

**Aus dem
Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine Universität**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Bojar

**Korrelationen von uPA und PAI-1 zu klassischen und neuen Prognosefaktoren
und zum rezidivfreien Überleben unter adjuvanter Systemtherapie
bei nodalnegativem und -positivem Mammakarzinom**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

**vorgelegt von
Ugur Özsahin**

2008

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Bojar

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Royer-Pokora

Gewidmet meiner Schwester Gamze

Inhaltsverzeichnis

Kapitel		Seite
1	Einleitung	7
1.1	Definition des Mammakarzinoms	7
1.2	Epidemiologie des Mammakarzinoms	7
1.3	Management des Mammakarzinoms	10
1.4	Prognosefaktoren beim Mammakarzinom	13
1.4.1	Klinisch etablierte Prognosefaktoren	16
1.4.2	Neue Prognosefaktoren	17
1.4.3	Prädiktive Faktoren	21
1.4.4	Bedeutung der neuen Prognosefaktoren uPA und PAI-1	23
1.5	Zielsetzung der Arbeit	26
2	Patientinnen, Material und Methoden	27
2.1	Material und Methoden	27
2.1.1	Testprinzip	27
2.1.2	uPA/PAI-1 ELISA Testdurchführung	30
2.1.3	Berechnung der Ergebnisse	31
2.1.4	cut-off Wert	31
2.2	uPA und PAI-1 im Kollektiv	33
2.3	Bestimmung der weiteren Prognosefaktoren	35
2.4	Auswertung der Korrelationen	39
2.5	Auswertung des rezidivfreien Überlebens	42
2.6	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Korrelation von uPA und PAI-1 zu etablierten Prognosefaktoren	50
3.1.1	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Alter	50
3.1.2	Korrelation von uPA und PAI-1 zur Tumorgröße	51
3.1.3	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Nodalstatus	52
3.1.4	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Grading	53
3.1.5	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Hormonrezeptorstatus	54
3.1.6	Korrelation von uPA und PAI-1 zum M-Status	56
3.2	Korrelation von uPA und PAI-1 zu neuen Prognosefaktoren	57

3.2.1	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Her2/neu-Status	57
3.2.2	Korrelation von uPA und PAI-1 zum EGFR	58
3.2.3	Korrelation von uPA und PAI-1 zum VEGF	59
3.2.4	Korrelation von uPA und PAI-1 zur p53-Mutation	60
3.2.5	Korrelation von uPA und PAI-1 zu Ki-67/MIB-1	61
3.2.6	Korrelation von uPA und PAI-1 zum MMP-11	62
3.3	Korrelationen im Überblick	63
3.4	Korrelation von uPA und PAI-1 zum rezidivfreien Überleben	64
3.4.1	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA	64
3.4.2	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von PAI-1	65
3.4.3	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA und PAI-1 in Kombination	66
3.4.4	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA und PAI-1 in 4 Gruppen	67
3.5	Korrelation von weiteren Prognosefaktoren zum rezidivfreien Überleben	69
3.5.1	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (ER)	69
3.5.2	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus (PR)	70
3.5.3	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (ER+PR)	71
3.5.4	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Her2/neu-Status	72
3.5.5	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom EGFR	73
3.5.6	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der p53-Mutation	74
4	Diskussion	75
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis	90
7	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	95
8	Abkürzungsverzeichnis	99
9	Danksagung	100

10	Lebenslauf	101
11	Erklärung	102

1 Einleitung

1.1 Definition des Mammakarzinoms

Brustkrebs (Synonym: Mammakarzinom) ist ein von den Epithelzellen der Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom) oder der Milchgänge (duktales Karzinom) ausgehender bösartiger Tumor. Eine bösartige Neoplasie ist durch schnelles Wachstum, Infiltration und Destruktion der Umgebung, Lymph- oder Blutgefäßinvasion und Metastasierung charakterisiert.

Als prämaligne Mammaveränderungen gelten das ductale Carcinoma in situ (DCIS), das als echte Präkanzerose eingestuft wird und das Carcinoma lobulare in situ (CLIS). Grundsätzlich wird zwischen duktalem und lobulärem Mammakarzinom sowie zwischen nicht invasivem und invasivem Formen unterschieden. Von Bedeutung ist auch die häufige Multifokalität bzw. Multizentrität des Mammakarzinoms. Die Tumorstadieneinteilung erfolgt nach dem TNM-System, welches sich nach Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Metastasenstatus richtet.

Der histologische Tumortyp des Mammakarzinoms ist vielfältig. Mit etwa 40-75% aller Tumore macht das invasiv duktales Karzinom den häufigsten Tumortyp aus, gefolgt vom invasiv lobulären Tumor (5-15%) und dem medullären Mammakarzinom (1-7%). Die Subgruppen, wie z.B. das muzinöse oder apokrine Mammakarzinom machen einen sehr geringen Anteil aus [1].

1.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Jährlich erkranken weltweit über eine Million Frauen an Brustkrebs. Somit ist das Mammakarzinom beim weiblichen Geschlecht der häufigste bösartige Tumor, gefolgt vom Cervixkarzinom und dem Lungenkarzinom. Zwischen den einzelnen Ländern bestehen erhebliche Unterschiede in Inzidenz und Mortalität.

Die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland kann nur geschätzt werden, da es noch keine vollständige und flächendeckende Meldepflicht für Tumorerkrankungen gibt. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts erkrankten im Jahre 2002 55.150 Frauen an einem Mammakarzinom [2]. Dahinter positionieren sich Darm- und Lungenkarzinom. 26,6% der Krebserkrankungen bei der Frau entfallen auf das Mammakarzinom. Männer haben ein 50- bis 100-fach niedrigeres Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken.

Die Inzidenz des Mammakarzinoms steigt. Durch verbesserte Früherkennung, z.B. das strukturierte und qualitätsgesicherte Mammographie-Screening-Programm für alle Frauen

zwischen 50-69 Jahren werden kleine Tumore nun häufiger entdeckt. Dadurch kann zukünftig die Anzahl der Neuerkrankungen noch stärker ansteigen.

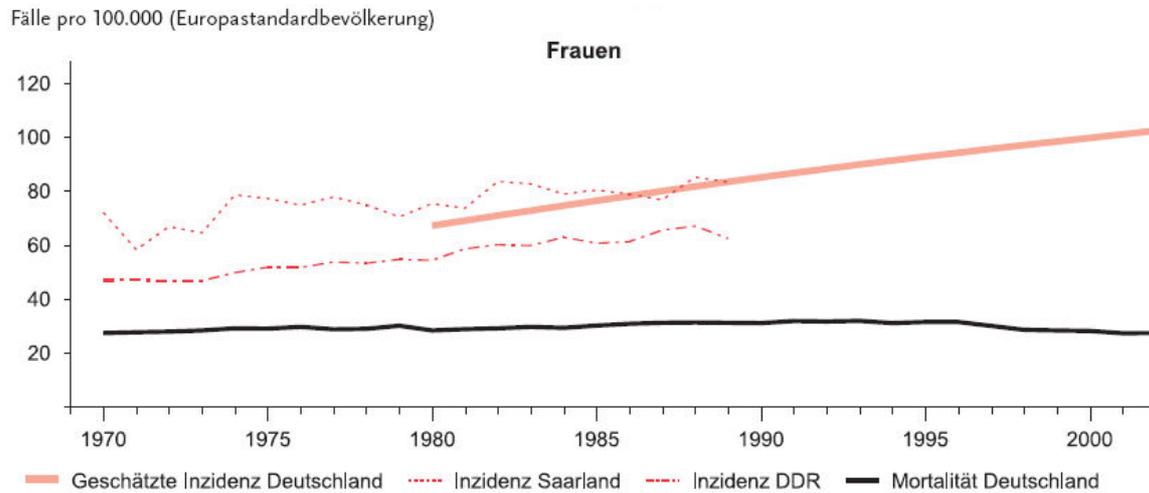


Abbildung 1: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1970-2002 [3]

Das Lebenszeitrisiko beträgt für eine Frau 9,2%. Jede 11. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Das Erkrankungsalter liegt im Durchschnitt bei 62 Jahren [3]. Die Mortalitätsrate lag nach Angaben des Robert-Koch-Instituts im Jahre 2000 bei 17.814 Fällen. Seit Mitte der 1990er Jahre sinkt die Mortalitätsrate. Der Anteil an der tumorbedingten Mortalität beträgt 17,8%. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt über alle Stadien bei 79%.

Es wird vermutet, dass die Verbesserung der Früherkennung und die Weiterentwicklung der adjuvanten Systemtherapie, die Gründe dafür sind, warum z.B. in England und den USA die Mortalitätsrate um 20% in den letzten 20 Jahren gesunken ist [5,6].

Die Pathogenese des Mammakarzinoms, das zu den chronischen Erkrankungen zählt, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Folgende Faktoren erhöhen jedoch das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken:

- Alter
Mit steigendem Alter steigt auch das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken.
- Lebensstil
Der Lebensstil, z. B. eine unausgewogene, einseitige Ernährung, oder übermäßiger Alkoholkonsum.

- **Hormone**
70 Prozent der Tumore sind Hormonrezeptor-positiv. Ebenso werden die Auswirkungen durch Einnahme der Pille sowie Hormonersatztherapien derzeit beobachtet.
- **Genetisch bedingte Risikofaktoren**
Wenn in der Verwandtschaft bereits ein Mammakarzinom aufgetreten ist, ist das genetische Risiko erhöht, ebenfalls an einem Mammakarzinom zu erkranken.
- **Mutationen**
Mutationen der Brustkrebs-Gene BRCA-1 und BRCA-2 erhöht das Lebenszeitrisiko auf 80 bis 85 Prozent. Dies betrifft zirka 5 bis 10 Prozent der Patientinnen [22].

Tabelle 1 gibt weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms an.

Risikofaktor	Relatives Risiko
Männer : Frauen	1 : 100
Alter 25 Jahre : Alter 45 Jahre	1 : 20
Menopause mit 42 Jahren : Menopause mit 52 Jahren	1 : 2
Menarche mit 14 Jahren : Menarche mit 11 Jahren	1 : 1,3
Multiparität : Nulliparität	1 : 1,3
Erste Geburt mit 20 Jahren : erste Geburt mit 35 Jahren	1 : 1,4
5 Jahre Stillen : kein Stillen	1 : 1,2
Keine Ovulationshemmer : Anwendung von Ovulationshemmern	1 : 1,1
Keine Hormonsubstitution : mit Hormonsubstitution	1 : 1,3
Kein Alkohol : Alkoholkonsum \geq 20 g täglich	1 : 1,3

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms [4]

1.3 Management des Mammakarzinoms

Das Ziel der Behandlung des Mammakarzinoms ist die vollständige Entfernung des Tumors und die Eliminierung möglicher Mikrometastasen. Verlässliche Parameter, die eine Mikrometastasierung sicher ausschließen können, liegen noch nicht vor [7].

Die Therapie des Mammakarzinoms entscheidet sich nach vielfältigen Faktoren. Folgende etablierte Optionen liegen für die Therapie des Mammakarzinoms einzeln oder in Kombination vor:

- Chirurgische Behandlung
 - brusterhaltende Therapie (BET) mit/ohne axilläre Lymphknotendissektion oder Sentinel-Lymphknoten-Technik
 - Mastektomie mit/ohne axilläre Lymphknotendissektion
- Radiatio
 - obligat nach brusterhaltender chirurgischer Therapie
 - nach Mastektomie bei erhöhtem Rezidivrisiko
- Systemische Therapie
 - Chemotherapie
 - generell indiziert bei rezeptornegativen Patienten
 - Hormontherapie
 - bei positivem Hormonrezeptorstatus
 - Immuntherapie
 - Antikörpertherapie Trastuzumab (Herceptin) bei Überexpression von Her2/neu

Um optimale individuelle Therapiekonzepte zu erstellen, müssen Faktoren bestimmt werden, die ein Ansprechen spezifischer Therapien (prädiktive Faktoren) und den Krankheitsverlauf (Prognosefaktoren) vorhersagen können. Je besser die Aussagekraft dieser Faktoren, desto gezielter kann die Therapie erfolgen. Begriffe wie „targeting und tailoring (zielgerichtet und zugeschnitten)“ werden in der Therapie des Mammakarzinoms immer mehr an Bedeutung gewinnen [1,8,9].

Bei der Entscheidung zur adjuvanten Systemtherapie hilft die Risikogruppeneinteilung nach dem Konsensuspapier von St.Gallen [75]. Die Risikogruppen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Niedriges Risiko	Mittleres Risiko	Hohes Risiko
<p>pN0 sowie alle der folgenden Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumorgröße max. 2 cm • hohe Differenzierung (G1) • keine Gefäßinvasion • ER-/PR-positiv • HER2/neu-negativ • Alter \geq 35 Jahre 	<p>pN0 sowie mind. eins der folgenden Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumorgröße $>$ 2 cm • mittlere – geringe Differenzierung (G2/G3) • Gefäßinvasion • HER2/neu-positiv • Alter $>$ 35 Jahre <p>oder</p> <ul style="list-style-type: none"> • pN+ (N1-3) und • HER2/neu-negativ 	<p>pN+ (N1–3) und HER2/neu-positiv</p> <p>oder</p> <p>pN+ (\geq 4N)</p>

Tabelle 2: Risikogruppen laut St.Gallen 2007 [75]

Hauptprognosefaktor für die Einteilung ist der Befall der Lymphknoten. Im Allgemeinen hat das nodal-negative Mammakarzinom eine günstige Prognose. Dennoch erleiden 30% der nodal-negativen Patientinnen einen Rückfall. Nach den Kriterien der Konsensuskonferenz von St. Gallen 2007 kann das Risiko nur dann als niedrig eingestuft werden, wenn gleichzeitig folgende Kriterien erfüllt sind: Tumorgröße $<$ 2 cm, Alter \geq 35 Jahre, G1, ER- und/oder PR-positiv, HER-2/neu negativ, kein Nachweis einer Gefäßinvasion. In solchen Fällen kann unter Umständen auf eine weitere adjuvante Therapie verzichtet werden (Tabelle 2 und 3).

Es ist aber auch zu beachten, dass der Verlauf der Erkrankung beim Mammakarzinom maßgeblich davon bestimmt wird, ob eine Fernmetastasierung eintritt. Eine adjuvante Systemtherapie kann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Metastasen um 20% senken [12].

Risikokategorie	Endokrin responsive	Unsicher Endokrin responsive	Endokrin non-responsive
Niedriges Risiko	ET	ET	Therapie?
Mittleres Risiko	ET alleine CT \rightarrow ET (ET + CT)	CT (ET + CT)	CT
Her2+	Trastuzumab	Trastuzumab	Trastuzumab
Höheres Risiko	CT \rightarrow ET (ET + CT)	CT \rightarrow ET (ET + CT)	CT
Her2+	Trastuzumab	Trastuzumab	Trastuzumab

Tabelle 3: Generelles Vorgehen gemäß St.Gallen 2007 (ET=Endokrine Therapie, CT=Chemotherapie) [75]

Um aber eine Übertherapie der restlichen 70% bei nodal-negativen Patientinnen zu vermeiden, reicht die Risikogruppeneinteilung nach St.Gallen nicht aus. Der St.Gallen-Aufteilung fehlt eine erweiterte Differenzierung der nodal-negativen Patientinnen.

Gerade dieses Kollektiv ist in den Studien von besonderem Interesse, da 50-60% aller Mammakarzinome keinen Lymphknotenbefall haben und die Größe dieser Subgruppe weiter zunimmt [12].

Bei der Hormonrezeptor-negativen Patientin ist bis auf wenige Ausnahmen eine adjuvante Chemotherapie indiziert. Prinzipiell sollten 6 Zyklen einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie appliziert werden [77].

1.4 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Die Therapie des Mammakarzinoms wird zunehmend an die einzelne Patientin und deren individuelles Tumorprofil zielgerichtet angepasst. Um optimale individuelle Therapiekonzepte zu erstellen, müssen Faktoren bekannt sein, die den Krankheitsverlauf vorhersagen und prospektiv auch das individuelle Rezidiv- und Sterberisiko einschätzen können. Von diesen Prognosefaktoren sind die prädiktiven Faktoren zu unterscheiden, die das Ausmaß des Ansprechens auf eine Therapie vorhersagen und damit zu einer selektiven Therapiewahl beitragen können [1]. Zu den prädiktiven Faktoren gehören der Hormonrezeptor-, der Her2/neu- und der Menopausenstatus. Mit den Prognose- und prädiktiven Faktoren sollen Patienten mit sehr guter Prognose identifiziert werden, um eine Übertherapie (z.B. adjuvante Systemtherapie) zu vermeiden und diejenigen mit schlechterer Prognose eher aggressiver zu behandeln und zusätzlich die Resistenz oder das Ansprechen von Therapeutika ausfindig zu machen.

Somit werden dringend zuverlässige Prognosefaktoren für die individualisierte adjuvante Therapie nodal-negativer Mammakarzinome benötigt. Aber auch für die Selektion der Hochdosis-Chemotherapie nodal-positiver Mammakarzinome und für die Entscheidung über die Art der adjuvanten Therapie müssen Prognosefaktoren gefunden werden [10].

Aktuell sind etwa 100 neue tumorbiologische Prognosefaktoren als potentielle Marker in der Diskussion. Die wichtigsten Faktoren sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Von diesen innovativen Markern erlangte der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor-1) durch eine prospektive randomisierte Multicenterstudie und eine Metaanalyse den höchsten Level of Evidence (LOE I) [11,13].

Prognosefaktoren müssen aber hohe Qualitätskriterien erfüllen, bevor sie in der Klinik Anwendung finden. Voraussetzung für die Anerkennung eines neuen Prognoseparameters ist, dass seine Relevanz statistisch einwandfrei und reproduzierbar in unabhängigen Studien belegt werden kann. Die Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren werden in Tabelle 5 angegeben.

Die Einführung in die klinische Routine scheitert meistens daran, dass die Literatur nicht einheitlich oder überzeugend genug ist oder keine Standardisierung und keine Qualitätskontrollen zur Verfügung stehen. Aber auch wenn der Marker die internationalen

Kriterien erfüllt, macht es keinen Sinn, wenn es zu keinen therapeutischen Konsequenzen in der klinischen Routine kommt.

Klassische Prognosefaktoren	Neue Prognosefaktoren
<p>TNM-Status Tumorgröße axillärer Lymphknotenbefall Metastasierung</p> <p>Morphologie Grading (GI-III) Histologischer Typ vaskuläre Invasion</p> <p>Lymphangiosis carcinomatosa</p> <p>Steroidhormonrezeptoren Östrogenrezeptoren (ER) Progesteronrezeptoren (PR)</p> <p>Menopausenalter</p>	<p>Tumorzellnachweis im Knochenmark</p> <p>Proliferation und Ploidie S-Phase, Ploidie Ki-67-Antigen, PCNA EGF-Rezeptor</p> <p>Onkogene/Supressorgene HER-2/neu (Erb-B2)-Onkoprotein p53 Erb-B3, C-myc, TGF-alpha TGF-beta</p> <p>tumorassoziierte Proteasen Urokinase Plasminogenaktivator (uPA) Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) Kathepsin B,D,L und deren Matrixmetalloproteasen und deren Inhibitoren</p>

Tabelle 4: Klassische und neue Prognosefaktoren von klinischer Relevanz [10]

Auch aus gesundheitsökonomischen Gründen wäre es sehr sinnvoll, die effektivste Therapie für die individuelle Patientin ausfindig zu machen. Vor 15 Jahren lagen die Kosten für eine Systemtherapie mit 6 Zyklen CMF (Cyclophosphamid – Methotrexat – 5-Fluoruracil) und 5 Jahre Tamoxifen bei etwa 980 Euro. Heute betragen die Kosten 61.775 Euro bei einer taxanhaltigen Chemotherapie, Aromatasehemmer und Trastuzumab [4]. Diese Zahlen lassen erkennen, dass in Zukunft Kosten-Nutzen- und Kosten-Effektivitäts-Analysen eine entscheidende Rolle bei der Therapie des Mammakarzinoms spielen werden. Daher wird es unverzichtbar sein, genau diejenigen tumorbiologischen Eigenschaften des Karzinoms zu bestimmen, die Aussagen über das Nutzen einer Chemo-, Hormon- oder Immuntherapie treffen können.

Kriterium	Erläuterung
1	Biologische Hypothese
2	Einfache und standardisierte Nachweismethode mit Qualitätssicherung
3	Biostatistische Planung der Evaluierungsstudien
4	Überprüfung der Korrelation zu etablierten Faktoren
5	Optimierte Schwellenwerte zur Unterscheidung in Niedrig- und Hochrisikogruppe
6	Univariate und multivariate Analyse (Unabhängigkeit und Gewichtung der Faktoren)
7	Unabhängige Validierung (anderes Patientenkollektiv, andere Untersucher)
8	Klinische (Therapie-)Studie, Metaanalyse
9	Überführung in die klinische Praxis

Tabelle 5: Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren [1]

1.4.1 Klinisch etablierte Prognosefaktoren

Es gibt wenige Faktoren, die eine gesicherte klinische Relevanz besitzen.

Obligat bestimmt werden müssen [1]:

- Nodalstatus
- TNM-Status
- Grading
- histologischer Tumortyp
- peritumorale Gefäßinvasion
- Steroidhormonrezeptorstatus

Der Nodalstatus ist der stärkste Prognosefaktor für ein Rezidiv und das Überleben. Hierbei korreliert die Anzahl der befallenen Lymphknoten direkt mit dem Risiko eines Rezidivs bzw. des Todes. Ob die Prognose auch durch den alleinigen Nachweis isolierter Tumorzellen bzw. Mikrometastasen beeinflusst wird, ist jedoch bei bisher unzureichender Datenlage unklar und sollte daher die Wahl der adjuvanten Therapie nicht beeinflussen. Es besteht eine positive Korrelation zwischen Größe des Primärtumors und axillärem Lymphknotenbefall.

Alle invasiven Mammakarzinome müssen graduiert werden. Die korrekte Graduierung ist bezüglich der prognostischen Aussage wichtiger als die Typisierung. Die Graduierung korreliert signifikant mit Lymphknotenstatus, Rezidivrate, Mortalitätsrate und Rezeptorstatus. Weiterhin besteht eine eindeutige Abhängigkeit zwischen histologischem Grading und rezidivfreiem Überleben.

Etwa 75-80% aller Mammakarzinome sind invasiv duktales Karzinome und 15% lobuläre Karzinome. Die Subtypen, wie z.B. muzinöses und medulläres Karzinom machen 5% der Karzinome aus und haben insgesamt eine bessere Prognose. Ein peritumorales Tumoreinbruch in die Lymph- oder Blutgefäße weist auf eine schlechte Prognose hin.

Der Hormonrezeptorstatus, ob Östrogen (ER)- und/oder Progesteronrezeptor (PR), wird bei 75-80% aller Mammakarzinome als positiv bestimmt und dient hauptsächlich als prädiktiver Faktor. Die prognostische Vorhersagekraft des Steroidhormonrezeptorstatus nimmt mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit ab und ist stark von der adjuvanten Therapie beeinflusst.

Auch das Alter der Patientin spielt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Prognose. Patientinnen unter 35 Jahre haben eine schlechtere Prognose [1].

1.4.2 Neue Prognosefaktoren

Zur Zeit werden zahlreiche Prognosefaktoren in Studien untersucht. Von den etwa 100 neuen Prognosefaktoren werden die Marker vorgestellt, die in der vorliegenden Arbeit auf die Korrelation zu der Protease uPA und seinem Inhibitor PAI-1 untersucht worden sind.

- human epidermal growth factor receptor 2 (Her2/neu)
- epidermal growth factor receptor (EGFR)
- vascular endothelial growth factor (VEGF)
- Tumorsuppressorgen p53
- Ki-67/MIB-1
- Matrix-Metalloproteinase 11(MMP-11)

Her2/neu

Das Her2/neu(erbB-2)-Onkoprotein ist ein transmembranöser Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ. 20-30% aller invasiven Mammakarzinome zeigen eine Überexpression dieses Glykoproteins. In den meisten Fällen ist dies auf eine Amplifikation des Protoonkogens c-erbB-2 zurückzuführen [14].

Eine Her2/neu-Überexpression ist mit folgenden Prognoseparametern verbunden:

- fortgeschrittenes Tumorstadium
- fehlende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren
- erhöhte S-Phasenfraktion
- erhöhte Zahl befallener axillärer Lymphknoten
- DNA-Ploidie
- höheres nukleäres Grading
- reduzierte Funktion lytischer Effektorzellen

Der Her2/neu-Status ist ein unabhängiger Prognosefaktor [15]. Dies gilt auch für kleine Mammakarzinome (pT1, pN0).

Es gibt Hinweise darauf, dass Patientinnen mit einer Überexpression von Her2/neu und einem positiven Hormonrezeptorstatus eher von einem Aromatasehemmer als von einem Antiöstrogen profitieren [16]. Bei Patientinnen mit einem positiven Her2/neu-Status ist eine Anthrazyklin- und/oder Taxan-haltige Chemotherapie wirksamer als eine CMF (Cyclophosphamid – Methotrexat – 5-Fluoruracil) Chemotherapie [17].

Seit der Konsensus-Konferenz von St. Gallen 2005 gilt der Her2/neu-Status als negativer Prognosefaktor und geht in die Therapieentscheidung mit ein.

EGF-Rezeptor

Der Wachstumsfaktor „epidermal growth factor“ (EGF) ist ein Transmembranprotein und vermittelt die Tumorpheriferation und tritt bei ca. 20% aller Mammakarzinome auf [59]. Die EGFR Überexpression kann immunhistochemisch an Gefrier- und Paraffinmaterial nachgewiesen werden.

Der Nachweis des EGF-Rezeptors in Tumorzellen ist mit einer geringeren rezidivfreien Überlebenszeit bei nodal-positiven sowie nodal-negativen Patientinnen korreliert [48]. Eine nachgewiesene EGFR Überexpression ist auch mit verkürztem Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben assoziiert.

Dieser Faktor ist möglicherweise nicht nur als Prognosefaktor, sondern auch zur Abschätzung des Ansprechens auf eine Tamoxifentherapie geeignet (gutes Ansprechen in Abwesenheit des EGF-Rezeptors) [21].

Neuartige Krebstherapien zielen darauf ab, dieses onkogene Signal von EGFR zu blockieren und somit das Tumorstwachstum zu unterbinden. Bereits erfolgreich getestete und zugelassene Substanzen dieser sogenannten gezielte Krebstherapie (targeted therapy) sind unter anderem Gefitinib (Iressa), Erlotinib (Tarceva) oder die monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbix) und Panitumumab (Vectibix).

