

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des  
Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Fritz Jänicke

Bedeutung der Proteolysefaktoren Urokinase Plasminogenaktivator  
und Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1 für das rezidivfreie  
Intervall sowie das Gesamtüberleben von Patientinnen mit  
nodalnegativem Mammakarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Christopher Leib

aus Hamburg

2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 16.06.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss der/die Vorsitzende: Prof. Dr. F. Jänicke  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. B. Brandt  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. I. Fiedler

## Inhaltsverzeichnis:

### 1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom	.....	1
1.2. Prognose und Therapie des Mammakarzinoms	.....	3
1.3. Die Proteolysefaktoren uPA / PAI-1 beim nodalnegativen Mammakarzinom	.....	7
1.4. Nachweismethoden von uPA / PAI-1	.....	10
1.5. Zielsetzung der Arbeit	.....	11

### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Material

2.1.1. Patientenakten	.....	12
2.1.2. uPA / PAI-1 Tumorgewebe	.....	13
2.1.3. ELISA Test- Kits und Gerätschaften	.....	13

#### 2.2. Methoden

2.2.1. Datenerhebung und Follow-up	.....	14
2.2.2. Bestimmung von uPA / PAI-1	.....	17
2.2.3. Gewebeaufbereitung	.....	22
2.2.4. Proteinbestimmung	.....	23
2.2.5. Bestimmung der Hormonrezeptoren	.....	24
2.2.6. Statistische Auswertung	.....	24
2.2.7. Festlegen der optimalen Cut-Off- Werte für uPA / PAI-1	.....	24

3. Ergebnisse	
3.1. Datenüberblick	26
3.2. Untersuchungen zu uPA	
3.2.1. Darstellung der uPA Konzentrationen im Tumorzytosol der Patientinnen	28
3.2.2. Zusammenhang zwischen uPA und etablierten Prognosefaktoren	29
3.2.3. Korrelation von uPA zum rezidivfreien und Gesamtüberleben	34
3.3. Untersuchungen zu PAI-1	
3.3.1. Darstellung der PAI-1 Konzentrationen im Tumorzytosol der Patientinnen	38
3.3.2. Zusammenhang zwischen PAI-1 und etablierten Prognosefaktoren	39
3.3.3. Korrelation von PAI-1 zum rezidivfreien und Gesamtüberleben	44
3.4. Zusammengenommene Betrachtung von uPA und PAI-1	48
4. Diskussion	
4.1. Datenerfassung	56
4.2. Methodische Probleme	56
4.3. Grenzwerte	57
4.4. Prognostische Bedeutung von uPA und PAI-1	58
4.5. Ausblick	62
5. Zusammenfassung	64

6. Abkürzungen	.....	66
7. Literaturverzeichnis	.....	68
8. Anhang	.....	76
9. Danksagungen	.....	80
10. Lebenslauf	.....	81
11. Erklärung	.....	82

## 1. Einleitung

---

### 1.1. Das Mammakarzinom

Als Brustkrebs wird ein krankhaft bedingtes Wachstum des Brustgewebes bezeichnet, woran jede achte Frau im Laufe ihres Lebens erkrankt. In Deutschland sind das jährlich nahezu 46.000 Frauen, von denen etwa 17.000 im Alter unter 60 Jahren sind [1]. Brustkrebs stellt damit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar und ist für 26% aller Krebsneuerkrankungen und 18% aller Krebstodesfälle bei Frauen verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63,5 Jahren [2].

Risikofaktoren für Brustkrebs sind besonders:

- *Alter und Geschlecht* : Wie bei vielen Krebsarten spielt das Alter eine wichtige Rolle, bei 77% der Neuerkrankten und 84% der Brustkrebs bedingten Todesfälle sind die Frauen im Alter von 50 Jahren und älter. Weniger als 1% entfällt dabei auf Männer [3, 4].
- *Erbfaktoren und familiäre Anamnese* : Einige Familien scheinen eine genetische Veranlagung für die Entstehung von Brustkrebs zu haben. Dabei wurden zwei Gene entdeckt, die damit in Verbindung stehen : BRCA1 und BRCA2. Die Gene p53 und BARD1 scheinen ebenso eine wichtige Rolle zu spielen. Außerdem wurden durch andere Untersuchungen noch die Gene BRCA3 und Noey2 aufgezeigt. Diese Fakten legen nahe, dass Brustkrebs durch das Wachstum genetisch beschädigter Zellen entsteht [5-8].
- *Hormonelle Einflüsse* sind insofern wichtig, da sich Hormone positiv auf das Zellwachstum auswirken [4, 9, 10].

- 
- *Frühe Menstruation und späte Menopause* : Frauen, bei denen die Menstruation bereits sehr früh einsetzt (jünger als 12 Jahre) oder die erst spät in die Menopause eintreten (älter als 55) sind einem erhöhten Brustkrebsrisiko ausgesetzt. Auch Frauen, die niemals Kinder bekommen haben oder erst nach Ihrem 30ten Lebensjahr sind einem erhöhten Krebsrisiko ausgesetzt [11].
  - *Kontrazeptiva* (Anti-Babypille): Anti-Babypillen scheinen das Risiko für Brustkrebs leicht zu erhöhen abhängig vom Alter, Dauer der Anwendung und anderen Faktoren [12].
  - *Östrogenpräparate* : Bei Östrogenpräparaten (vor allem der Hormonersatztherapie), die länger als 5 Jahre eingenommen wurden, hat sich eine Erhöhung des Risikos für Brustkrebs gezeigt, dabei steigt das Risiko mit der Dauer der Anwendung [13-16].
  - *Körpergewicht* : Adipositas wird als Risikofaktor kontrovers diskutiert [17].
  - *Alkoholabusus* : Exzessiver Alkoholgenuss von mehr als 1-2 Getränken pro Tag hat ein erhöhtes Brustkrebsrisiko zur Folge [18].
  - *Chemikalien* : Einige Studien haben gezeigt, dass östrogenähnliche Substanzen in Pestiziden und anderen Industrieprodukten ein erhöhtes Brustkrebsrisiko hervorrufen [19, 20].
  - *Strahlung* : Menschen, die im Kindesalter radioaktiver Strahlung ausgesetzt sind, haben ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken [21-23].
  - *Zusätzliche Risikofaktoren* : In einigen Studien hat sich gezeigt, dass bei bestehenden oder vorhergehenden Krebserkrankungen im Uterus, Ovar oder Dickdarm aber auch bei einer positiven Familienanamnese mit Krebserkrankungen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko besteht [4].

---

Die klinischen Symptome der Brustkrebserkrankung sind z.B. ein tastbarer Knoten in der Brust, der überwiegend schmerzlos ist, sowie ein Knoten im Achselbereich.

Die Häufigkeit zeigt bei der Brustkrebsinzidenz in Deutschland, wie in allen anderen Ländern der EU, in den letzten 20 Jahren einen steigenden Trend [1].

## 1.2. Prognose und Therapie des Mammakarzinoms

### a) Prognose

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate einer an primärem Mammakarzinom erkrankten Frau beträgt heute etwa 73%. Ihr gehen somit durchschnittlich 6 Jahre ihrer ausstehenden Lebenserwartung verloren [1].

Das Ziel klinischer Studien ist es also vorrangig, die Mortalitätsrate zu senken. So können durch Primärtherapien wie Operation, Bestrahlung und Fortbehandlungen etwa 30% der Patientinnen dauerhaft geheilt werden, aber bei 70% treten dennoch ein Lokalrezidiv oder eine distante Metastasierung auf.

Die Prognose der Patientinnen mit primärer Erkrankung wird durch klinische, histopathologische und biochemische Faktoren bestimmt. Zu den klinischen Daten zählen das Alter der Patientin bzw. der prä- oder postmenopausale Hormonstatus.

Die Tumorausbreitung wird pathohistologisch durch das pTNM- System bestimmt, entsprechend der Richtlinien der UICC ( Union Internationale Contre Le Cancer ). Anhand des postoperativ durch pathohistologische Untersuchung gesicherten pTNM-Schemas lassen sich die Größe des Primärtumors (pT), der



Befall der regionären Lymphknoten (pN) und eventuelle Fernmetastasierung (pM) einstufen.

Dabei wird der Befall der Lymphknoten in vielen Untersuchungen als der bedeutendste prognostische Marker angesehen. 70% der nodalpositiven Patientinnen entwickeln in den ersten zehn Jahren ein Rezidiv, dagegen nur 30% der nodalnegativen [24-27].

Als ergänzende prognostische und prädiktive Faktoren müssen am Tumorgewebe neben Tumorgöße und Lymphknotenstatus ebenfalls bestimmt werden:

- der histologische Typ:

Das invasiv- duktales Karzinom bildet die größte Gruppe, gefolgt vom invasiv-lobulären und medullären Karzinom.

- der Differenzierungsgrad (Grading):

Das Tumor- Grading nach Bloom and Richardson erfasst unabhängig vom Geschwulsttyp histologische und zytologische Merkmale und ordnet diese in ein Schema von üblicherweise drei Differenzierungsgraden (Grading I-III). Diese Einteilung beruht auf drei Kriterien: dem Grad der tubulären Differenzierung, der Polymorphie und dem Anteil an Mitosen.

- der Östrogen- und der Progesteronrezeptorstatus:

Der Nachweis von Steroidhormonrezeptoren wird von einigen Autoren mit einer günstigen Prognose in Zusammenhang gebracht. Diese Rezeptoren sind vor allem aber ein prädiktiver Parameter für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie.

---

Das Mammakarzinom metastasiert häufig und früh.

Der Verlauf der Erkrankung wird ausschließlich davon bestimmt, ob eine Fernmetastasierung eintritt. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Fernmetastasen und sogar der Tod am Mammakarzinom kann durch eine adjuvante, postoperative, systemische Therapie um etwa 20% gesenkt werden [28].

## b) Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms stützt sich momentan auf fünf Säulen.

### 1) *Operation*

Es wird die brusterhaltende Therapie (BET) von der Entfernung des gesamten Brustdrüsenkörpers (Mastektomie, Ablatio) als Operationsform unterschieden. Obligatorisch ist dabei die Entfernung der Lymphknoten in der Axilla. Hier setzt sich jedoch mehr und mehr die alleinige Entfernung des Wächterlymphknotens (Sentinel-Lymphknoten-Technik) durch.

### 2) *Bestrahlung*

Die Bestrahlung wird bei der BET obligatorisch angewandt. Bei einer Ablatio wird nur bei erhöhtem lokalen Rezidivrisiko eine zusätzliche Bestrahlung durchgeführt.

### 3) *Chemotherapie*

Die Durchführung einer postoperativen, adjuvanten Chemotherapie wird heutzutage vorwiegend nach den Kriterien von St. Gallen entschieden. Hierbei wird nach verschiedenen Parametern (siehe Tabelle 1) das Metastasierungsrisiko

ermittelt und bei erhöhtem Risiko zur Senkung desselben eine Chemotherapie durchgeführt [29].

Risikokategorie	
Niedriges Risiko	<i>Nodalnegativer Befund, sowie pT ≤ 2 cm und Tumorgrading 1 und Abwesenheit von peritumoralen Gefäßeinsprossungen und Her2/neu Gen weder überexpressioniert noch verstärkt und Alter ≤ 35 Jahre</i>
Erhöhtes Risiko	<i>Nodalnegativer Befund, sowie pT &gt; 2 cm oder Tumorgrading 2 oder 3 oder Peritumorale Gefäßeinsprossung oder Her2/neu Gen Überexpression oder Verstärkung oder Alter &lt; 35 Jahre Nodalpositiver Befund (1-3 befallene Knoten), sowie Her2/neu Gen weder überexpressioniert noch verstärkt</i>
Hohes Risiko	<i>Nodalpositiver Befund (1-3 befallene Knoten), sowie Her2/neu Gen Überexpression oder Verstärkung Nodalpositiver Befund (≥ 4 befallene Knoten)</i>

**Tab. 1:** Risikoeinschätzung bei nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen nach der Konsensabstimmung von St. Gallen 2005 [26, “International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer”]

Die nodalnegativen Patientinnen ohne weitere Risikofaktoren werden dabei nicht berücksichtigt, obwohl sie ein Rezidivrisiko von 30% haben. Es ist also wichtig, diese Patientinnen zu erkennen und zu therapieren.

---

4) *Hormontherapie*

Bei positivem Hormonrezeptorstatus werden Antiöstrogene verabreicht, wie z.B. Tamoxifen für maximal 5 Jahre.

5) *Antikörpertherapie*

Der bis dato einzige zugelassene Antikörper bei Her2/neu überexprimierendem Mammakarzinom ist Trastuzumab (Herceptin®).

1.3. Die Proteolysefaktoren uPA / PAI-1 beim nodalnegativen Mammakarzinom

Für Patientinnen mit negativem Lymphknotenbefall sind die klinischen Vorteile einer Chemotherapie verhältnismäßig klein, weil eine primäre operative lokoregionäre Behandlung bereits 60%–70% dieser Patienten heilt [30-32]. Dennoch entwickeln ca. 30% der Patientinnen Metastasen.

So müsste man also 100 % der nodalnegativen Patientinnen therapieren, das heißt, sie zum Teil unnötigen und belastenden Nebenwirkungen aussetzen, um bei den gefährdeten 30% der Patientinnen einen Überlebensvorteil zu erreichen. Um dennoch eine Belastung von Patientinnen, die nicht einer systemischen adjuvanten Therapie bedürfen, zu vermeiden, sind aussagekräftige, prognostische Faktoren notwendig, die dazu beitragen, jene 30% der Patientinnen zu erkennen, welche ein hohes Risiko einer Rezidivkrankung haben.

