

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienaufbau

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 48 Patientinnen mit einem fernmetastasierten Mammakarzinom im Alter von 30 bis 86 Jahren bei Erstdiagnose, von denen 38 an der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin, und 10 am Campus Mitte bzw. Virchow behandelt wurden. Es handelte sich um 42 duktal-invasive und 6 lobulär-invasive Karzinome.

Es wurden 23 Hautmetastasen, 14 Knochenmetastasen, 6 Leber- und 5 Lungenmetastasen untersucht. Bei den Lebermetastasen wurden, wenn keine Probeexzision zur Verfügung stand, auch Leberstanzbiopsien verwendet. Von 4 Patientinnen standen zwei verschiedene Fernmetastasen zur Verfügung. Alle Primärkarzinome und Metastasen wurden immunhistochemisch auf die Expression von HER1, HER2, HER3 und HER4 sowie auf die HER2-Genamplifikation durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) untersucht.

Der retrospektive Beobachtungszeitraum erstreckte sich vom Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms bis zum Dezember 2002 oder bis zum Tod der Patientin und umfasste im Median 58 Monate. 39 der 48 Patientinnen verstarben innerhalb des Studienzeitraumes an den Folgen des Mammakarzinoms. Alle Frauen erhielten eine operative Primärtherapie. Postoperativ erfolgte eine Zuordnung des Tumors gemäß der TNM-Klassifikation. Bei allen Patientinnen wurden die axillären Lymphknoten bis mindestens Level II entfernt und histologisch untersucht. Zum Ausschluß von Fernmetastasen wurden Röntgen-Thoraxaufnahmen, Skelettszintigraphie sowie Leberultraschallsonographie bewertet.

Von der Untersuchung ausgeschlossen wurden Patientinnen, (I) deren Tumorgewebe oder Metastasengewebe nicht zur Verfügung stand, (II) die keine sicher korrespondierende Metastase aufwiesen, (III) deren histologisches Material aus Sektionen stammte. Die Paraffinblöckchen mit Anteilen des Mammakarzinoms und der korrespondierenden Metastasen wurden von Prof. Dr. H. Stein, Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin und Prof. Dr. M. Dietel, Institut für Pathologie, Campus Charité Mitte (Charité-Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die klinischen Informationen wurden aus den Krankenakten des Zentralarchivs der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Campus Benjamin Franklin und Campus Charité Mitte, von niedergelassenen praktischen Ärzten, Allgemeinärzten und Gynäkologen sowie vom Landeseinwohneramt bezogen. Ein positives Ethikvotum liegt vor.

## 2.2 Geräte und Reagenzien

Folgende Geräte und Reagenzien kamen zur Anwendung:

**Messinstrumente.** Feinwaage Typ SAS 51 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen) und pH-Meter MP 220 (Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz) zum Ansetzen von Pufferlösungen.

**Färbezubehör.** Kälteplatte zur Kühlung der Paraffinblöckchen beim Schneiden. Schlittenmikrotom (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf), Mikrotomklingen S35 und R35 (Feather), Paraffin-Streckbad GFL 1052 (Zilab Labortechnik GmbH, Adligenswil, Schweiz) und beschichtete Objektträger Super Frost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) zur Herstellung und Streckung der Paraffinschnitte. Brutschrank zur Trocknung der Paraffinschnitte, Abzug für die Durchführung der Entparaffinierung, Wasserbad und Mikrowelle (Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe) zur hitzeinduzierten Demaskierung, Färbebank mit kippbarem Einsatz (Hausmodell, UKBF). Sonstiges Färbematerial wie Färbetröge, u. a. nach Coplin, Spritzflaschen, Deckgläser (Merck KGaA, Darmstadt), Reaktionsgefäß und Pipette für Chromogen-Substrat (DakoCytomation GmbH, Hamburg). Färbeautomat *Benchmark* (Ventana, Tucson, USA) für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

**Mikroskope.** Dialux 22 (Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar), Polyvar Pol (Reichert-Jung, Wien, Österreich) und Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 mot plus (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena).

**Hilfsmittel.** Magnetrührer, Messzylinder, Messbecher, sonstige Glasgefäße (Merck), 15 ml Falcon-Reaktionsgefäße aus Kunststoff (Becton Dickinson, San Jose, USA), 150 mm Pasteurpipetten aus Glas (Brand GmbH & Co KG, Wertheim), Pipetten, -spitzen und 1 ml Eppendorfküvetten (Eppendorf AG, Hamburg), Thermomixer zur Inaktivierung des FCS, Vortex, Millipore-Aqua dest. Zubereitung, Kühlschränke bzw. Kühlraum zur Aufbewahrung der Chemikalien und ungefärbten Paraffinschnitte bei 4 °C. Gefrierfach zur Aufbewahrung des Sekundärantikörpers bei -20 °C.