VEGF

Wächst der Tumor über mikroskopische Grenzen hinaus, kann seine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion allein nicht mehr aufrechterhalten werden. Für eine weitere Größenzunahme müssen neue Blutgefäße gebildet werden (Angiogenese). Zu den wichtigsten die Angiogenese stimulierenden Faktoren gehört der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor), der auch in der Embryogenese und bei der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielt. Die Angiogenese fördernde und hemmende Faktoren halten sich im gesunden Organismus die Waage und neutralisieren sich in ihrer Wirkung (angiogene Balance), so dass nicht unkontrolliert neue Blutgefäße gebildet werden. Dieses Gleichgewicht kippt, wenn der Tumor die Angiogenese stimulierenden Faktoren freisetzt, wodurch neue Blutgefäße gebildet werden (angiogener Switch). Bei der tumorbedingten Angiogenese wird VEGF vom Tumor freigesetzt und erreicht auf Endothelzellen benachbarter Blutgefäße spezifische Rezeptoren, an die er bindet. Durch das

Andocken wird die Bildung neuer und das Wachstum vorhandener Blutgefäße im und zum Tumor angeregt. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass der Tumor wachsen und Metastasen bilden kann [22].

Der monoklonale Antikörper Bevacizumab greift zum Beispiel in diesen Prozess ein, indem es freies VEGF im Serum bindet. Da VEGF nicht mehr an die Rezeptoren andocken kann, wird die Angiogenese gehemmt, der Tumor kann nicht weiter wachsen.

In einer Studie von Leitner et al. war die Tumorneoangiogenese der stärkste Prädiktor für Metastasierung bei nodal-negativen Patientinnen mit einem relativen Risiko (RR) von 6,3 in der multivariaten Analyse [23]. Die quantitative Messung des VEGF im Primärtumor bei 260 nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen korrelierte in einer Untersuchung von Martin et al. signifikant mit dem rezidivfreien und Gesamtüberleben in der univariaten und multivariaten Analyse [24].

Tumorsuppressorgen p53

Mutationen im p53-Gen sind bei verschiedenen soliden Karzinomen nachgewiesen worden [20]. Dieses Wächtergen sorgt in der Wildtypform dafür, dass Zellen mit DNA-Schäden im Zyklus arretiert werden, um Reparaturmechanismen in Gang zu setzen bzw. die Apoptose der malignen Zelle einzuleiten. Das Ansprechen auf die adjuvante Chemotherapie korreliert allerdings nicht mit dem immunhistochemischen p53-Nachweis [25-27]. Damit hat p53 keinen prädiktiven Wert. Das Protoonkogen bcl-2 kann den p53-vermittelten Apoptosemechanismus rückgängig machen, verschafft also einen Selektionsvorteil, indem es das Zellüberleben verlängert, ohne primär die Zellproliferation zu beeinflussen [28]. Durch zusätzlich erworbene Mutationen kann es jedoch zur Progression und Invasion kommen. Die bcl-2-Überexpression und der Apoptoseverlust sind hochsignifikante Prädiktoren des axillären Lymphknotenbefalles [29].

Ki-67/MIB-1

MIB-1, ein monoklonaler Antikörper, wird zur immunhistochemischen Anfärbung des Ki-67 Proteins benutzt. Der Proliferationsindex wird mit MIB-1 positive Zellen/100 Tumorzellen angegeben. Je niedriger die MIB-1 positiven Zellen, desto geringer die Proliferationsaktivität des Tumorgewebes.

Das Ki-67 ist ein zelluläres Protein, welches mit der Zellproliferation assoziiert ist und nur während der G0 Phase detektiert werden kann. Es dient somit als Zellproliferationsmarker.

Eine erhöhte Proliferationsaktivität ist oft mit einem geringen Differenzierungsgrad, einem negativen Steroidhormonrezeptorstatus und einer ungünstigen Prognose assoziiert.

Es finden sich signifikante Korrelationen zwischen dem Überleben und der mit Hilfe von MIB-1 respektive Ki-67 bestimmten Proliferation.

Der Proliferationsmarker Ki-67 ist zudem ein unabhängiger signifikanter Prognosefaktor für die Vorhersage eines späten Lokalrezidivs mehr als 2 Jahre nach Primärtherapie, unabhängig davon, ob bei der chirurgischen Primärtherapie ein ablatives oder brusterhaltendes Verfahren zum Einsatz kam.

Eine hohe Proliferationsaktivität erhöht allerdings auch die Wahrscheinlichkeit einer Komplettremission unter neoadjuvanter (Radio-)Chemotherapie [19,30].

MMP-11 (Stromelysin-3 ST3)

Die Proteolyse ist die Ablösung von Zellen aus dem Primärverband des Tumors und Penetration durch Basalmembran und Zellmatrix. Dabei spielen Membrantyp- 1, ±2, ±3-Matrixmetalloproteinasen (MT-1, 2, 3, MMP) eine wichtige Rolle [31].

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind und zum Um- und Abbau von Gewebe führen. Bei physiologischen Prozessen, wie bei der Gewebsneubildung und dem Wachstum einschließlich Zellabbau bzw. Zellerneuerung ist die Funktion dieser Enzyme von wesentlicher Bedeutung für den Organismus. Aber auch bei pathologischen Veränderungen spielen die katalytischen Aktivitäten der MMPs und deren Regulierung eine wichtige Rolle [20,32]

Es ist nachgewiesen, dass die Aktivierung des Kollagenabbaus der Zellmatrix auf mehreren Wegen erreicht wird:

- Proteolyse der Fibroblastenprokollagenase zu Kollagenase [33]
- Inhibition einer Antikollagenase durch proteolytische Spaltung von Tissue inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)

Das MMP-11 (Stromelysin-3 ST3) spielt bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle. Mammakarzinompatientinnen mit einer Überexpression von MMP-11 haben sowohl ein kürzeres DFS- (Disease Free Survival) als auch ein kürzeres OS-Intervall (Overall Survival) [34].

1.4.3 Prädiktive Faktoren

Wie bereits erwähnt, gehören zu den prädiktiven Faktoren der Hormonrezeptorstatus, die Her2/neu Überexpression und der Menopausenstatus. Diese Faktoren haben die Fähigkeit, das Ansprechen einer Therapie vorauszusagen.

Eine eindeutige Trennung in prädiktive und prognostische Marker ist nicht immer möglich. Nicht selten verfügt ein Marker über therapie- und prognoserelevante Eigenschaften. So würde sich der Einfluss rein prädiktiver Faktoren auf die Krankheitsprognose ausschließlich durch die angewandte Therapie erklären lassen. Die Einschätzung einer Prognose anhand eines prognostischen Markers bliebe dagegen unbeeinflusst von jeder therapeutischen Maßnahme. Der Hormonrezeptorstatus ist ein Beispiel für einen bivalenten Marker. Sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptorstatus sind unabhängige Prognosefaktoren für das Mammakarzinom. Patientinnen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus zeigen ein verlängertes Gesamtüberleben. Dies wiederum ist zu großen Teilen dem prädiktiven Einfluss einer erfolgreichen endokrinen Therapie geschuldet.

Prädiktive Faktoren für die adjuvante Therapie des Mammakarzinoms				
Faktor	Therapie	Oxford LOE	Oxford GR	AGO EG
ER/PR-Status	Endokrin	1a	A	++
HER2	Endokrin	2b	D	–
Menopausenstatus	Ovarablation	1c	A	++
Menopausenstatus	Aromataseinhibitoren	1c	A	++
HER2	Chemotherapie	2b	D	–
ER/PR-Status	Chemotherapie	2a	B	+/-
uPA/PAI-1	Chemotherapie	2a	C	+/-
HER2	Trastuzumab	2b	D	++
Topoisomerase II α	Anthrazykline	2b(a)	B	–
ER = Östrogenrezeptorstatus PR = Progesteronrezeptorstatus Oxford LOE = level of evidence Oxford GR = Grades of Recommendation EG = Empfehlungsgrad				

Tabelle 6: Empfehlung der Bestimmung prädiktiver Faktoren für die Therapieentscheidung nach AGO 2007 [36]

Patientinnen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus profitieren von einer antihormonellen Therapie. Voraussetzung für die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie ist der Nachweis von Hormonrezeptoren mittels Immunhistochemie oder quantitativ. Patientinnen, deren

Karzinome östrogenrezeptornegativ sind, haben keinen Vorteil von einer antihormonellen Therapie. Die Tumoren dieser Patientinnen sprechen signifikant besser auf eine primäre Chemotherapie an [35].

Eine HER2-Proteinüberexpression bzw. Genamplifikation ist prädiktiv für das Ansprechen einer Trastuzumab-Therapie. Die Bestimmung des HER2-Status sollte mittels Immunhistochemie durchgeführt werden. Bei einer mittelgradigen Expression (Score 2+) sollte eine ergänzende Fluoreszenz- in-situ-Hybridisierung (FISH) erfolgen.

Zu welcher Therapieentscheidung die jeweiligen prädiktiven Faktoren nach den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) Kommission Mammakarzinom führen sollten, ist in Tabelle 6 für die adjuvante Therapie des Mammakarzinoms gezeigt [36].

1.4.4 Bedeutung der neuen Prognosefaktoren uPA und PAI-1

Proteolysefaktoren gehören zu den Serinproteasen und entfalten irreversible Wirkungen, was für die meisten anderen Enzymen nicht typisch ist, da sie die biochemische Reaktion in beide Richtungen katalysieren. Charakteristisch für die Serinproteasen ist der Besitz der sogenannten katalytischen Triade in der Aminosäuresequenz. Die katalytische Triade wird durch Serin 195, Histidin 57 und Asparaginsäure 102 aufgebaut.

Sowohl in gesunden als auch in Krebszellen werden die Proteolysefaktoren sezerniert, wobei der Gehalt im tumorösen Gewebe höher ist als im Normalgewebe.

Sowohl Plasmin, t-PA (tissue/Gewebe-Typ Plasminogenaktivator), uPA (urokinase-Plasminogenaktivator), uPAR (uPA-Rezeptor), PAI-1 als auch PAI-2 gehören zu den Proteolysefaktoren aus der Plasminogenaktivator-Gruppe und spielen bei der Blutgerinnung und Abbau von Blutgerinnsel eine wichtige Rolle.

Die Serinproteasen t-PA und uPA überführen Plasminogen zu Plasmin. Plasminogen befindet sich nicht nur in Blutgefäßen, sondern auch im Gewebe. Die Hauptaufgabe des Plasmins ist die Fibrinolyse.

Neben seiner fibrinolytischen Aktivität kann Plasmin verschiedene andere Proteine spalten. Auch an entzündlichen Prozessen, Wundheilung, Angiogenese und der Tumordinvasion und Metastasierung ist es beteiligt und baut entweder direkt oder indirekt über Matrixmetalloproteasen (MMPs) die meisten Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) ab. Ebenso fördert der Abbau der ECM die Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel von EGF (epidermal growth factor), welche in der intakten ECM ihre Aktivität nicht entfalten können.

Durch die Umwandlung des Plasminogens zu Plasmin werden die Gewebeverbindungen und auch das Stroma des Tumors aufgelöst. Dieser Vorgang wird als Matrixdegradation bezeichnet (Abbildung 2). Die Aktivierung der Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin erfolgt durch die Bindung des uPA an den Rezeptor der Tumorzelle. Als Inhibitor wirkt das PAI-1, welches sich auch an den uPA/uPa-R-Komplex bindet und durch transmembranöse Rezeptoren in die Zelle aufgenommen wird. Intrazellulär kommt es zur Abspaltung dieses Tertiärkomplexes und die Rezeptoren können sich wieder an die Zelloberfläche begeben. Die Bindung von uPA an seinen Rezeptor kann wieder erfolgen. [37,38].

Durch die perizelluläre Proteolyse wird nun der Weg freigemacht für die Metastasierung der Tumorzellen über die Blut- und Lymphgefäße. Die Tumorzellen verlassen die Gefäße wiederum durch die Proteolyse.

Unabhängig von ihrer enzymatischen, den Abbau der ECM begünstigenden Aktivität, löst die Bindung von uPA an den uPAR Wachstumssignale in den Tumorzellen aus. Zudem interagiert der uPA-Rezeptor mit Vitronektin und Integrinen, welche jeweils eine Rolle in den Prozessen der Zelladhäsion und der Signaltransduktion spielen.

Insgesamt erwerben die Tumorzellen also Wachstums- und Überlebensvorteile, indem sie das uPA-System überexprimieren, welches das Wachstum, die Invasion und die metastatische Ausbreitung der Tumorzellen über multiple Mechanismen begünstigt. Somit stellt das uPA-System eine therapeutische Zielstruktur für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente dar, die in der Lage sein sollen, den Tumor an unterschiedlichen Stellen im Wachstums- und Metastasierungsprozess anzugreifen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das Plasminogen-Aktivator-System und das Matrix-Metalloproteinsystem bei der Metastasierung von Tumorzellen eine entscheidende Rolle spielen.

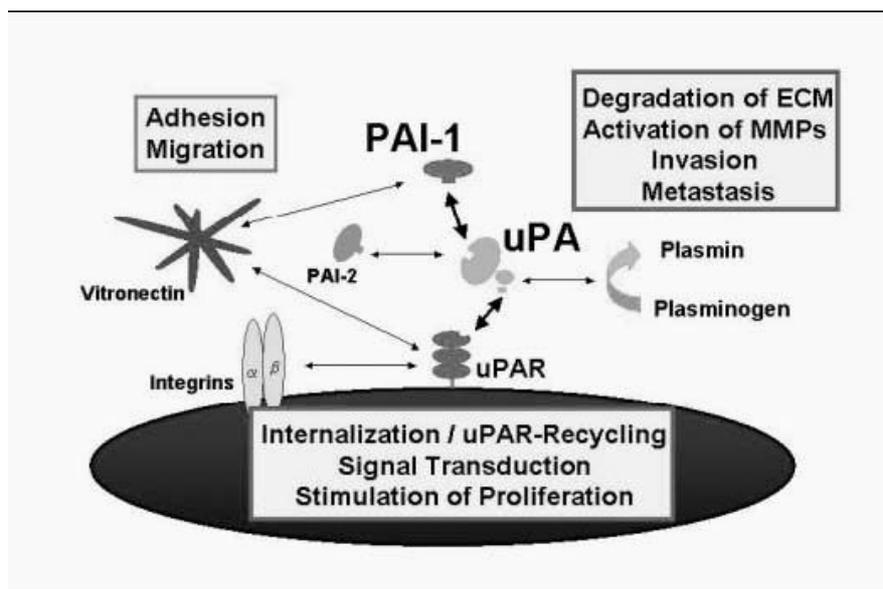


Abbildung 2: Funktionsweise von uPA und PAI-1 [39]

Obwohl man davon ausgehen müsste, dass PAI-1 die Metastasierung von malignem Gewebe einschränken müsste, ist dies aber nicht der Fall. Der Grund liegt in dessen vielfältigen biologischen Eigenschaften. Es ist es nicht nur ein Inhibitor für uPA und t-PA, sondern hat seine Aufgaben auch bei der Zelladhäsion und Zellmigration, Signaltransduktion und Apoptose.

Zahlreiche Studien zeigen, dass hohe Werte von uPA (>3 ng/mg Protein) und PAI-1 (>14 ng/mg Protein) mit einer schlechten Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens und dem DFS (Disease Free Survival) einhergehen [11,13,37,40].

Bei 45% der nodal-negativen Patientinnen liegen hohe Werte an uPA und/oder PAI-1 vor. 55% mit niedrigen uPA und/oder PAI-1 haben ein Rezidivrisiko innerhalb der ersten 5 Jahre von 5% [13].

Astedt et al. hatten 1976 erstmals hohe Werte an uPA beim Ovarialkarzinom nachweisen können [41]. Heute liegen zahlreiche Publikationen vor, die die erhöhte Expression von uPA auch bei anderen Tumorarten gezeigt haben [42-47].

Duffy et al. stellten 1988 den Zusammenhang zwischen hohen Werten von uPA und signifikant kürzerem DFS-Intervall beim Mammakarzinom 1988 fest [48].

Über die Korrelation von hohen PAI-1-Werten und schlechter Prognose beim Mammakarzinom berichteten erstmals Jänicke et al. 1991 und hatten 1993 als erste festgestellt, dass nicht nur uPA, sondern auch PAI-1 eine prognostische Aussage besitzt [49].

In einigen Studien zeigte sich, dass die prognostische Information, die durch uPA-Antigen-Bestimmung erhalten wird, unabhängig von den klassischen prognostischen Faktoren wie Tumorgröße und Lymphknotenstatus ist [49].

Beide Faktoren sind auch unabhängig von den klassischen Prognosefaktoren wie Grading, Hormonrezeptorstatus oder Menopausalstatus [40].

Dem HER2/neu ist es als reiner Prognosefaktor beim nodal-negativen Mammakarzinom für die Abschätzung des weiteren Krankheitsverlaufs ohne adjuvante Systemtherapie überlegen [50].

Durch eine prospektive randomisierte Multicenterstudie und einer Metaanalyse erreichten die Proteasen uPA und PAI-1 den höchsten Level of Evidence (LOE I) und wurden in die Leitlinien 2006 der AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie) aufgenommen [9].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die Korrelationen zwischen uPA und PAI-1 zu etablierten (Alter, T-Status, N-Status, Grading, Hormonrezeptoren, M-Status) und neuen Prognosefaktoren (Her2/neu-Status, EGFR, VEGF, p53, Ki-67/MIB-1, MMP-11) untersucht. Des Weiteren wurde die Korrelation von uPA und PAI-1 zum rezidivfreien Überleben (RFS) sowohl bei nodal-negativen als auch bei nodal-positiven Mammakarzinomen nach adjuvanter Systemtherapie (Chemo und/oder Hormontherapie) analysiert und mit den Prognosefaktoren Hormonrezeptor, Her2/neu, EGFR und Tumorsuppressorgen p53 verglichen.

Das Augenmerk wurde auf das Subkollektiv der Frauen ohne Lymphknotenbefall gelegt. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Liegen signifikante Zusammenhänge zwischen uPA und PAI-1 zu etablierten und neuen Prognosefaktoren vor?
2. Wie verhält sich die prognostische Fähigkeit von uPA und PAI-1 bezüglich des rezidivfreien Intervalls bei nodal-negativem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie im Vergleich zu anderen Prognosefaktoren wie Hormonrezeptor, Her2/neu, EGFR und p53?

2 Patientinnen, Material und Methoden

2.1 Material und Methoden

Die Daten von 1993 Mammakarzinomen stammten aus dem Brustzentrum der St. Josefsklinik in Offenburg und wurden im Zeitraum vom 01.01.1997 bis zum 20.03.2008 dokumentiert.

Aus diesen Daten flossen 1251 Mammakarzinome in die Analyse der Korrelationen ein und 1278 Mammakarzinome in die Auswertung des rezidivfreien Intervalls.

Als Datenbank wurde in Offenburg das Tumordokumentationsprogramm MaDoS (**M**amma-**D**okumentations-**S**ystem) benutzt.

Die Bestimmung der Proteasen erfolgte im Institut für onkologische Chemie der Heinrich-Heine Universität mittels kommerziell erhältlichen ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-Tests in Detergenzextrakten.

Dabei wurde der in vitro Test Femtelle von dem Unternehmen american diagnostica eingesetzt.

Da bei allen Geweben die Bearbeitung der Proben nach gleichen Kriterien erfolgte, ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Für die Bestimmung werden etwa 150-200 mg Gefriermaterial benötigt. Das Ergebnis liegt am dritten Tag nach Materialeingang vor [19].

2.1.1 Testprinzip

Femtelle erkennt verschiedene Formen von uPA: sc-uPA, hoch molekulares (HMW) uPA, uPA komplexiert mit PAI-1 oder mit Plasminogenaktivator Inhibitor Typ-2 (PAI-2), sowie latente und aktive Formen von PAI-1. Der Femtelle Test basiert auf einem hoch spezifischen monoklonalen Maus Fängerantikörper, der entweder gegen humanes uPA oder humanes PAI-1 gerichtet ist. Tumorgewebeextrakte mit bekannter Gesamtproteinkonzentration werden über Nacht in den Vertiefungen der Mikrotiterstreifen inkubiert, die mit uPA oder PAI-1 Fängerantikörper beschichtet sind. Nach dem Waschen wird der biotinylierte Detektionsantikörper, der entweder gegen humanes uPA oder humanes PAI-1 gerichtet ist, zugesetzt. Nach kurzer Inkubationszeit, wird der biotinylierte Zweitantikörper durch ein Streptavidin – Meerrettichperoxidase (HRP) Konjugat nachgewiesen.

Das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Perborat (TMB) wird durch die HRP umgesetzt, was zu einer Blaufärbung führt. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird die Reaktion gestoppt und die Färbung schlägt von blau nach gelb um. Die uPA und PAI-1 Werte werden durch

Messung der optischen Dichte bei 450 nm anhand der mitgeführten Standardkurve ermittelt. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration des Gewebextrakts erfolgt durch einen chromogenen Protein Assay. Die gemessenen Werte werden entweder als ng uPA/mg Gesamtprotein oder als ng PAI- 1/mg Gesamtprotein im Tumorgewebeextrakt angegeben.

Vorbereitung der Reagenzien

A. uPA und PAI-1 Standards

1. Je 1 ml gefiltertes deionisiertes H₂O in die 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 und 1.0 ng/mL uPA Standard Fläschchen geben. 2 ml gefiltertes deionisiertes H₂O in das 0.0 ng/mL uPA Standard Fläschchen geben.
2. Je 1 ml gefiltertes deionisiertes H₂O in die 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 und 10 ng/mL PAI-1 Standard Fläschchen geben. Je 2 ml gefiltertes deionisiertes H₂O in das 0.0 ng/mL PAI-1 Standard Fläschchen geben.
3. Vorsichtig 3 Minuten mischen. Nicht vortexen!

B. Detektionsantikörper

1. Je 5.5 ml gefiltertes deionisiertes H₂O in die uPA und PAI-1 Detektionsantikörper Fläschchen geben
2. Vorsichtig 3 Minuten mischen.

C. Enzymkonjugat Verdünner

1. 20 ml gefiltertes deionisiertes H₂O zugeben und gut durchmischen.

D. Waschpuffer

1. Den Inhalt einer Packung PBS in 900 ml gefiltertem deionisiertem H₂O lösen.
2. 4 mL des 25% Triton X-100 Detergenz zugeben.
3. Mit gefiltertem deionisiertem H₂O ad 1 Liter auffüllen.
4. Gut mischen.

E. Proben Puffer

BSA zum Waschpuffer in einer Endkonzentration von (1% w/v) zugeben.
Ausreichende Menge des Probenpuffers herstellen (ca. 2 ml Probenpuffer/Probe).

F. 10% Triton X-100

4 mL 25% Triton X-100 zu 6 mL gefiltertem deionisiertem H₂O zugeben.

G. Tris-gepufferte Salzlösung, TBS, pH 8,5

1. Den Inhalt einer Packung TBS in 900 ml gefiltertem deionisiertem H₂O lösen.
2. Mit gefiltertem deionisiertem H₂O ad 1 Liter auffüllen.

3. Gut mischen.

Probenvorbereitung

A. Pulverisierung des Gewebes

1. Ca. 100-300 mg des tiefgefrorenen Gewebes entnehmen (z.B. aus flüssigem Stickstoff Tank).
2. Den gefrorenen Gewebekblock in ein vorgekühltes Dismembratorgefäß (in flüssigem Stickstoff gekühlt) überführen.
3. Das Gewebe 30 sec im Mikro-Dismembrator pulverisieren.
4. Das gefrorene Pulver in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen.

B. Gewebeextraktion

5. 0.2 mL 10% Triton-X 100 in 1.8 mL TBS, pH 8.5 geben um eine 1% Triton-X Lösung zu erhalten. (Beachte: Für cytosolische Gewebefractionen 2.0 mL TBS, pH 8.5 ohne Triton-X 100 Detergenz verwenden).
6. Das Gewebepulver in 2 mL kaltem TBS, pH 8.5 mit 1% Triton X-100 resuspendieren (Beachte: Für cytosolische Gewebefractionen das pulverisierte Gewebe in 2.0 mL kaltem (4°C) TBS, pH 8.5 ohne Triton X-100 Detergenz aufnehmen).
7. Die Gewebesuspension vorsichtig für 14 - 16 h bei 4°C schütteln (z.B. Überkopfschüttler).
8. Die Suspension bei 100 000 x g für 1 h bei 4°C zentrifugieren, um Zelltrümmer abzutrennen.
9. Mögliche Lipidreste, die sich dem Überstand befinden vorsichtig entfernen und den klaren Überstand (Gewebe Extrakt) in vorbereitete Kryoröhrchen (auf Eis) überführen. Das Pellet bzw. die Zelltrümmer verwerfen.
10. Den Überstand (Gewebeextrakt) in 100 NI Portionen aliquotieren und aus einem Aliquot die Gesamtproteinkonzentration des Gewebeextrakts bestimmen. Den Gewebeextrakt in flüssigem Stickstoff oder bei -800C bis zum weiteren Gebrauch lagern. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist unbedingt zu vermeiden, da es die Messergebnisse verfälschen kann.
11. Für die Anwendung im ELISA den Gewebeextrakt 1:20 in Probenpuffer verdünnen.

Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinkonzentration der Gewebeextrakte sollte mit dem BCA Proteintest von Pierce bestimmt werden, da dieser Proteintest nicht durch Detergenzien gestört wird und durch Triton X-100 Konzentrationen bis zu 1% nicht beeinflusst wird. Falls nötig, sollte die Gesamtproteinkonzentration des Gewebeextrakts durch Zugabe von TBS, pH 8.5 auf 2-3 mg Gesamtprotein/ml eingestellt werden.

2.1.2 uPA/PAI-1 ELISA Testdurchführung

Die Testführung erfolgt an zwei Tagen:

erster Tag

1. Benötigte Anzahl der beschichteten uPA Mikrotiterstreifen aus der Verpackung nehmen und in den Halter einlegen. Die restlichen Teststreifen gut verschlossen in der Folien Verpackung bei +2° bis +8°C lagern.
2. Benötigte Anzahl der beschichteten PAI-1 Mikrotiterstreifen aus der Verpackung nehmen und in den Halter einlegen. Die restlichen Teststreifen gut verschlossen in der Folien Verpackung bei +2° bis +8°C lagern.
3. Je 100 NL der rekonstituierten uPA Standards, Kontrollen und verdünnten Gewebeextrakt Proben in die mit uPA Antikörper beschichteten Vertiefungen zur Bestimmung von uPA geben. Je 100 NL der rekonstituierten PAI-1 Standards, Kontrollen and verdünnten Gewebeextrakt Proben in die mit PAI-1 Antikörper beschichteten Vertiefungen zur Bestimmung von PAI-1 geben.
4. Abdecken und über Nacht bei +40C in feuchter Kammer inkubieren.

zweiter Tag

5. Inhalt verwerfen und Teststreifen je 4 x mit Waschpuffer waschen.
6. Je 100 NL uPA Detektionsantikörper in die uPA beschichteten Vertiefungen geben. Je 100 uL PAI-1 Detektionsantikörper in die PAI-1 beschichteten Vertiefungen geben.
7. Abdecken und 1 h bei Raumtemperatur inkubieren (20° – 25°C).
8. Inhalt verwerfen und Teststreifen 4 x mit Waschpuffer waschen.
9. Für die Messung einer kompletten Platte mit 96 Vertiefungen 12 Nl des Enzymkonjugats in 12 ml Enzymkonjugat Verdünner geben (falls nicht die komplette Platte genutzt wird, 2 Nl Enzymkonjugat in 2 ml Verdünnerlösung pro Teststreifen (16 Vertiefungen) geben).

