia, M., Chieffi, P. (2011). GPR30 is overexpressed in post-puberal testicular germ cell tumors. *Cancer Biology & Therapy*, 11(6), 609–613.

Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M. M., Mizukami, Y. (2006). G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(3), 904–910.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.191>

Gao, F., Ma, X., Ostmann, A. B., Das, S. K. (2011). GPR30 activation opposes estrogen-dependent uterine growth via inhibition of stromal ERK1/2 and estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) phosphorylation signals. *Endocrinology*, 152(4), 1434–1447. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1368>

Geisler, J., King, N., Anker, G., Ornati, G., Di Salle, E., Lønning, P. E., Dowsett, M. (1998). In vivo inhibition of aromatization by exemestane, a novel irreversible aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 4(9), 2089–2093.

Giersiepen, K., Heitmann, C., Janhsen, K., Lange, C. (2005). Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Heft 25, Brustkrebs. Robert-Koch-Institut, Berlin, Deutschland.

Goldhirsch, A., Glick, J. H., Gelber, R. D., Coates, A. S., Senn, H. J. (2001). Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(18), 3817–3827. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.18.3817>

Goldhirsch, A., Glick, J. H., Gelber, R. D., Coates, A. S., Thürlimann, B., Senn, H.-J., Panel members. (2005). Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 16(10), 1569–1583. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi326>

Goss, P. E., Ingle, J. N., Martino, S., Robert, N. J., Muss, H. B., Piccart, M. J., Castiglione M., Tu D., Shepherd L.E., Pritchard K.I., Livingston R.B., Davidson N.E., Norton L., Perez E.A., Abrams J.S., Therasse P., Palmer M.J. Pater, J. L. (2005). Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(17), 1262–1271. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji250>

Gray, R. G., Rea, D., Handley, K., Bowden, S. J., Perry, P., Earl, H. M., Poole, C.J., Bates, T., Chetiyawardana, S., Dewar, J.A., Fernando, I.N., Grieve, R., Nicoll; J., Rayter, Z., Robinson, A., Salman, A., Yarnold, J., Bathers, S., Marshall, A., Lee, M. (2013). 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*, 31(18\_suppl), 5–5. [https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.18\\_suppl.5](https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.18_suppl.5)

GTEEx Portal. Abgerufen 8. August 2018, von <https://gtexportal.org/home/gene/GPER1>

Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., ... American Society of Clinical Oncology. (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(33), 5287–5312.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.2364>

Howell, A., Cuzick, J., Baum, M., Buzdar, A., Dowsett, M., Forbes, J. F., Hocht-Boes G., Houghton J., Locker G.Y., Tobias J.S., ATAC Trialists' Group. (2005). Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet (London, England)*, 365(9453), 60–62.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17666-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17666-6)

Howell, A. on behalf of the ATAC Trialist' Group (2004) The ATAC trial in postmenopausal women with early breast cancer – updated efficacy results based on a median follow-up of 5 years. SABCS, No 1

Ignatov, A., Ignatov, T., Roessner, A., Costa, S. D., Kalinski, T. (2010). Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(1), 87–96.

<https://doi.org/10.1007/s10549-009-0624-6>

Ignatov, A., Ignatov, T., Weissenborn, C., Eggemann, H., Bischoff, J., Semczuk, A., Roessner, A., Costa, S.D., Kalinski, T. (2011). G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(2), 457–466.

<https://doi.org/10.1007/s10549-011-1584-1>

Ignatov, T., Weißenborn, C., Poehlmann, A., Lemke, A., Semczuk, A., Roessner, A., Costa, S.D., Kalinski, T., Ignatov, A. (2013). GPER-1 Expression Decreases During Breast Cancer Tumorigenesis. *Cancer investigation*, 31, 309–315.