**Puffer.** Die Pufferlösungen wurden selbst hergestellt. Tris-Puffer: Für das 5fach-Konzentrat wurden 33,0 g Trizma-HCl, 4,5 g Trizma-Base (beides Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 43,9 g Natriumchlorid (Merck) mit Aqua dest. auf 5000 ml aufgefüllt. Für die 1fach konzentrierte Gebrauchslösung Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. Citrat-Puffer: Gebrauchslösung bestehend aus 18 ml 0,1 M Stammlösung A (21,01 g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest.), 82 ml 0,1 M Stammlösung B (29,41 g Natriumcitrat in 1000 ml Aqua dest., beides Merck) und 900 ml Aqua dest., anschließend Einstellung auf pH 6.

## **2.3 Immunhistochemische Färbungen**

### **2.3.1 Vorbereitung**

**Herstellung von Schnittpräparaten.** Es wurden von jedem Paraffinblock mehrere 1 µm dünne Präparate am Mikrotom geschnitten, im erwärmten Wasserbad auf beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Blöckchennummer und Färbedurchgang wurden notiert. Danach wurden die Schnitte bis zur Färbung bei 4 °C gekühlt.

**Trocknen und Entparaffinieren.** Zur Beseitigung von Wasserrückständen unter den Schnitten wurden diese vor der jeweiligen Färbung für eine Nacht bei 60 °C getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe. Dazu wurden jeweils 20 Objektträger für 5 min in Xylol, erneut 5 min in Xylol, 10 min in Aceton (beides Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, USA), weitere 10 min in ein 1:2 Aceton/Tris-Gemisch und abschließend 10 min in Tris-Puffer getaucht.

**Demaskierung.** Die Antigendemaskierung erfolgte bei der HER1-Färbung enzymatisch mit Proteinase K (Merck) für 8 min bei Zimmertemperatur, für die HER2-Färbung hitzeinduziert in Citratpuffer für 40 min in der Mikrowelle (600 W), für die HER3- und HER4-Färbung hitzeinduziert in mit Citratpuffer gefüllten Färbetrogen nach Coplin für 10 min im Wasserbad (95 °C). Anschließend Abkühlung auf Raumtemperatur und zweimalige Spülung für jeweils 5 min mit Tris-Puffer.

**Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen.** Fetales Kälberserum (Biochrom AG, Berlin) diente als Blockierungserum zur Absättigung niedrig affiner Bindungsstellen des

Gewebes und damit zur Reduktion unspezifischer Anfärbungen. Alle Schnitte wurden vor Zugabe des Primärantikörpers für mindestens 30 min mit Serum inkubiert. Um die unspezifischen Bindungsstellen besetzt zu halten, wurde anschließend nicht gespült.

### **2.3.2 APAAP-Nachweismethode**

**Allgemein.** Der APAAP-Komplex (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) besteht aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, die spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind. Nach Bindung des Primärantikörpers an das im Gewebe liegende Antigen wird ein korrespondierender Brückenantikörper (je nach Spezies des Primärantikörpers) eingesetzt, der dann an den APAAP-Komplex bindet.

**HER1-Färbung.** Diese wurde nach obiger Nachweismethode ausgeführt. Nach bereits beschriebener Vorbehandlung wurden die Schnitte (mit Ausnahme der Negativkontrolle) mit dem aus der Maus stammenden EGFR-Primärantikörper (monoklonal, Ab-10, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach), in der Verdünnung 1:50 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im weiteren folgten der Brückenantikörper aus dem Kaninchen (AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG H+L, Dianova GmbH, Hamburg) und der APAAP-Komplex (Maus IgG1, ebenfalls Dianova). Beide wurden in der Konzentration 1:40 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Wiederholung der Schritte Brückenantikörper und APAAP-Komplex für weitere 10 min konnte eine Verstärkung der Reaktion ermöglicht werden.

### **2.3.3 ABC-Nachweismethode**

**Allgemein.** Die ABC-Nachweismethode (Avidin-Biotin-Complex) macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Der verwendete Brückenantikörper ist mit Biotin markiert (biotinyliert), einem wasserlöslichen Vitamin, das die Verbindung zum ABC-Komplex durch Reaktion mit Avidin herstellt. Der Komplex selbst besteht aus Avidin, das an drei von vier möglichen Bindungsstellen bereits ein Molekül Biotin gebunden hält. Über dieses wird ein Enzym, zum Beispiel Peroxidase oder alkalische Phosphatase, an den Komplex gekoppelt. Der auf diese Weise zuvor hergestellte Enzymkomplex weist noch eine freie Bindungsstelle für den biotinylierten Sekundärantikörper auf.