10. Je 100 NL des verdünnten Enzymkonjugats in die entsprechenden Vertiefungen geben (Beachte: uPA Enzym Konjugat nur in die mit uPA Antikörper beschichteten Vertiefungen geben. PAI-1 Enzym Konjugat nur in die mit PAI-1 Antikörper beschichteten Vertiefungen geben.)
7. Abdecken und 1 h bei Raumtemperatur inkubieren (20° – 25°C).
8. Inhalt verwerfen und Teststreifen 4 x mit Waschpuffer waschen.
9. Je 100 NL TMB Substratlösung in die Vertiefungen geben, abdecken und 20 min bei Raumtemperatur (20°-25°C) inkubieren. Eine blaue Farbentwicklung ist zu beobachten.
10. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von je 50 NL 0.5 N H₂SO₄. Kurz mischen (durch Antippen der Platte) um eine gleichmäßige Verteilung zu bewirken. Die Lösung färbt sich gelb.
11. Die Messung soll innerhalb von 30 min bei einer Meßwellenlänge von 450 nm erfolgen. Der Mittelwert der Extinktion des Nullwerts (Standard 0 ng/ml) ist von den Standards und den Proben abzuziehen.

2.1.3 Berechnung der Ergebnisse

1. Unter Verwendung des jeweiligen Extinktionsmittelwerts der verdünnten Probe, wird die entsprechende uPA und PAI-1 Konzentration in ng/ml anhand der Standardkurve abgelesen.
2. Um die uPA und PAI-1 Konzentrationen des Gewebeextrakts zu erhalten, ist der Probenwert mit 20 zu multiplizieren (Beachte: Der Gewebeextrakt wurde 20 fach verdünnt im Test eingesetzt).
3. Um die uPA und PAI-1 Konzentrationen in ng/mg Gesamtprotein zu erhalten, sind die uPA und PAI-1 Werte (ng/ml) durch die Gesamtproteinkonzentration (mg/mL) des Gewebeextrakts (siehe oben) zu teilen.

2.1.4 cut-off Wert

Der optimale cut-off Wert für beide Proteasen wurde in einer randomisierten Studie mit 3 ng/mg Protein für uPA und 14 ng/mg Protein für PAI-1 bestätigt und für die Aufteilung in Risikogruppen genutzt [37,39]. Niedrige Werte (uPA \leq 3 ng/mg Protein **und** PAI-1 \leq 14 ng/mg Protein) haben nach Angaben der Literatur [13] eine gute Prognose bezüglich Gesamtüberleben und rezidivfreiem Intervall und hohe Werte (uPA $>$ 3 ng/mg Protein **und/oder** PAI-1 $>$ 14 ng/mg Protein) eine schlechtere Prognose (Abbildung 3).

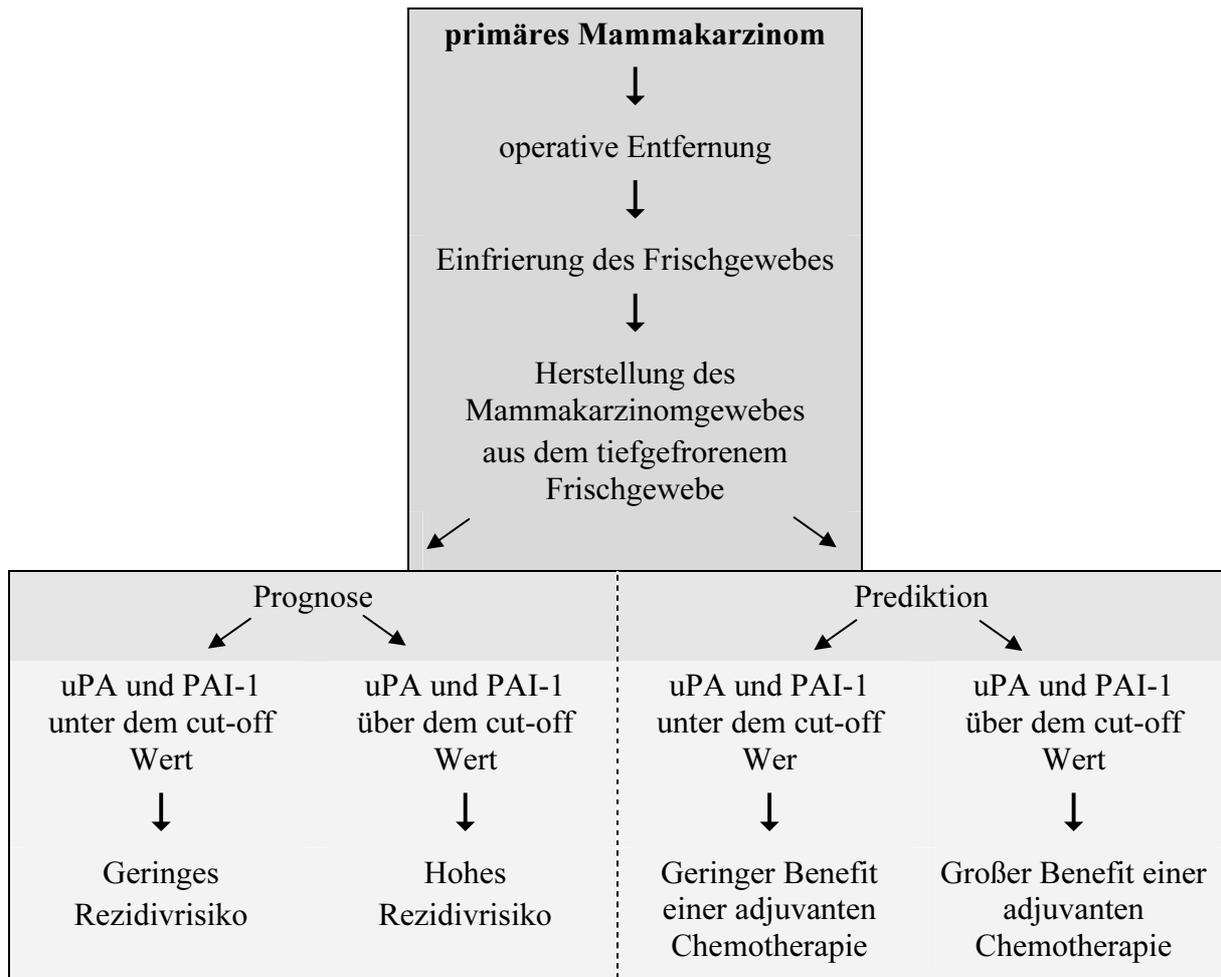


Abbildung 3: Algorithmus der Proteasenbestimmung [76]

2.2 uPA und PAI-1 im Kollektiv

Das Minimum sowohl für uPA als auch PAI-1 lag bei 0,1 ng/mg Protein. Im Maximum erreichte uPA einen Wert von 59,0 ng/mg Protein und PAI-1 743,0 ng/mg Protein. Die Mittelwerte liegen bei 3,232 ng/mg Protein für uPA und 19,467 ng/mg Protein für PAI-1 (Tabelle 7).

	Proteasen (n=1251)	
	uPA*	PAI-1*
Minimum	0,1	0,1
Maximum	59,0	743,0
Mittelwert	3,232	19,467
Standardabweichung	3,2789	30,5237
cut-off	> 3,0	> 14,0
n \leq cut-off	738 (59%)	717 (57%)
n > cut-off	513 (41%)	534 (43%)

Tabelle 7: uPA und PAI-1 im Überblick (*Einheit in ng/mg Protein)

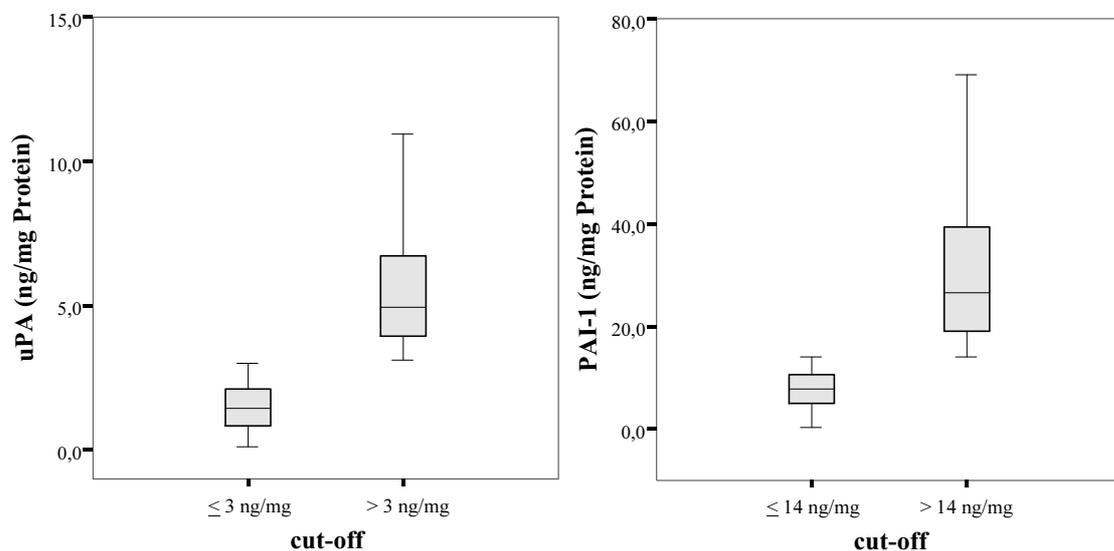


Abbildung 4: Box-Plot Darstellung von uPA und PAI-1 (Extremwerte und Ausreißer werden nicht dargestellt)

Entsprechend der Literatur wurden uPA und PAI-1 in zwei Gruppen eingeteilt (Tabelle 8). Die stärkste Unterscheidung zwischen Hoch- und Niedrigrisiko-Patientinnen wurde durch die Kombination uPA/PAI-1 mit der Einteilung in uPA und PAI-1 niedrig versus uPA und/oder PAI-1 hoch durch Studien bestätigt [37,39,51,52].

44% der Patientinnen hatten in unserem Kollektiv niedrige uPA und PAI-1 Werte, also unter dem cut-off Wert. Hohe uPA und/oder PAI-1 Werte waren bei 56% anzutreffen (Tabelle 8b).

Gruppeneinteilung	Gruppendefinition	n	%
uPA und PAI-1 (-)	≤ 3 ng uPA/mg Protein und ≤ 14 ng PAI-1/mg Protein	548	44
uPA und/oder PAI-1 (+)	> 3 ng uPA/mg Protein und/oder > 14 ng PAI-1/mg Protein	703	56
Gesamt		1251	100

Tabelle 8: Verteilung von uPA und PAI-1 in kombinierten Gruppen (n=1251)

2.3 Bestimmung der weiteren Prognosefaktoren

Östrogen- und Progesteronrezeptor

Gemäß dem St. Gallen-Konsens 2003 wird zwischen hormonsensitiven und nicht-hormonsensitiven Mammakarzinomen unterschieden. Es ist noch keine Einigkeit darüber erzielt worden, welcher exakte Grenzwert zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Kategorien herangezogen werden sollte.

Tumoren mit einem geringen Prozentsatz positiver Tumorzellkerne (ab ca. 1% der Tumorzellen) können ein gewisses Ansprechen auf eine endokrine Therapie zeigen. Aus empirischen Gesichtspunkten wird derzeit eine positive Färbereaktion von $\geq 10\%$ der Tumorzellkerne als Grenzwert für eine endokrine Ansprechbarkeit angesehen. Daher gelten in unserer Berechnung die Mammakarzinome ab $\geq 10\%$ als Hormonrezeptor-positiv. Die Bestimmung erfolgte immunhistologisch.

Her2/neu-Proto-Onkogen

Der Her2/neu-Status wurde in der vorliegenden Arbeit in die Kategorien „negativ und positiv“ eingeteilt. Die Klassifikation des Her2/neu-Proto-Onkogen-Nachweises erfolgte gemäß der Färbung der Plasmamembran bei immunhistochemischer Untersuchung.

Damit wurden die Mammakarzinome mit einem immunhistochemischen Score von 0+ bis 2+ als negativ bezeichnet und 3+ als positiv. Tabelle 9 definiert den immunhistochemischen Score von 0+ bis 3+.

Immunhistochemie Score	Reaktionsmuster	Bewertung
0+	keine Färbereaktion oder $\leq 10\%$ der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran	negativ
1+	$> 10\%$ der invasiven Tumorzellen mit schwacher inkompletter Markierung der Zellmembran	negativ
2+	$> 10\%$ der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität gering bis mittelgradig	schwach positiv (geringe HER-2/neu-Überexpression)
3+	$> 10\%$ der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität stark	stark positiv (starke HER-2/neu-Überexpression)

Tabelle 9: Bewertung der HER-2/neu-Immunhistochemie

EGFR

Die EGF-Rezeptor-Färbung ist eine Zellmembranfärbung. Bei der semiquantitativen Auswertung der EGFR-Färbung wurde die Intensität der stärksten Zellmembranfärbung mit 0-3 angegeben. Im Falle einer Färbung von <10% der Tumorzellen wurde der Schnitt als negativ gewertet. Eine schwache membranöse Anfärbung wurde als 1+, eine mäßige Anfärbung als 2+ und eine starke Anfärbung als 3+ gewertet (Tabelle 10).

Farbintensität	Reaktionsmuster
0+	Keine Membrananfärbung
1+	Schwache Membrananfärbung
2+	Mäßige Membrananfärbung
3+	Starke Membrananfärbung

Tabelle 10: EGFR-Score der Farbintensität

VEGF

Der Nachweis von VEGF erfolgte mittels Real-Time-RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion). Geht man davon aus, dass die in einer Zelle vorhandene Menge an mRNA von der Aktivität des korrespondierenden Gens abhängig ist, so lässt sich *vice versa* über die quantitative Erfassung der Veränderungen in den mRNA-Spiegeln ein Rückschluss auf die Aktivität des entsprechenden Gens vornehmen. Als ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung der mRNA-Mengenverhältnisse gilt die RT-PCR. Sie ist insbesondere dann die Methode der Wahl, wenn kleine Probengrößen vorliegen, d. h. die mRNA nur in geringer Menge exprimiert wird. Im Vergleich zur Vermehrung von DNA-Matrizen mit der herkömmlichen PCR, werden in der RT-PCR RNA-Moleküle vervielfältigt, indem man sie zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase in die cDNA umschreibt und dann die PCR nach dem herkömmlichen Schema ablaufen lässt. Die Intensität der nach einer Gelelektrophorese mit Agarose entstehenden Banden erlaubt Rückschlüsse auf die ursprünglich vorliegende mRNA-Menge. Zum einen können die Banden im Verhältnis zueinander verglichen werden, zum anderen kann eine Quantifizierung durch den Vergleich mit Kontrollen erfolgen, die durch eine PCR mit einer definierten Menge DNA gewonnen worden sind. Ein wesentlicher Fortschritt in der RT-PCR-Technologie hat sich durch die Real-Time-RT-PCR ergeben. Sie stellt ein Verfahren dar, in dem in einem System die Amplifikation sowie die direkte Detektion und Quantifizierung der Akkumulation des PCR-

Produktes möglich ist. Die quantitative Echtzeitanalyse („real time“) der PCR ist über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen realisierbar.

Die quantitative Bestimmung der Expression der Zielgene erfolgte durch Hochdurchsatz-Echtzeit-RT-PCR auf dem ABI PRISM® 7900HT Cycler. Die Primer und Sonden wurden als „Assay-on-Demand“ von Applied Biosystems bezogen. Jeder Assay enthält ein Amplifikationsprimer-Paar und eine zusätzliche TaqMan-MGB-Oligonukleotidsonde mit einem 6-FAM Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende sowie einem Quencher am 3'-Ende mit einem „Minor-groove“-Bindungsprotein zur Senkung der Schmelztemperatur (T_m) der Sonde. Die genauen Primersequenzen werden von Applied Biosystems nicht offen gelegt. Zur Orientierung sind aber Context Sequenzen des Amplikons und Zielexone bekannt gegeben (Tabelle 11).

Assay ID	Gene	Chromosome	Context Sequenz	Target Exons
Hs00171829_m1	MMP11	22	GCCTTCCAGGATGCTGATGGCTA TG	7
Hs00173626_m1	VEGF	6	ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGC ACC	1
Kontrollgen: Hs99999902_m1	RPLP0		GAAATGTTTCATTGTGGGAGCAG AC	

Tabelle 11: Materialtabelle der Primer/Sonden Kombination „Assays on Demand“ ABI

Die Gene wurden durch Ermittlung des Schwellenzyklus (C_t) quantifiziert. Als endogene Kontrolle wurde das Gen des ribosomalen Humanproteins RPLP0 verwendet. Die C_t Werte der Zielgene wurden durch Subtraktion des C_t Wertes der Kontrolle normalisiert:

$$\Delta C_t \text{ Zielgen} = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{RPLP0})$$

Alle Gene wurden doppelt analysiert. Zur Qualitätssicherung flossen für die weitere statistische Auswertung nur Versuche mit einem C_t (RPLP0) unter 31 Zyklen ein.

Aus der damit ermittelten Expressionsstärke wurde eine Rangfolge innerhalb des Kollektivs ermittelt und durch die Anzahl der getesteten Mammakarzinom-Biopsien geteilt. (Bestimmung des relativen Expressionsranges). Der Prozentrang sagt etwas über den Rang oder die Stellung aus, die in der Stichprobe eingenommen wird. Die Schwelle wurde bei einem Prozentrang von $\geq 80\%$ festgelegt.

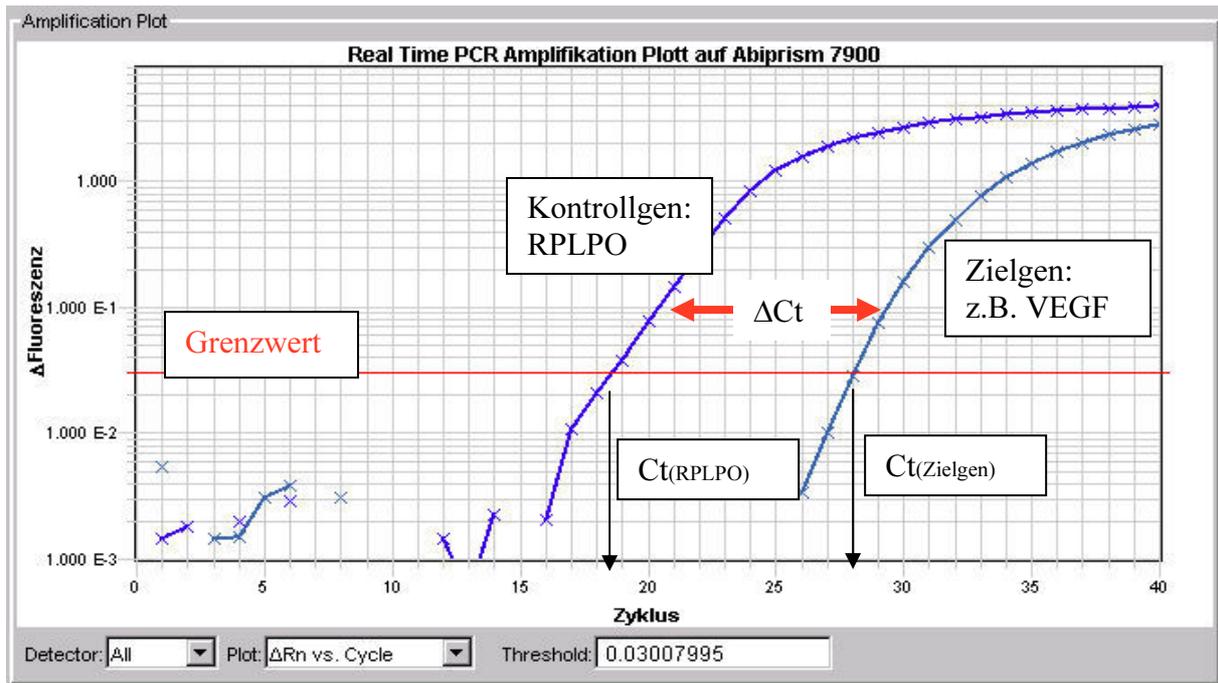


Abbildung 5: Beispiel für die Amplifikationskurve der RT-PCR auf dem Abiprism 7900

Tumorsuppressorgen p53

Nur als mutiertes Protein kann das p53-Gen in den Zellen akkumulieren. Somit wurde die Einteilung auf die vorhandene p53-Mutation bezogen (keine p53-Mutation versus p53-Mutation). Die Bestimmung erfolgte mittels Sequenzierung, mit der man den Ort der Mutation bestimmen kann.

Ki-67/MIB-1

Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde durch den monoklonalen Antikörper MIB-1 angefärbt und die Anfärbung der Tumorzelle beurteilt. Der angegebene Wert für die Proliferationsaktivität entspricht dem Prozentsatz der angefärbten Zellkerne. Die Färbungsintensität findet keine Berücksichtigung. Eine Überexpression für Ki-67 bzw. MIB-1 wurde bei größer oder gleich 30% angegeben.

MMP-11

Die Expressionsstärke der Matrix-Metalloproteinase 11 in den Tumorzellarealen wurde wie die Bestimmung von VEGF mittels Real-Time-RT-PCR ermittelt. Die Schwelle wurde ebenfalls bei Prozentrang $\geq 80\%$ festgelegt.

2.4 Auswertung der Korrelationen

Alle invasiven Mammakarzinome bei denen **beide** Proteasen uPA und PAI-1 bestimmt worden sind wurden auf die Korrelationen zu anderen Prognosefaktoren untersucht. Somit bestand das Kollektiv aus 1251 Mammakarzinomen. Reine Tis wurden ausgeschlossen. Tabelle 12 gibt die Ein- und Ausschlusskriterien an.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> invasives Mammakarzinom uPA <u>und</u> PAI-1 bestimmt 	<ul style="list-style-type: none"> reine Tis

Tabelle 12: Ein- und Ausschlusskriterien für die Auswertung der Korrelationen

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen lag bei 63 Jahren. Die jüngste Patientin war 25, die älteste 94 Jahre alt (Abbildung 6).

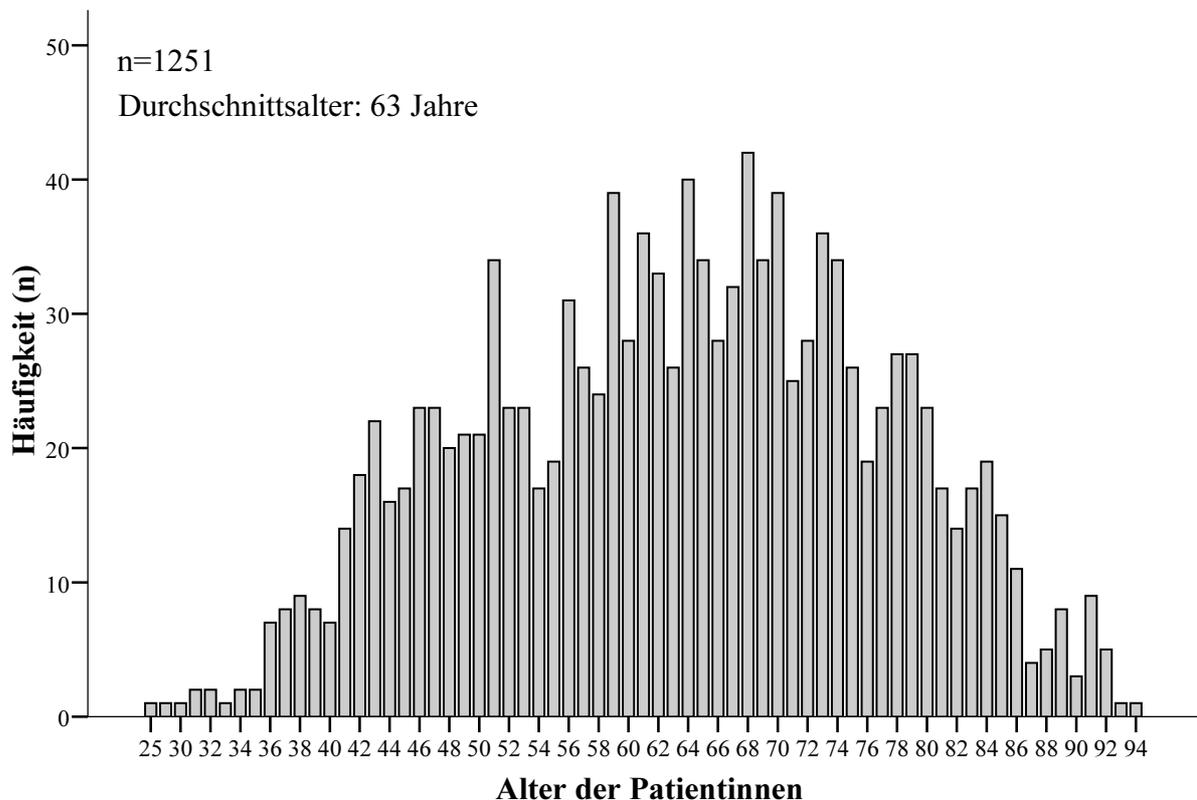


Abbildung 6: Altersverteilung im Kollektiv (n=1251)

Als klassische Prognosefaktoren wurden Alter, Tumorgröße (T-Status), Nodalstatus, Grading, Hormonrezeptor- und Metastasenstatus für die Korrelationsanalyse zu den beiden Proteasengruppen ausgewählt.

Her2/neu-Status, EGF-Rezeptor, VEGF, p53-Mutation, Antikörper MIB-1 bzw. Ki-67 und MMP-11 wurden als neue Prognosefaktoren in die Untersuchung der Zusammenhänge zu uPA und PAI-1 aufgenommen (Tabelle 13).