Der Gebrauch von traditionellen prognostischen Faktoren, wie zum Beispiel Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Tumorgrading, und Steroidhormonrezeptorstatus, ist hierzu jedoch nur mangelhaft geeignet.

Um eine Verfeinerung der Risikoabschätzung und eine individualisierte Behandlungsmöglichkeit beim nodalnegativen Mammakarzinom ermöglichen zu können, wurde in den letzten Jahren der Untersuchung von neuen prognostischen Faktoren erhebliche Aufmerksamkeit gewidmet.

Durch verschiedene Studien ist klar geworden, dass die Fähigkeit von Krebszellen, die extrazelluläre Matrix zu infiltrieren, und in Lymph- und Blutgefäße einzuwachsen, sowie Metastasen an entfernten Stellen zu bilden, von der koordinierten Wechselwirkung von zwei Hauptproteasesystemen abhängig ist, dem Matrix-Metalloproteinase-System und dem Plasminogen-Aktivator-System. Hierbei kristallisieren sich vor allem die Serinprotease Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und ihr Inhibitor, Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) als viel versprechende neue Faktoren heraus.

Diese Bauteile spielen eine zentrale Rolle in den Abläufen, die letzten Endes zur Entwicklung von Metastasen führen. Sie spielen in der proteolytischen Kaskade, die bei dem physiologischen und pathophysiologischen Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix involviert ist, eine tragende Rolle. Ist uPA an seinen zellulären Rezeptor uPA-R gebunden, verwandelt es das Plasminogen in das Serin-Protease-Plasmin. Dabei wird die Aktivität des uPA durch die Serin-Protease Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 kontrolliert. Das Plasmin löst zahlreiche Komponenten der Gewebeverbindungen auf und bei Malignität auch das Stroma, das die Krebszellnester umschließt. Bindet PAI-1 an den uPA/uPA-R Komplex kommt es mithilfe transmembranärer Rezeptoren der LDL-Familie zur Aufnahme dieses Tertiärkomplexes in die Zelle. Hier wird der uPA/uPA-R Komplex kaskadenartig abgebaut und der uPA-Rezeptor wieder an der Membranoberfläche replaziert. Damit wird die proteolytische Aktivität der Zelloberfläche und damit die perizelluläre Proteolyse wiederhergestellt [33].

Neben der proteolytischen Aktivität bewirkt das uPA- System in Zusammenarbeit mit anderen Proteinen auch einige wichtige andere biologische Effekte. Wie zum Beispiel die Chemotaxis, Invasion, Proliferation und auch die Angiogenese. Die Produktion und der Zusammenbau von perizellulärem und zellulärem uPA, uPA-R und PAI-1 sind somit die Voraussetzung für eine effiziente Proteolyse, Angiogenese, Zelladhäsion und Migration und damit für die Tumorzellinsvasion und Metastasierung [34-38].

Bei einer Metastasierung wird durch die Einwirkung des rezeptorgebundenen Plasminogenaktivators (uPA) Plasmin aus dem enzymatisch inaktiven Plasminogen in der Umgebung der Tumorzellen gebildet, wobei Inhibitoren (z.B. PAI-1) die Aktivität des uPAs an den invasiven Tumorgrenzen kontrollieren.

An der Tumorperipherie entstandenes Plasmin aktiviert so die Kollagenase und durch die enzymatische Einwirkung dieser beiden Faktoren wird die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran durchbrochen. Auf diese Weise können die Tumorzellen die Gefäße erreichen. Hier schützen sie sich nach ihrer Intravasation durch koagulative Mechanismen vor der Immunreaktion im Kreislauf und organisieren sich in den Kapillaren und den Lymphknoten. Ebenfalls durch Proteolyse treten die Tumorzellen aus den Gefäßen wieder aus und dringen in die Metastasierungsstellen ein. Diese Sekundärtumore (Metastasen) veranlassen wiederum unter Einwirkung von uPA und PAI-1 die Angiogenese.

Im Tumorzytosol ist eine quantitative Bestimmung von uPA und PAI-1 anhand des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Verfahrens möglich. Es

zeigte sich, dass in malignen Tumoren (wie z.B. Brustkrebs) die uPA und PAI-1 Konzentrationen deutlich höher liegen als in normalem Gewebe [39-41].

Dabei sind hohe Konzentrationen, sowohl von uPA, als auch PAI-1 mit einer schlechten Prognose für Brustkrebspatientinnen verbunden [42, 43]. So haben sich neben einem jugendlichen Alter (<35 Jahre), einem negativen Hormonrezeptorstatus und einem undifferenzierten Tumorgrad (Grading 3), erhöhte uPA und PAI-1 Werte als Prognoseparameter für ein kurzes rezidivfreies Überleben (disease-free survival), sowie ein kurzes Gesamtüberleben (overall survival) herauskristallisiert [34, 43-47].

#### 1.4. Nachweismethoden von uPA / PAI-1

Die Bestimmung von uPA und PAI-1 erfolgt mittels eines kommerziell erhältlichen, standardisierten und qualitätskontrollierten ELISA im Tumorgewebeextrakt, d.h. an frischem oder unmittelbar nach der Operation in Stickstoff oder bei -80 °C tiefgefrorenem Tumorgewebe. Eine repräsentative Gewebemenge, die mengenmäßig etwa einer Stanzbiopsie (ca. 25 mg) oder einem 90 µm Kryoschnitt entspricht, ist für die ELISA- Messung technisch ausreichend. Klinisch relevante Daten durch immunhistochemische Bestimmung von uPA/PAI-1, liegen derzeit nicht vor. Ein Grund hierfür ist sicherlich die heterogene Expression von uPA und PAI-1 auf Tumor- und Stromazellen. Dieses heterogene Expressionsmuster wird durch die biochemische ELISA-Bestimmungsmethode standardisierbar und reproduzierbar quantifiziert.

Die immunhistochemische Bestimmung an Paraffinmaterial ist nicht standardisiert, da die heterogene Anfärbung im Gewebe nicht reproduzierbar beurteilt werden kann. Neue molekularbiologische Bestimmungsmethoden

---

werden derzeit evaluiert. Eine Ableitung klinischer Konsequenzen aus immunhistochemischen oder molekularbiologischen uPA, bzw. PAI-1 Bestimmungen ist nicht evidenzbasiert und daher nicht zulässig.

### 1.5. Zielsetzung der Arbeit

In verschiedenen Studien wurden uPA und PAI-1 bereits als neue Prognosefaktoren für maligne Tumoren beschrieben. In dieser Arbeit soll ihre Aussagekraft in Bezug auf das rezidivfreie Überleben, sowie das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit primärem nodalnegativem Mammakarzinom überprüft werden. Außerdem wird ihre Korrelation mit etablierten Prognosefaktoren, sowie adjuvanter Hormon- und Chemotherapie untersucht.



## 2. Material und Methoden

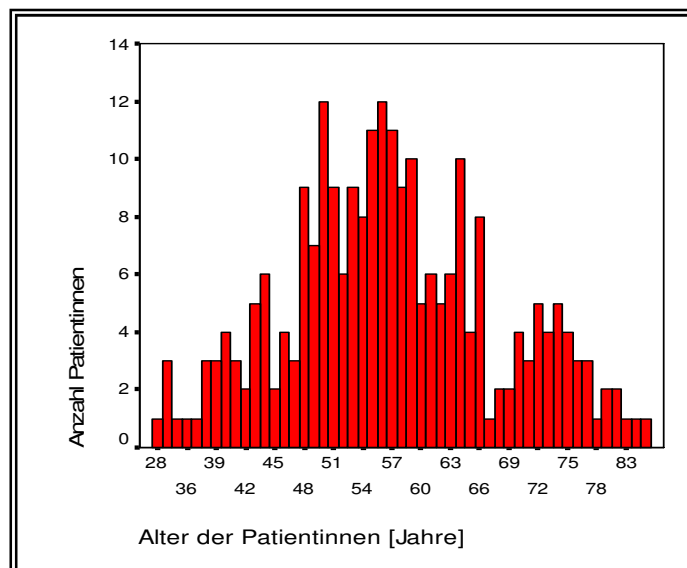
---

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Patientenakten

Von 243 Patientinnen, die im Zeitraum zwischen März 1991 und Juni 1999 an einem primären Brustkrebstumor in der Frauenklinik des UKE operiert worden sind, wurden die Akten ermittelt und zur Auswertung aus dem Archiv angefordert. Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 28 und 88 Jahren. Der Altersdurchschnitt lag mit 57 Jahren nur wenig über dem Median von 56 Jahren.

In der Abbildung ist die Altersverteilung des gesamten Kollektivs dargestellt (vgl. Diagramm 1).



**Diagramm 1:** Altersverteilung der Patientinnen im Kollektiv

---

### 2.1.2. uPA / PAI-1 Tumorgewebe

Das Tumorgewebe stammte von 243 Patientinnen, welche im Zeitraum von Januar 1997 bis Oktober 2001 in der Universitätsfrauenklinik Hamburg wegen eines primären Mammakarzinoms operiert wurden. Bei allen Geweben erfolgte die Probenaufarbeitung nach gleichen Kriterien, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Patientinnen mit Brustkrebs wurden entweder brusterhaltend (n=163) oder durch modifizierte radikale Mastektomie (n=80) operiert. In jedem Fall erfolgte die axilläre Lymphonodektomie, wobei im Median 16 (0-30) Lymphknoten entnommen wurden. Bei allen 243 in die Untersuchung eingeschlossenen Fällen waren die axillären Lymphknoten tumorfrei. In keinem Fall kam es innerhalb der ersten 12 Monate zu einem axillären Tumorrezidiv. Alle Primärdaten beziehen sich auf den Zeitpunkt der Operation.

### 2.1.3. ELISA Test- Kits und Gerätschaften

Die uPA / PAI-1 ELISA –Kits stammten von der Firma american diagnostica GmbH in Pfungstadt, Deutschland (Femtelle uPA/PAI-1 Test REF 899, american diagnostica inc. Starnford, Connecticut USA). Die Reagenzien zur Proteinbestimmung stammten von der Firma Biorad. Die übrigen Reagenzien und Lösungsmittel wurden von der Firma Merck in Darmstadt bezogen.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Datenerhebung und Follow-up

#### A) Aktenauswertung

Die Auswertung setzte sich wie folgt zusammen :

- Name der Patientin
- Anschrift und Telefonnummer
- Geburtsdatum
- Operationsdatum
- Operationsart
- Lymphknotenbefall
- Tumorgröße
- Grading
- Nummer des histologischen Berichtes
- falls vorhanden die uPA / PAI-1 Konzentrationen
- und die Anschrift des weiterbehandelnden niedergelassenen Arztes

Diese Angaben wurden zur weiteren Bearbeitung aufgenommen und in tabellarischer Form festgehalten. Dabei wurden ausschließlich Akten von Patientinnen mit negativem Lymphknotenbefall untersucht, und ebenfalls keine Akten männlicher Patienten berücksichtigt.

#### B) Arztanschriften / Befragung

Die jeweiligen angegebenen Ärzte wurden mit einem Brief kontaktiert, in dem sie eine allgemeine Erklärung des Anliegens, sowie einen Fragebogen mit dem Namen der jeweiligen Patientin erhielten. Auf diesem Fragebogen wurde nach

dem letzten Kontakt zur Patientin, aufgetretenen Metastasierungen, neuen Operationen in Bezug zur Primärerkrankung, sowie veränderten postoperativen Medikationen oder Behandlungsweisen gefragt. Der Fragebogen selbst konnte dann an eine spezielle Faxnummer zurückgesendet werden und konnte so in die Auswertung des Follow-Ups für die jeweilige Patientin mit einbezogen werden. Es wurden 200 Patienten-Fragebögen an ca. 120 Ärzte versandt, von denen jedoch nur ca. 70 % ausgefüllt in die Auswertung miteinbezogen werden konnten.

Der restliche Anteil war durch nur einmaligen oder zu weit zurückliegenden Kontakt des Arztes mit der Patientin nicht auswertbar.

### C) Patientenanschreiben

Durch die aus den Akten ermittelten Anschriften der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation, konnte an diejenigen Patientinnen, über die noch nicht ausreichende Informationen zum Follow-Up vorlagen, ein direktes Anschreiben gerichtet werden. Dabei war der Brief wieder in einen allgemeinen erklärenden Abschnitt und in einen Fragebogen unterteilt. Auf dem die Patientinnen ihren letzten Besuch beim Frauenarzt, sowie die Anschrift ihres jetzigen Frauenarztes und eventuell neu aufgetretene Ereignisse in Bezug auf ihre Primärerkrankung (wie Metastasierungen, neue Operationen, neue Medikationen, oder neue Behandlungsstrategien) angeben sollten.

Die Rücksendung des Fragebogens wurde mittels eines beigefügten frankierten Rückumschlags ermöglicht, wobei die Erfolgsrate dieser Methode ebenfalls bei ca. 70% lag, da einige Patientinnen unter der damaligen angegebenen Adresse nicht mehr zu erreichen waren.