<https://doi.org/10.3109/07357907.2013.789901>

Jakesz, R., Jonat, W., Gnant, M., Mittlboeck, M., Greil, R., Tausch, C., Hilfrich, J., Kwasny, W., Menzel, C., Samonigg, H., Seifert, M., Gademann, G., Kaufmann, M., ABCSG and the GABG. (2005). Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet (London, England)*, 366(9484), 455–462.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67059-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67059-6)

Janni, W., Kühn, T., Schwentner, L., Kreienberg, R., Fehm, T., Wöckel, A. (2014). Sentinel Node Biopsy and Axillary Dissection in Breast Cancer. *Deutsches Ärzteblatt International*, 2014; 111(14), 244-9.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90.  
<https://doi.org/10.3322/caac.20107>

Kaufmann, M., Costa, S. D., Scharl, A. (Hrsg.). (2013). *Die Gynäkologie* (3., vollst. überarb. und erw. Aufl). Berlin: Springer Medizin.

Kaufmann M., Jakesz R., Gnant M. (2005). Benefits of switching postmenopausal women with hormone-sensitive early breast cancer to anastrozole after 2 years adjuvant tamoxifen: combined results from 3123 women enrolled in the ABCSG Trial 8 and the ARNO 95. *Breast Cancer Res.* 14, 81

Kennecke, H. F., Ellard, S., O'Reilly, S., Gelmon, K. A. (2006). New guidelines for treatment of early hormone-positive breast cancer with tamoxifen and aromatase inhibitors | *BC-Medical Journal*. 48(3), 121-126.

Knight, 3rd WA, Osborne, C. K., Yochmowitz, M. G., & McGuire, W. L. (1980). Steroid hormone receptors in the management of human breast cancer. *Annals of Clinical Research*, 12(5), 202–207.

Kommission Mamma, Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (2021). Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs. Abgerufen 01.12. 2021, von [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom\\_4\\_0/Version\\_4.4/LL\\_Mammakarzinom\\_Langversion\\_4.4.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.4.pdf)

Kreienberg, R., Albert, U., Follmann, M., Kopp, I., Kühn, T., Wöckel, A. (2013). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*, 10(03), 164–192.  
<https://doi.org/10.1055/s-0033-1355476>

Kundt, G., Krentz, H., Glass, Ä. (2014). *Epidemiologie und Medizinische Biometrie: Eine kurzgefasste übersichtliche Einführung mit Prüfungsfragen und Übungsaufgaben* von Günther Kundt; Helga Krentz; Änne Glass: Shaker Verlag 9783844013986, European-Media-Service Mannheim.

Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Deutsche Krebshilfe e.V. (2006). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. c/o Deutsche Krebsgesellschaft e.V.

Lindsey, S. H., Yamaleyeva, L. M., Brosnihan, K. B., Gallagher, P. E., Chappell, M. C. (2011). Estrogen Receptor GPR30 Reduces Oxidative Stress and Proteinuria in the Salt-Sensitive Female mRen2 Rat. *Hypertension*, 58(4), 665–671.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175174>

Lønning, P. E. (1998). Pharmacology of new aromatase inhibitors. *The Breast*, 5, 202-208.

[https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(96\)90094-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(96)90094-6)

Lubig, J., Lattrich, C., Springwald, A., Häring, J., Schüler, S., Ortmann, O. Treeck, O. (2012). Effects of a combined treatment with GPR30 agonist G-1 and herceptin on growth and gene expression of human breast cancer cell lines. *Cancer Investigation*, 30(5), 372–379.

<https://doi.org/10.3109/07357907.2012.666690>

Lyman, G. H., Temin, S., Edge, S. B., Newman, L. A., Turner, R. R., Weaver, D. L., ... American Society of Clinical Oncology Clinical Practice. (2014). Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(13), 1365–1383.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1177>

Maiti, K., Paul, J. W., Read, M., Chan, E. C., Riley, S. C., Nahar, P., Smith, R. (2011). G-1-activated membrane estrogen receptors mediate increased contractility of the human myometrium. *Endocrinology*, 152(6), 2448–2455.

<https://doi.org/10.1210/en.2010-0979>

Mizukami, Y. (2010). In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocrine Journal*, 57(2), 101–107.