Üblicherweise wird anstelle von Avidin das reinere Streptavidin verwendet. Dieses wird gentechnisch aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert. Das hier verwendete Streptavidin ist mit alkalischer Phosphatase konjugiert.

**HER2-Färbung.** Die Präparate wurden mit dem bereits verdünnten Primärantikörper (polyklonal, Rabbit Anti-Human mit negativer Kontrollreagenz, "Ready to Use", DakoCytomation) für 30 min inkubiert. Anschließend Behandlung mit Biotin-SP-Konjugat aus der Maus (Biotin-SP-conjugated AffiniPure Mouse Anti-Rabbit IgG H+L, Dianova) und Streptavidin-AP-Konjugat (Roche Diagnostica GmbH, Mannheim), jeweils in der Konzentration 1:1000 für 40 min.

**HER3-Färbung.** Inkubation der Schnitte in der Konzentration 1:26 mit dem HER3 Primärantikörper (C-17 Rabbit Anti-Human, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) für 1 h. Anschließend Biotin-SP-Konjugat aus der Maus und Streptavidin-AP-Konjugat, jeweils in der Konzentration 1:400 für 30 min.

**HER4-Färbung.** Behandlung mit HER4 Primärantikörper (C-18 Rabbit Anti-Human, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) in der Konzentration 1:40 über 1 h. Dann Biotin-SP-Konjugat aus der Maus und Streptavidin-AP-Konjugat, jeweils in der Konzentration 1:400 für 30 min.

Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Präparate fünfmal mit Tris-Puffer gespült.

### **2.3.4 Chromogen und Gegenfärbung**

Die Entwicklungslösung wurde bei jedem Färbedurchgang kurz vorher angesetzt: 3 Tropfen Fuchsin-Chromogen wurden mit 3 Tropfen Aktivierungsreagenz zur Reaktion gebracht, nach 2 min mit Substrat-Puffer auf 2 ml aufgefüllt und gemischt. Alle Gewebeschnitte wurden mit dem Fuchsin-Substrat-Chromogen (Fuchsin-Substrat-Chromogen-System, DakoCytomation) für 15 min bedeckt, nach anschließender Spülung in Aqua dest. mit Hämalaun (*Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie*, Merck) für 25 sec gegengefärbt und erneut unter fließendem Leitungswasser 10 min gespült. Die jeweiligen angefärbten Strukturen ergaben ein rotes bis violette Farbprodukt. Zuletzt wurden die Präparate mit vorgewärmtem Einbettmedium (*Kaisers Glyceringelatine*, Merck) eingedeckt.

	<b>HER1</b>	<b>HER2</b>	<b>HER3</b>	<b>HER4</b>
<b>Nachweismethode</b>	APAAP	ABC	ABC	ABC
<b>Demaskierung</b>	enzymatisch Proteinase K	Mikrowelle	Wasserbad	Wasserbad
<b>Antikörperversdünnung</b>	1:50	vorverdünnt	1:26	1:40
<b>Tierspezies</b>	Maus	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen
<b>Klonalität</b>	monoklonal	polyklonal	polyklonal	polyklonal
<b>Firma</b>	Santa Cruz	Dako	Santa Cruz	Santa Cruz
<b>Brückenantikörper</b>	Kaninchen	Maus	Maus	Maus
<b>Komplex</b>	APAAP	Streptavidin-AP	Streptavidin-AP	Streptavidin-AP

**Tab. 1: Übersicht der immunhistochemischen Färbungen**

### 2.3.5 Positiv- und Negativkontrollen

Bei jedem Färbedurchgang wurde ein positives sowie ein negatives Kontrollpräparat mitgeführt. Für die HER1-, 3- und 4-Färbung diente Plazentagewebe als Positivkontrolle, für die HER2-Färbung wurde ein als sicher positiv (3+ nach Dako-Score) diagnostiziertes Mammakarzinomgewebe verwendet. Die Negativkontrolle erfolgte durch Austausch des Primärantikörpers gegen Puffer auf dem Referenzgewebe zum Nachweis unspezifischer Färbereaktionen des Detektionssystems.

Die auf alle Färbedurchgänge verteilten Präparate der Metastasen bildeten eine zusätzliche interne Kontrolle, da außer den pathologisch veränderten Zellen die Keratinozyten der Epidermis für HER1,<sup>83,95</sup> HER2,<sup>83</sup> HER3<sup>83</sup> und HER4,<sup>157</sup> die Hepatozyten und Gallengangsepithelien der Leber für HER4,<sup>157</sup> Bronchi und Alveoli im Lungengewebe für HER1, -2, -3<sup>125</sup> und HER4<sup>157</sup> eine positive Farbreaktion zeigten. Knochengewebe fungierte für HER4<sup>157</sup> als endogene Negativkontrolle.