---

D) Patienten- Hinterbliebenenbefragung

Als letzte Möglichkeit zur Erstellung des Follow-Ups für die Patientinnen wurden die in den Akten angegebenen, bzw. durch Nutzung anderer Informationsquellen, wie Internet, erhaltenen Telefonnummern angerufen. Um die Patienten direkt über ihr derzeitiges Befinden und ihren jetzigen Frauenarzt, neu aufgetretene Erkrankungen in Verbindung mit ihrer Primärerkrankung oder neue Medikationen bzw. Behandlungsstrategien zu befragen.

Konnten nur die Hinterbliebenen erreicht werden, wurde sich auf das Eintreten des Todes mit Zeitpunkt und Ursache beschränkt. Es konnte jedoch auch hier nicht bei allen Patienten ein erfolgreiches Follow-Up erstellt werden, da sich Telefonnummern als nicht mehr gültig erwiesen oder Hinterbliebene keine Aussagen zu machen wünschten.

Die Responserate aller Formen der Befragung stellt in tabellarisch übersichtlicher Form noch einmal die Tabelle 2 dar.

	Anzahl	Erfolgsrate	
Ausgewählte Akten	250	100 %	
Follow-Up	Arztanschreiben	120	48 %
	Patientenanschreiben	113	45,2 %
	Telefonbefragung	10	4 %
Insgesamt	243	97,2 %	
Fehlend	7	2,8 %	

**Tab. 2:** Überblick über die Rücklaufquoten der angewandten Follow-Up Methoden

---

### 2.2.2. Bestimmung von uPA / PAI-1

#### Prinzip der Messung

Der American Diagnostica Femtelle Test basiert auf einem hoch spezifischen monoklonalen Maus Fängerantikörper, der entweder gegen humanes uPA oder humanes PAI-1 gerichtet ist. Er erkennt dabei verschiedene Formen von uPA, wie hochmolekulares (HMW) uPA, uPA komplexiert mit PAI-1 oder PAI-2, sowie latente und aktive Formen von PAI-1.

Für die Messung wurden die Tumorgewebeextrakte mit bekannter Gesamtproteinkonzentration über Nacht in den mit uPA oder PAI-1 Fängerantikörper beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterstreifen inkubiert. Nach dem Waschen wurde nun ein biotinylierter Detektionsantikörper, der entweder gegen humanes uPA oder humanes PAI-1 gerichtet ist, zugesetzt. Dieser wurde wiederum nach kurzer Inkubationszeit durch ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP) Konjugat nachgewiesen. Danach gab man als Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Perborat (TMB) hinzu, welches durch die HRP umgesetzt wurde und so zu einer Blaufärbung führte. Durch Zugabe von Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und die Färbung schlug von blau nach gelb um. Nun konnten die uPA und PAI-1 Konzentrationen durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm anhand der miterstellten Standardkurve abgelesen werden.

---

Material und Lösungen

- anti-human uPA IgG und anti-human PAI-1 IgG beschichtete Mikrotiterplatten
- uPA/PAI-1 Standards mit in ng/ml kalibriertem hochreinem uPA/PAI-1
- Detektionsantikörper: biotinyliertes anti-human uPA (lyophilisiert), biotinyliertes anti-human PAI-1 (lyophilisiert)
- uPA Enzym Konjugat, Streptavidin-HRP (60 µl)
- PAI-1 Enzym Konjugat, Streptavidin-HRP (60 µl)
- Enzymkonjugat Verdünner (lyophilisiert)
- PBS Puffer (PBS), pH 7.4
- 25% Triton X-100 (12 ml) Detergenz
- Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 8.5 (lyophilisiert)
- Peroxidase Substrat (TMB) (11 ml)
- 0,22µm gefiltertes deionisiertes H<sub>2</sub>O (1 l)
- 0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Pipetten: 2-20 µl, 20-200 µl und 200-1000 µl mit auswechselbaren Pipettenspitzen
- Präzisions-Multipipetten
- Reagenzgläser zur Probenverarbeitung
- Photometer für Mikrotiterplatten mit einer Wellenlänge von 450 nm
- Kryogefäße – 1 ml
- Flüssiger Stickstoff
- Mikro-Dismembrator
- Ultrazentrifuge mit Rotor
- Schüttler für Reaktionsgefäße und Mikrotiterplatten

---

Vorbereitung der Reagenzien des Assays

Zur Vorbereitung der uPA und PAI-1 Standards wird je 1 ml gefiltertes deionisiertes Wasser in die 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 und 1.0 ng/ml uPA Standard Fläschchen gegeben ,sowie 2 ml gefiltertes deionisiertes Wasser in die 0.0 ng/ml uPA Standard Fläschchen. Ebenso verfährt man bei den 1.0, 2.5, 5.0 und 10 ng/ml PAI-1 Standard Fläschchen. Alle Standards werden dann vorsichtig für 3 Minuten gemischt.

Die uPA und PAI-1 Detektionsantikörper Fläschchen werden mit 5.5 ml gefiltertem deionisierten Wasser aufgefüllt und ebenfalls 3 Minuten gemischt.

Zu dem Enzymkonjugat Verdünner wird 20 ml des gefilterten deionisierten Wassers hinzugegeben und gut durchgemischt.

Der Waschpuffer wird durch Lösen einer Packung PBS in 900 ml gefiltertem deionisierten Wassers unter Zugabe von 4 ml des 25% Triton X-100 Detergenz und anschließendem Auffüllen mit weiterem gefilterten deionisierten Wasser auf 1 Liter erstellt.

Für die Vorbereitung des Proben Puffers wird BSA zum Waschpuffer in einer Endkonzentration von 1% w/v zugegeben.

Um das 10%ige Triton X-100 für die Gewebeextraktion zu erhalten werden 4 ml des 25%igen Triton X-100 mit 6 ml gefiltertem deionisierten Wasser gemischt.

Zur Vorbereitung der Tris gepufferten Salzlösung (TBS) mit pH 8.5 wird eine Packung TBS in 900 ml gefiltertem deionisierten Wasser gelöst und nach Auffüllung zu 1 Liter mit weiterem gefilterten deionisierten Wasser gut durchmischt.



---

### Durchführung

Die uPA/PAI-1 ELISA Testdurchführung mit Femtelle gliedert sich in zwei Tage. Am ersten Tag werden die Mikrotiterstreifen in benötigter Menge in den Halter eingelegt und mit je 100 µl der rekonstituierten uPA bzw. PAI-1 Standards, Kontrollen und verdünnten Gewebeextrakt Proben in den mit uPA bzw. PAI-1 Antikörpern beschichteten Vertiefungen versehen. Dabei werden immer Doppelbestimmungen durchgeführt die sich in folgendem Schema wiedergeben.

	1	2
A	S1	S1
B	S2	S2
C	S3	S3
D	S4	S4
E	S5	S5
F	S6	S6
G	P1	P1
H	K1	K1

**Tab. 3:** Schema zur empfohlenen Verteilung der Proben (S= Standard; P= gewebeextrakt Probe; K= Kontrolle)

Nach dem Beschichten werden die Mikrotiterstreifen abgedeckt und bei +4°C in feuchter Kammer inkubiert.

Am zweiten Tag wird der Inhalt aus den Mikrotiterstreifen verworfen und je 4x mit Waschpuffer gewaschen. Es werden je 100 µl Detektionsantikörper in die uPA bzw. PAI-1 beschichteten Vertiefungen gegeben und wiederum nach Abdeckung 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Verwerfen des Inhaltes und viermaligem Waschen mit Waschpuffer werden 2 µl des uPA bzw. PAI-1 Enzymkonjugates in 2 ml des uPA bzw. PAI-1 Enzymkonjugat Verdünners gegeben (pro Mikrotiterstreifen) und je 100 µl des verdünnten Enzymkonjugates in die entsprechenden

Vertiefungen pipettiert. Nach erneutem Abdecken und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur werden die Inhalte verworfen und vier mal mit Waschpuffer gewaschen. Nun wird 100 µl TMB Substratlösung in die Vertiefungen gegeben und unter Abdeckung bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Es kommt zu einer Reaktion mit blauer Farbentwicklung, die durch Zugabe von je 50 µl 0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt wird und zu einem gelben Farbumschlag führt. Jetzt wird innerhalb von 30 Minuten die Messung der Extinktionswerte der Mikrotiterstreifen bei 450 nm in einem ELISA-Reader (Titertek Multiskan MK II von Labsystems, Finnland) vorgenommen und eingetragen.

#### Zusammenfassung des Verfahrens

Arbeitsschritte	Inkubation
1. Zugabe der Standards, Kontrollen und Proben in die Mikrotiterstreifen	min. 20 Std. bei 4°C
2. 4x Waschen	1 Std. bei RT
3. Zugabe des Detektionsantikörpers in die Vertiefungen	1 Std. bei RT
4. 4x Waschen	1 Std. bei RT
5. Zugabe des Konjugates in die Vertiefungen	20 Min. bei RT
6. 4x Waschen	20 Min. bei RT
7. Zugabe von Substratlösung in die Vertiefungen	
8. Zugabe der Stopplösung in die Vertiefungen	
9. Lesen der Platte bei 450 nm	

RT=Raumtemperatur 20-25°C

**Tab. 4:** Zusammenfassende Darstellung aller Arbeitsschritte

---

Auswertung

Bezugspunkt für die Messwerte der Patientinnenproben ist eine Kurve, die anhand der Koordination der Standardmesswerte erstellt wird. Hierbei wurden die jeweils gemessenen Mittelwerte der sechs Einzel-Extinktionen ( $E=450\text{nm}$ ) auf der Y-Achse gegen die entsprechenden sechs Konzentrationen mit genau definiertem uPA/PAI-1 Gehalt ( $\text{ng/ml}$ ) auf der x-Achse aufgetragen.

Es ergab sich eine annähernd lineare Standardkurve. Über die gemittelte Extinktion der Kontrollen und Proben ist es möglich, die Konzentrationen derselbigen direkt durch Computerberechnung (Programm Magellan von Tecan, Deutschland) abzuleiten. Anschließend wurde überprüft, ob die bestimmten Werte für die Kontrollen im angegebenen Referenzbereich lagen. Bei Abweichen der doppelt gemessenen Werte voneinander um mehr als 10 Prozent musste dieser Wert im nächsten Versuch neu ermittelt werden.

Falls die Konzentration der gemessenen Probe über dem Referenzbereich lag, musste die Probe in weiteren Verdünnungsschritten bestimmt werden.

Als weitere Verdünnungsschritte wurden gewählt:

1:100 / 1:200 / 1:400 / 1:800 / 1:1600

Die gemessenen Konzentrationen mussten dann jeweils mit dem entsprechenden Faktor multipliziert werden : 2 / 4 / 8 / 16 / 32

### 2.2.3. Gewebeaufbereitung

Das Gewebe wurde unmittelbar nach der operativen Entnahme in das pathologische Labor gebracht, wo die Schnellschnittbegutachtung erfolgte. Das für die Untersuchung benötigte Gewebe wurde vom Pathologen aus dem Tumor

herauspräpariert, von umgebendem Fettgewebe befreit und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Tumoraufbereitung wurden 100- 300 mg des eingefrorenen Gewebes abgewogen und in einem Mikrodismembrator mittels einer Wolframkugel im vorgekühlten Teflon- Gefäß 30 Sekunden bei 2000 U dismembriert. Das pulverisierte Gewebe wurde anschließend in 1.8 ml 1:10 verdünntem TBS-Puffer und 0.2 ml 10%igem Triton X-100 resuspendiert, um eine 1%ige Triton-X Lösung zu erhalten. Anschließend wurde diese Lösung über Nacht in einem Schüttler bewegt. Die Abtrennung der Kernbestandteile erfolgte in einer Ultrazentrifuge für 1 Stunde bei 25.000 Umdrehungen und 4°C. Das im Überstand enthaltene Tumorzytosol wurde danach durch eine Gaze filtriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 2.2.4. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bio-Rad-Methode. Die Zytosole wurden hierzu 1:20 mit BCA-Puffer [49,5ml TBS-Puffer und 0,5ml 10% Triton X-100] vorverdünnt und anschließend wurden 50µl in Mikrotiterplatten pipettiert und mit je 200µl Farbreagenz von Pierce über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei musste beachtet werden, das Triton X-100 andere Proteinbestimmungs-Tests stört und nur der BCA Protein Assay von Pierce zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben empfohlen wird. Die Messung und Auswertung erfolgte im ELISA-Reader bei 540nm mit dem Computerprogramm Magellan der Firma Tecan.

---

### 2.2.5. Bestimmung der Hormonrezeptoren

Die Bestimmung des Steroidhormonrezeptor-Status erfolgte durch Auswertung der Akten der Patientinnen.

### 2.2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller gesammelten Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows im Release 11.0.1 der Firma SPSS Inc., 1989-2001 in Zusammenarbeit mit LEADTOOLS ©1991-2000, der Firma LEAD Technologies, Inc.

Mit Hilfe dieses Programms konnte der Zusammenhang zwischen uPA, bzw. PAI-1 mit anderen Prognosefaktoren anhand des Chi- Quadrat- Testes ermittelt werden.