Online, G. L. (2018). > Fachinformation Arimidex® 1 mg Filmtabletten | Gelbe Liste. Abgerufen 8. August 2018, von [https://www.gelbe-liste.de/produkte/Arimidex-1-mg-Filmtabletten\\_120608/fachinformation](https://www.gelbe-liste.de/produkte/Arimidex-1-mg-Filmtabletten_120608/fachinformation)

Online, G. L. (2018). > Fachinformation Tamoxifen-ratiopharm® 20 mg Tabletten | Gelbe Liste. Abgerufen 8. August 2018, von [https://www.gelbe-liste.de/produkte/Tamoxifen-ratiopharm-20-mg-Tabletten\\_13716/fachinformation](https://www.gelbe-liste.de/produkte/Tamoxifen-ratiopharm-20-mg-Tabletten_13716/fachinformation)

Otto, C., Rohde-Schulz, B., Schwarz, G., Fuchs, I., Klewer, M., Brittain, D., Langer, G., Bader, B., Prella, K., Nubbemeyer, R., Fritzemeier, K.-H. (2008). G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*, 149(10), 4846–4856.

<https://doi.org/10.1210/en.2008-0269>

Pandey, D. P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M., Picard, D. (2009). Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO Journal* 28, 523-532

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153601>

Pang, Y., Dong, J., Thomas, P. (2008). Estrogen Signaling Characteristics of Atlantic Croaker G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) and Evidence It Is Involved in Maintenance of Oocyte Meiotic Arrest. *Endocrinology*, 149(7), 3410–3426.  
<https://doi.org/10.1210/en.2007-1663>

Peyton, C., Thomas, P. (2011). Involvement of epidermal growth factor receptor signaling in estrogen inhibition of oocyte maturation mediated through the G protein-coupled estrogen receptor (Gper) in zebrafish (*Danio rerio*). *Biology of Reproduction*, 85(1), 42–50.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088765>

Pollock, R. E., Doroshow, J. H., Khayat, D., Nakao, A., O'Sullivan, B. (Hrsg.). (2004). *UICC Manual of Clinical Oncology* (8 edition). Hoboken, N.J: Wiley-Liss. 570-577, 585-597

Powles, T. J., Ashley, S., Tidy, A., Smith, I. E., Dowsett, M. (2007). Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(4), 283–290.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/djk050>

Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Sklar, L. A. (2007). GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and cellular endocrinology*, 265–266, 138–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.010>

Prossnitz, E. R., Oprea, T. I., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. (2008). The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3–5), 350–353.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.006>

Rae, J. M., Johnson, M. D. (2005). What does an orphan G-protein-coupled receptor have to do with estrogen? *Breast Cancer Research: BCR*, 7(6), 243–244.  
<https://doi.org/10.1186/bcr1330>

Remmele, W., Stegner, H. E. (1987). Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*, 8(3), 138–140.

Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), 1625–1630.  
<https://doi.org/10.1126/science.1106943>

Robert Koch-Institut (Hrsg), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert-Koch-Institut, Berlin, Deutschland, 11. Ausgabe.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.0, 2017 AWMF Registernummer: 032-045OL

Simon, R. M., Paik, S., & Hayes, D. F. (2009). Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *Journal of the National Cancer Institute*, *101*(21), 1446–1452.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/djp335>

Smith, H. O., Arias-Pulido, H., Kuo, D. Y., Howard, T., Qualls, C. R., Lee, S.-J., Verschraegen, C.F., Hathaway, H.J., Joste, N.E., Prossnitz, E. R. (2009). GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, *114*(3), 465–471.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.05.015>

Smith, H. O., Leslie, K. K., Singh, M., Qualls, C. R., Revankar, C. M., Joste, N. E., Prossnitz, E. R. (2007). GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *196*(4), 386.e1-9; discussion 386.e9-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.01.004>