Das Mitführen eines Kontrollpräparates bei jedem Färbedurchgang hatte neben der Kontrollfunktion den Vorteil, die Reaktionsstärke der einzelnen Färbedurchgänge miteinander vergleichen zu können. Dies erleichterte die Beurteilung der Präparate und gab Hinweise auf einen möglichen Sensitivitätsverlust des Antikörpers.

## 2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Allgemein. Mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierung (ISH) lassen sich Nukleinsäuresequenzen (sowohl DNA- als auch RNA-Sequenzen) in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen direkt im Paraffinschnittpräparat sichtbar machen. Diese Technik wurde erstmals von Pardue et al.<sup>117</sup> sowie von John et al.<sup>69</sup> unabhängig voneinander beschrieben.

Nach Aufspaltung des DNA-Doppelstranges in der Zelle kann die sogenannte Sonden-DNA spezifisch an den Einzelstrang der Ziel-DNA binden. Die Sonde ist ein zu der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz komplementärer DNA- oder RNA-Abschnitt, der zusätzlich mit bestimmten Markern versehen wurde. Nach der Hybridisierung von Ziel- und Sonden-DNA werden die markierten Nukleotide mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Sind diese wiederum an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, können die Markermoleküle mit einem Fluoreszenzmikroskop und einem speziellen Anregungsfilter, welcher der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes entspricht, beurteilt werden (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung = FISH). Die Lokalisation einzelner Gene erfolgt durch sogenannte Gen-Sonden.

HER2/*neu*-Genamplifikation. Normale Epithelzellen besitzen zwei Kopien des HER2-Protoonkogens und exprimieren nur physiologische Mengen des wachstumsregulierenden HER2-Rezeptorproteins. Dagegen ist in Mammakarzinomzellen, bei Vorliegen einer HER2/*neu*-Überexpression, eine vielfache Amplifikation des zugehörigen Gens nachweisbar (siehe 1.3.2). Der Nachweis der HER2/*neu*-Genamplifikation in den Schnittpräparaten der Tumoren und der Metastasen erfolgte durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem Färbeautomat *Benchmark* der Firma Ventana. Die HER2-Gen-Sonde bestand aus einem biotinmarkierten DNA-Abschnitt. Die grün fluoreszierenden Kopien des Protoonkogens wurden mittels Fluoreszenzmikroskop und geeigneten Filtern gezählt. Ein Tumor galt als HER2-amplifiziert, wenn mehr als 4 Kopien pro Zelle gefunden wurden.

## 2.5 Auswertung

Die Präparate wurden von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt. Die Untersucher besaßen zum Zeitpunkt der Auswertung keine Kenntnis über zugehörige Patientinnendaten, Krankheitsverläufe und Rezeptorstatus.

Die Beurteilung erfolgte bei allen Färbungen unter Einbeziehung der Reaktionsmuster (zytoplasmatisch, nukleär und membranständig), wobei nur für die jeweilige Färbung relevante Reaktionsmuster in die Auswertung eingingen.

Bei Nichtbeurteilbarkeit aufgrund nicht ausreichenden Gewebematerials, zu schwacher oder heterogener Anfärbung wurden die Färbungen wiederholt oder die Präparate ganz von der Studie ausgeschlossen.

HER1: Die Auswertung erfolgte nach dem standardisierten Score von Lewis et al.<sup>95</sup> Ein Score von 2 und 3 galt als HER1-überexprimiert und positiv.

Score	Wertung der Überexpression	Färbemuster
0	Negativ	keine erkennbare Färbung
1	Negativ	schwache cytoplasmatische Färbung
2	Positiv	deutliche cytoplasmatische Färbung
3	Positiv	starke cytoplasmatische Färbung oder Membranfärbung

Tab. 2: HER1-Score nach Lewis

HER2: Die Beurteilung der HER2-Färbung erfolgte mit Hilfe des Scores der Firma DakoCytomation.<sup>24</sup> Präparate mit einem Score von 2 + und 3 + galten als HER2-überexprimiert und somit positiv.