### 2.2.7. Festlegung der optimalen Cut-Off- Werte

Um die prognostische Bedeutung von uPA und PAI-1 untersuchen zu können, bedarf es eines sinnvollen Cut-Off- Wertes, welcher es ermöglicht, zwischen einer Gruppe von Patientinnen mit erhöhten Werten und einer Gruppe mit niedrigen Werten zu unterscheiden. Die Gruppe von Patientinnen, welche einen erhöhten Gehalt an uPA und/oder PAI-1 im Tumorzytosol aufweisen und dadurch eine signifikant geringere Heilungswahrscheinlichkeit, bzw. ein erhöhtes Metastasierungsrisiko und ein verkürztes Gesamtüberleben, sowie einen signifikant größeren Nutzen von einer adjuvanten Chemotherapie hätten;

.....  
stehen dabei den Patientinnen mit niedrigem Gehalt an uPA/PAI-1 gegenüber, welche nach 5 Jahren eine 96%ige Überlebenschance haben. Während Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1 Gehalt nur zu etwa 88% die ersten 5 Jahre überleben. Dabei hat sich in einer großen multizentrisch prospektiv randomisierten Therapiestudie „Chemo-N0“ gezeigt, dass zur Unterscheidung zwischen guter und schlechter Prognose der Cut-Off- Wert für uPA mit 3 ng/μg Protein im Tumorzytosol festzulegen wäre und der Cut-Off-Wert für PAI-1 bei 14 ng/μg Protein im Tumorzytosol anzusetzen ist [31, 32, 48].

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.1. Datenüberblick

Von den ursprünglich ausgewählten 250 Patientinnen konnten nur 243 in die Untersuchungen mit einbezogen werden, da zu 7 Patientinnen trotz intensiver Recherche kein Follow-Up erstellt werden konnte. In 143 Fällen wurde eine adjuvante Hormontherapie und in 54 Fällen eine adjuvante Chemotherapie, teilweise auch eine doppelte Therapie veranlasst. 60 Patientinnen erhielten keine adjuvante Therapie. Die mediane Nachbeobachtungszeit beträgt 86 Monate. Von den 243 in die Untersuchung eingeschlossenen Patientinnen erlitten 50 Patientinnen ein Rezidiv. Es verstarben insgesamt 43 Patientinnen.

Den Datenüberblick der aufgenommenen Daten zu den 243 in die Untersuchung einbezogenen Patientinnen und ihre entsprechenden Werte gibt Tabelle 5 noch einmal zusammenfassend wieder.

		Anzahl	Prozentualer Anteil (jew. am Gesamtkollektiv)
Alter	□ 50 Jahre	70	28,8 %
	> 50 Jahre	173	71,2 %
Operationsart	Ablatio	80	32,9 %
	BET	163	67,1 %
Tumorgroße	< 2 cm	82	33,7 %
	2-5 cm	153	63,0 %
	> 5 cm	6	2,5 %

	Mit Befall der Haut, bzw. Muskulatur	2	0,8 %
Grading	Nicht bestimmt	8	3,2 %
	G I (Gut differenziert)	48	19,8 %
	G II (Mittel differenziert)	106	43,6 %
	G III (Undifferenziert)	81	33,3 %
Östrogenrezeptorstatus	Positiv	189	77,8 %
	Negativ	54	22,2 %
Progesteronrezeptorstatus	Positiv	191	78,6 %
	Negativ	52	21,4 %
Adj. Hormontherapie	Keine	100	41,2 %
	Tamoxifen	136	56,0 %
	Zoladex	7	2,9 %
Adj. Chemotherapie	Keine	189	77,8 %
	CMF	49	20,2 %
	4xEC	4	1,6 %
	FEC/FAC	1	0,4 %
Rezidivstatus	Kein Rezidiv	193	79,4 %
	Rezidiv	50	20,6 %
Vitalstatus	Lebend	200	82,3 %
	Verstorben	43	17,7 %
Insgesamt		243	100 %

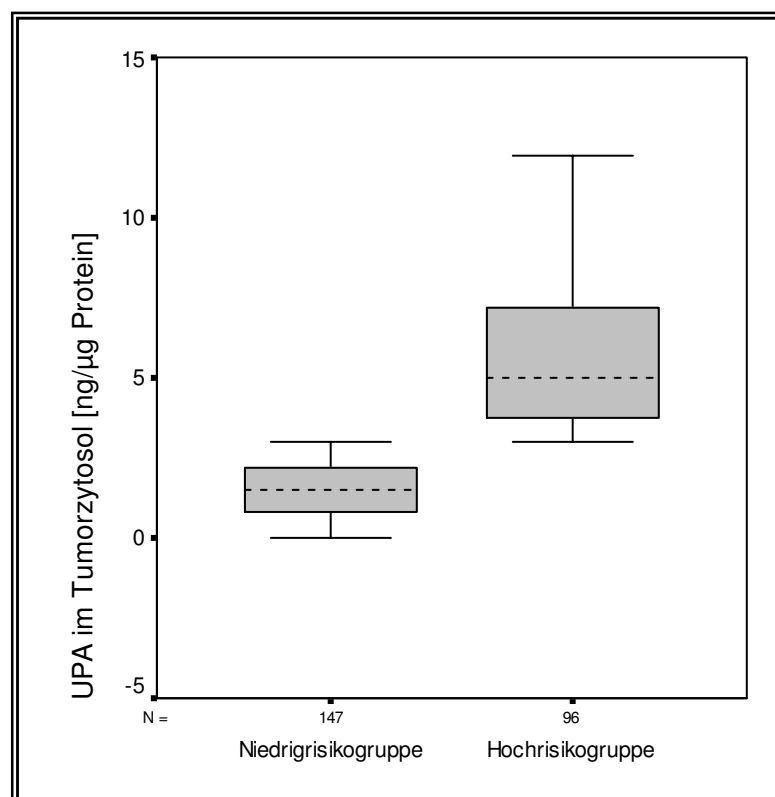
**Tab. 5:** Gesamtübersicht der erfassten Follow-Up Daten



### 3.2. Untersuchungen zu uPA

#### 3.2.1. Darstellung der uPA- Konzentrationen im Tumorzytosol der Patientinnen

Die uPA- Konzentrationen in dem untersuchten Kollektiv (n=243) lagen zwischen 0,03 und 22,90 ng/ $\mu$ g Protein. Mit dem festgelegten Cut-Off Wert von 3 ng/ $\mu$ g Protein für uPA ergab sich ein Median von 1,48 ng/ $\mu$ g Protein für die Patientinnen mit uPA- Werten unter dem Cut-Off und ein Median von 4,98 ng/ $\mu$ g Protein in der Gruppe von Patientinnen mit uPA- Werten über dem Cut-Off (Diagramm 1).



**Diagramm 1:** Box-Plot Darstellung der Konzentrationen von uPA der Patientinnen im Kollektiv

## 3.2.2. Zusammenhang zwischen uPA und etablierten Prognosefaktoren

## A) Korrelation von uPA und der Tumorgröße

Bei dem Vergleich zwischen den uPA Konzentrationen im Tumorzytosol und der Tumorgröße der Patientinnen ergibt sich in diesem Kollektiv kein Hinweis auf eine signifikante Beziehung ( $p=0,2$ ) (Tabelle 6).

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA > 3 ng/ $\mu$ g (Prozent)	Patientinnen mit uPA $\leq$ 3 ng/ $\mu$ g (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Tumorgröße				
Stadium pT 1+2	82	27 (32,9%)	55 (67,1%)	p=0,2
Stadium pT 3+4	161	69 (42,9%)	92 (57,1%)	
Gesamt	243	96 (39,5%)	147 (60,5%)	

**Tab. 6:** Kreuztabelle zwischen Tumorgröße und Patientinnengruppen von uPA

## B) Korrelation von uPA mit dem Tumorgrading

Es konnte in diesem Kollektiv ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen den uPA-Tumorzytosolkonzentrationen und dem Tumor Grading gezeigt werden. So gibt es eine annähernd gleiche Verteilung der Patientinnen mit Tumor Grading 3 in beiden Gruppen und für ein Tumor Grading 1 und 2 zeigt sich ein leicht erhöhter Anteil bei den Patientinnen mit niedrigen uPA- Werten (vgl. Tabelle 7).

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA > 3 ng/μg (Prozent)	Patientinnen mit uPA ≤ 3 ng/μg (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Grading				
nicht bestimmt	8	4 (50%)	4 (50%)	
Tumor Grad 1+2	154	55 (35,7%)	99 (64,3%)	
Tumor Grad 3	81	39 (48,1%)	42 (51,9%)	p=0,27
Gesamt	243	96 (39,5%)	147 (60,5%)	

**Tab. 7:** Kreuztabelle zwischen Tumor- Grading und Patientinnengruppen von uPA

## C) Korrelation von uPA und dem Patientenalter

Die Tabelle 8 zeigt, dass es in diesem Kollektiv keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Patientenalter und der Konzentration von uPA im Tumorzytosol gibt. In beiden Altersgruppen weisen 40% der Patientinnen erhöhte uPA- Werte auf..

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA > 3 ng/μg (Prozent)	Patientinnen mit uPA ≤ 3 ng/μg (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Alter				
unter 50 Jahre	70	28 (40%)	42 (60%)	p=0,52
ab 50 Jahre	173	68 (39,3%)	105 (60,7%)	
Gesamt	243	96 (39,5%)	147 (60,5%)	

**Tab. 8:** Kreuztabelle zwischen Alter der Patientinnen und Patientinnengruppen von uPA

## D) Korrelationen zwischen uPA und dem Hormonrezeptorstatus

Der Hormonrezeptorstatus wurde im Kollektiv jeweils in Progesteron- und Östrogenrezeptorstatus unterschieden. Tabelle 9 gibt die nicht signifikanten Korrelationen zwischen uPA- Konzentration im Tumorzytosol und dem Progesteronrezeptorstatus des Kollektivs wieder, wobei ein Großteil der Patientinnen einen positiven Rezeptorstatus hat und zur Gruppe der Patientinnen mit niedrigen uPA-Werten gehört. In Tabelle 10 ergibt sich die nicht signifikante Korrelation zwischen dem Östrogenrezeptorstatus und der uPA-Konzentration im Tumorzytosol des Kollektivs, wobei die Verteilung hier ganz ähnlich der des Progesteron-Rezeptorstatus ist und ein Großteil der Patientinnen östrogenrezeptorpositiv ist und ebenfalls der Gruppe Patientinnen mit niedrigen uPA-Werten angehört.

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA > 3 ng/μg (Prozent)	Patientinnen mit uPA ≤ 3 ng/μg (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Progesteronrezeptor negativ	52	25 (48,1%)	27 (51,9%)	p=0,1
positiv	191	71 (37,2%)	120 (62,8%)	
Gesamt	243	96 (39,5%)	147 (60,5%)	

**Tab. 9:** Kreuztabelle zwischen Progesteronrezeptorstatus und Patientinnengruppen von uPA

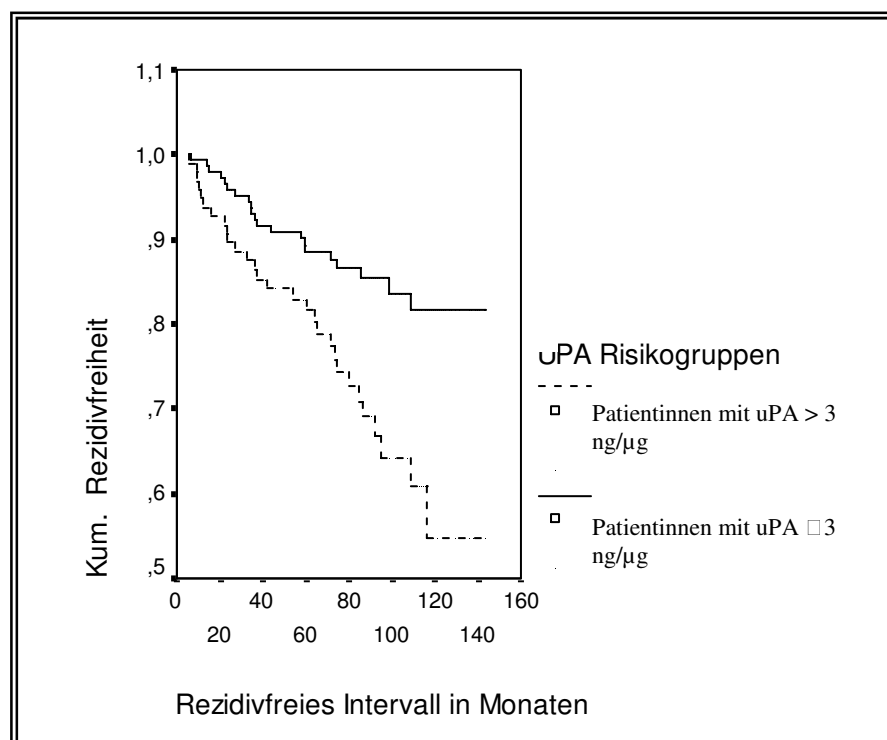
	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA > 3 ng/μg (Prozent)	Patientinnen mit uPA ≤ 3 ng/μg (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Östrogenrezeptor				
negativ	54	25 (46,3%)	29 (53,7%)	p=0,16
positiv	189	71 (37,6%)	118 (62,4%)	
Gesamt	243	96 (39,5%)	147 (60,5%)	