TAILORx., Sparano, J. A., Gray, R. J., Makower, D. F., Pritchard, K. I., Albain, K. S., Hayes, D. F., Geyer, C.E., Dees, E.C., Goetz, M.P., Olson, J.A., Lively, T., Badve, S.S., Saphner, T. J., Wagner, L. I., Whelan, T. J., Ellis, M. J., Paik, S., Woos, W. C., Ravdin, P. M., Keane M. M., Gomez Moreno H. L.<sup>1</sup>, Reddy, P. S., Goggins T. F., Mayer, I. A., Brufsky, A. M., Toppmayer, D. L., Kaklamani, V. G., Berenberg, J. L., Abrams, J., Sledge, G. W. (2018). Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *379*(2), 111–121.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804710>

Taylor, C. R., Rudbeck, L., Sjørup, A. H. (2013). Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Sixth Edition, 218.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, *146*(2), 624–632.  
<https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>

Tissue expression of GPER1 - Summary - The Human Protein Atlas. (2018). Abgerufen 8. August 2018, von <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000164850-GPER1/tissue>

Untch, M., Jackisch, C., Thomssen, C., Nitz, U., von Minckwitz, G., Kaufmann, M. (2006). Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. *Deutsches Ärzteblatt*, *103*, Heft 50, 3406-3410.

Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Recchia, A. G., Musti, A. M., Picard, D., Andò, S., Maggiolini, M. (2006). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. - *Molecular Endocrinology* 20, 631-646.

Weißborn, C., Ignatov, T., Poehlmann, A., Wege, A. K., Costa, S. D., Zenclussen, A. C., Ignatov, A. (2014). GPER functions as a tumor suppressor in MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(4), 663–671.

<https://doi.org/10.1007/s00432-014-1598-2>

Weyerstahl, T., Stauber, M. (2013). *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. Thieme, Stuttgart, Deutschland, 2013, 4. Auflage. 375, 381, 383-390

Wittekind, C., Meyer, H.-J. (2010). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren (7.)*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

WHO | Breast cancer: prevention and control. (2018). Abgerufen 8. August 2018, von <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>

## 8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Claus Lattrich für die interessante Themenstellung dieser Doktorarbeit, sowie die wissenschaftliche Förderung und Unterstützung während der Bearbeitungszeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Lina Meißner. Du hast mir Vertrauen geschenkt, mir immer mit Rat und noch mehr Tat zur Seite gestanden und mir damit diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht. Durch Deine Faszination für die Forschung und Deinen unermüdlichen Einsatz hast Du mir den Zugang zur medizinischen Forschung ermöglicht und wissenschaftliches Arbeiten überhaupt erst beigebracht. Ohne Dich wäre ich nie soweit gekommen.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Olaf Ortmann danken, dass ich diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen durfte und er die Möglichkeit gefördert hat, dass ich an wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen konnte, um meine Ergebnisse zu präsentieren.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Atanas Ignatov für die Ideengebung dieser Arbeit bedanken.

Für die Bereitstellung der Laborräume und Laborausstattung danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Evert und dem ganzen Institut der Pathologie der Universität Regensburg. Vielen Dank für die kollegiale Zusammenarbeit und Kooperation. Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. Kirsten Utpatel für die Unterstützung bei der Auswahl der Gewebeschnitte und dem Scoring. Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Doris Gaag bedanken, die mir liebevoll und sehr unterstützend bei der Durchführung meiner Methoden geholfen hat, immer mitgetüffelt hat und mir meine Zeit am Institut jeden Tag versüßt hat. Des Weiteren möchte ich mich bei Sonja Fleischmann bedanken für das Schneiden unzähliger Gewebeschnitte.

Mein besonderer Dank gilt dem Tumorzentrum Regensburg e.V. und seiner Direktorin Frau Prof. Dr. Monika Klinkhammer-Schalke für die Bereitstellung der hochqualitativen Tumor- und Follow-up-Daten. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne den Einsatz von Dr. Michael Gerken, der mich sehr bei der statistischen Auswertung unterstützt hat und bei Problemen immer schnell und unkompliziert geholfen hat.

Eine solche Arbeit ist nicht ohne den Rückhalt und das Verständnis der Familie und Freunde zu schaffen. Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Alois und Ulrike Plätzer. Ihr habt mich im Rahmen meines Studiums immer begleitet und unterstützt und mir all das erst möglich gemacht.