Klassische Prognosefaktoren	Neue Prognosefaktoren
<ul style="list-style-type: none"> • Alter • Tumorgröße • Nodalstatus • Grading • Hormonrezeptorstatus • Metastasierter Status 	<ul style="list-style-type: none"> • Her2/neu-Status • EGFR • VEGF • p53-Mutation • Ki-67/MIB-1 • MMP-11

Tabelle 13: Liste der untersuchten Prognosefaktoren zur Korrelation mit uPA und PAI-1

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Verteilung der zu untersuchenden Prognosefaktoren im Gesamtkollektiv. Einige Prognosefaktoren erreichen nicht eine 100%ige Bestimmung, da sie nicht immer dokumentiert oder bestimmt worden waren.

n=1251							
Prognosefaktor		n	%	Prognosefaktor		n	%
Alter			Her2/neu-Status				
< 50 Jahre	225	18	negativ	1116	89		
≥ 50 Jahre	1026	82	positiv	134	11		
fehlend	-	-	fehlend	1	>1		
Menopausalstatus			p53-Mutation				
prämenopausal	163	13	nein	850	68		
perimenoopausal	22	2	ja	236	19		
postmenopausal	575	46	fehlend	165	13		
fehlend	491	39					
Tumorgröße			EGFR				
T1 – T2	1100	88	≤ 2+	1101	88		
T3 – T4	119	9	3+	93	7		
fehlend	32	3	fehlend	57	5		
Nodalstatus			VEGF				
N0	654	52	< 80 %	205	16		
N1 – N3	557	45	≥ 80 %	57	5		
fehlend	40	3	fehlend	989	79		
Grading			MMP-11				
G1 – G2	823	66	< 80 %	232	19		
G3	425	34	≥ 80 %	93	7		
fehlend	3	>1	fehlend	926	74		
Metastasenstatus			MIB-1				
M0	1137	91	< 30 %	171	14		
M1	98	9	≥ 30 %	262	21		
fehlend	16	1	fehlend	818	65		
Hormonrezeptorstatus			Proteasen				
ER < 10%	238	19	uPA ≤ 3 ng/mg	738	59		
ER ≥ 10%	1013	81	uPA > 3 ng/mg	513	41		
PR < 10%	361	29	PAI-1 ≤ 14 ng/mg	717	57		
PR ≥ 10%	890	71	PAI-1 > 14 ng/mg	534	43		
fehlend	-	-	fehlend	-	-		

Tabelle 14: Datenübersicht (n=1251)

2.5 Auswertung des rezidivfreien Überlebens (RFS)

Das rezidivfreie Überleben bei nodal-negativen bzw. -positiven Mammakarzinomen nach adjuvanter Systemtherapie wurde nach der Methode von Kaplan-Meier dargestellt. In die Berechnung wurden nur Mammakarzinome aufgenommen, bei denen Tumortyp, Nodal- und Metastasenstatus bekannt war. Alle Patienten mit einer adjuvanten Systemtherapie wurden einbezogen, unabhängig davon, ob sie eine Mono- oder kombinierte Therapie (Chemo- **und/oder** Hormontherapie) erhalten haben. Follow-up-Daten mussten vorhanden sein. Metastasierte Karzinome, reine Tis und Fälle mit Nx und Mx wurden aus der Berechnung ausgeschlossen (Tabelle 15).

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • invasives Mammakarzinom • Nodalstatus bestimmt • Metastasenstatus bestimmt • adjuvante Systemtherapie (Chemo- <u>und/oder</u> Hormontherapie) • Follow-up Statistik vorhanden 	<ul style="list-style-type: none"> • reine Tis • Nodalstatus x (Nx) • metastasierte Mammakarzinome (M1) • Metastasenstatus x (Mx)

Tabelle 15: Ein- und Ausschlusskriterien für die Auswertung des rezidivfreien Überlebens

Nach diesen Ein- und Ausschlusskriterien verblieben 1278 Mammakarzinome aus dem Gesamtkollektiv von 1993 Datensätzen. Als Rezidiv wurden **sowohl** Lokalrezidive **als auch** Fernmetastasen definiert.

Die mediane Nachbeobachtungszeit lag bei 46,8 (1,6-132,7) Monaten. Zu jedem Faktor wurden jeweils die Ergebnisse der nodal-negativen und -positiven Mammakarzinome gegenüber gestellt.

	nodal-negativ		nodal-positiv		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
	759	59	519	41	1278	100
Proteasen						
uPA \leq 3 ng/mg	336	44	227	44	563	44
uPA $>$ 3 ng/mg	175	23	167	32	342	27
fehlend	248	33	125	24	373	29
PAI-1 \leq 14 ng/mg	311	41	234	44	545	43
PAI-1 $>$ 14 ng/mg	204	27	165	32	369	29
fehlend	244	32	120	24	364	28
uPA \leq 3 ng/mg und PAI-1 \leq 14 ng/mg	254	33	169	33	423	33
uPA $>$ 3 ng/mg und PAI-1 $>$ 14 ng/mg	257	34	225	43	482	38
fehlend	248	33	125	24	373	29
Hormonrezeptorstatus						
ER $<$ 10%	130	17	95	18	225	17
ER \geq 10%	627	82	424	82	1051	82
fehlend	2	>1	-	-	2	>1
PR $<$ 10%	214	28	145	28	359	28
PR \geq 10%	543	71	374	72	917	71
fehlend	2	>1	-	-	2	>1
ER $<$ 10% und PR $<$ 10%	114	15	89	17	203	15
ER \geq 10% und/oder PR \geq 10%	643	84	430	83	1073	84
fehlend	2	>1	-	-	2	>1
Her2/neu-Status						
negativ	691	91	453	87	1144	89
positiv	66	8	66	13	132	10
fehlend	2	>1	-	-	2	>1
p53-Mutation						
nein	510	67	329	63	839	66
ja	121	16	96	19	217	17
fehlend	128	17	94	18	222	17
EGFR						
\leq 2+	643	85	454	88	1097	86
3+	48	6	33	6	81	6
fehlend	68	9	32	6	100	8

Tabelle 16: Übersicht der untersuchten Prognosefaktoren für die Auswertung des rezidivfreien Überlebens (n=1278)

Die therapeutische Situation der 1278 Patientinnen zeigt Tabelle 17.

Bei 759 nodal-negativen Patientinnen wurden in 12% (n=89) der Fälle eine reine Chemotherapie durchgeführt und in 72% (n=548) der Fälle eine rein endokrine Therapie verabreicht. Die kombinierte adjuvante Systemtherapie erhielten 122 (16%) Patientinnen. Lokalrezidive und/oder Fernmetastasen traten bei 40 Frauen (5%) auf.

11% (n=58) der nodal-positiven Patientinnen erhielten reine adjuvante Chemotherapie. Nur Hormontherapie wurde in 115 (22%) Fällen verabreicht. Prozentual lag die Rezidivrate (Lokalrezidive und/oder Fernmetastasen) mit 19% über den Patientinnen ohne Lymphknotenbefall (5%). Beim nodal-positiven Subkollektiv verstarben im Beobachtungszeitraum 55 Patienten mehr.

	nodal-negativ		nodal-positiv		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
	759	59	519	41	1278	100
Operationsart						
BET	479	63	208	40	687	54
Mastektomie	278	36	311	60	589	46
kein chirurgischer Eingriff	2	>1	-	-	2	>1
adjuvante Systemtherapie						
reine Chemotherapie	89	12	58	11	147	12
reine Hormontherapie	548	72	115	22	663	52
Chemo- und Hormontherapie	122	16	346	67	468	37
Chemo- und/oder Hormontherapie	759	100	581	100	1419	100
Rezidive/Metastasen						
Lokalrezidive und/oder Fernmetastasen	40	5	96	19	136	11
Lokalrezidive und Fernmetastasen	4	>1	11	2	15	1
reine Lokalrezidive	14	2	10	2	24	2
reine Fernmetastasen	22	3	75	14	97	8
verstorben	17	2	72	14	89	7

Tabelle 17: Therapieformen, Rezidiv- und Metastasenstatus aus dem Kollektiv für die Auswertung des rezidivfreien Überlebens (n=1278)

98% (n=87) der 89 nodal-negativen Patientinnen, die nur adjuvante Chemotherapie erhielten, hatten einen negativen Hormonrezeptorstatus. Nahezu alle Patientinnen mit einer adjuvanten Hormontherapie (99%) waren Hormonrezeptor-positiv (Tabelle 18a und 18b).

nodal-negative Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie (n=89)					
	↓ HR (+) 2 (2%)			↓ HR (-) 87 (98%)	
	↓			↓	
G1	G2	G3	G1	G2	G3
0	0	2 (100%)	0	29 (33%)	58 (67%)
HR (+): Hormonrezeptorstatus positiv ER und/oder PR \geq 10%					
HR (-): Hormonrezeptorstatus negativ ER und PR < 10%					

Tabelle 18a: Hormonrezeptorstatus und Grading bei nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie (n=89)

nodal-negative Patientinnen mit adjuvanter Hormontherapie (n=548)*					
	↓ HR (+) 543 (99%)			↓ HR (-) 3 (1%)	
	↓			↓	
G1	G2	G3	G1	G2	G3
64 (12%)	402 (74%)	77 (14%)	0	1 (33%)	2 (67%)
* bei 2 Patientinnen wurden die Hormonrezeptoren nicht bestimmt/dokumentiert					
HR (+): Hormonrezeptorstatus positiv ER und/oder PR \geq 10%					
HR (-): Hormonrezeptorstatus negativ ER und PR < 10%					

Tabelle 18b : Hormonrezeptorstatus und Grading bei nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Hormontherapie (n=548)

Bei den nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und Hormontherapie waren 81% (n=98) Hormonrezeptor-positiv und 19% (n=23) hatten einen negativen Rezeptorstatus (Tabelle 19a).

Tabelle 19b fasst nochmals alle 759 nodal-negativen Patientinnen mit einer adjuvanten Therapie zusammen. Von denen hatten 85% (n=643) einen positiven und 15% (n=113) einen negativen Hormonrezeptorstatus.

nodal-negative Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und Hormontherapie (n=122)*					
	↓			↓	
	HR (+) 98 (81%)			HR (-) 23 (19%)	
	↓			↓	
G1	G2	G3	G1	G2	G3
1 (1%)	55 (56%)	42 (43%)	0	3 (13%)	20 (87%)
* bei 1 Patientin wurde das Grading nicht bestimmt/dokumentiert					
HR (+): Hormonrezeptorstatus positiv ER und/oder PR ≥ 10%					
HR (-): Hormonrezeptorstatus negativ ER und PR < 10%					

Tabelle 19a: Hormonrezeptorstatus und Grading bei nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und Hormontherapie (n=122)

nodal-negative Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und/oder Hormontherapie (n=759)*					
	↓			↓	
	HR (+) 643 (85%)			HR (-) 113 (15%)	
	↓			↓	
G1	G2	G3	G1	G2	G3
65 (10%)	457 (71%)	121 (19%)	0	33 (29%)	80 (71%)
* bei 3 Patientinnen wurden die Hormonrezeptoren nicht bestimmt/dokumentiert und bei 1 Patientin wurde das Grading nicht bestimmt/dokumentiert					
HR (+): Hormonrezeptorstatus positiv ER und/oder PR ≥ 10%					
HR (-): Hormonrezeptorstatus negativ ER und PR < 10%					

Tabelle 19b: Hormonrezeptorstatus und Grading bei nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und/oder Hormontherapie (n=759)

Von 58 nodal-positiven Patientinnen mit nur adjuvanter Chemotherapie waren 2% (n=1) Hormonrezeptor-positiv und 98% (n=57) Hormonrezeptor-negativ (Tabelle 20a). Nahezu alle Patientinnen (99%) mit einer reinen adjuvanten Hormontherapie hatten einen positiven Rezeptorstatus (Tabelle 20b).

nodal-positive Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie					
(n=58)					
	↓			↓	
	HR (+)			HR (-)	
	1 (2%)			57 (98%)	
	↓			↓	
G1	G2	G3	G1	G2	G3
0	0	1 (100%)	1 (2%)	8 (14%)	48 (84%)
HR (+): Hormonrezeptorstatus positiv ER und/oder PR ≥ 10%					
HR (-): Hormonrezeptorstatus negativ ER und PR < 10%					

Tabelle 20a: Hormonrezeptorstatus und Grading bei nodal-positiven Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie (n=58)

nodal-positive Patientinnen mit adjuvanter Hormontherapie					
(n=115)					
	↓			↓	
	HR (+)			HR (-)	
	114 (99%)			1 (1%)	
	↓			↓	
G1	G2	G3	G1	G2	G3
3 (3%)	79 (69%)	32 (28%)	0	0	1 (100%)
HR (+): Hormonrezeptorstatus positiv ER und/oder PR ≥ 10%					
HR (-): Hormonrezeptorstatus negativ ER und PR < 10%					

Tabelle 20b: Hormonrezeptorstatus und Grading bei nodal-positiven Patientinnen mit adjuvanter Hormontherapie (n=115)

Nodal-positive Patientinnen mit einer adjuvanten Chemo- und Hormontherapie wiesen in 91% (n=315) der Fälle einen positiven Hormonrezeptorstatus auf und 9% (n=31) einen negativen Status (Tabelle 21a).

Insgesamt wurden 519 nodal-positive Patientinnen mit einer adjuvanten Systemtherapie behandelt. 83% (n=430) der Patientinnen waren Hormonrezeptor-positiv und 17% (n=89) hatten negative Hormonrezeptoren.

nodal-positive Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und Hormontherapie (n=346)					
	↓			↓	
	HR (+) 315 (91%)			HR (-) 31 (9%)	
	↓			↓	
G1	G2	G3	G1	G2	G3
5 (2%)	188 (60%)	122 (38%)	0	7 (23%)	24 (77%)
HR (+): Hormonrezeptorstatus positiv ER und/oder PR ≥ 10%					
HR (-): Hormonrezeptorstatus negativ ER und PR < 10%					

Tabelle 21a: Hormonrezeptorstatus und Grading bei nodal-positiven Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und Hormontherapie (n=346)

nodal-positive Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und/oder Hormontherapie (n=519)					
	↓			↓	
	HR (+) 430 (83%)			HR (-) 89 (17%)	
	↓			↓	
G1	G2	G3	G1	G2	G3
8 (2%)	267 (62%)	155 (36%)	1 (1%)	15 (17%)	73 (82%)
HR (+): Hormonrezeptorstatus positiv ER und/oder PR ≥ 10%					
HR (-): Hormonrezeptorstatus negativ ER und PR < 10%					

Tabelle 21b: Hormonrezeptorstatus und Grading bei nodal-positiven Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und/oder Hormontherapie (n=519)

2.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden aus dem Dokumentationsprogramm MaDoS (**M**amma-**D**okumentations-**S**ystem) gewonnen und in das SPSS-Programm (Statistical Package for the Social Sciences Version 15 Inc., Chicago, IL, USA) importiert. Im SPSS wurden die Zusammenhänge zwischen den Proteasen und den Prognosefaktoren mit Kontingenztafeln (Kreuztabellen) dargestellt. Die Signifikanz wurde zweiseitig mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson bzw. exakten Fisher-Test berechnet und das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

Die Darstellung des rezidivfreien Überlebens (Relapse-Free-Survival RFS) erfolgte nach der Methode von Kaplan-Meier. Die Signifikanz-Einschätzung wurde durch den Log-Rank-Test durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde auch hier als signifikant betrachtet und $p < 0,1$ als Trend bezeichnet.

Das mediane Follow-up lag bei 46,8 (1,6-132,7) Monaten.

3 Ergebnisse

3.1 Korrelation von uPA und PAI-1 zu etablierten Prognosefaktoren

3.1.1 Korrelation von uPA und PAI-1 zum Alter

Von den insgesamt 1251 Patientinnen waren 225 (18%) unter 50 Jahre alt und 1026 (82%) über 50 Jahre alt.

Es lässt sich kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,505$) zwischen dem Alter und der Protease uPA und seinem Inhibitor PAI-1 erkennen. Tabelle 22 veranschaulicht die Verteilung der beiden Gruppen.

Altersverteilung	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
< 50 Jahre	225	18 %	94	42 %	131	58 %	0,505
≥ 50 Jahre	1026	82 %	454	44 %	572	56 %	
Gesamt	1251	100 %	548	44 %	703	56 %	

Tabelle 22: Korrelation von uPA und PAI-1 zum Alter

3.1.2 Korrelation von uPA und PAI-1 zur Tumorgröße

Von den 1219 Mammakarzinomen waren mit T1 und T2 1100 (90%) und 119 mit T3 und T4 (10%) bezüglich Ihrer Tumorgröße bestimmt worden.

Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Tumorgröße und der Gruppeneinteilung der Proteasen uPA und PAI-1 ($p=0,174$). Trotzdem zeigt Tabelle 20 Auffälligkeiten in der Verteilung der beiden Gruppen mit T3 und T4 Tumoren. 62% der T3 und T4 Tumoren haben in diesem Status hohe uPA und/oder PAI-1 Werte.

Tumorgröße	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
T1 – T2	1100	90 %	492	45 %	608	55 %	0,174
T3 – T4	119	10 %	45	38 %	75	62 %	
Gesamt	1219	100 %	537	44 %	682	56 %	

Tabelle 23: Korrelation von uPA und PAI-1 zur Tumorgröße

3.1.3 Korrelation von uPA und PAI-1 zum Nodalstatus

Der Nodalstatus wurde bei 1211 Mammakarzinomen bestimmt. 654 (54%) hatten einen nodal-negativen Status und bei 557 (46%) lag ein Lymphknotenbefall vor.

Es liegt ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,005$) zwischen dem Lymphknotenstatus und der Proteasenverteilung vor. Beim N+-Status treten in 60% der Fälle erhöhte Werte von uPA und seinem Inhibitor PAI-1 auf.

Nodalstatus	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
N0	654	54 %	313	48 %	341	52 %	0,005
N1 – N3	557	46 %	222	40 %	335	60 %	
Gesamt	1211	100 %	535	44 %	676	56 %	

Tabelle 24: Korrelation von uPA und PAI-1 zum Nodalstatus

3.1.4 Korrelation von uPA und PAI-1 zum Grading

Das Grading wurde bei 1248 Mammakarzinomen bestimmt. Die Verteilung wird in Tabelle 25 dargestellt. Ein Grading von G1 und G2 lag bei 823 (66%), ein G3 bei 425 (34%) Mammakarzinomen vor.

Es zeigt sich ein höchstsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading und den Proteasengruppen ($p < 0,001$). Prozentual treten mehr hohe Werte von uPA/PAI-1 bei undifferenzierten Tumoren auf. 65% der beiden Proteasen liegen über dem cut-off Wert bei G3 Tumoren.

Grading	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
G1 – G2	823	66 %	397	48 %	426	52 %	< 0,001
G3	425	34 %	150	35 %	275	65 %	
Gesamt	1248	100 %	547	44 %	701	56 %	

Tabelle 25: Korrelation von uPA und PAI-1 zum Grading

3.1.5 Korrelation von uPA und PAI-1 zum Hormonrezeptorstatus

Der Östrogen- und Progesteronstatus wurde bei 1251 Mammakarzinomen bestimmt. Einen negativen Hormonrezeptorstatus wiesen 216 Patienten (17%) auf. Als negativ wurden alle Mammakarzinome mit Werten von unter 10% aufgenommen und es mussten ER und PR negativ ermittelt worden sein. 1035 Patientinnen (83%) hatten einen positiven Hormonrezeptorstatus (ER und PR \geq 10%).

Tabelle 26 zeigt einen höchstsignifikanten Zusammenhang zwischen Hormonrezeptorstatus und Proteasenverteilung ($p < 0,001$). Proteasenwerte über dem cut-off treten ganz besonders bei Hormonrezeptor-negativen Patientinnen auf (80%).

Hormonrezeptorstatus	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
ER und PR < 10%	216	17 %	44	20 %	172	80 %	< 0,001
ER und/oder ER \geq 10%	1035	83 %	504	49 %	531	51 %	
Gesamt	1251	100 %	548	44 %	703	56 %	

Tabelle 26: Korrelation von uPA und PAI-1 zum Hormonrezeptorstatus

Bei den Ergebnissen der Korrelation von uPA und PAI-1 zu den einzelnen Hormonrezeptoren zeigt sich das gleiche Bild.

Beide Zusammenhänge, entweder zum Östrogenrezeptorstatus oder zum Progesteronrezeptorstatus, zeigen höchstsignifikante Ergebnisse ($p < 0,001$). In der Tabelle 27 tritt die Protease uPA und sein Inhibitor PAI-1 mit erhöhten Werten bei 76% der Östrogenrezeptor-negativen Tumore auf. Auch beim negativen Progesteronstatus kommen bis zu 67% der Fälle Proteasenwerte über dem cut-off Wert vor.

Östrogenrezeptorstatus	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
ER < 10%	238	19 %	58	24 %	180	76 %	< 0,001
ER \geq 10%	1013	81 %	490	48 %	523	52 %	
Gesamt	1251	100 %	548	44 %	703	56 %	

Tabelle 27: Korrelation von uPA und PAI-1 zum Östrogenrezeptorstatus

Progesteronrezeptorstatus	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
PR < 10%	361	29 %	119	33 %	242	67 %	< 0,001
PR \geq 10%	890	71 %	429	48 %	461	52 %	
Gesamt	1251	100 %	548	44 %	703	56 %	

Tabelle 28: Korrelation von uPA und PAI-1 zum Progesteronrezeptorstatus

3.1.6 Korrelation von uPA und PAI-1 zum M-Status

Von den 1235 Mammakarzinomen waren 98 (8%) in einem metastasierten Status. Obwohl ein starkes Ungleichgewicht bei dem metastasierten Status vorliegt, ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen uPA und PAI-1 zum Metastasenstatus ($p=0,203$). In 62% der Fälle liegen beim M1-Status erhöhte uPA und/oder PAI-1 Werte vor. Die Verteilung wird in Tabelle 29 dargestellt.

M-Status	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
M0	1137	92 %	508	45 %	629	55 %	0,203
M1	98	8 %	37	38 %	61	62 %	
Gesamt	1235	100 %	545	44 %	690	56 %	

Tabelle 29: Korrelation von uPA und PAI-1 zum M-Status

3.2 Korrelation von uPA und PAI-1 zu neuen Prognosefaktoren

3.2.1 Korrelation von uPA und PAI-1 zum Her2/neu-Status

Der Her2/neu-Status wurde bei 1250 Mammakarzinomen gemessen, davon 1116 (89%) Fälle mit negativem und 134 (11%) Fälle mit positivem Status.

Tabelle 30 zeigt eine statistisch signifikante Beziehung ($p < 0,001$) zwischen uPA/PAI-1 und dem Her2/neu-Status. Hohe uPA- und/oder PAI-1 Werte treten gehäuft bei positivem Her2/neu-Status auf (73%).

Her2/neu-Status	n		Proteasenverteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
negativ	1116	89 %	512	46 %	604	54 %	< 0,001
positiv	134	11 %	36	27 %	98	73 %	
Gesamt	1250	100 %	548	44 %	702	56 %	

Tabelle 30: Korrelation von uPA und PAI-1 zum Her2/neu-Status

3.2.2 Korrelation von uPA und PAI-1 zum EGFR

In die Berechnung der Korrelation von uPA und PAI-1 zum EGF-Rezeptor gingen 1194 Bestimmungen ein. In 8% (n=93) der Fälle wurde eine Überexpression gemessen.

Es zeigt sich ein höchstsignifikanter Zusammenhang zwischen dem EGF-Rezeptor und der Gruppeneinteilung ($p < 0,001$). Erhöhte Proteasenwerte liegen gehäuft bei einer starken Zellmembrananfärbung von 3+ des EGF-Rezeptors vor (84%).

EGFR	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
≤ 2+	1101	92 %	503	46 %	598	54 %	< 0,001
3+	93	8 %	15	16 %	78	84 %	
Gesamt	1194	100 %	518	44 %	676	56 %	

Tabelle 31: Korrelation von uPA und PAI-1 zum EGFR

3.2.3 Korrelation von uPA und PAI-1 zum VEGF

Bei 262 Mammakarzinomen wurde die Expressionsstärke von VEGF mittels Real-Time-RT-PCR ermittelt. Die Angaben liegen in Prozenträngen vor.

Es zeigt sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen VEGF und Proteasenverteilung ($p=0,008$). Ein Prozentrang für $VEGF \geq 80\%$ kommt in 84% der Fälle bei hohen uPA und PAI-1 Werten vor.

VEGF	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
< 80 %	205	79 %	72	35 %	133	65 %	0,008
≥ 80 %	57	21 %	9	16 %	48	84 %	
Gesamt	262	100 %	81	31 %	181	69 %	

Tabelle 32: Korrelation von uPA und PAI-1 zum VEGF

3.2.4 Korrelation von uPA und PAI-1 zur p53-Mutation

Die p53-Mutation lag bei 236 (22%) Mammakarzinomen vor. Bei den insgesamt 1086 Untersuchungen wurden bei 850 (78%) Mammakarzinomen keine p53-Mutation festgestellt. Es zeigt sich in der Tabelle 33 ein höchstsignifikanter Zusammenhang zwischen der p53-Mutation und der Proteasenverteilung ($p < 0,001$).

Es werden überwiegend hohe uPA und/oder PAI-1 Werte bei einer p53-Mutation ermittelt (72%).

p53-Mutation	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
keine Mutation	850	78 %	381	45 %	469	55 %	< 0,001
Mutation	236	22 %	65	28 %	171	72 %	
Gesamt	1086	100 %	446	41 %	640	59 %	

Tabelle 33: Korrelation von uPA und PAI-1 zur p53-Mutation

3.2.5 Korrelation von uPA und PAI-1 zu Ki-67/MIB-1

MIB-1 wurde in 433 Fällen bestimmt. Es liegt ein höchstsignifikanter Zusammenhang zwischen Ki-67/MIB-1 und den Proteasen uPA und PAI-1 vor ($p < 0,001$).

Eine Expression von $\geq 30\%$ lag bei 262 (60%) Mammakarzinomen vor. Tabelle 34 verdeutlicht, dass hohe uPA und/oder PAI-1 Werte in 77% der Fälle bei Mammakarzinomen auftreten, die eine Überexpression von Ki-67/MIB-1 vorweisen.

MIB-1	n		Gruppeneinteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
< 30 %	171	40 %	80	47 %	91	53 %	< 0,001
≥ 30 %	262	60 %	60	23 %	202	77 %	
Gesamt	433	100 %	140	32 %	293	68 %	

Tabelle 34: Korrelation von uPA und PAI-1 zu Ki-67/MIB-1

3.2.6 Korrelation von uPA und PAI-1 zum MMP-11

Bei 325 Mammakarzinomen wurde die Expressionsstärke von MMP-11 mittels Real-Time-RT-PCR ermittelt. Die Angaben liegen in Prozenträngen vor.

Es zeigt sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen MMP-11 und Proteasenverteilung ($p < 0,001$). Ein Prozentrang für MMP-11 $\geq 80\%$ kommt in 87% der Fälle bei hohen uPA und PAI-1 Werten vor.