**Tab. 10:** Kreuztabelle zwischen Östrogenrezeptorstatus und Patientinnengruppen von uPA

### 3.2.3. Korrelation von uPA zum rezidivfreien und Gesamtüberleben

#### A) Rezidivfreies Intervall

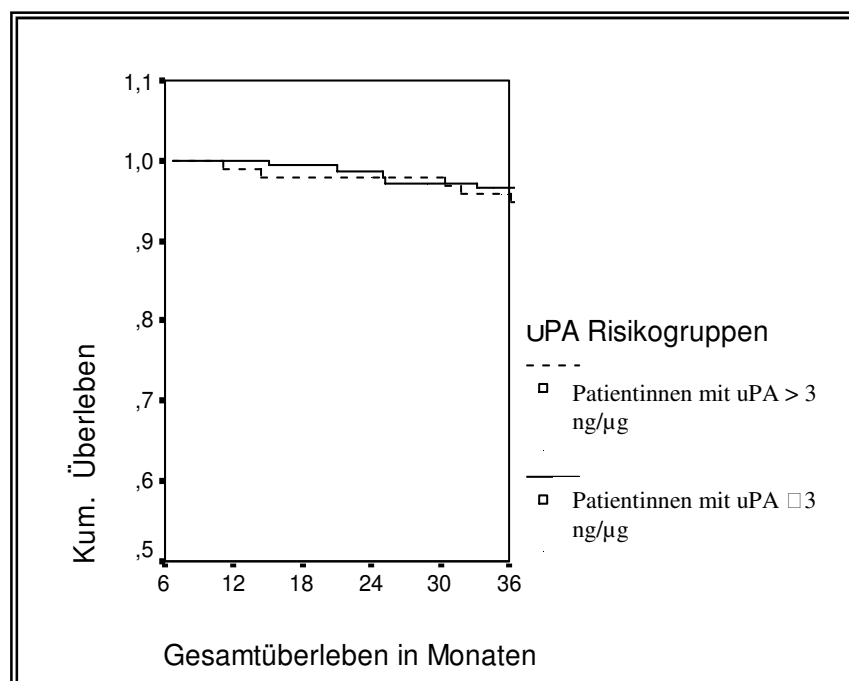
Es zeigt sich bei der Betrachtung der Kaplan- Meier Kurven des rezidivfreien Intervalls der beiden Patientinnengruppen des uPA ein signifikant verkürztes rezidivfreies Intervall für Patientinnen mit erhöhten uPA- Werten ( $p=0,012$  nach Log-Rank Test) (Diagramm 2). Nach einem Betrachtungszeitraum von ca. 10 Jahren sind nur noch 55% der Patientinnen mit erhöhten uPA- Werten rezidivfrei (kumulierte Rezidivfreiheit von 0,55) im Gegensatz zu mehr als 80% der Patientinnen mit niedrigen uPA- Werten.



**Diagramm 2:** Kaplan-Meier Kurve zum rezidivfreien Intervall der uPA Patientinnengruppen

### B) Korrelation von uPA zum Überleben nach 3 Jahren

Nach 3 Jahren zeigt sich in der Kaplan- Meier Kurve kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der Gruppe von Patientinnen mit uPA- Werten über dem Cut-Off zu denen der Gruppe mit uPA- Werten unter oder gleich dem Cut-Off (Diagramm 3). So enden beide Kurven mit einer Überlebenschance von 98% bzw. 97% nach 3 Jahren.

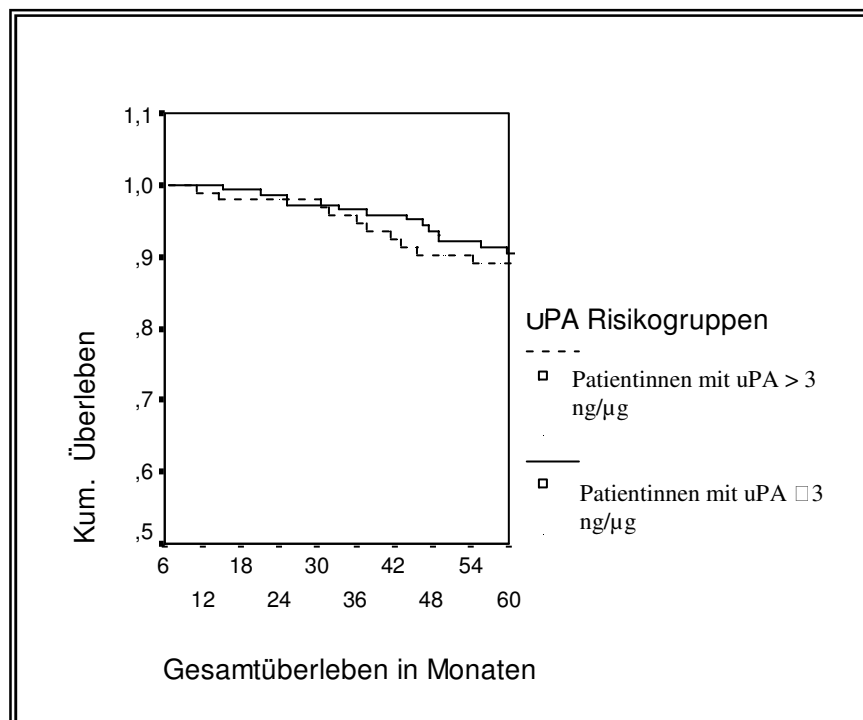


**Diagramm 3:** Kaplan-Meier Kurve zum Überleben der uPA Patientinnengruppen nach 3 Jahren



## C) Korrelation von uPA zum Überleben nach 5 Jahren

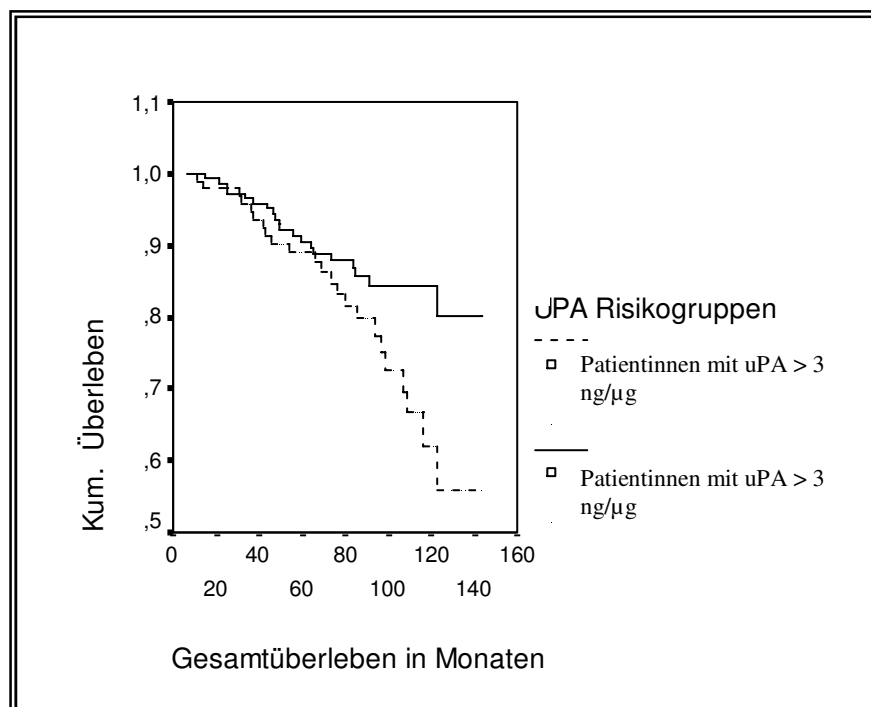
Über einen Betrachtungszeitraum von 5 Jahren zeigt sich jedoch schon ein Absinken der Kurve für die Patientinnen mit erhöhten uPA- Werten. Sie haben nur noch eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 89% gegenüber den Patientinnen mit niedrigen uPA- Werten die nach 5 Jahren eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 91% besitzen (Diagramm 4).



**Diagramm 4:** Kaplan-Meier Kurve zum Überleben der uPA Patientinnengruppen nach 5 Jahren

## D) Korrelation von uPA zum Gesamtüberleben nach 12 Jahren

Nach einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren (60 Monaten) zeigt sich eine deutlich erhöhte Sterblichkeit der Patientinnen mit uPA- Werten über  $3\text{ng}/\mu\text{g}$  im Tumorzytosol gegenüber den Patientinnen mit uPA-Werten kleiner oder gleich  $3\text{ng}/\mu\text{g}$  im Tumorzytosol. Über den Gesamtverlauf der Studie betrachtet, mit einer maximalen Nachbeobachtungszeit von 11,84 Jahren, zeigt sich ein signifikant schlechteres Überleben für die Patientinnen mit erhöhten uPA-Werten ( $p=0,03$ , Log-Rank Test) (vgl. Diagramm 5).

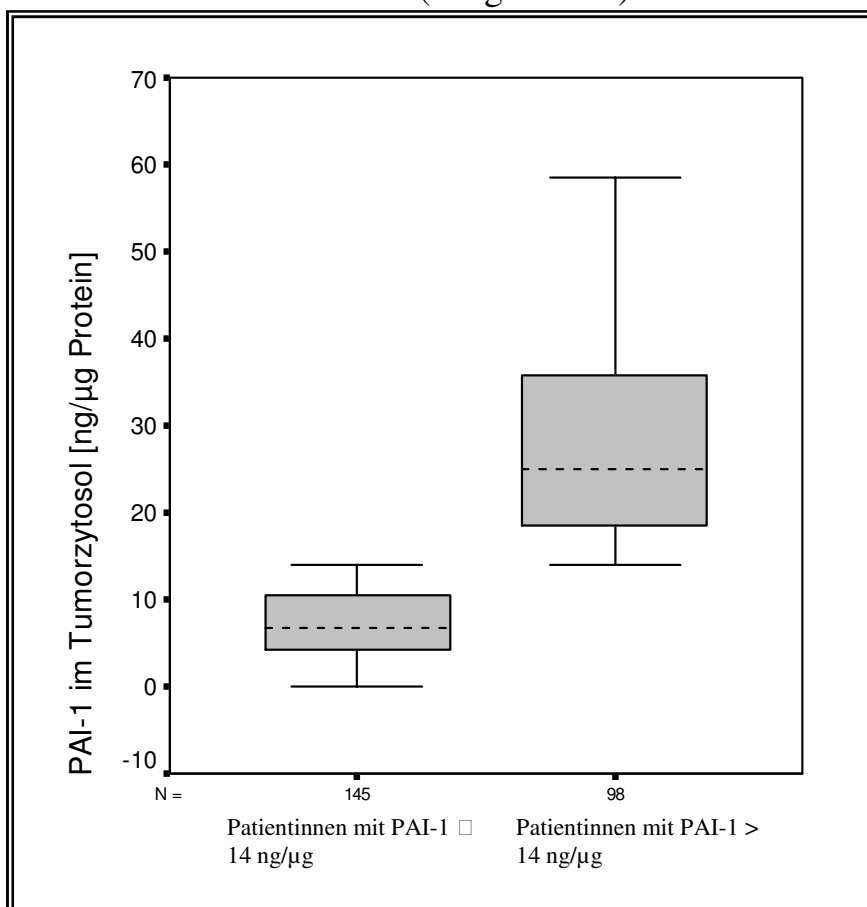


**Diagramm 5:** Kaplan-Meier Kurve zum Gesamtüberleben der uPA Patientinnengruppen innerhalb der Studie

### 3.3. Untersuchungen zu PAI-1

#### 3.3.1. Darstellung der PAI-1- Konzentrationen im Tumorzytosol der Patientinnen

Die PAI-1- Konzentrationen im Tumorzytosol des untersuchten Kollektivs (n=243) lagen zwischen 0,02 und 142,45 ng/ $\mu$ g Protein (als Extrem). Bei dem festgesetzten Cut-Off Wert von 14 ng/ $\mu$ g Protein ergab sich für die Gruppe von Patientinnen mit PAI-1- Werten unter dem Cut-Off ein Median von 6,66 ng/ $\mu$ g Protein und ein Median von 25,02 ng/ $\mu$ g Protein in der Gruppe von Patientinnen mit PAI-1- Werten über dem Cut-Off (Diagramm 6).



**Diagramm 6:** Box-Plot Darstellung der Konzentrationen von PAI-1 in den Patientinnengruppen

### 3.3.2. Zusammenhang zwischen PAI-1 und etablierten Prognosefaktoren

#### A) Korrelation von PAI-1 mit der Tumorgröße

Die Konzentrationen des PAI-1 im Tumorzytosol der Patientinnen des Kollektivs zeigten eine signifikante Korrelation von  $p=0,02$  (nach Fischer). Patientinnen mit der Tumorgröße pT 3 und 4 zeigen dabei höhere PAI-1-Konzentrationen (im Median 20,92 ng/ $\mu$ g Protein) als Patientinnen mit den Stadien pT 1 und 2 (Konzentration im Median 12,42 ng/ $\mu$ g Protein) (vgl. Tabelle 11).

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit PAI-1 > 14 ng/ $\mu$ g (Prozent)	Patientinnen mit PAI-1 $\leq$ 14 ng/ $\mu$ g (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Tumorgröße				
Stadium pT 1+2	82	22 (26,8%)	60 (73,2%)	p=0,02
Stadium pT 3+4	161	76 (47,2%)	85 (52,8%)	
Gesamt	243	98 (40,3%)	145 (59,7%)	

**Tab. 11:** Kreuztabelle zwischen Tumorgröße und Patientinnengruppen von PAI-1

## B) Korrelation von PAI-1 mit dem Tumorgrading

Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen PAI-1- Werten und Grading ( $p=0,043$ ). Die Patientinnen mit undifferenzierten Tumoren (Grading 3) haben mit einem Median von 15,15 ng/ $\mu$ g Protein höhere PAI-1- Werte als Patientinnen mit differenzierteren Tumoren (Grading 1 und 2), die einen Median von 10,0 ng/ $\mu$ g Protein aufzeigen (Tabelle 12).