Score	Wertung der Überexpression	Färbemuster
0	Negativ	Keine erkennbare Färbung oder erkennbare Membranfärbung in <10% der Tumorzellen
1 +	Negativ	Schwache Membranfärbung in >10% der Tumorzellen, nur Teile der Membran sind gefärbt
2 +	Positiv	Schwache bis mäßige komplette Membranfärbung in >10% der Tumorzellen
3 +	Positiv	Mäßige bis starke komplette Membranfärbung in >10% der Tumorzellen

Tab. 3: HercepTest<sup>®</sup>-Score für HER2 von DAKO



HER3 und HER4: Beurteilt wurde pro Präparat die Intensität der vorherrschenden Cytoplasmafärbung in Stufen von 0 bis 3 sowie die Membranfärbung von 0 bis 3. Durch Multiplikation dieser beiden Kriterien ergab sich der immunreaktive Score (IRS) mit Werten zwischen 0 und 9. Ein Tumor mit einem  $IRS \geq 3$  wurde als HER3- bzw. HER4-überexprimiert und damit positiv gewertet. Eine komplette Membranfärbung wurde weder für HER3 noch für HER4 beobachtet, eine fast vollständige Membranfärbung in weniger als 5 % der Fälle für HER3 und in weniger als 8 % der Fälle für HER4 beobachtet, so dass der maximal erreichbare  $IRS = 6$  war. Somit musste mindestens eine mäßige Cytoplasmafärbung vorhanden sein, um eine positive Überexpression zu erreichen. Eine Kernfärbung wurde bei HER3 nicht, bei HER4 in fast 90 % der Fälle beobachtet und als HER4-typisches Färbemuster gewertet. Sie erlaubte keine Differenzierung hinsichtlich einer HER3/4-Überexpression in Tumorgewebe und wurde im immunreaktiven Score nicht berücksichtigt.

<b>Cytoplasmafärbung</b>	<b>Membranfärbung</b>
0 = keine Färbung	0 = keine Membranfärbung
1 = schwache Färbung	1 = Membrananteile gefärbt
2 = mäßige Färbung	2 = Membran fast vollständig gefärbt
3 = starke Färbung	3 = Membran komplett gefärbt

**Tab. 4: Immunreaktiver Score (IRS) für HER3 und HER4**

FISH: Die HER2/*neu*-Genkopien der Tumorzellen wurden unter Fluoreszenzlicht gezählt. Die Einteilung erfolgte in Präparate mit weniger als 4 Signalen, 4 bis 10 Signalen, 11 bis 20 und mehr als 20 Signalen pro Zelle. Solche mit überwiegend mehr als 4 Signalen pro Zelle wurden als HER2/*neu*-genamplifiziert gewertet.

<b>Genkopien pro Zelle</b>	<b>HER-2 Status</b>	<b>Genamplifikation</b>
$\leq 4$	negativ	Es lag keine HER-2/ <i>neu</i> -Amplifikation vor.
$> 4$	positiv	Eine HER-2/ <i>neu</i> -Amplifikation lag vor.

**Tab. 5: Beurteilung der Genamplifikation durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

## 2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS Version 11 für Windows.

Die Beziehungen zwischen den Faktoren wurden mit dem  $\chi^2$ -Test, gegebenenfalls mit dem *exakten Test nach Fisher*, analysiert. Bei metrischen Variablen wurde der *U-Test nach Mann und Whitney* verwendet. Durch den  $\chi^2$ -Test nach *McNemar* wurde die Änderung des Färbescores von Primärkarzinom zu Metastase, mit *Cohens Kappa* der Grad der Übereinstimmung untersucht. Der Zusammenhang der jeweiligen Rezeptoren untereinander innerhalb der Karzinome bzw. Metastasen wurde ebenfalls mittels  $\chi^2$ -Test nach *McNemar* analysiert bzw. durch Berechnen der Häufigkeiten beschrieben. Univariate Analysen der klinischen Faktoren und Rezeptoren mit dem *dfs*, *ms* und *os* wurden mit Hilfe der Überlebenskurven nach *Kaplan* und *Meier* in Verbindung mit dem *log-rank*-Test dargestellt, dabei wurde *dfs* (disease free survival = metastasenfrees Überleben) als Zeit von der Erstdiagnose des Mammakarzinoms bis zur Diagnose der ersten Fernmetastase, *ms* (metastatic survival = Überleben nach Metastasierung) als Zeit von der Diagnose der ersten Fernmetastase bis zum Tod bzw. Ende der Studie Dezember 2002 und *os* (overall survival = Gesamtüberlebenszeit) als die Zeit von der Erstdiagnose des Mammakarzinoms bis zum Tod bzw. Studienende gewertet. Patientinnen, die über diesen Zeitraum hinaus überlebten, wurden als zensierte Fälle gewertet. Für alle Tests wurde  $p < 0,05$  als Signifikanzniveau gewertet.