MMP-11	n		Proteasenverteilung				p-Wert
			uPA und PAI-1 (-)		uPA und/oder PAI-1 (+)		
< 80 %	232	71 %	93	40 %	139	60 %	< 0,001
≥ 80 %	93	29 %	12	13 %	81	87 %	
Gesamt	325	100 %	105	32 %	220	68 %	

Tabelle 35: Korrelation von uPA und PAI-1 zum MMP-11

3.3 Überblick der Korrelationen

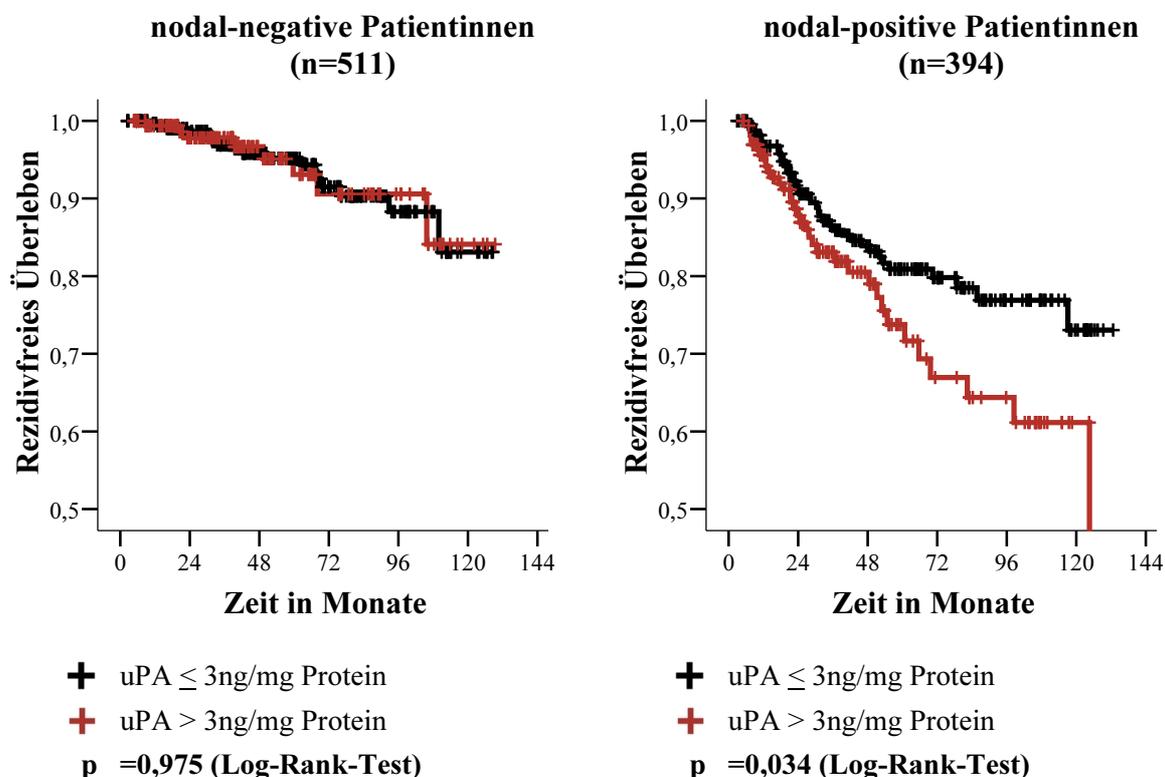
Insgesamt lagen signifikante Zusammenhänge von uPA und PAI-1 zum Nodal-, Grading-, Hormonrezeptor-, Her2/neu-Status, EGFR, VEGF, zur p53-Mutation, zu Ki-67/MIB-1 und zum MMP-11 vor (Tabelle 36).

Prognosefaktor	n	Anteil von uPA und/oder PAI-1 (+)	p-Wert
Altersverteilung	1251	58% bei < 50 Jahre	0,505
Tumorgröße	1219	62% bei T3-T4	0,174
Nodalstatus	1211	60% bei N1-N3	0,005*
Grading	1248	65% bei G3	< 0,001*
Hormonrezeptorstatus	1251	80% bei ER und PR < 10%	< 0,001*
M-Status	1235	62% bei M1	0,203
Her2/neu-Status	1250	73% bei Status positiv	< 0,001*
EGFR	1194	84% bei 3+ Membrananfärbung	< 0,001*
VEGF	262	84% bei \geq 80% (Prozentrang)	0,008*
p53-Mutation	1086	72% bei Mutation	< 0,001*
Ki-67/MIB-1	433	77% bei \geq 30% Expression	< 0,001*
MMP-11	325	87% bei \geq 80% (Prozentrang)	< 0,001*

Tabelle 36: Überblick der Korrelationen von uPA und PAI-1 zu den untersuchten Prognosefaktoren (*statistisch signifikant $p < 0,05$)

3.4 Korrelation von uPA und PAI-1 zum rezidivfreien Überleben

3.4.1 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA



	n	Rezidive	Zensiert		n	Rezidive	Zensiert
+	336	18 (5%)	318 (95%)	+	227	38 (17%)	189 (83%)
+	175	8 (5%)	167 (95%)	+	167	34 (20%)	133 (80%)
Gesamt	511	26 (5%)	485 (95%)	Gesamt	394	72 (18%)	322 (82%)

Abbildung 7: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Bei den 511 nodal-negativen Patientinnen zeigt sich in der Kaplan-Meier Darstellung (Abbildung 7) kein signifikantes Ergebnis für das rezidivfreie Überleben ($p=0,975$). Beide Risikogruppen unterscheiden sich kaum hinsichtlich Ihrer Prognose.

Im Gegensatz dazu liegt ein signifikantes Ergebnis bei den 394 nodal-positiven Patientinnen vor ($p=0,034$). Patientinnen mit einem hohen Level an uPA haben nach einer adjuvanten Systemtherapie eine ungünstigere Prognose als Patientinnen mit einem niedrigen Level.

3.4.2 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von PAI-1

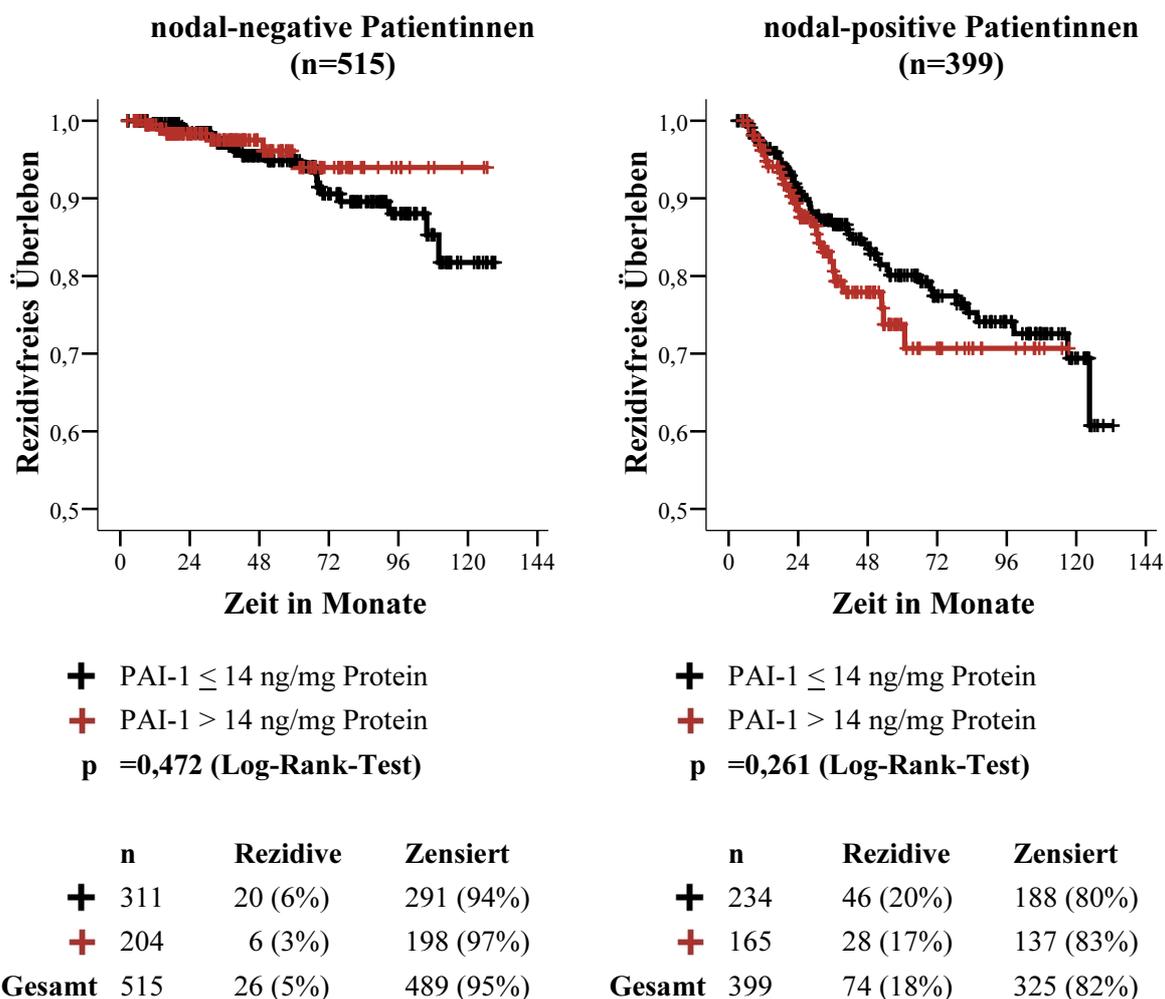


Abbildung 8: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von PAI-1 im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Der Vergleich zwischen den nodal-negativen und -positiven Mammakarzinomen bezüglich des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit zum Inhibitor PAI-1 zeigt in beiden Subkollektiven kein signifikantes Ergebnis für die beiden Risikogruppen. Nach Log-Rank liegt die Signifikanz für die nodal-negativen Patientinnen bei $p=0,472$ und für die nodal-positiven bei $p=0,261$. Es deutet sich aber an, dass Frauen ohne Lymphknotenbefall und hohem PAI-1 Level mit zunehmendem Nachbeobachtungszeitraum eher von einer adjuvanten Systemtherapie profitieren, als Frauen mit einem niedrigen PAI-1 Level.

3.4.3 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA und PAI-1 in Kombination

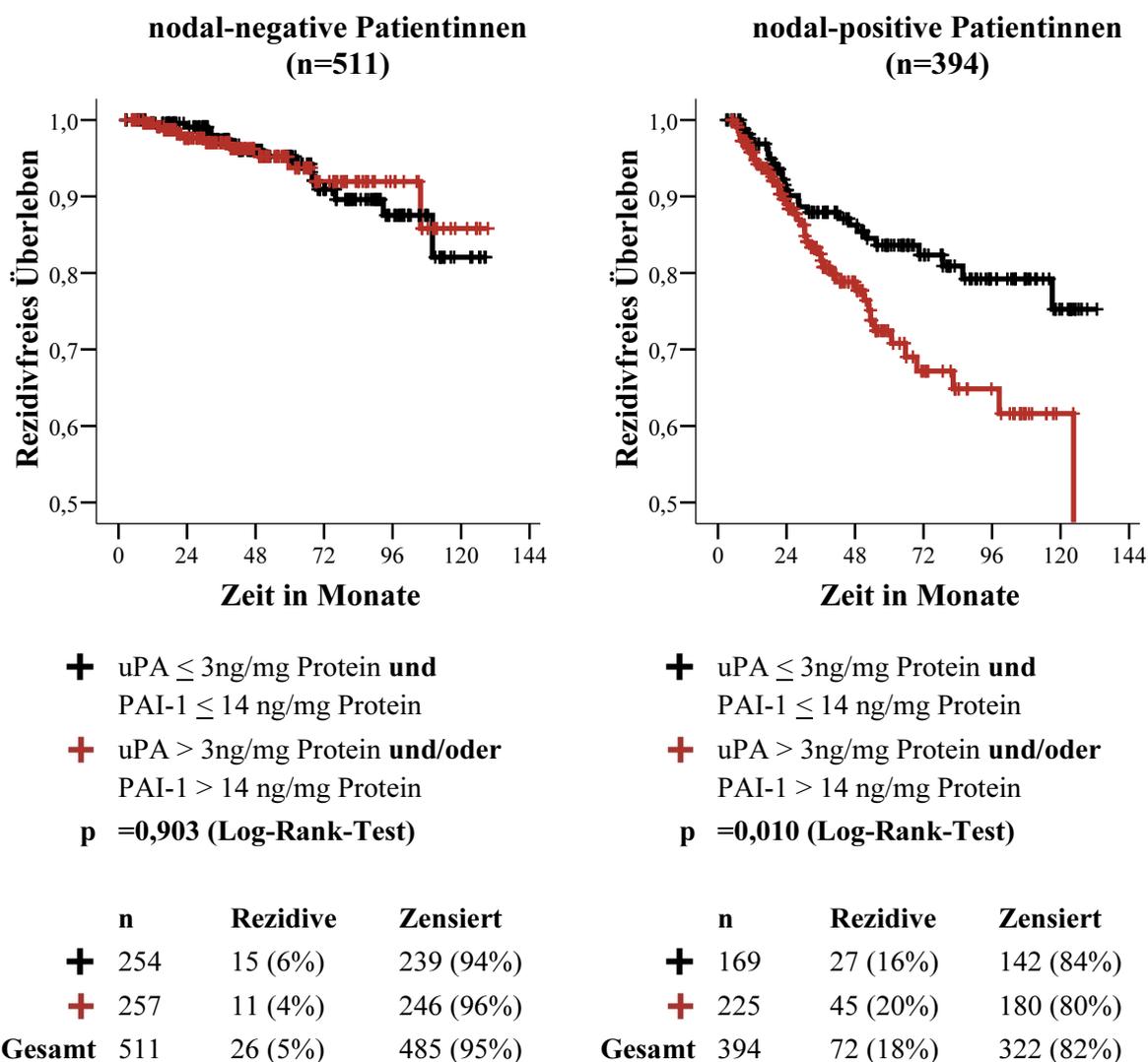


Abbildung 9: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA/PAI-1 im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Die Kaplan-Meier Kurve für die 394 nodal-positiven Patientinnen zeigt einen signifikant günstigeren Verlauf für Patientinnen mit niedrigen uPA und PAI-1 Werten im Vergleich zu Patientinnen mit hohen uPA und PAI-1 Werten ($p=0,010$). Nach Log-Rank ist jedoch die Kaplan-Meier Darstellung in der nodal-negativen Gruppe nicht signifikant ($p=0,903$).

3.4.4 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA und PAI-1 in vier Gruppen

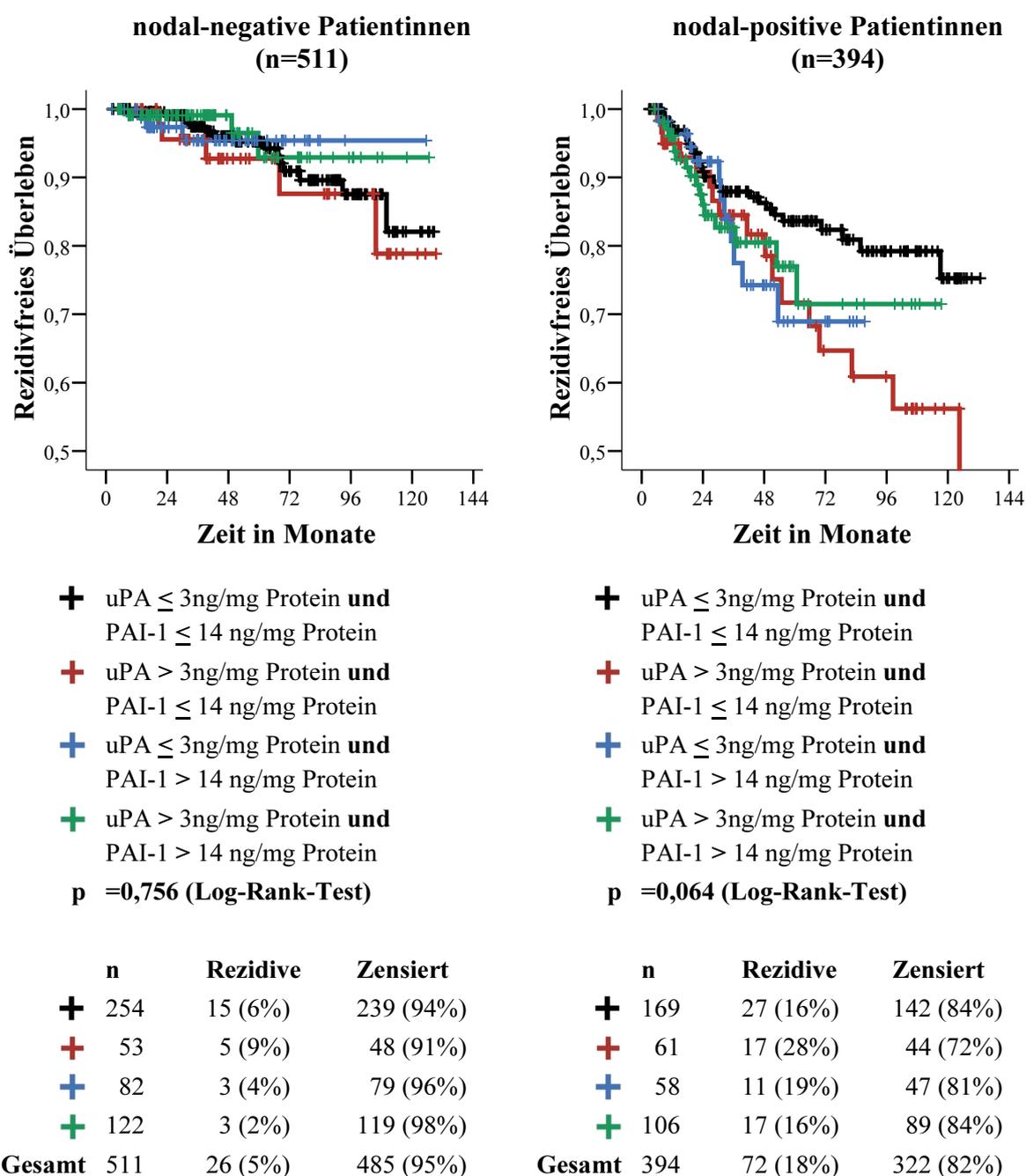


Abbildung 10: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA und PAI-1 in 4 Gruppen im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Die Protease uPA und sein Inhibitor PAI-1 wurden in der Abbildung 10 in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Das Ergebnis der nodal-negativen Patientinnen zeigt kein signifikantes Ergebnis ($p=0,756$). Die Gruppe mit uPA > 3ng/mg Protein **und** PAI-1 ≤ 14 ng/mg Protein weist die ungünstigste Prognose in beiden Darstellungen auf. Mit $p=0,064$

zeigt sich eine Tendenz bei den nodal-positiven Patientinnen. Niedrige Werte bei den Proteasen zeigen einen günstigeren Verlauf als die Gruppen mit einer Erhöhung einer oder beider Proteasen.

3.5 Korrelation von weiteren Prognosefaktoren zum rezidivfreien Überleben

3.5.1 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (ER)

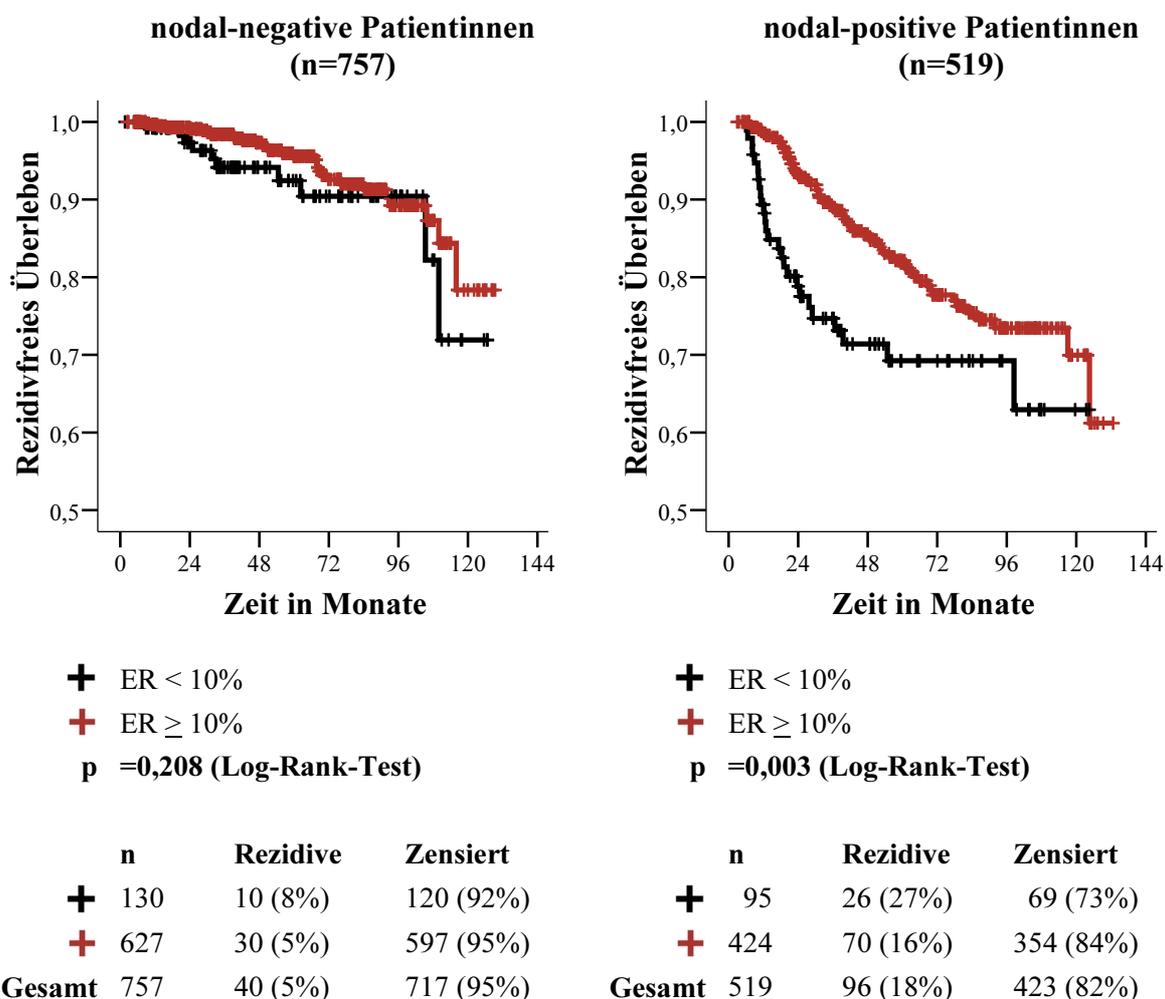


Abbildung 11: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (ER) im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Es liegt bei den nodal-negativen Patientinnen (n=757) keine signifikante Korrelation zwischen rezidivfreiem Überleben und Östrogenrezeptorstatus vor. Im Gegensatz dazu liegt ein signifikanter Zusammenhang bei den nodal-positiven Mammakarzinomen vor (p=0,003). Die günstige Prognose der Östrogenrezeptor-positiven Patientinnen nimmt aber mit zunehmender Nachbeobachtungszeit ab.

3.5.2 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus (PR)

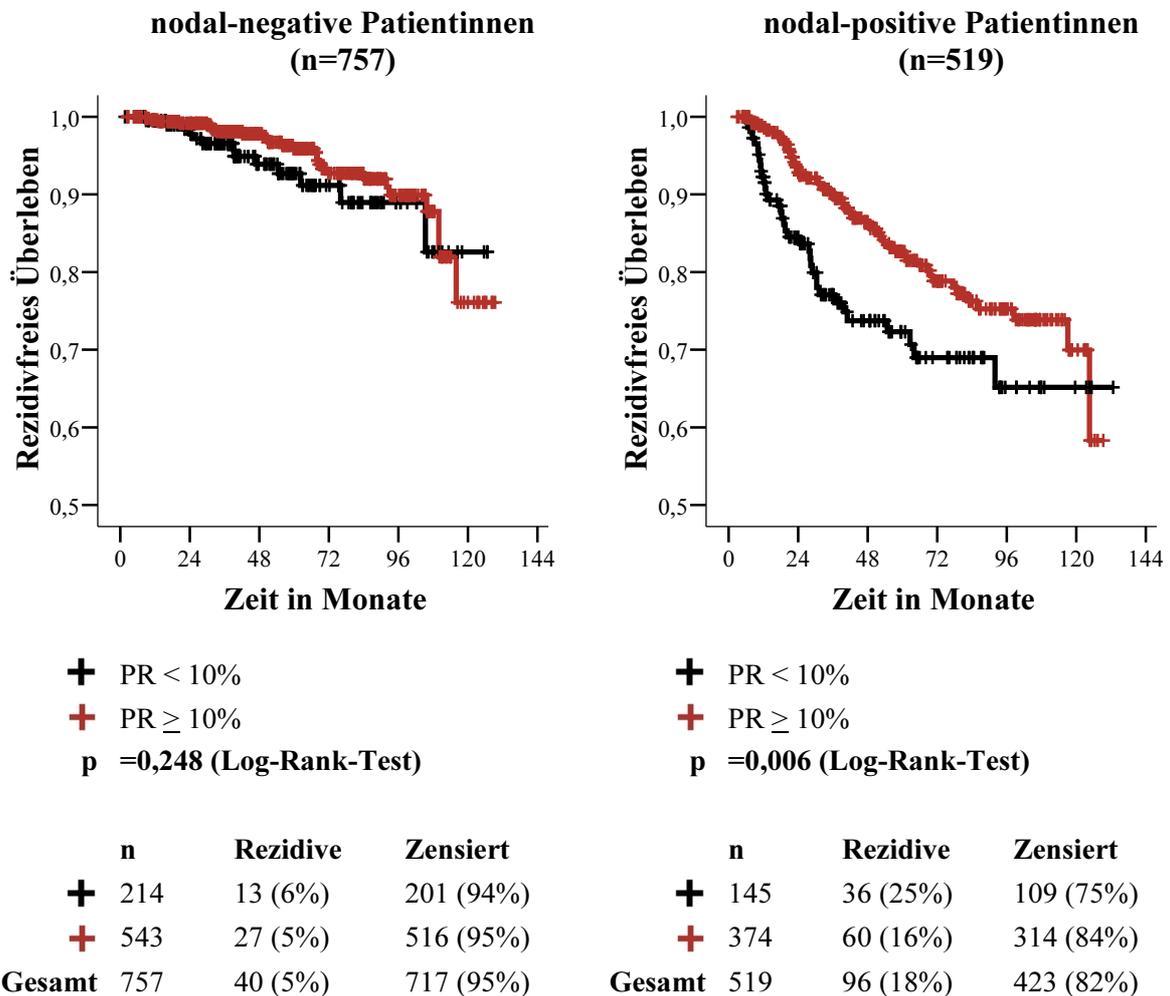


Abbildung 12: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus (PR) im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Die Kaplan-Meier Darstellung der nodal-negativen Patientinnen (n=757) in Abhängigkeit zum Progesteronrezeptorstatus zeigt keine Signifikanz (p=0,248).

In der nodal-positiven Gruppe konnte eine Signifikanz von p=0,006 ermittelt werden. Nodal-positive Patientinnen profitieren eher von einer adjuvanten Systemtherapie als Progesteronrezeptor-negative Patientinnen. Dieser Benefit nimmt aber mit zunehmender Nachbeobachtungszeit ab.