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit PAI-1 > 14 ng/ $\mu$ g (Prozent)	Patientinnen mit PAI-1 $\leq$ 14 ng/ $\mu$ g (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Grading				
nicht bestimmt	8	4 (50%)	4 (50%)	
Tumor Grad 1+2	154	53 (34,4%)	101 (65,5%)	
Tumor Grad 3	81	41 (50,6%)	40 (49,4%)	$p=0,043$
Gesamt	243	98 (40,3%)	145 (59,7%)	

**Tab. 12:** Kreuztabelle zwischen Tumor Grading und den Patientinnengruppen von PAI-1

## C) Korrelation von PAI-1 zum Patientenalter

Es lässt sich in diesem Kollektiv keine signifikante Beziehung zwischen dem Patientenalter und den Konzentrationswerten von PAI-1 im Tumorzytosol der Patientinnen nachweisen (Tabelle 13). Der Großteil der Patientinnen gehört dabei der Altersgruppe über 50 Jahren an, und gehört zur Gruppe von Patientinnen mit PAI-1- Werten kleiner oder gleich dem Cut-Off.

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit PAI-1 > 14 ng/μg (Prozent)	Patientinnen mit PAI-1 ≤ 14 ng/μg (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Alter				
unter 50 Jahre	70	33 (47,1%)	37 (52,9%)	p=0,11
ab 50 Jahre	173	65 (37,6%)	108 (62,4%)	
Gesamt	243	98 (40,3%)	145 (59,7%)	

**Tab. 13:** Kreuztabelle zwischen Patientinnenalter und Patientinnengruppen von PAI-1

## D) Korrelationen zwischen PAI-1 und dem Hormonrezeptorstatus

Es wurde in diesem Kollektiv jeweils zwischen Progesteron- und Östrogenrezeptorstatus unterschieden. Tabelle 14 gibt die nicht signifikanten Korrelationen ( $p=0,13$ ) zwischen der PAI-1 Konzentration im Tumorzytosol und dem Progesteronrezeptorstatus des Kollektivs wieder. Ein positiver oder negativer Progesteronrezeptorstatus ist somit nicht mit der Zugehörigkeit zu einer der Patientinnengruppen von PAI-1 korreliert. Aus Tabelle 15 ergibt sich die ebenfalls nicht signifikante Korrelation zwischen der PAI-1 Konzentration im Tumorzytosol des Kollektivs und dem Östrogenrezeptorstatus.

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit PAI-1 > 14 ng/ $\mu$ g (Prozent)	Patientinnen mit PAI-1 $\leq$ 14 ng/ $\mu$ g (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Progesteronrezeptor				
negativ	52	25 (48,1%)	27 (51,9%)	p=0,13
positiv	191	73 (38,2%)	118 (61,8%)	
Gesamt	243	98 (40,3%)	145 (59,7%)	

**Tab. 14:** Kreuztabelle zwischen Progesteronrezeptorstatus und Patientinnengruppen von PAI-1

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit PAI-1 > 14 ng/μg (Prozent)	Patientinnen mit PAI-1 ≤ 14 ng/μg (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Östrogenrezeptor negativ	54	27 (50%)	27 (50%)	p=0,07
positiv	189	71(37,6%)	118 (62,4%)	
Gesamt	243	98(40,3%)	145 (59,7%)	

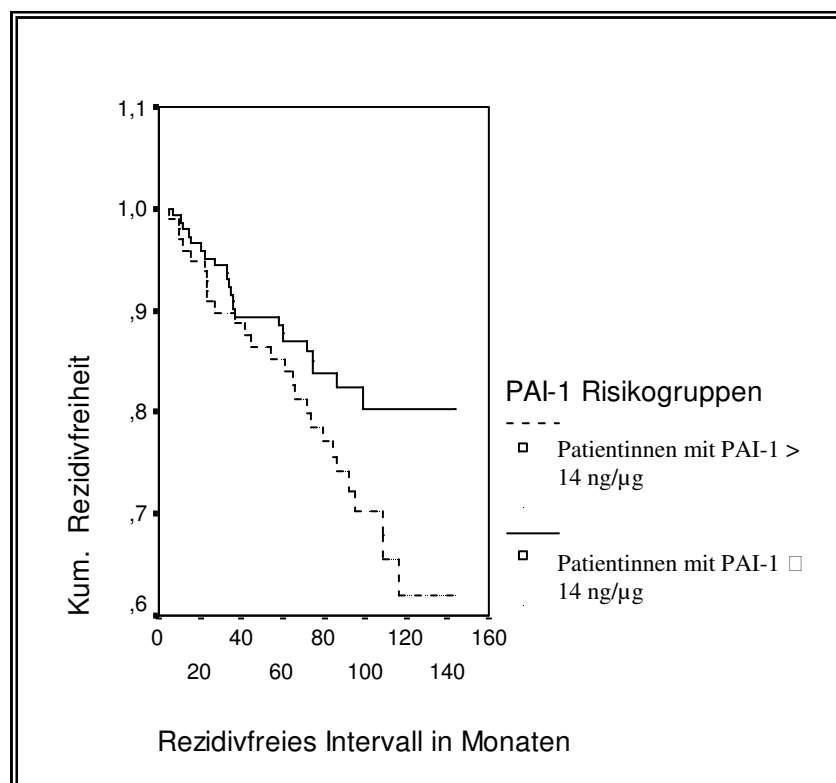
**Tab. 15:** Kreuztabelle zwischen Östrogenrezeptorstatus und Patientinnengruppen von PAI-1



### 3.3.3. Korrelation von PAI-1 zum rezidivfreien und Gesamtüberleben

#### A) Rezidivfreies Intervall

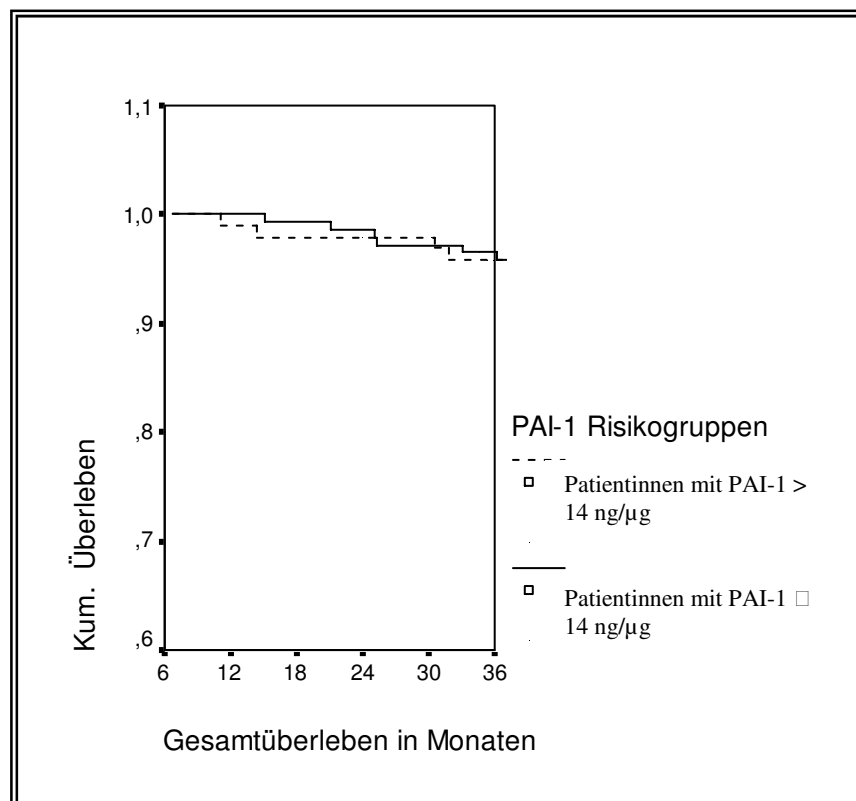
In der Kaplan- Meier Kurve zum rezidivfreien Intervall der Patientinnengruppen von PAI-1 zeichnet sich eine verringerte kumulierte Rezidivfreiheit der Patientinnen mit erhöhten PAI-1- Werten gegenüber den Patientinnen mit niedrigen PAI-1- Werten ab. Diese ist nach Log-Rank Test jedoch nicht signifikant ( $p=0,061$ ) (Diagramm 7). Obwohl nach ca. 36 Monaten eine deutliche Mehrheit der Gruppe von Patientinnen mit PAI-1-Werten über dem Cut-Off ein Rezidiv erlitten haben und sich dieser Trend im weiteren Beobachtungsverlauf eindeutig fortsetzt.



**Diagramm 7:** Kaplan- Meier Kurve zum Rezidivfreien Intervall der Patientinnengruppen von PAI-1

## B) Korrelation von PAI-1 zum Überleben nach 3 Jahren

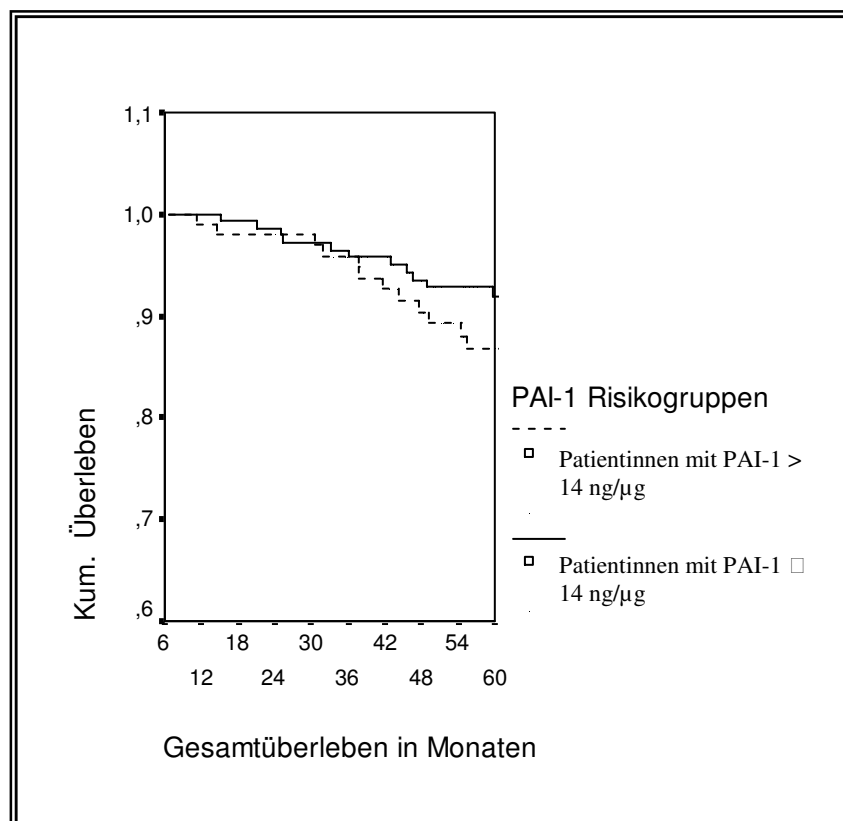
Die Kaplan-Meier Kurve zeigt bei der Betrachtung des Überlebens zwischen den beiden Patientinnengruppen von PAI-1 keine signifikanten Abweichungen im Verlauf der ersten 3 Jahre (Diagramm 8). Beide Patientinnengruppen zeigen nach einem Beobachtungszeitraum von 36 Monaten eine Überlebenschance von etwa 97%.



**Diagramm 8:** Kaplan-Meier Kurve zum Überleben der Patientinnengruppen von PAI-1 nach 3 Jahren

## C) Korrelation von PAI-1 zum Überleben nach 5 Jahren

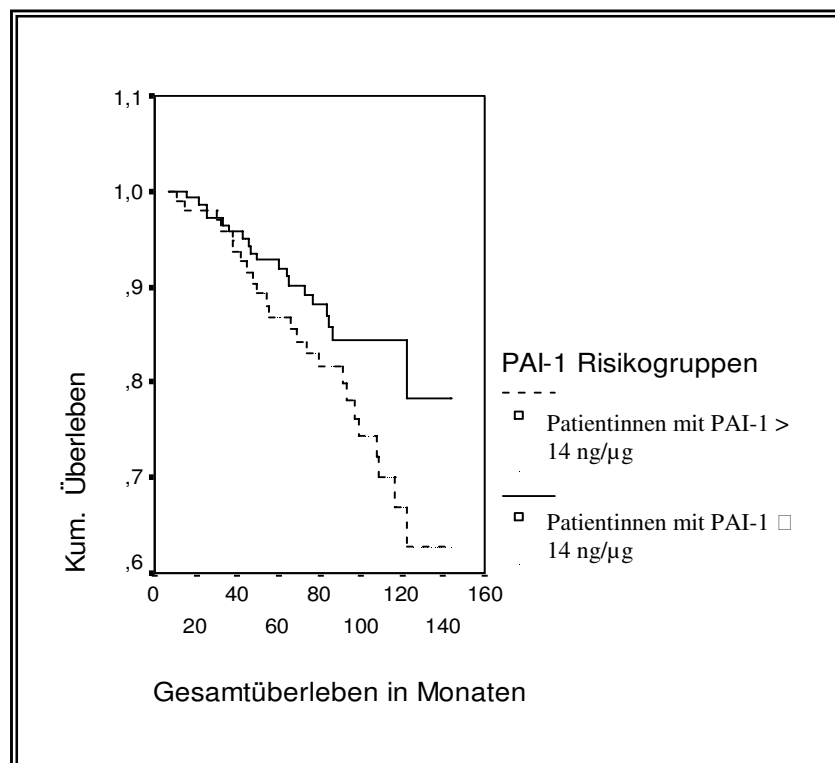
Die Kaplan-Meier Kurven zum Überleben über einen Verlauf von 5 Jahren zeigen für die Patientinnen mit PAI-1- Werten über dem Cut-Off mit 86% eine deutlich niedrigere Überlebenschance als für die Patientinnen mit PAI-1- Werten kleiner oder gleich dem Cut-Off, die eine Überlebenschance von 94% zeigen (Diagramm 9).