3.5.3 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (ER+PR)

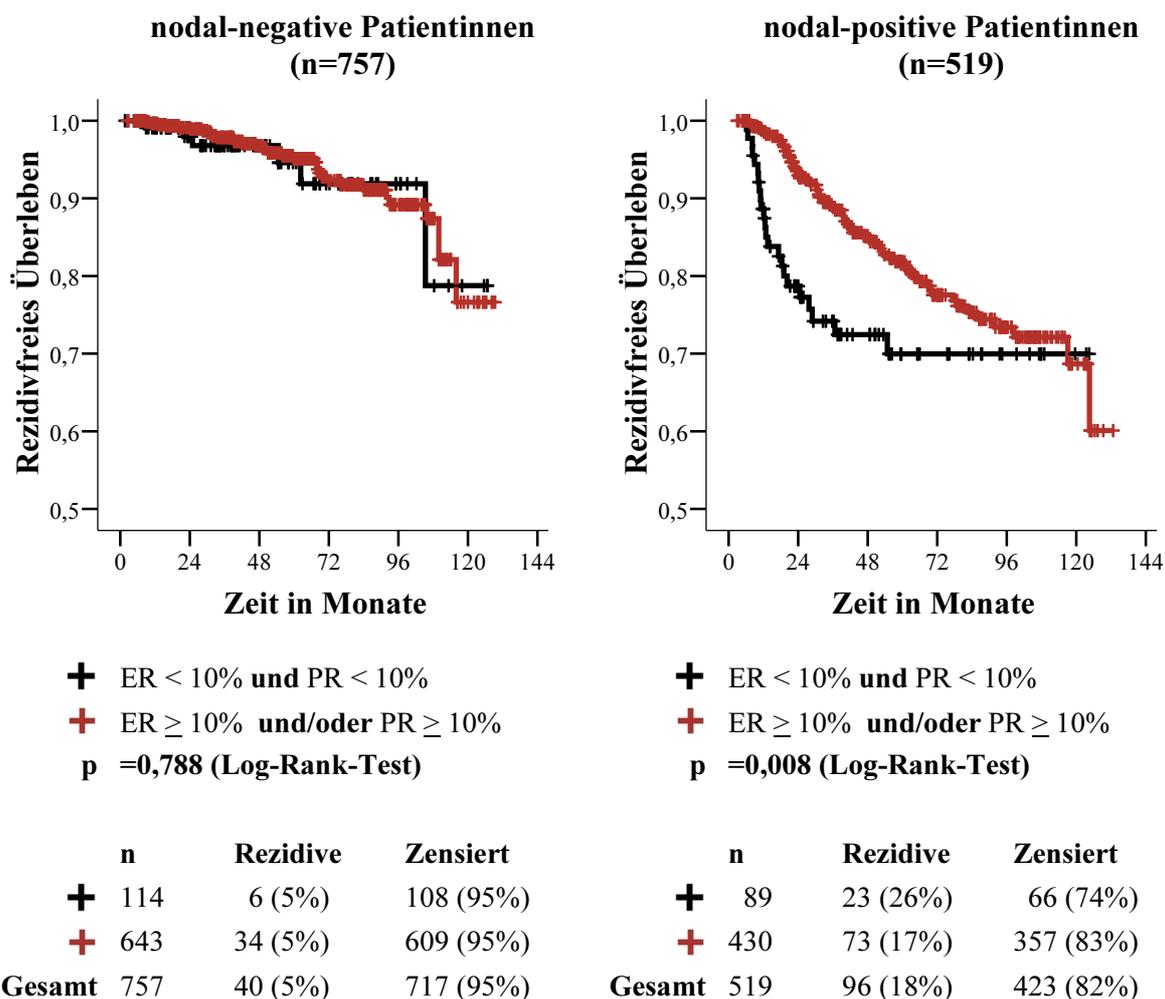


Abbildung 13: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (ER+PR) im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

In der Abbildung 13 wurden beide Hormonrezeptoren ER und PR kombiniert. Es lässt sich bei der nodal-negativen Gruppe keine Signifikanz erkennen ($p=0,788$). Bei den nodal-positiven Patientinnen zeigt sich eine signifikante Korrelation beider Risikogruppen ($p=0,008$). Die günstige Prognose der Hormonrezeptor-positiven Patientinnen nimmt aber mit zunehmender Nachbeobachtungszeit ab.

3.5.4 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Her2/neu-Status

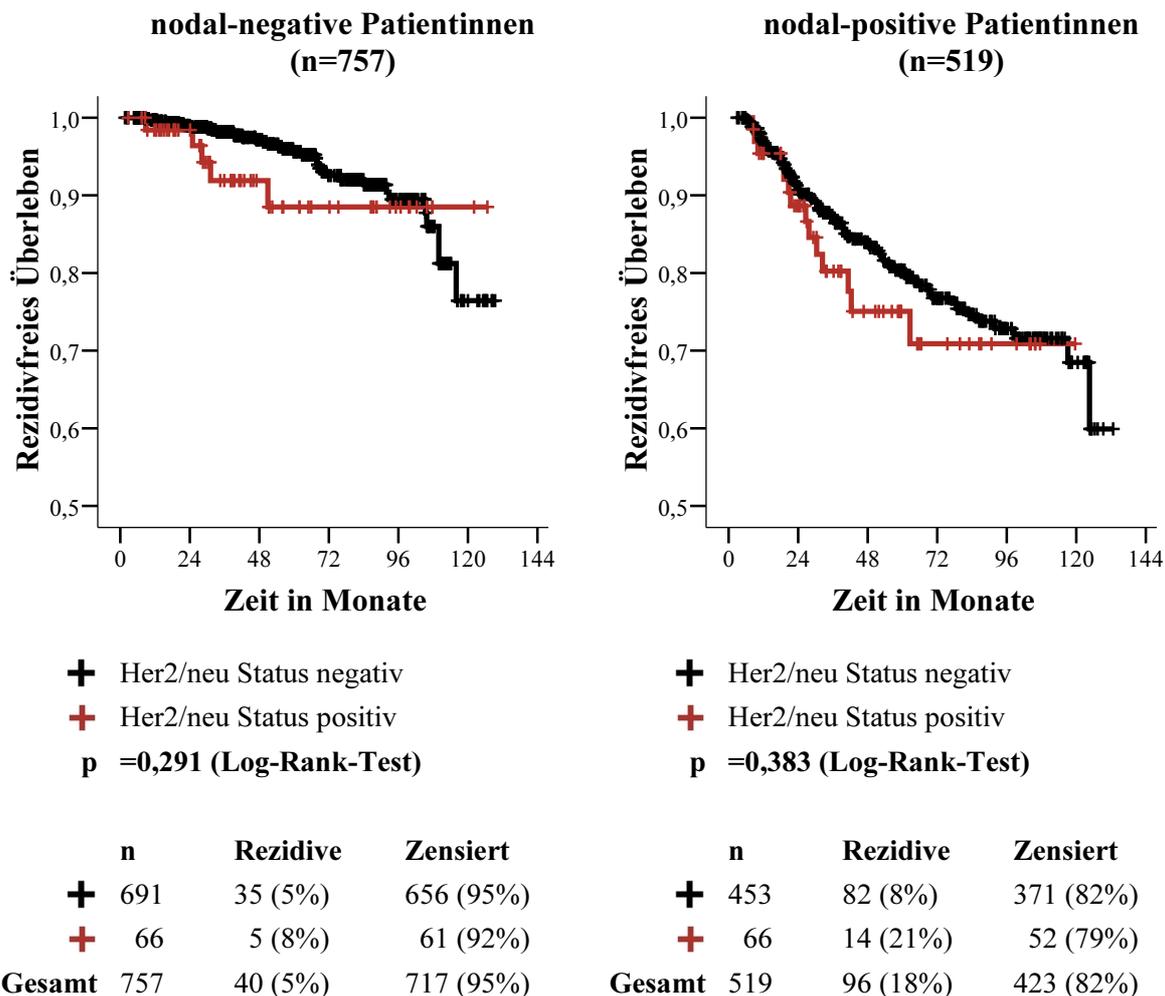


Abbildung 14: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Her2/neu-Status im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Der Vergleich zwischen den nodal-negativen bzw. -positiven Mammakarzinomen hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Her2/neu-Status lässt sich in beiden Subkollektiven kein signifikantes Ergebnis ermitteln. Nach Log-Rank liegt die Signifikanz für die nodal-negativen Patientinnen bei $p=0,291$ und für die nodal-positiven bei $p=0,383$.

3.5.5 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom EGFR

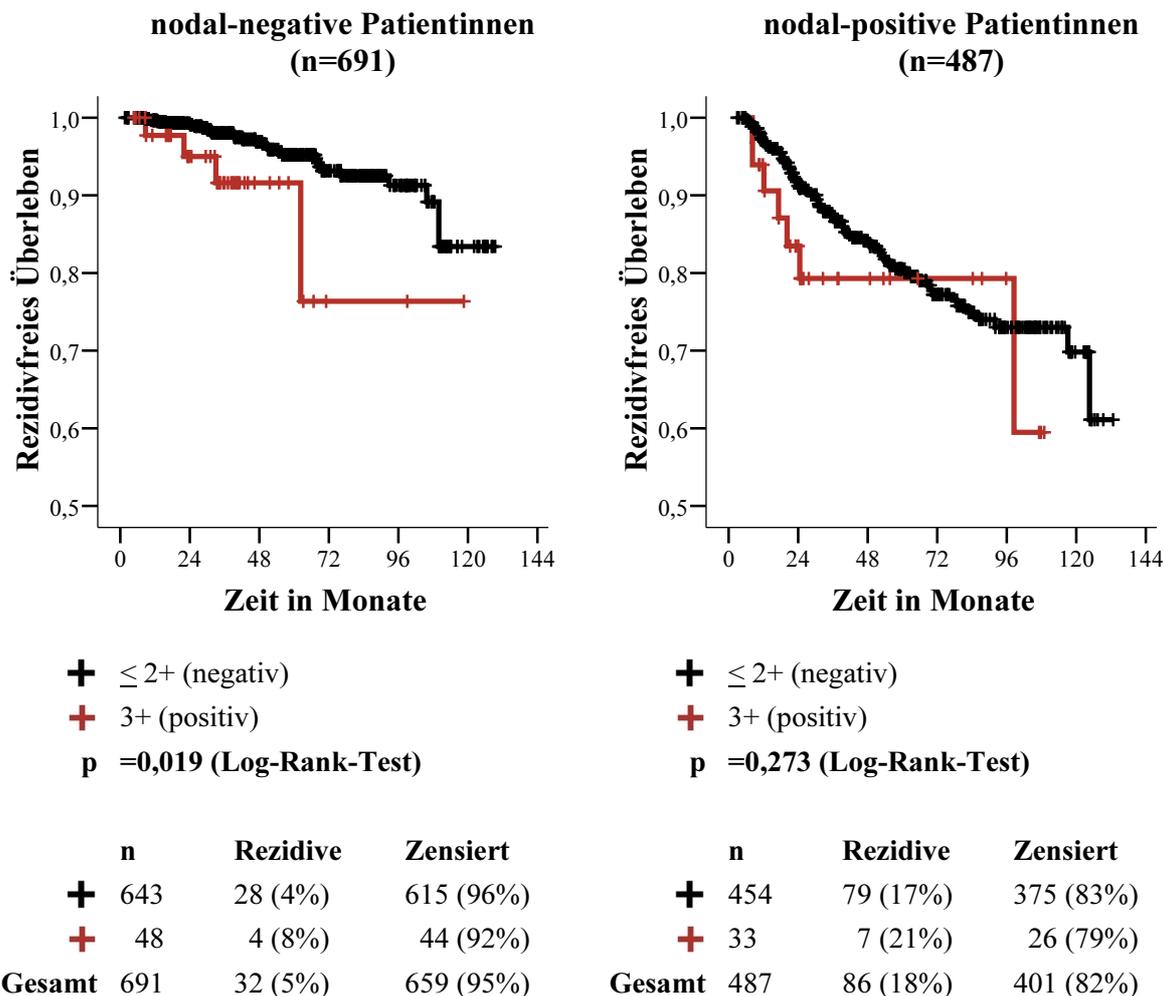


Abbildung 15: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom EGFR im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Aus dem Gesamtkollektiv wurden bei 691 nodal-negativen Patientinnen die Expression des EGF-Rezeptors bestimmt. Es liegt eine signifikante Korrelation zwischen rezidivfreiem Überleben und der EGFR Expression bei nodal-negativen Patientinnen nach adjuvanter Systemtherapie vor (n=691) vor. Eine negative Membrananfärbung ($\leq 2+$) zeigt eine günstigere Prognose nach einer adjuvanten Systemtherapie als eine starke Membrananfärbung (3+), wobei nur bei 48 (7%) Patientinnen eine Überexpression zu beobachten war. Eine Signifikanz lässt sich bei den nodal-positiven Patientinnen (n=487) nicht erkennen (p=0,273).

3.5.6 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der p53-Mutation

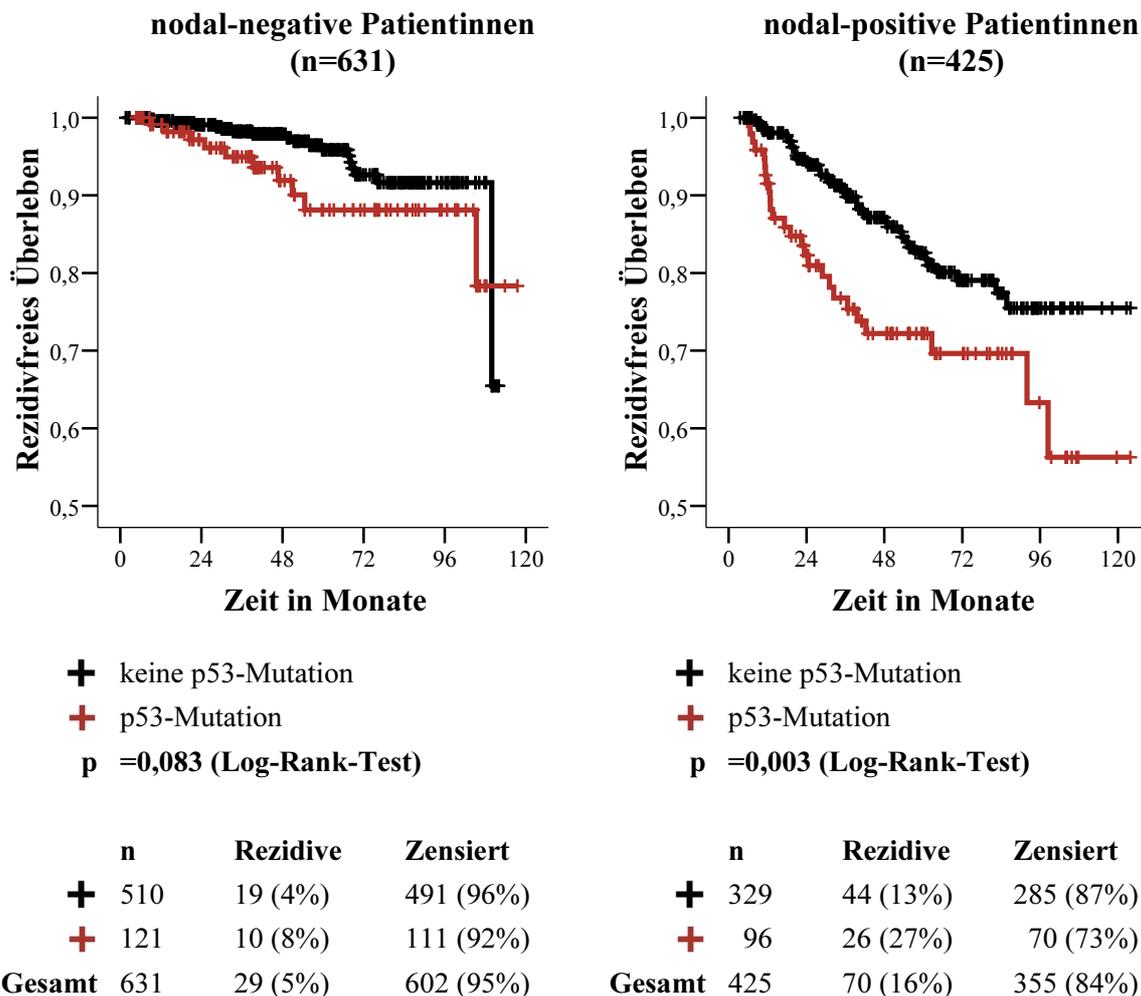


Abbildung 16: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der p53-Mutation im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie

Bei den nodal-negativen Patientinnen (n=631) zeigt sich eine leichte Tendenz von p=0,083. Die günstige Prognose bei keiner p53-Mutation nimmt mit zunehmender Nachbeobachtungszeit ab.

Bei den nodal-positiven Mammakarzinomen (n=425) ist das Ergebnis signifikant (p=0,003). Patientinnen ohne eine p53-Mutation entwickeln nach einer adjuvanten Systemtherapie eine bessere Prognose als Frauen mit einer p53-Mutation.

4 Diskussion

Die Serinproteasen Plasminogen Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA) und sein Inhibitor Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) gehören zu den proteolytischen Faktoren und spielen eine Schlüsselrolle in der physiologischen und pathophysiologischen Degradation und Remodelierung der extrazellulären Substanz.

Durch die Bindung von uPA an den zellulären Rezeptor, Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPA-R), wandelt es Plasminogen in Plasmin um. Dieser Mechanismus unterliegt der Kontrolle vom Inhibitor PAI-1 und führt zur Proteolyse der extrazellulären Matrix. Zusätzlich dieser proteolytischen Eigenschaft besitzt das uPA-PAI-1 System auch andere wichtige biologische Effekte zur Chemotaxis, Migration, Invasion, Adhäsion, Proliferation und Angiogenese.

Diese vielfältigen biologischen Eigenschaften führten dazu, dass hohes Interesse an der Forschung des uPA-PAI-1 Systems in soliden Tumoren gezeigt worden ist. Die zahlreichen Studien belegen dies eindrucksvoll.

Hohe Werte von uPA und PAI-1 wurden in vielen soliden Tumoren gefunden und korrelierten mit einem verkürzten krankheitsfreiem Überleben und Gesamtüberleben [11,13,39-49].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Korrelationen von uPA/PAI-1 auf etablierte und neue Prognosefaktoren untersucht und der prädiktive Wert bei nodal-negativen und -positiven Patientinnen nach einer adjuvanten Systemtherapie ermittelt, wobei der Focus der Untersuchung auf die Mammakarzinome ohne Lymphknotenbefall gelegt worden ist. Aus diesem Grunde wird sich die Diskussion hauptsächlich auf die Ergebnisse der nodal-negativen Patientinnen konzentrieren.

Unser Datenkollektiv mit 1251 Mammakarzinomen ergab signifikante Korrelationen zwischen der Protease uPA und seinem Inhibitor PAI-1 zum Nodalstatus ($p=0,005$), Grading ($p<0,001$), Hormonrezeptorstatus ($p<0,001$), Her2/neu-Status ($p<0,001$), EGFR ($p<0,001$), VEGF ($p=0,008$), zur p53-Mutation ($p<0,001$), zu Ki-67/MIB-1 ($p<0,001$) und zum MMP-11 ($p<0,001$).

Zur Altersverteilung ($p=0,505$), Tumorgröße ($p=0,174$) und zum M-Status ($p=0,203$) konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Hohe uPA und/oder PAI-1 Werte mit einem cut-off für uPA > 3ng/mg Protein und für PAI-1 > 14ng/mg Protein traten gehäuft in Mammakarzinomen auf, wenn folgender Status vorlag (in Klammern der prozentuale Anteil in diesem Status):

- positiver Nodalstatus (60%)
- Grading G3 (65%)
- negativer Hormonrezeptorstatus (80%)
- positiver Her2/neu-Status (73%)
- Überexpression von EGFR (84%)
- Überexpression von VEGF (84%)
- vorhandene p53-Mutation (72%)
- Überexpression von Ki-67/MIB-1 (77%)
- Überexpression von MMP-11 (87%)

Die prozentuale Verteilung beider Gruppen in unserem Kollektiv entsprach der Spannweite anderer Studien [39,40]. 44% der Patientinnen hatten in unserem Kollektiv niedrige uPA und PAI-1 Werte und hohe uPA und/oder PAI-1 Werte waren bei 56% anzutreffen.

Unsere Daten unterstützen die Ergebnisse von Manders et al. (2004), die 1119 Patientinnen auf Korrelationen untersucht hatten. Diese Forschergruppe konnte signifikante Korrelationen zum Hormonrezeptorstatus, Grading und zum Lymphknotenstatus finden. Zusätzlich auch zum Alter und der Tumorgroße, die wir aber nicht bestätigen konnten [57].

In einer weiteren Untersuchung von Leib (2007) an 243 Patientinnen wurde eine statistisch signifikante Beziehung nur zur Tumorgroße ($p=0,0016$) und zum Tumorigrad ($p=0,047$), jedoch nicht zum Patientinnenalter oder Hormonrezeptorstatus gefunden [74].

In den weiteren Studien zur Korrelation wurden überwiegend beide Faktoren getrennt voneinander untersucht und nicht, wie in unserer Arbeit, in zwei Gruppen zusammengefasst. Die zwei Gruppen zwischen Hoch- und Niedrigrisiko-Patientinnen wurde durch die Kombination uPA/PAI-1 mit der Einteilung in uPA und PAI-1 niedrig versus uPA und/oder PAI-1 hoch durch Studien bestätigt [37,39,51,52].

Die signifikanten Ergebnisse der Korrelationen durch die univariate Analyse deuten darauf hin, dass die Proteolysefaktoren uPA und sein Inhibitor PAI-1 in ein komplexes System eingebunden sind und in ihrer Funktion und Aufgabe nicht unabhängig von anderen

tumorbiologischen Faktoren zu betrachten sind. Das uPA-PAI-1 System kann demnach nicht als eigenständiger Apparat angesehen werden.

Es ist weiter abzuklären, wie die Wechselwirkungen zwischen weiteren tumorbiologischen Faktoren sind und wie sie sich einander beeinflussen.

Eine multivariate Analyse würde weitere Erkenntnisse bezüglich der Zusammenhänge von uPA/PAI-1 und den anderen Prognosefaktoren gewinnen lassen.

Angesichts der Fülle der zu untersuchenden Faktoren sind Strukturen zu fordern, die einen weitgehenden Datenaustausch über die Grenzen der einzelnen Forschergruppen hinaus ermöglichen. Um eine optimale Vergleichbarkeit zwischen den Studien zu ermöglichen, müssen unbedingt gleiche Bedingungen und Standards zwischen den Studien herrschen.

Für die Bestimmung der Konzentration von uPA und PAI-1 wird die ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-Methode in der klinischen Routine an frischem oder gefrorenem Gewebe als Standard empfohlen.

ELISA'S sind kommerziell erhältlich und wurden von der EORTC Receptor und Biomarker Group einer Qualitätskontrolle unterzogen. Empfehlenswert sind non-ionic Detergens Triton X-100 für die Gewebeextraktion. So findet man bei Verwendung des Detergen Triton X-100 doppelt so viel uPA-Antigen wie in der Triton-freien Zytosolfraction und liefert zusätzlich eine bessere Messbarkeit für das DFS.

Die Ausbeute an PAI-1 ist hingegen in der Tritonfraction etwa 10 % niedriger als im Zytosol, was durch den höheren Proteinwert in der Tritonfraction bedingt ist. Hieraus ergeben sich zunächst unterschiedliche cut-off Werte für beide Extraktionsarten, die aber die prognostische Aussagekraft nicht beeinflussen.

Der cut-off Wert von 3 ng/mg Protein für uPA und 14 ng/mg Protein für PAI-1 haben sich durch zahlreiche Studien etabliert [63,51].

Aufgrund der validierten Studien bezüglich der prognostischen Aussagekraft der Proteasengruppen wurde die Bestimmung dieser neuen Tumormarker in die Leitlinien der AGO, in die S3-Leitlinien und in die Guidelines der ASCO (American Society of Clinical Oncology) 2007 aufgenommen. Die Bestimmung dient der besseren Risikoabschätzung für nodal-negative Patientinnen.

In das Konsensuspapier von St.Gallen 2007 haben uPA und PAI-1 noch nicht Einzug gehalten. Sicherlich ein Grund hierfür ist die Testung an Frischgewebe, die nicht in allen Ländern Standard ist. Obwohl gute Daten für die prognostische Bedeutung für uPA und PAI-1 vorliegen, ist deren Untersuchung (Kühlkette, Bestimmungsmethode) vielerorts schwierig

und stößt besonders bei kleinen Tumoren (zu wenig Frischgewebe) an technische Grenzen. In Deutschland ist die Testung in mehreren Einsendelabors möglich.

Beide Proteasen in Kombination, uPA und PAI-1 niedrig versus uPA und/oder PAI-1 hoch, bewiesen sich als Prognosefaktor bezüglich der Abschätzung derjenigen Brustkrebspatientinnen, die nach einer operativer Entfernung des Tumors, ein geringes bzw. hohes Risiko für einen Rückfall der Krankheit tragen. Wenn sowohl die uPA als auch die PAI-1 Konzentration niedrig ist, also unter dem cut-off Wert, gehört die Patientin zur Gruppe mit niedrigem Risiko. Liegt aber die Konzentration einer der beiden Proteasen (uPA/PAI-1) über den entsprechenden cut-off Wert, gehört die Patientin zur Gruppe mit hohem Rezidivrisiko.

Somit können durch eine solch bessere Risikoeinschätzung der nodal-negativen Patientinnen Übertherapien in diesem Kollektiv vermieden werden.

In der Chemo N0-Studie von Harbeck et al. (2001) mit 13 Zentren in Deutschland und einem Zentrum in Slowenien wurden 689 nodal-negative Patientinnen in niedrige und hohe uPA/PAI-1 Risikogruppen eingeteilt. Patientinnen mit hohem uPA und/oder PAI-1 wurden entweder in einen Chemotherapiearm mit 6 Zyklen CMF (Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluoruracil) oder einen unbehandelten Arm randomisiert. Die Patientinnen erhielten keine endokrine Therapie.

Nach einer medianen Beobachtungszeit von 3 Jahren konnten uPA/PAI-1 als unabhängige prognostische Faktoren im Bezug auf das rezidivfreie Überleben bestätigt werden [53]. In der zweiten Interimanalyse mit einem Follow-up von 50 Monaten konnte auch eine prognostische Wertigkeit für das Gesamtüberleben gezeigt werden. Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1 im Primärtumor, d.h. etwa die Hälfte der nodal-negativen Patientinnen, wiesen auch ohne adjuvante Therapie ein exzellentes 5-Jahres-Gesamtüberleben (>95%) auf [37,53].

Die nachgewiesene Prognosekraft für uPA/PAI-1 konnte ebenfalls in weiteren Studien bestätigt werden (Tabelle 37).

Zusätzlich zeigte sich in der Chemo N0-Studie eine deutliche Verbesserung des rezidivfreien Überlebens durch die adjuvante CMF-(Cyclophosphamid-Methotrexat-5-Fluoruracil) Therapie bei Patientinnen mit hohen uPA/PAI-1-Werten. Das Rezidivrisiko wurde in diesem Kollektiv durch die adjuvante Chemotherapie um 58% reduziert. Es konnte auch gezeigt werden, dass high-risk Patientinnen mit hohen uPA/PAI-1 bei nodal-negativen Patientinnen ein vergleichbar hohes Risiko haben wie Patientinnen mit ≥ 3 befallenen Lymphknoten [11,39].

Somit besitzt uPA/PAI-1 nicht nur einen prognostischen Wert, sondern auch einen prädiktiven Wert hinsichtlich des Ansprechens auf eine adjuvante Chemotherapie.

Mit unseren Daten war es nicht möglich die prognostische Aussagekraft zu untersuchen, da alle Patientinnen in unserem ausgewählten Kollektiv entweder eine Chemo- und/oder Hormontherapie erhalten haben. Um die Prognosekraft in unserem Patientinnengut ermitteln zu können, wäre eine Gruppe unbehandelter Patientinnen mit nodal-negativem Status erforderlich gewesen. Daher konzentrierte sich die Untersuchung auf den prädiktiven Wert beider Proteasen bei Patienten mit einer adjuvanten Systemtherapie (Chemo- und/oder Hormontherapie).

Author (year)	Country	Assays ^b (method of tissue extraction) ^c	uPA/PAI-1 determination	Patients (N ₀)	Median follow up (months)
Duffy (1988) ^a	Ireland	Activity ^{ih} (Cyt)	Retrospective	52 (25)	17
Jänicke (1991)	Germany	ELISA ^{ADI} (TX)	Prospective	104 (50)	25
Jänicke (1993)	Germany	ELISA ^{ADI} (TX)	Prospective	247 (101)	30
Foekens (1994)	The Netherlands	ELISA ^{ADI} (Cyt)	Retrospective	657 (273)	48
Grøhndahl-H. (1995)	Denmark	ELISA ^{MO} (Cyt)	Retrospective	505 (193)	54
Fernö (1996) ^a	Sweden	LIA ^{San} (Cyt)	Retrospective	688 (265)	42
Eppenberger (1998)	Switzerland	ELISA ^{ADI} (Cyt)	Retrospective	305 (159)	37
Kim (1998)	Japan	ELISA ^{Bio} (Cyt)	Prospective	130 (130)	53
Kute (1998)	USA	ELISA ^{MO} (Cyt)	Retrospective	168 (168)	58
Knoop (1998)	Denmark	ELISA ^{MO} (TX)	Retrospective	429 (178)	61
Bouchet (1999)	France	ELISA ^{ADI} (Cyt)	Retrospective	499 (233)	72
Foekens (2000)	The Netherlands	ELISA ^{ADI} (Cyt)	Retrospective	2780 (1405)	88
Jänicke (2001)	Germany	ELISA ^{ADI} (TX)	Prospective	556 (556)	32
Konecny (2001)	USA/Germany	ELISA ^{ADI} (TX)	Retrospective	587 (283)	26
Harbeck (2002)	Germany	ELISA ^{ADI} (TX)	Prospective	761 (269)	60
Cufer (2003)	Slovenia	ELISA ^{ADI} (TX)	Retrospective	460 (214)	33
Hansen (2003)	Denmark	ELISA ^{ih} (TX)	Retrospective	228 (101)	150
Zemzoum (2003)	Germany	ELISA ^{ADI} (TX)	Prospective	128 (128)	126
Bouchet (2003)	France	ELISA ^{ADI} (Cyt)	Retrospective	488 (226)	120
Manders (2004) ^d	The Netherlands	ELISA ^{ih} (Cyt)	Retrospective	576 (576)	61
Meo (2004)	Italy	ELISA ^{ADI} (Cyt)	Retrospective	196 (196)	65

^aOnly determination of uPA.

^bAssays: ADI (American Diagnostica Inc., Stamford, CT, USA), Mo (Monozyme, Horsholm, Denmark), San (Sangtec, Bromma, Sweden), Bio (Biopool, Umea, Sweden), ih (in-house assay).

^cTissue extraction: Cyt (cytosol), TX (Triton-X-100, *i.e.*, detergent extraction).

^dAdditional determination of uPA:PAI-1 complex.

Tabelle 37: Studien zu uPA und PAI-1 im Überblick [55]

Wir konnten mit unserer Arbeit keinen signifikanten Benefit einer adjuvanten Systemtherapie zwischen den beiden Risikogruppen der Proteasen bei nodal-negativen Patientinnen mit einem medianen Follow-up von 46,8 Monaten nachweisen. Weder in der Abhängigkeit zu

einem der Faktoren oder in den beiden Gruppen uPA und PAI-1 niedrig versus uPA/PAI-1 hoch. Die Risikogruppen reagierten bezüglich des Krankheitsverlaufes ähnlich auf eine Hormonrezeptor-assoziierte Therapie. Es konnten kaum Unterschiede zwischen den Verläufen erkannt werden. Nur der Inhibitor PAI-1 deutete mit Zunahme der Beobachtungszeit einen Benefit einer adjuvanten Systemtherapie bei nodal-negativen Patientinnen mit hohem PAI-1 Level an ($p=0,472$).

Auch in der vierer Gruppe mit uPA **und** PAI-1 niedrig, nur PAI-1 hoch, nur uPA hoch und uPA **und** PAI-1 hoch konnten die Proteasen keine signifikanten Ergebnisse ermitteln.

Ganz besonders in den Risikogruppen mit uPA und PAI-1 niedrig versus uPA/PAI-1 hoch, deren prognostische Aussagekraft hinreichend bestätigt worden ist, verlieren die Proteolysefaktoren bei den nodal-negativen Patientinnen ihre Prognosefähigkeit nach einer Hormonrezeptor-adaptierten Therapie.

Signifikante Ergebnisse konnten aber in der nodal-positiven Gruppe ermittelt werden. Somit zeigte uPA einen signifikant günstigeren Verlauf, wenn niedrige uPA Werte vorlagen ($p=0,034$). Das gleiche Bild ließ sich bei der Kombination beider Proteasen zeigen. Mammakarzinome mit einem hohen uPA und/oder PAI-1 Wert hatten nach einer adjuvanten Systemtherapie eine ungünstigere Prognose als Patientinnen mit niedrigen Werten ($p=0,010$). In diesem Subkollektiv ging die prognostische Fähigkeit der Proteasen auch nach einer Hormonrezeptor-adaptierten Therapie nicht verloren.

Eine Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit der Chemo N0 Studie ist nicht gewährleistet. In der Studie von Harbeck et al. wurden nur Fernmetastasen als Rezidiv aufgenommen. In die Analyse unserer Arbeit gingen Lokalrezidive und/oder Fernmetastasen ein. Zusätzlich wurden die Patientinnen nur mit einer Chemotherapie behandelt.

Hätte die Untersuchung nur Fernmetastasen erfasst, wären die Ergebnisse aufgrund der zu niedrigen Ereigniszahl nicht zu bewerten gewesen. Von den 1278 Frauen (nodal-negative und -positive) erlitten 2% ($n=24$) der Fälle ein Lokalrezidiv.

Auch wurden die Patienten in der Chemo N0-Studie nicht mit einer endokrinen Therapie behandelt. Aber auch bei der Aufspaltung in eine Chemo- oder Hormontherapie lieferten die Proteasen in unserem Datenkollektiv keine signifikanten Ergebnisse. Es konnte kein prädiktiver Wert, weder in der adjuvanten Hormon- noch Chemotherapie ermittelt werden. Aufgrund der niedrigen Ereignisfälle wurden diese Ergebnisse in der Arbeit nicht dargestellt. Es konnte z.B. wegen zu geringen Ereignisfällen ($n=2$) nach einer adjuvanten Chemotherapie bei nodal-negativen Patientinnen keine Kaplan-Meier Kurve dargestellt werden.

Die Therapie unserer Patientinnen erfolgte überwiegend Hormonrezeptor-adaptiert. Von den insgesamt 759 nodal-negativen Patientinnen erhielten 12% (n=89) eine reine Chemotherapie. Von denen hatten 87 (98%) einen Hormonrezeptor-negativen Status (Tabelle 18a, Seite 45). 548 (72%) Frauen erhielten eine rein endokrine Therapie. 543 (99%) von Ihnen hatten einen positiven Rezeptorstatus nach St. Gallen (Östrogen- oder Progesteronrezeptorstatus > 10%). Bei den 122 Patientinnen, die eine adjuvante Chemo- **und** Hormontherapie erhalten haben, waren 98 (81%) Rezeptor-positiv. Unter denen hatten 55 (56%) Patientinnen ein Grading von 2 und 42 (43%) Patientinnen ein Grading von 3.

Insgesamt waren 85% (n=643) der 759 nodal-negativen Patientinnen Hormonrezeptor-positiv und 15% (n=113) hatten einen negativen Status. Bei drei Patientinnen war der Hormonrezeptorstatus nicht bestimmt/dokumentiert worden, aber erhielten eine Chemo- und oder Hormontherapie

Das bedeutet, dass die Therapieentscheidung nicht unabhängig vom Hormonrezeptorstatus war.

Somit lässt auch der Einfluß anderer prädiktiver Faktoren, wie z.B. der Hormonrezeptorstatus, die Untersuchung von uPA und PAI-1 nicht unangetastet. Von entscheidender Bedeutung ist anscheinend die Hormonrezeptor-assoziierte Therapie und nicht der Proteasenstatus. 80% der Patientinnen mit einem hohen Proteasenlevel gingen mit Rezeptornegativität des Tumors einher. Genau diesem Patientinnenkollektiv wird nach den internationalen Leitlinien eine adjuvante Chemotherapie empfohlen, was in diesem Kollektiv zu 98% erfolgte. Die Zahlen deuten demnach darauf hin, dass die prognostische Kraft der Proteasen durch eine Hormonrezeptor-assoziierte Therapie aufgehoben wurde. Die Korrelation zwischen dem RFS in Abhängigkeit zu den beiden Proteasengruppen uPA/PAI-1 konnte daher auch keine Signifikanz liefern.

Einen klaren und eindeutigen Therapieeffekt würde man bei randomisierten Studien erhalten. Weiterhin ist natürlich auch die geringe Rezidivhäufigkeit in diesem Patientinnenkollektiv zu prüfen. Im Gesamtkollektiv von 1278 Frauen (nodal-negative und -positive) erlitten 2% (n=24) reine Lokalrezidive und 8% (n=97) reine Fernmetastasen. Nur 5% (n=40) von den 759 nodal-negativen entwickelten Lokalrezidive und/oder Fernmetastasen.

Zur Erforschung des therapeutischen Effekts sind prospektiv randomisierte Studien am optimalsten. Diese Studien sind aber oft schwer durchführbar und auch aus ethischen Gründen nicht zu unterstützen. Der Konsensus von internationalen Guidelines und Experten lässt einen Vergleich mit nicht therapierten Armen einer Studie bei einem primären Mammakarzinom nicht zu [56].

Um trotzdem die Aussagekraft eines Parameters optimal untersuchen zu können, eignen sich daher retroprospektive Studien in denen die Patientinnen nach dem zu untersuchenden Faktor nach adjuvanter und keiner adjuvanter Systemtherapie randomisiert werden. Die Auswertung sollte über multivariate Analysen erfolgen.

Weitere Untersuchungen zur prädiktiven Aussagekraft bei Patientinnen nach adjuvanter Systemtherapie liegen nur wenige vor (Tabelle 38).

In einer großen retrospektiven Analyse mit einem medianen Follow-up von 83 Monaten konnten Harbeck et al. (2002) bei 3424 Patientinnen im Gesamtkollektiv ermitteln, dass die Patientinnen mit einem hohen uPA/PAI-1 einen größeren Therapievorteil für eine Chemotherapie haben als welche die niedrige uPA/PAI-1 Werte aufwiesen ($p < 0,003$; HR 0,68; 95% CI; 0,53 – 0,88). Ein prädiktiver Wert nach einer endokrinen Therapie konnte, so wie in unserer Untersuchung, nicht festgestellt werden. [40].

Studie	adjuvante Therapie	Studien-design	n	Nodal-status	Ansprechen auf hohe uPA/PAI-1 Werte
2001 Jänicke et al. [11]	Chemotherapie	prospektiv	556	alle	gut
2002 Harbeck et al. [39]	Chemo- oder Hormontherapie	retrospektiv	761	alle	gut
2002 Harbeck et al. [40]	Chemotherapie	retrospektiv	3424	alle	signifikant gut
2003 Cufer et al. [58]	Hormontherapie	retrospektiv	460	alle	gut
2004 Manders et al. [57]	Chemo- oder Hormontherapie	retrospektiv	1119	alle	gut

Tabelle 38: Studien zur prädiktiven Aussagekraft von uPA und PAI-1 nach adjuvanter Systemtherapie (modifiziert nach [70])

Eine weitere Untersuchung von Harbeck et al. aus dem Jahre 2002 deutete für Patientinnen mit hohem uPA/-PAI-1 den Nutzen einer Chemotherapie an. Das zu untersuchende Kollektiv erhielt sowohl nodal-negative als auch nodal-positive Patientinnen (n=761).

In der univariaten Analyse konnten Sie ebenfalls, so wie in unseren Untersuchungen, keinen signifikant prädiktiven Wert für uPA/PAI-1 entdecken ($p=0,165$; Relative Risk 4,6; 95% CI, 2,6 – 8,3). Die Signifikanz änderte sich auch nicht in der Unterscheidung der Therapieformen zwischen Hormon- ($p=0,404$; RR 1,3; 95% CI; 0,7 – 2,2) oder Chemotherapie ($p=0,260$; RR 1,3; 95% CI; 0,8 – 2,2). Auch im Cox-Modell konnte keine signifikante Aussage gefunden werden. Es wurde dadurch begründet, dass die Analyse sehr stark von der Therapieentscheidung bezüglich Nodalstatus und der Art der Chemotherapie beeinflusst worden war [39].

In der adjuvanten Situation konnten Cufer et al. (2003) dafür eine gute Ansprechrate auf die endokrine Therapie bei hohen uPA und PAI-1 Werten herausfinden [58]. Es wurden prospektiv 460 primäre Mammakarzinome auf die prognostische und prädiktive Aussagekraft der Proteasen untersucht. 89% der Patientinnen erhielten eine adjuvante Systemtherapie. In unserem Kollektiv erhielten alle Patientinnen eine Chemo- und/oder Hormontherapie.

Nach einem 3-Jahres-DFS waren Patientinnen nach einer adjuvanten Hormontherapie mit beiden Proteasen hoch zu 95% rezidivfrei und 88% der Frauen, die uPA und/oder PAI-1 niedrig aufwiesen. Die Ergebnisse konnten aber keine Signifikanz niederlegen ($p=0,250$; HR 0,30; 95% CI; 0,04-2,34). Es erschien, dass die Hormontherapie die prognostische Aussagekraft der beiden Proteasen ebenfalls aufhieb.

Aber auch in dieser Untersuchung wurden die Patientinnen nicht in zwei Gruppen bezüglich des Lymphknotenbefalls aufgegliedert (N- versus N+) und die Gruppen wurden in uPa **und/oder** PAI-1 niedrig versus uPA **und** PAI-1 hoch aufgeteilt und entspricht somit nicht der durch Studien bestätigten Einteilung (uPA und PAI-1 niedrig versus uPA und/oder PAI-1 hoch) [37,39,51,52].

2004 untersuchten Manders et al. 1119 primäre Mammakarzinome auf die Korrelation zwischen Ansprechrate und adjuvanter Systemtherapie. Das mediane Follow-up lag bei 59 Monaten [57].

Es wurde ein hoher Benefit einer adjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit hohem versus niedrigem uPA und PAI-1 gefunden. Die Untersuchungen lieferten eine signifikante Beziehung zwischen der adjuvanten Chemotherapie und hoher uPA und PAI-1 Werten ($p=0,033$).

Zusätzlich konnte eine signifikante Interaktion zwischen der adjuvanten Hormontherapie und uPA gefunden werden ($p=0,031$). Auch konnte gefunden werden, dass PAI-1 mit der adjuvanten Chemotherapie korreliert ($p=0,012$).

Der Vergleich mit unseren Daten ist nicht gegeben, da uPA und PAI-1 als Gruppe untersucht worden sind und die cut-off Werte nicht mit unseren und den anderen Studien identisch waren.

Aktuellere Arbeiten ab dem Jahre 2004 liegen für die prädiktive Vorhersagekraft von uPA und PAI-1 nicht vor.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Bestimmung von uPA und PAI-1 als prädiktiver Indikator zur Abschätzung des Therapieansprechens auf eine adjuvante Chemotherapie und/oder Hormontherapie noch nicht vollständig validiert ist und weitere Studien zu erfolgen haben.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass nach einer Hormonrezeptor-adaptierten Therapie kaum ein Benefit zwischen den Risikogruppen der Proteasen zu sehen war.

Aber auch die weiteren, in dieser Arbeit untersuchten, Prognosefaktoren wie der Hormonrezeptorstatus, Her2/neu-Status und das Tumorsuppressorgen p53 konnten als prädiktiver Faktor bei nodal-negativen Patientinnen nach einer adjuvanten Systemtherapie nicht als signifikant ermittelt werden und zeigten wie uPA und PAI-1 nur eine schwache Trennung zwischen den Niedrig- und Hochrisikopatientinnen in den Darstellungen nach Kaplan-Meier.

Als einziger Parameter konnte der EGF-Rezeptor eine signifikant prädiktive Aussagekraft bezüglich RFS bei den nodal-negativen Patientinnen liefern ($p=0,019$). Bei den nodal-positiven Patientinnen konnte dies nicht beobachtet werden ($p=0,273$).

Nodal-negative Patientinnen mit einer schwachen Membrananfärbung (≤ 2) hatten in unserem Kollektiv ein signifikant bessere Prognose bezüglich RFS als Patientinnen mit einer starken Membrananfärbung von 3+ nach einer adjuvanten Systemtherapie. Somit sprachen Mammakarzinome mit einer starken Expression des EGF-Rezeptors schlechter auf eine Hormonrezeptor-adaptierte Therapie an.

Der EGF-Rezeptor und die Steroidhormonrezeptoren sind in Ihrer Wirkungsweise voneinander abhängig. Diese gegenseitige Interaktion führt dazu, dass eine endokrine Resistenz in ER-positiven Mammakarzinomen induziert wird. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Marker eine Resistenz gegenüber endokriner Therapie und Chemotherapie besitzt [21,59-62].

Obwohl der Hormonrezeptor in Studien als prädiktiver Faktor bestätigt worden ist, konnten wir weder für den Östrogen- noch Progesteronrezeptor eine Vorhersagekraft bei nodal-

negativen Patientinnen auf eine Hormonrezeptor-assoziierte Therapie finden. Auch in Kombination wurde keine Signifikanz ermittelt. Die Ursache kann daran liegen, dass die Ergebnisse durch die Chemotherapie überdeckt worden sind.

Bei den nodal-positiven Patientinnen konnten in allen drei Einheiten eine signifikante Korrelation ermittelt werden. Ein negativer Hormonrezeptorstatus, ob nur ER ($p=0,003$) negativ, PR negativ ($p=0,006$) oder beide der Rezeptoren negativ ($p=0,008$), hat eine ungünstigere Prognose als Mammakarzinome mit einem positiven Rezeptorstatus. So wie in den Studien bestätigt, nimmt auch in unserem Kollektiv die prognostische Vorhersagekraft des Steroidhormonrezeptorstatus mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit ab [64,65].

Der Her2/neu Status, der ebenfalls auf die prädiktive Aussagekraft untersucht worden ist, konnte weder in der nodal-negativen ($p=0,291$) noch -positiven ($p=0,383$) Gruppe signifikante Ergebnisse liefern.

Eine HER-2/neu-Überexpression ist in der Regel mit einem aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung und einer Herunterregulierung des Hormonrezeptorstatus korreliert [66]. Vier große Studien haben den Einsatz von Herceptin in der adjuvanten Situation beim Mammakarzinom untersucht (NSABP 31, NCCTG-N 9831, BCIRG 006, HERA). Diese ergaben bereits nach einem kurzen Follow-up von zwei Jahren eine signifikante Verlängerung des krankheitsfreien Intervalles und im Weiteren des Gesamtüberlebens. Die Zulassung von Herceptin als adjuvante Therapie während eines Jahres erfolgte aufgrund der Zwischenergebnisse der HERA Studie.

Eine HER2-Proteinüberexpression bzw. Genamplifikation ist prädiktiv für das Ansprechen einer Trastuzumab-Therapie. [17].

Eine unabhängige prognostische Relevanz einer HER-2/neu-Überexpression ist allerdings nicht endgültig geklärt, da die Korrelation zwischen HER-2/neu-Status und Krankheitsverlauf durch seine prädiktive Bedeutung hinsichtlich des Ansprechens auf eine Systemtherapie überdeckt wird [67]. Diese Beeinflussung lag auch in unserer Analyse vor.

Das Tumorsuppressorgen p53, als weiterer untersuchter Faktor auf die prädiktive Aussagekraft, lieferte bei den nodal-negativen Patientinnen eine leichte Tendenz zur Signifikanz ($p=0,083$). Patientinnen mit keiner p53-Mutation profitierten eher von einer adjuvanten Systemtherapie, als Patientinnen mit einer p53-Mutation. Die prädiktive Kraft nahm aber mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit ab.

Diese Abnahme der prädiktiven Aussagekraft zeigte sich nicht bei den nodal-positiven Patientinnen ($p=0,003$). In diesem Subkollektiv hatten Patientinnen mit einer p53-Mutation nach einer adjuvanten Systemtherapie eine ungünstigere Prognose als Patientinnen ohne eine p53-Mutation.

Somit konnte der EGF-Rezeptor in unserer Untersuchung als einziger Marker eine signifikante Aussagekraft über den rezidivfreien Verlauf nach einer adjuvanten Systemtherapie bei nodal-negativen Patientinnen zeigen. Patientinnen mit einer niedrigen EGFR-Expression sprechen auf eine Hormonrezeptor-assoziierte Therapie besser an, als Patientinnen mit einer Überexpression ($p=0,019$).

Der Her2/neu-Status, das Tumorsuppressorgen p53 und auch der Hormonrezeptorstatus unterschieden sich in ihrer Vorhersagekraft auf eine adjuvante Systemtherapie zu den Proteasen uPA und PAI-1 kaum voneinander. Es lagen kaum Unterschiede im Nutzen einer Hormonrezeptor-assoziierten Therapie zwischen den Risikogruppen bei nodal-negativen Patientinnen vor.

Was die Proteasen angeht, erfolgt in Studien schon die Selektierung der Chemotherapien, da über den Nutzen unterschiedlicher Chemotherapieregime bezogen auf den Proteasenstatus bisher keine Aussage gemacht werden konnte. Es laufen zur Zeit zwei Studien, um die günstigste Chemotherapie für Patientinnen mit einem hohen Level an uPA und/oder PAI-1 zu eruieren.

In der internationalen NNBC-3-Studie (Nodal-Negative-Breast-Cancer-III-Trial), die seit Oktober 2002 läuft, und die gemeinsam von der AGO, der German Breast Group und der EORTC-RBG durchgeführt wird, wird untersucht man, ob nodal-negative Hochrisikopatientinnen mit hohem uPA/PAI-1 von einer zusätzlichen Taxantherapie profitieren [71].

In der ADEBAR-Studie (Adjuvant Docetaxel vs. Epirubicin Based Regimen Trial), eine randomisierte Phase III Studie zum Vergleich von FEC-Chemotherapie versus EC-Doc-Chemotherapie in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms mit ≥ 4 befallenen Lymphknoten, wird der prädiktive Wert des uPA und PAI-1 Status mit untersucht. Im Rahmen dieser Studie wird eine prospektive uPA/PAI-1 Bestimmung angeboten, um zu untersuchen, ob Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1 nach Anthrazyklintherapie von einer zusätzlichen Taxantherapie profitieren. 2005 wurde die Rekrutierung abgeschlossen. In die Studie gingen 1500 Patientinnen ein [72].

Auch die ersten tumorbiologischen Therapieansätze für das uPA-System sind angelaufen. Die Medikamentenkandidaten WX-UK1 und WX-671 sind die ersten uPA-Inhibitoren weltweit, die in klinischen Studien bei Krebspatienten eingesetzt werden. WX-UK1 ist ein intravenös verabreichter, synthetischer niedermolekularer Inhibitor von uPA und anderen Serinproteasen. WX-UK1 soll somit den Metastasierungsprozess an unterschiedlichen Stellen hemmen. WX-671 ist ein oraler Inhibitor von uPA und anderen Serinproteasen. Als oral verabreichtes Medikament soll WX-671 zur Behandlung von Tumorerkrankungen weiterentwickelt werden, bei denen eine langfristige chronische Behandlung notwendig ist [73].

Unabhängig von diesen Ansätzen und Studien der Proteasen uPA und seinem Inhibitor PAI-1 untersucht die BIG/EORTC MINDACT-Studie (Microarray for Node Negative Disease may Avoid Chemotherapy) 6000 Patientinnen mit nodal-negativen Mammakarzinomen. Hauptziel der Studie ist die Identifikation von Patientinnen mit einer exzellenten Prognose ohne adjuvante Chemotherapie.

Auch in der TAILORx-Studie (Trial Assigning Individualized Options for Treatment) werden nodal-negative Patientinnen (n=4390) mit einem negativen Her2/neu-Status und Hormonrezeptor-positivem Status auf prädiktive bzw. prognostische Gensignaturen untersucht. Wahrscheinlich können 80-85% dieser Patientinnen ausschließlich durch eine adjuvante endokrine Therapie geheilt werden [36].

Die Genexpressionsprofile sind zwar viel versprechend, müssen aber auch wie die anderen Prognosefaktoren und prädiktive Marker durch die entsprechenden prospektiven Studien in den nächsten Jahren erst noch validiert werden und können so in der klinischen Routine nicht empfohlen werden.

Die Studien machen aber deutlich, dass die Identifizierung von Patientinnengruppen mit einer sehr guten klinischen Prognose, ganz besonders der nodal-negativen Frauen, zukünftig im Mittelpunkt steht. Dazu haben sicherlich uPA und PAI-1 viel beigetragen.

Auch wenn diese beiden Faktoren international noch nicht die volle Anerkennung errungen haben, können Sie doch vielen nodal-negativen Patientinnen die Belastungen einer Chemotherapie ersparen.

5 Zusammenfassung

Die prognostische Aussage der Protease uPA und seinem Inhibitor Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 zum Gesamtüberleben und rezidivfreiem Intervall wurde in den letzten Jahren mehrfach bestätigt. Beide Parameter haben sich neben den klassischen Prognosefaktoren wie Patientinnenalter, Tumorgröße, Grading und Hormonrezeptorstatus als unabhängige Prognosefaktoren etabliert.