**Diagramm 9:** Kaplan-Meier Kurve zum Überleben der Patientinnengruppen von PAI-1 nach 5 Jahren

## D) Korrelation von PAI-1 zum Gesamtüberleben nach ca. 12 Jahren

Über den Gesamtzeitraum der Studie von maximal 11,84 Jahren betrachtet, zeichnet sich mit 63% weiter ein deutlich niedrigeres kumuliertes Gesamtüberleben der Patientinnen mit erhöhten PAI-1-Werten gegenüber den Patientinnen mit niedrigen PAI-1- Werten, die ein kumuliertes Gesamtüberleben von 78% zeigen, ab. Dennoch lässt sich für die Patientinnengruppen von PAI-1 keine Signifikanz nach Log-Rank Test im Gesamtüberleben nachweisen ( $p=0,07$ ) (vgl. Diagramm 10).



**Diagramm 10:** Kaplan-Meier Kurve zum Gesamtüberleben der Patientinnengruppen von PAI-1 innerhalb der Studie

### 3.4. Zusammengenommene Betrachtung von uPA und PAI-1

#### A) Korrelation der Faktoren uPA und PAI-1

Es ergab sich für das Patientinnenkollektiv eine sehr hohe Korrelation ( $p < 0,001$ ) zwischen uPA und PAI-1. 67,7% der Patientinnen mit hohen uPA- Werten weisen auch hohe PAI-1- Werte auf. 78,2% der Patientinnen mit niedrigen uPA- Werten haben gleichzeitig niedrige PAI-1- Werte (vgl. Tabelle 16). Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten werden die 63 Patientinnen, die jeweils gemischte Werte aufweisen in den weiteren Betrachtungen nicht berücksichtigt.

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit PAI-1 Werten über dem Cut-Off (Prozent)	Patientinnen mit PAI-1 Werten unter dem Cut-Off (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
UPA Tumorzytosolkonzentration				
Unter dem Cut-Off	147	32 (21,8%)	115 (78,2%)	p<0,001
Über dem Cut-Off	96	65 (67,7%)	31 (32,3%)	
Gesamt	243	97 (39,3%)	146 (60,7%)	

**Tab. 16:** Kreuztabelle zwischen den Patientinnengruppen von uPA und den Patientinnengruppen von PAI-1

### B) Korrelation von uPA und PAI-1 mit der Tumorgröße

Bei der zusammengenommenen Betrachtung von uPA und PAI-1 und der Tumorgröße der Patientinnen zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen geringer Tumorgröße und niedrigen uPA- und PAI-1- Werten ( $p=0,008$ ) (vgl. Tabelle 17).

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten über dem Cut-Off (Prozent)	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten unter dem Cut-Off (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Tumorgröße				
Stadium pT 1+2	59	13(22,0%)	46 (78,0%)	p=0,008
Stadium pT 3+4	121	52(43,0%)	69 (57,0%)	
Gesamt	180	65(36,1%)	115 (63,9%)	

**Tab. 17:** Kreuztabelle zwischen Tumorgröße und den Patientinnengruppen von uPA/PAI-1

## C) Korrelation von uPA und PAI-1 zum Grading

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Grading und uPA- und PAI-1-Werten. Niedrige uPA- und PAI-1- Werte treten gehäuft bei differenzierteren Tumoren Grading 1 und 2 auf (69%), hohe uPA- und PAI-1- Werte eher bei Patientinnen mit undifferenzierten Tumoren (Grading 3) (52,2%) ( $p=0,047$ ). Tabelle 18 verdeutlicht noch einmal die signifikanten Beziehungen.

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten über dem Cut-Off (Prozent)	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten unter dem Cut-Off (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Grading				
nicht bestimmt	4	1 (25%)	3 (75%)	
Tumor Grad 1+2	114	34 (29,8%)	80 (70,2%)	
Tumor Grad 3	62	30 (48,4%)	32 (51,6%)	$p=0,047$
Gesamt	180	65 (36,1%)	115 (63,9%)	

**Tab. 18:** Kreuztabelle zwischen Tumor Grading und den Patientinnengruppen von uPA/PAI-1

## D) Korrelation von uPA und PAI-1 zum Patientenalter

Das Patientinnenalter zeigt auch bei der zusammengefassten Betrachtung beider Patientinnengruppenzugehörigkeiten keine signifikanten Beziehungen zwischen der Altersgruppe unter fünfzig Jahren oder darüber, und der Patientinnengruppenzugehörigkeit (Tabelle 19).

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten über dem Cut-Off (Prozent)	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten unter dem Cut-Off (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Alter				
unter 50 Jahre	57	24 (42,1%)	33 (57,9%)	p=0,16
ab 50 Jahre	123	41 (33,3%)	82 (66,7%)	
Gesamt	180	65 (36,1%)	115 (63,9%)	

**Tab. 19:** Kreuztabelle zwischen Patientinnenalter und den Patientinnengruppen von uPA/PAI-1



## E) uPA und PAI-1 zum Hormonrezeptorstatus

Es ergibt sich auch bei zusammengenommener Betrachtung der Patientinnengruppenzugehörigkeiten keine signifikante Beziehung zwischen dem Hormonrezeptorstatus und der Zugehörigkeit zu einer Patientinnengruppe von uPA und PAI-1. Es zeigen gleich viele Patientinnen aus der Gruppe der Patientinnen mit hohen uPA und PAI-1 Werten, wie auch Patientinnen die in beiden Faktoren niedrige Werte aufweisen einen negativen Progesteronrezeptorstatus und es weisen sogar mehr Patientinnen mit niedrigen Werten in beiden Faktoren einen positiven Rezeptorstatus auf als die Gruppe der Patientinnen die bei beiden Faktoren hohe Werte zeigen (vgl. Tabelle 20 und Tabelle 21).

	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten über dem Cut-Off (Prozent)	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten unter dem Cut-Off (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Progesteronrezeptor				
negativ	40	19 (47,5%)	21 (52,5%)	p=0,10
positiv	140	46 (32,9%)	94 (67,1%)	
Gesamt	180	65 (36,1%)	115 (63,9%)	

**Tab. 20:** Kreuztabelle zwischen Progesteronrezeptorstatus und den Patientinnengruppen von uPA/PAI-1

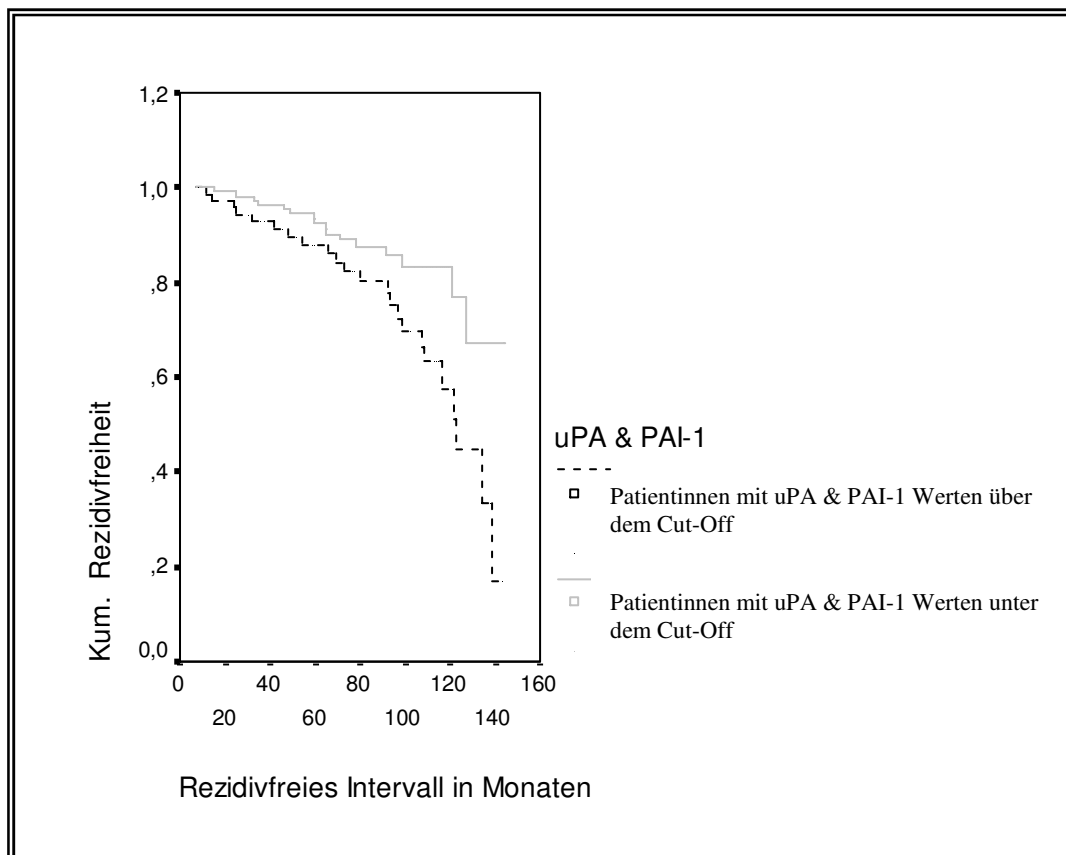
	Anzahl Patientinnen	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten über dem Cut-Off (Prozent)	Patientinnen mit uPA & PAI-1 Werten unter dem Cut-Off (Prozent)	Signifikanz nach Fischer
Östrogenrezeptor				
negativ	40	19(47,5%)	21 (52,5%)	p=0,10
positiv	140	46(32,9%)	94 (67,1%)	
Gesamt	180	65(36,1%)	115 (63,9%)	

**Tab. 21:** Kreuztabelle zwischen Östrogenrezeptorstatus und den Patientinnengruppen von uPA/PAI-1

## F) Korrelation von uPA und PAI-1 zum rezidivfreien und Gesamtüberleben

## a) Rezidivfreies Intervall

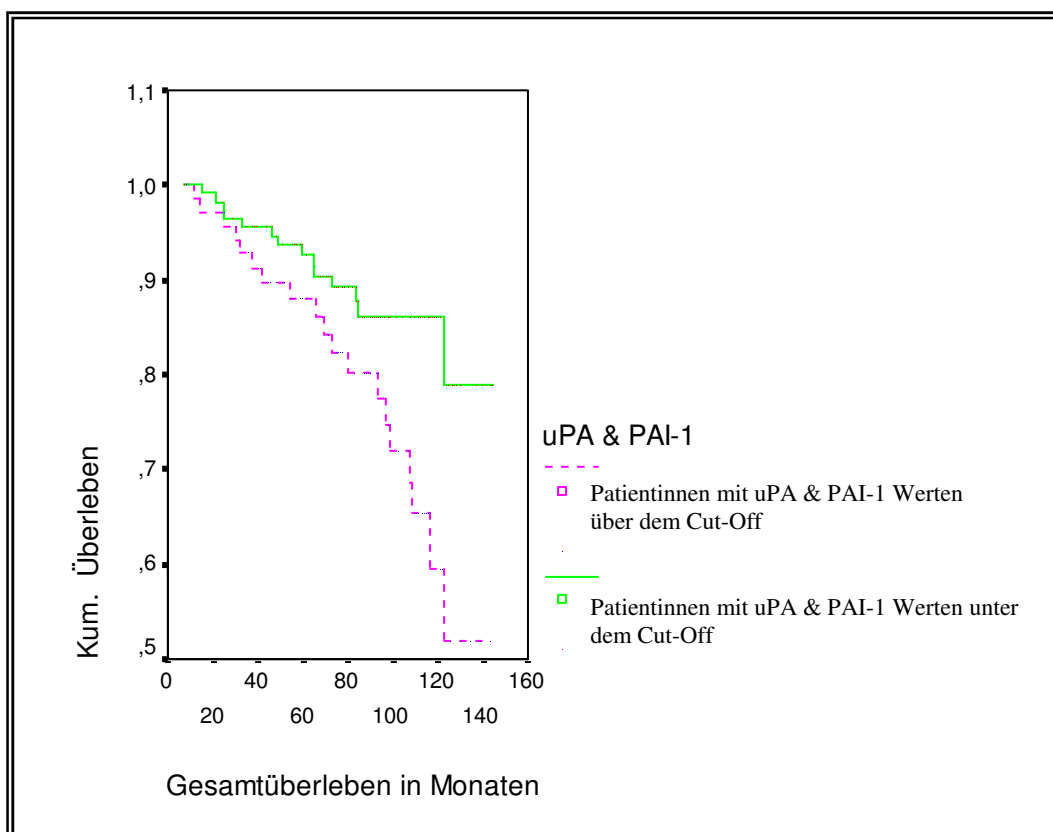
Für die Betrachtung des rezidivfreien Intervalls zeigt sich ein deutlich längeres rezidivfreies Intervall für Patientinnen mit niedrigen uPA- und PAI-1- Werten im Vergleich zu Patientinnen mit hohen uPA- und PAI-1- Werten ( $p=0,009$ ). So zeigt sich nach einem Nachbeobachtungszeitraum von etwa zehn Jahren bei 58% der Patientinnen mit hohen uPA- und PAI-1- Werten Rezidivfreiheit, wohingegen 82% der Patientinnen mit niedrigen uPA- und PAI-1- Werten rezidivfrei sind (Diagramm 11).