In unserer Arbeit wurden 1251 Mammakarzinome auf die Korrelation der Proteasen uPA und PAI-1 zu etablierten und neuen Prognosefaktoren untersucht. Zusätzlich wurde von 1278 Mammakarzinomen die prädiktive Aussagekraft beider Proteasen auf eine adjuvante Systemtherapie bezüglich des rezidivfreien Überlebens untersucht und mit den Faktoren Hormonrezeptorstatus, Her2/neu-Status, p53-Mutation und EGFR verglichen. Die Daten wurden in nodal-negative und -positive Mammakarzinome unterteilt. Das mediane Follow-up lag bei 46,8 (1,6-132,7) Monaten.

Es konnten signifikante Zusammenhänge zwischen den Proteasen uPA und PAI-1 zum Nodalstatus ($p=0,005$), Grading ($p<0,001$), Hormonrezeptorstatus ($p<0,001$), Her2/neu-Status ($p<0,001$), EGFR ($p<0,001$), VEGF ($p=0,008$), zur p53-Mutation ($p<0,001$), zu Ki-67/MIB1 ($p<0,001$) und zum MMP-11 ($p<0,001$) ermittelt werden, während zur Altersverteilung ($p=0,505$), Tumorgröße ($p=0,174$) und zum M-Status ($p=0,203$) kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnte.

Demnach sind die Proteasen keine eigenständigen Prognosefaktoren, sondern in das Risikoprofil eines Mammakarzinoms, das sich vielfältig im Bereich von molekularbiologischen Faktoren widerspiegelt, eingebunden.

Ein prädiktiver Wert konnte für die Proteasen, sei es für uPA ($p=0,975$), PAI-1 ($p=0,472$) oder in Kombination uPA/PAI-1 ($p=0,903$), bei den nodal-negativen Patientinnen bezüglich einer Hormonrezeptor-adaptierten Therapie nicht signifikant bestätigt werden. Die Prognosekraft der Proteasen ging in dem untersuchten Kollektiv nach einer adjuvanten Systemtherapie verloren. Zwischen den Risikogruppen konnten bezüglich des Krankheitsverlaufes kaum Unterschiede beobachtet werden. Bei den nodal-positiven Patientinnen behielten die Proteasen Ihre prognostische Fähigkeit.

Auch der Hormonrezeptorstatus ($p=0,788$), der Her2/neu-Status ($p=0,291$) und das Tumorsuppressorgen p53 ($p=0,083$) konnten keinen prädiktiven Wert aufweisen. All diese Marker konnten wie die Proteasen kaum Unterschiede im Benefit einer Hormonrezeptor-assoziierten Therapie zwischen den Risikogruppen bei nodal-negativen Patientinnen aufzeigen.

Als einziger Prognosefaktor konnte der EGF-Rezeptor eine signifikante Aussage liefern ($p=0,019$). Demnach hatten nodal-negative Patientinnen mit geringer Expression, die eine Hormonrezeptor-assoziierte Therapie erhielten, eine günstigere Prognose, als Patientinnen mit einer Überexpression. Eine Signifikanz konnte bei den nodal-positiven Mammakarzinomen nicht ermittelt werden ($p=0,273$).

6 Literaturverzeichnis

- 1 Manual Mammakarzinome (2007) Herausgeber Tumorzentrum München
URL: www.tzm.web.med.uni-muenchen.de
- 2 Ries L, Eisner M, Kosary C, Hankey B, Miller B et al. National Cancer Institute (2004) SEER cancer statistics review 1975–2001.
URL: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2001/
- 3 GEKID (2006), RKI (Hrsg) Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und das Robert Koch- Institut (RKI), Saarbrücken
- 4 Kuhl H. (2003) Epidemiologie, Mammakarzinom und Hormonersatztherapie. J Menopause 10 (4): 5–9
- 5 National Institutes of Health Consensus Development Panel (2001) Conference statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1–3. J Natl Cancer Inst Monogr 30: 5–15
- 6 Blanks RG, Moss SM, McGahan CE, Quinn MJ, Babb PJ Effect of NHS breast screening programme on mortality from breast cancer in england and wales. 1990–8: comparison of observed with predicted mortality. BMJ 321(7262): 665– 669
- 7 Harbeck N, Aigner M., Kusche B, Kiechle M (2002) Mammakarzinom – prognostische und prädiktive Faktoren. Onkologie 8: 808-816
- 8 Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Senologie (2007) S3-Leitlinie Mammakarzinom.
URL: www.senologie.org
- 9 AGO Leitlinien (2006) – Leitlinien für die Behandlung des primären und des metastasierten Mammakarzinoms.
URL: www.ago-online.de
- 10 Weise W, Schiller S, Beck C, Canzler E, Conradt A, Franke A, Gademann G, Nieder J, Roessner A, Rothe K, Wolansky D (2007) Das Mammakarzinom Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge
URL: www.med.unimagdeburg.de/fme/ufk/lehre/mamma_ca2.html
- 11 Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M, for the German Chemo N0 Study Group (2001) Risk-adapted adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer based on tumor biological factors uPA and PAI-1: First interim analysis of a randomized multicenter trial. J Natl Cancer Inst 93: 913–920
- 12 Clark GM, McGuire WL (1998) Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. Semin Oncol 15(2 Suppl 1): 20-5
- 13 Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Brünner N, Kates R, Fernö M, Eppenberger S, Spyrtos F, Thomssen C, Sweep CGJ, Peyrat JP, Martin PM, Blankenstein MA, Magdelenat H, Quillien-Pouvreau V, Daver, Ricolleau G, Daxenbichler G, Cufer T, Bendahl PO, Lisboa B, Ulm K, Christensen IJ, Meijer-van Gelder ME, Fiets E, Manders P, Broët P, Romain S, Windbichler G, Borstnar S, Beex LVRM, Jänicke F, Klijn JGM, Eppenberger U, Schmitt M, Foekens JA (2002) Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in 8,377 breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 94: 116–128

- 14 Onkodin
URL: www.onkodin.de/zms/content/e2/e32345/e32557/index_ger.html
- 15 Joensuu H, Isola J, Lundin M, et al. (2003) Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res* 9:923-930
- 16 Ellis MJ et al. (2001) Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1-and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol*; 19:3808–16
- 17 Paik S et al. (2000) Her2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 92: 1991–8
- 18 Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ (1987) Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence and death from breast cancer. *Lancet I*: 1398-1402
- 19 Heinrich Heine Universität – Institut für onkologische Chemie
URL: www.uniklinikduesseldorf.de/deutsch/unternehmen/institute/institutfronkologisch-echemie/funktionsbereiche/metastatischekapazitt/page.html
- 20 Untch M, Kahlert S, Thomssen C, Jänicke F (1989) Prognose- und Prädiktivfaktoren beim Mammakarzinom *Gynäkologe* 31:1067-1074
- 21 Newby JC, Johnston SRD, Smith IE, Dowsett M (1997) Expression of epidermal growth factor receptor and c-erb B2 during the development of Tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 3: 1643-1651
- 22 Medizin-Aspekte
URL: www.medizin-aspekte.de/07/05/medizin/brustkrebs.html
- 23 Leitner SP, Swern AS, Weinberger D et al. (1995) Predictors of recurrence for patients with small (1 cm or less) localized breast cancer (T1 a, b, N0, M0). *Cancer* 76: 2266-2274
- 24 Martin L, Green B, Renshaw C et al. (1997) Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 76: 1046-1054
- 25 Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, Hietanen P, Wasenius VM (1997) Predictive value of cerbB2, p53, Cathepsin D and histology of the primary tumor in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 76: 917-922
- 26 Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Allred C (1995) p53 protein overexpression and chemosensitivity in breast cancer. *Lancet* 345: 1181-1182
- 27 Mathieu MC, Koscielny S, Le Bihan ML, Spelmann M, Arriagada R (1995) p53 protein overexpression and chemosensitivity in breast cancer. *Lancet* 345: 1182
- 28 Chiou S, Rao L, White E (1994) Bcl-2 blocks p53 dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 14: 2556-2563
- 29 Sierra A, Castellsague X, Tortola S et al. (1996) Apoptosis loss and bcl-2 expression: Key determinants of lymph node metastases in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res* 2: 1887-1894
- 30 Sundblad A, Ahn C, Battifora H (1996) Immunohistochemical detection of bcl-2 and MIB-1/Ki-67 in breast cancer: retrospective analysis of 238 cases. *Medicina-B-Aires*, 56 (3): 343-347

- 31 Ueno H, Nakamura H, Inoue M et al. (1997) Expression and tissue localization of membrane- types 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57: 2055-2060
- 32 Crawford HC, Matrisian LM (1995) "Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their ""role in tumor progression. " *Invasion Metastasis*. 14: S.234-245
- 33 Bauer EA, Strickly GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ (1975) Collagenous production by human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 232-240
- 34 Johanna Skoglund Anna Emterling Gunnar Arbmán Patrick Anglard Xiao-Feng Suna (2004) Clinicopathological Significance of Stromelysin-3 Expression in Colorectal Cancer. *Oncology* 67:67–72
- 35 Gianni L et al. (2005) Feasibility and tolerability of sequential doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy. *Clin Cancer Res* 15: 8715–21
- 36 Rhiem K (2007) Prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom Individuelle Therapiekonzepte gesucht. *Gynäkologie und Geburtshilfe Sonderausgabe* 1:14-18
- 37 Harbeck N, Meisner C, Prechtel A, et al. (2001) for the German Chemo-N0 Study Group Level-I evidence for prognostic and predictive impact of uPA and PAI-1 in node-negative breast cancer provided by second scheduled analysis of multicenter Chemo-N0 therapy trial. *Breast Cancer Res Treat* 69: 213
- 38 Mengele K, Harbeck N, Reuning U, Magdolen V, Schmitt M (2005) Tumorassoziierte Prognosefaktoren der Plasminogenaktivator-Familie. *Hämostaseologie* 35: 301-10
- 39 Harbeck N, Kates R, Schnitt M (2002) Clinical Relevance of invasion factors uPA and PAI-1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer ist greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 20: 1000-1009
- 40 Harbeck N, Kates RE, Look MP, et al. (2002) Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified highrisk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and and plasminogen activator inhibitor type 1 (n=3424). *Cancer Res* 62: 4617-22
- 41 Astedt B, Holmberg L (1976) Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature* 261: 595-597
- 42 Knoop A, Andreasen PA, Andersen JA, Hansen S, Laenkholm AV, Simonsen ACW, Andersen J, Overgaard J and Rose C (1998) Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 77: 932-940
- 43 Duffy MJ, Reilley D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JN, Andreasen P (1990) Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 50: 6827-6829
- 44 Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H (1993) Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong, independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24: 195-208
- 45 Bouchet C, Spyrtos F, Martin PM, Hacéne K, Gentile A, Oglobine J (1994) Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas. *Br J Cancer* 69: 398-405
- 46 Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Jänicke F, Klijn JGM (1994) Plasminogen activator inhibitor-1 and breast cancer metastasis. *J Clin Oncol* 12: 1648-1658

- 47 Fernö M, Borg A, Killander D, Hirschberg L, Brundell J (1994) Urokinase plasminogen activator as prognostic factor in breast cancer: measured with a novel immunoluminometric assay suited for routine use. *Breast cancer Res Treat* 32: 30
- 48 Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ (1988) Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. *Cancer* 62: 531-533
- 49 Jänicke F, Schmitt M, Graeff H (1991) Clinical relevance of the urokinase-type and the tissue-type plasminogen activators and of their inhibitor PAI-1 in breast cancer. *Seminars in Thromb Haemostas* 17: 303-312
- 50 Zemzoum I, Kates RE, Ross JS, et al. (2003) Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 21: 1022-8
- 51 Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, et al. (1999) Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: six-year median follow-up. *Br J Cancer* 80: 419-26
- 52 Konecny G, Untch M, Arboleda J, Wilson C, Kahlert S, Boettcher B, Felber M, Beryt M, Lude S, Hepp H, Slamon D, Pegram M (2001) HER-2/neu and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 7:2448 2457
- 53 Euler U, Annecke K, Thomssen C, Harbeck N (2006) uPA und PAI-1 als Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom. *Journal Onkologie* 08:10-11
- 54 Weise W, Schiller S, C. Beck, E. Canzler, A. Conradt, A. Franke, G. Gademann, J. Nieder, A. Roessner, K. Rothe, D. Wolansky (2007) Das Mammakarzinom Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge
URL: www.med.unimagdeburg.de/fme/ufk/lehre/mamma_ca2.html
- 55 Harbeck N, Schmitt M, Paepke S, Allgayer H, Ronald EK (2007) TUMOR-ASSOCIATED PROTEOLYTIC FACTORS uPA AND PAI-1: Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 44, 2; ProQuest Health and Medical Complete pg. 179
- 56 Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ (2005) Panel Members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 16: 1569-1583
- 57 Manders P, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot AJ, van Tienoven DT, Beex LV, Sweep FC (2004) The complex between urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-I) independently predicts response to first-line endocrine therapy in advanced breast cancer. *Thromb Haemost.* 91(3):514-21
- 58 Cufér T, Borstnar S, Vrhovec I (2003) Prognostic and predictive value of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitors PAI-1 and PAI-2 in operable breast cancer *Int J Biol Markers* 18: 106-115
- 59 Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL (1987) Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence and death from breast cancer. *Lancet* i1: 1398-1402
- 60 Klijn JG, Look MP, Portengen H, et al. (1994) Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* 29: 73-83
- 61 Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA (1992) The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 13: 3-17

- 62 Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, et al. (2002) Prognostic value of epidermal growth factor receptor (HER-1/ E GFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 71: 67–75
- 63 Jänicke F, et al. (1994) Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissue are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1. *Cancer Res*, 54: p. 2527-30
- 64 Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillem Porta V, Semiglazov V, Garcia-Conde J, Zambetti M, Valagussa P, Bonadonna G, for the ECTO Study Group (2002) First report of the European Cooperative Trial in operable breast cancer (ECTO): effects of primary systemic therapy (PST) on local-regional disease. *Proc ASCO* 21: 34a
- 65 Untch M, Konecny G, Ditsch N, Sorokina Y, Moebus V, Muck B, Kuhn W, Bastert G, Werner Ch, Thomssen Ch, Wallwiener D, Albert U, Bothmann G, Kreienberg R, Lück HJ (2002) Dose-dense sequential epirubicin-paclitaxel as preoperative treatment of breast cancer: results of a randomised AGO study. *Proc ASCO* 21: 34a
- 66 Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ (2003) Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 142–153
- 67 Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF (2001) When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 19: 2334–2356
- 68 Beck T, Weller EE, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Knapstein PG (1995) Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of breast carcinomas: Correlation with established prognosis parameters and with the proliferation marker MIB-1. In: *Gynecol Oncol* 57: 96-104
- 69 Borg A, Lennerstrand J, Stenmark-Askmal M, Ferno M, Brisfors A, Ohrvik A, Stal O, Killander D, Lane, D, Brundell J (1995) Prognostic significance of p53 overexpression in primary breast cancer; a novel luminometric immunoassay applicable on steroid receptor cytosols. In: *Br J Cancer* 71: 1013-1017
- 70 Harbeck N, Kates ER, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C, Look PM, Foekens JA (2004) Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor Type 1 Predict Disease Outcome and Therapy Response in Primary Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 5: 348-352
- 71 NNBC-3-Trial
URL: www.germanbreastgroup.de/nNBC3/
- 72 ADEBAR Studie zur Therapie des Mammakarzinoms
URL: www.estimate.de/adebar/
- 73 WILEX
URL: www.wilex.de/index_dt.htm
- 74 Leib, C (2006) Bedeutung der Proteolysefaktoren Urokinase Plasminogenaktivator und Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1 für das rezidivfreie Intervall sowie das Gesamtüberleben von Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom. Habilitationsschrift: Medizinische Fakultät der Universität Hamburg
- 75 St. Gallen Konsensuskonferenz (2007) Neue Therapieempfehlungen für das frühe Mammakarzinom. *Focus Onkologie* 5: 48-50

- 76 american diagnostica
URL: www.american-diagnostica.de/FEMTELLE_Test.20.0.html
- 77 Kaufmann M, Loibl S, Rody A, von Minckwitz G (2006) Stadienadaptierte Therapie des Mammakarzinoms. Gynäkologe 39: 618-626

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Kapitel		Seite
1	Einleitung	
Abbildung 1:	Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1970-2002	8
Tabelle 1:	Risikofaktoren für die Entwicklung des Mammakarzinoms	9
Tabelle 2:	Risikogruppen nach St.Gallen-Kriterien 2007	11
Tabelle 3:	Generelles Vorgehen gemäß St.Gallen 2007	11
Tabelle 4:	Klassische und neuere Prognosefaktoren von klinischer Relevanz	14
Tabelle 5:	Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren	15
Tabelle 6:	Empfehlung der Bestimmung prädiktiver Faktoren für die Therapieentscheidung nach der AGO 2007	21
Abbildung 2:	Funktionsweise von uPA und PAI-1	24
2	Patientinnen, Material und Methoden	
Abbildung 3:	Algorithmus der Proteasenbestimmung	32
Tabelle 7:	uPA und PAI-1 im Überblick	33
Abbildung 4:	Box-Plot Darstellung von uPA und PAI-1	33
Tabelle 8:	Verteilung von uPA und PAI-1 in kombinierten Gruppen (n=1251)	34
Tabelle 9:	Bewertung der HER-2/neu-Immunhistochemie	35
Tabelle 10:	EGFR-Score der Farbtintensität	36
Tabelle 11:	Materialtabelle der Primer/Sonden Kombination „Assays on Demand“ ABI	37
Abbildung 5:	Beispiel für die Amplifikationskurve der RT-PCR auf dem Abisprism 7900	38
Tabelle 12:	Ein- und Ausschlusskriterien für die Auswertung der Korrelationen	39
Abbildung 6:	Altersverteilung im Kollektiv (n=1251)	39
Tabelle 13:	Liste der untersuchten Prognosefaktoren zur Korrelation mit uPA und PAI-1	40
Tabelle 14:	Datenübersicht (n= 1251)	41
Tabelle 15:	Ein- und Ausschlusskriterien für die Auswertung des rezidivfreien Überlebens	42
Tabelle 16:	Übersicht der untersuchten Prognosefaktoren für die Auswertung des rezidivfreien Überlebens (n= 1278)	43
Tabelle 17:	Therapieformen, Rezidiv- und Metastasenstatus aus dem Kollektiv für die Auswertung des rezidivfreien Überlebens (n=1278)	44
Tabelle 18a:	Hormonrezeptorstaus und Grading bei nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie (n=89)	45

Tabelle 18b:	Hormonrezeptorstaus und Grading bei nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Hormontherapie (n=548)	45
Tabelle 19a:	Hormonrezeptorstaus und Grading bei nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und Hormontherapie (n=122)	46
Tabelle 19b:	Hormonrezeptorstaus und Grading bei nodal-negativen Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und/oder Hormontherapie (n=759)	46
Tabelle 20a:	Hormonrezeptorstaus und Grading bei nodal-positiven Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie (n=58)	47
Tabelle 20b:	Hormonrezeptorstaus und Grading bei nodal-positiven Patientinnen mit adjuvanter Hormontherapie (n=115)	47
Tabelle 21a:	Hormonrezeptorstaus und Grading bei nodal-positiven Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und Hormontherapie (n=346)	48
Tabelle 21b:	Hormonrezeptorstaus und Grading bei nodal-positiven Patientinnen mit adjuvanter Chemo- und/oder Hormontherapie (n=519)	48
3	Ergebnisse	
Tabelle 22:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Alter	50
Tabelle 23:	Korrelation von uPA und PAI-1 zur TumorgroÙe	51
Tabelle 24:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Nodalstatus	52
Tabelle 25:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Grading	53
Tabelle 26:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Hormonrezeptorstatus	54
Tabelle 27:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Östrogenrezeptorstatus	55
Tabelle 28:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Progesteronrezeptorstatus	55
Tabelle 29:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum M-Status	56
Tabelle 30:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Her2/neu-Status	57
Tabelle 31:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum EGFR	58
Tabelle 32:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum VEGF	59
Tabelle 33:	Korrelation von uPA und PAI-1 zur p53-Mutation	60
Tabelle 34:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum Ki-67/MIB1	61
Tabelle 35:	Korrelation von uPA und PAI-1 zum MMP-11	62
Tabelle 36:	Überblick der Korrelationen von uPA und PAI-1 zu den untersuchten Prognosefaktoren (*statistisch signifikant p<0,05)	63
Abbildung 7:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	64
Abbildung 8:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von PAI-1 im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	65
Abbildung 9:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA/PAI-1 im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	66

Abbildung 10:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von uPA und PAI-1 in 4 Gruppen im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	67
Abbildung 11:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (ER) im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	69
Abbildung 12:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus (PR) im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	70
Abbildung 13:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (PR+ER) im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	71
Abbildung 14:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Her2/neu-Status im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	72
Abbildung 15:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom EGFR im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	73
Abbildung 16:	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der p53-Mutation im Vergleich zwischen nodal-negativem und -positivem Mammakarzinom nach adjuvanter Systemtherapie	74
4	Diskussion	
Tabelle 37:	Studien zu uPA und PAI-1 im Überblick	79
Tabelle 38:	Studien zur prädiktiven Aussagekraft von uPA und PAI-1 nach adjuvanter Systemtherapie	82

8 Abkürzungsverzeichnis

AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
BCIRG 006	Breast Cancer International Research Group
CMF	Cyclophosphamid – Methotrexat – 5-Fluoruracil
CT	Chemotherapie
DFS	Disease Free Survival
Doc	Docetaxel
EC	Epirubicin
EGF-R	Epidermal Growth Factor - Receptor
EORTC-RBG	European Organization for Research an Treatment of Cancer – Receptor and Biomarker Group
ER	Östrogenrezeptor
ET	Endokrine Therapie
FEC	5-Fluoruracil – Epirubicin - Cycloposphamid
G	Grading
Her2/neu	human epidermal growth receptor 2
HERA	Herceptin Adjuvant Trial
LOE	Level of Evidence
MMP-11	Matrix-Metalloprotein 11
N0	nodalnegativ
NCCTG- N 9831	North Central Cancer Treatment Group
NNBC-3-Studie	(Nodal-Negative-Breast-Cancer-III-Trial)
NSABP 31	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
OS	Overall Survivial
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PAI-2	Plasminogenaktivator-Inhibitor-2
PR	Progesteronrezeptor
RFS	Relapse-Free-Survival
t-PA	tissue/Gewebe-Typ Plasminogenaktivator
TNM	Tumorgröße – Nodalstatus - Metastasenstatus
uPA	Urokinasetyp Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinasetyp Plasminogenaktivator-Rezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

9 Danksagung

Mein Dank geht vor allem an Herrn Prof. Dr. J.W. Siebers für die Idee und Überlassung des Themas, für die großartige Unterstützung, die zahlreichen konstruktiven Anregungen und die kritische Diskussion unserer Ergebnisse.

Des Weiteren an Herrn A. Schattenberg für die hervorragende Arbeit der Datenanpassung.

Ein ganz herzliches Dankeschön auch an Herrn Prof. Bojar und Herrn PD. Dr. Prisack für Ihre tolle Betreuung.

10 Lebenslauf

Name: Ugur Özsahin
Geburtsdatum: 12. November 1973
Geburtsort: Tarsus/Türkei
Eltern: Temur Özsahin, Dreher
Güner Özsahin, Hausfrau
Schulausbildung: 1980 – 1984 Grundschule-Heide, Bochum
1985 – 1994 Märkisches Gymnasium, Bochum
Studium: 1995 – 2003 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine
Universität Düsseldorf
Fernstudium: 2004 – 2005 Gesundheitsökonomie am Prof. Dr. Braunschweig-Institut
Beruf: 2006 ärztlicher Mitarbeiter beim Deutschen Onkologie Centrum
2007 ärztlicher Projektleiter beim Westdeutschen Brust-Centrum
2008 ärztlicher Projektleiter bei der medfacilities GmbH – ein
Unternehmen der Uniklinik Köln

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.



.....

Ugur Özsahin

Abstract

Die prognostische Aussage der Protease uPA und seinem Inhibitor Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 zum Gesamtüberleben und rezidivfreiem Intervall wurde in den letzten Jahren mehrfach bestätigt. In unserer Arbeit wurden 1251 Mammakarzinome auf die Korrelation der Proteasen uPA und PAI-1 zu etablierten und neuen Prognosefaktoren untersucht. Zusätzlich wurde bei 1278 Mammakarzinomen die prädiktive Aussagekraft beider Proteasen auf eine adjuvante Systemtherapie bezüglich des rezidivfreien Überlebens untersucht und mit den Faktoren Hormonrezeptorstatus, Her2/neu-Status, p53-Mutation und EGFR verglichen. Die Daten wurden in nodal-negative und -positive Mammakarzinome unterteilt. Das mediane Follow-up lag bei 46,8 (1,6-132,7) Monaten. Es konnten signifikante Zusammenhänge zwischen den Proteasen uPA und PAI-1 zum Nodalstatus ($p=0,005$), Grading ($p<0,001$), Hormonrezeptorstatus ($p<0,001$), Her2/neu-Status ($p<0,001$), EGFR ($p<0,001$), VEGF ($p=0,008$), zur p53-Mutation ($p<0,001$), zu Ki-67/MIB1 ($p<0,001$) und zum MMP-11 ($p<0,001$) ermittelt werden, während zur Altersverteilung ($p=0,505$), Tumorgröße ($p=0,174$) und zum M-Status ($p=0,203$) kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnte. Demnach sind die Proteasen keine eigenständigen Prognosefaktoren, sondern in das Risikoprofil eines Mammakarzinoms, das sich vielfältig im Bereich von molekularbiologischen Faktoren widerspiegelt, eingebunden.

Ein therapeutischer Benefit einer Hormonrezeptor-adaptierten Therapie konnte zwischen den Risikogruppen der Proteasen, sei es für uPA ($p=0,975$), PAI-1 ($p=0,472$) oder in Kombination uPA/PAI-1 ($p=0,903$) nicht bestätigt werden. Die Prognosekraft der Proteasen ging in dem untersuchten Kollektiv nach einer adjuvanten Systemtherapie verloren. Zwischen den Risikogruppen konnten bezüglich des Krankheitsverlaufes kaum Unterschiede beobachtet werden. Bei den nodal-positiven Patientinnen behielten die Proteasen ihre prognostische Fähigkeit. Auch der Hormonrezeptorstatus ($p=0,788$), der Her2/neu-Status ($p=0,291$) und das Tumorsuppressorgen p53 ($p=0,083$) konnten wie die Proteasen kaum Unterschiede im Benefit einer Hormonrezeptor-assoziierten Therapie zwischen den Risikogruppen bei nodal-negativen Patientinnen aufzeigen. Als einziger Prognosefaktor konnte der EGF-Rezeptor eine signifikante Aussage liefern ($p=0,019$). Demnach hatten nodal-negative Patientinnen mit geringer Expression, die eine Hormonrezeptor-assoziierte Therapie erhielten, eine günstigere Prognose, als Patientinnen mit einer Überexpression. Eine Signifikanz konnte bei den nodal-positiven Mammakarzinomen nicht ermittelt werden ($p=0,273$).