**Diagramm 11:** Kaplan-Meier Kurve zum Rezidivfreien Intervall der Patientinnengruppen von uPA/PAI-1 innerhalb der Studie

## b) Korrelation von uPA und PAI-1 zum Gesamtüberleben

Ebenso für das Gesamtüberleben zeigt sich ein Zusammenhang zwischen uPA und PAI-1 und Überlebenszeit ( $p=0,019$ ). Nach 10 Jahren leben noch 86% der Patientinnen mit niedrigen uPA- und PAI-1- Werten im Gegensatz zu 60% der Patientinnen mit hohen uPA- und PAI-1- Werten (Diagramm 12).



**Diagramm 12:** Kaplan-Meier Kurve zum Gesamtüberleben der Patientinnengruppen von uPA/PAI-1 innerhalb der Studie

## 4. Diskussion

---

### 4.1. Datenerfassung

Allgemein sind auf Grund der großen Datenmengen Übertragungsfehler von den Fragebögen in das Datenerfassungsprogramm nicht auszuschließen.

### 4.2. Methodische Probleme

Die vorliegende Untersuchung wurde an Tumorzytosolen durchgeführt. Dafür ist zunächst das Einhalten einer lückenlosen Kühlkette von der Gewebeentnahme über die Gewebeaufarbeitung bis zur definitiven Bestimmung der Proteasenkonzentration im Zytosol Voraussetzung. Dieses war während dieser Arbeit gewährleistet. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Art der Gewebeaufschlüsselung, da die Materialausbeute entscheidend hiervon abhängt. So findet man bei Verwendung des Detergens Triton X-100 im Median doppelt so viel uPA wie in der Triton-freien Zytosolfraktion. Die Ausbeute an PAI-1 ist hingegen in der Tritonfraktion etwa 10 % niedriger als im Zytosol, was durch den höheren Proteinwert in der Tritonfraktion bedingt ist [49]. Hieraus ergeben sich zunächst unterschiedliche Cut-Off- Werte für beide Extraktionsarten. Noch wichtiger ist jedoch die Tatsache, dass die prognostische Information des uPA trotz Anpassung des Cut-Off- Wertes in der Tritonfraktion höher ist als im Tumorzytosol. Der prognostische Wert vom PAI-1 bleibt hingegen von der Wahl der Extraktionsmethode weitgehend unbeeinflusst [49, 50] und erwies sich in anderen Untersuchungen bei zunehmender Nachbeobachtungszeit als der stärkste Faktor des Proteasensystems [51-53].

### 4.3. Grenzwerte

Die festgelegten Grenzwerte von uPA bei 3 ng/ $\mu$ g Protein im Tumorzytosol und von PAI-1 bei 14 ng/ $\mu$ g Protein im Tumorzytosol dienen zur Unterteilung der gemessenen Patientenwerte in Gruppen. So lassen sich für beide Faktoren eine Gruppe von Patientinnen mit hohen Werten und eine Gruppe von Patientinnen mit niedrigen Werten erstellen, was der Zuordnung zu einer Risikogruppe entspricht. Da gerade für die Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Operation noch keinen histologisch nachzuweisenden Lymphknotenbefall aufweisen, eine Risikoabschätzung von besonderer Gewichtung ist, bedarf es für sie zuverlässiger Prognosefaktoren als Voraussetzung für eine risikoadaptierte adjuvante Therapie. Oder gar, da etwa 70% aller nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen allein durch die chirurgische Maßnahme geheilt sind, die komplette Unterlassung einer weiterführenden adjuvanten Therapie [56].

Im Gegensatz dazu stehen die Patientinnen, die den Gruppen mit erhöhten Werten angehören. Sie haben ein deutlich erhöhtes Risiko eines Rezidives nach der operativen Therapie und werden so von einer weiteren adjuvanten Therapie, wie etwa einer Chemotherapie, profitieren.

In einer randomisierten, multizentrischen Studie zum nodalnegativen Mammakarzinom die zwischen 1993 und 1999 an 13 deutschen Hochschulen, sowie einer Slowenischen durchgeführt worden sind, wurden Patienten mit hohen uPA- und/oder PAI-1 Werten, die mittels handelsüblicher ELISA- Tests aus primärem Tumorgewebe bestimmt wurden, entweder einer adjuvanten Therapie mit CMF oder nur der Beobachtung zugewiesen [57]. Diese erste

gestaffelte Analyse bestätigte die unabhängige prognostische Bedeutung von uPA- und/oder PAI-1 für das rezidivfreie Überleben, und bestätigte die vorher optimierten Cut-Off- Werte für uPA (3ng/ $\mu$ g) und PAI-1 (14ng/ $\mu$ g), die zur Unterteilung zwischen hohen und niedrigen Werten benutzt wurden [56].

#### 4.4. Prognostische Bedeutung von uPA/PAI-1

##### A) uPA/PAI-1 im Zusammenhang mit etablierten Prognosefaktoren

Die Fähigkeit eines Tumors zu wachsen und zu metastasieren ist deutlich von Proteasesystemen, wie dem Plasminogen Aktivator System, abhängig. Das Plasminogen Aktivator System schließt den Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und den Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1), unter anderen weiteren Molekülen in sich ein und beide Faktoren haben sich mittlerweile neben den Standardfaktoren wie Tumorgröße, Patientenalter, Hormonrezeptorstatus und Tumorgrading als prognostische Faktoren für Patienten mit Brustkrebs etabliert. Da die Relevanz dieser zuletzt genannten Faktoren mittlerweile hinlänglich betrachtet wurde, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob uPA und/oder PAI-1 in Relation zu einem oder mehrerer dieser Faktoren zu bringen ist. Und es zeigte sich, dass die Zugehörigkeit der Patientinnen zu einer der Patientinnengruppen von uPA mit keinem der weiteren Prognosefaktoren in einer statistisch signifikanten Beziehung steht ( $p > 0,1$ ). Für die Zugehörigkeit zu den Patientinnengruppen von PAI-1 hingegen, zeigte sich für die Relation zur Tumorgröße, sowie zum Tumorgrading eine statistisch signifikante Beziehung. Patientinnen die der Gruppe mit niedrigen PAI-1-Werten angehören haben eine signifikant geringere Tumorgröße ( $p = 0,02$ ) und

gehäuft ein Tumorgrading Grad 1 oder 2 ( $p=0,043$ ). Bei den weiteren Faktoren, wie Patientenalter und Hormonrezeptorstatus ließ sich jedoch auch hier keine Korrelation aufzeigen.

Betrachtet man uPA und PAI-1 zusammengenommen, ergibt sich ebenfalls für die Patientinnen die zur Gruppe mit niedrigen uPA- Werten, sowie zur Gruppe mit niedrigen PAI-1- Werten gehören eine statistisch signifikante Beziehung zur Tumorgröße ( $p=0,016$ ) und zum Tumorgrading ( $p=0,047$ ), jedoch nicht zum Patientenalter oder Hormonrezeptorstatus.

B) uPA und PAI-1 im Zusammenhang mit dem rezidivfreien Intervall und dem Gesamtüberleben.

Seit 2003 zählen uPA und PAI-1 zu den ersten tumorbiologischen Prognosefaktoren beim Mammakarzinom, deren prognostische Bedeutung auf höchstem Evidenzniveau nachgewiesen wurde, und für die somit alle Evaluierungskriterien vor Überführung in die Klinik erfüllt sind. Es hat sich eindeutig gezeigt, dass Patientinnen mit einem hohen Gehalt an uPA und/oder PAI-1 im Primärtumorgewebe eine signifikant geringere Heilungswahrscheinlichkeit als Patientinnen mit niedrigem uPA und PAI-1 haben [58].

Auch in dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass insbesondere der Faktor uPA eine deutliche statistisch signifikante Aussagekraft ( $p=0,01$ ) über ein eventuell auftretendes Rezidiv hat. Die Patientinnen mit erhöhten uPA- und/oder PAI-1- Werten im Tumorzytosol zeigten deutlich mehr Fälle eines Rezidivbefalles als Patientinnen mit niedrigen uPA- und/oder PAI-1 Werten.

Ebenfalls zeigte sich ein deutlicher statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p=0,03$ ) zwischen der Zugehörigkeit zu einer der Patientinnengruppen von uPA



und dem Verlauf des Gesamtüberlebens über drei, fünf und mehr als zehn Jahren im Kollektiv.

Auch hier kam es in der Gruppe der Patientinnen mit hohen uPA Werten im Beobachtungszeitraum zu mehr Todesfällen, als in der Gruppe der Patientinnen mit niedrigen Werten.

Für die Patientinnengruppeneinteilung von PAI-1 und der Aussagekraft über das rezidivfreie Intervall ( $p=0,06$ ), sowie das Gesamtüberleben ( $p=0,07$ ), konnte in dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Aber es zeigte sich in allen Betrachtungen eine deutliche Tendenz dazu dass die Patientinnen mit hohen PAI-1- Werten das jeweils höhere Risiko eines Ereigniseintrittes haben. Dies lässt vermuten, dass die Werte bei einem entsprechend größeren Kollektiv und einem längeren Beobachtungszeitraum eventuell statistische Signifikanzen aufweisen würden.

Betrachtet man die Patientinnengruppen von uPA und PAI-1 jeweils zusammengenommen, zeigte sich ebenfalls dass sich eine statistisch signifikante Korrelation mit dem rezidivfreien Intervall ( $p=0,009$ ), sowie dem Gesamtüberleben im Kollektiv ( $p=0,02$ ) aufzeigen lässt. So haben Patientinnen die bei beiden Faktoren zur Patientinnengruppe mit niedrigen uPA/PAI-1- Werten gehören ein signifikant geringeres Risiko ein Rezidiv zu erleiden oder zu versterben.

Eine eventuelle Erklärung dafür, dass in dieser Untersuchung kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PAI-1 und dem rezidivfreien Intervall oder dem Gesamtüberleben aufgezeigt werden konnte, ist vielleicht die im Jahre 2004 veröffentlichte Untersuchung in der gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von aktivem PAI-1 in vitro bei Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen die Zellmigration und Invasion reduziert [59]. Hier wäre

die Verteilung der Patientinnengruppe also genau umgekehrt wie in der Gruppeneinteilung von uPA. Nun handelt es sich hierbei um eine in vitro Studie die nicht für eine Bedeutung in vivo auszulegen ist, aber es könnte ein Ansatz zur Erklärung sein.

Über ihre prognostische Bedeutung hinausgehend konnte für uPA und PAI-1 mittlerweile auch eine prädiktive Bedeutung hinsichtlich des Ansprechens auf adjuvante Chemotherapie gezeigt werden. Patientinnen mit hohem uPA oder PAI-1 haben einen signifikant größeren Nutzen an einer adjuvanten Chemotherapie als Patientinnen mit niedrigem uPA oder PAI-1.

Jüngst hat sich auch in einer Untersuchung an 576 nodalnegativen Patientinnen gezeigt, dass nicht nur die einzelnen Faktoren, sondern auch der von ihnen gebildete Komplex deutliche Aussagen über das verringerte rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patientinnen erlaubt [60].

Es zeigte sich ebenfalls dass die Expression des uPA/PAI-1-Komplexes die Wirksamkeit der adjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom unabhängig voraussagt. Es zeigt sich ein größerer Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie für Patientinnen die einen höheren Gehalt an uPA/PAI-1-Komplex im Tumorgewebe aufweisen.

Die resultierende Frage nach der optimalen Chemotherapie für Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1 versucht derzeit in Deutschland die NNBC-3-Studie beim nodalnegativen Mammakarzinom (AGO, EORTC-RBG) zu beantworten. Gleichzeitig legen diese Ergebnisse den frühzeitigen Einsatz neuer mit dem uPA- System interferierender tumorbiologischer Therapeutika, in Kombination mit konventioneller Chemotherapie, bei Patientinnen mit hohen uPA- und PAI-1- Werten nahe.

Bei einer Untersuchung von 691 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, die ein Rezidiv entwickelten und daraufhin als erste systemische Maßnahme mit Tamoxifen behandelt wurden, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass erhöhte Werte von uPA/PAI-1 im Tumorgewebe ein signifikant schlechteres Ansprechen auf eine Tamoxifen Therapie zeigen. In der multivariablen Analyse lieferte uPA zudem zusätzliche Informationen, unabhängig von den traditionellen Prognosefaktoren, um den Nutzen einer Tamoxifen Therapie vorauszusagen [61].

Darüber hinaus konnte 2004 für den Faktor PAI-1 gezeigt werden, dass eine Überexpression von aktivem PAI-1 in vitro bei Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen die Zellmigration und Invasion reduziert [59].

#### 4.5. Ausblick

In den letzten 15 Jahren, wurden ausreichende Beweise erbracht das die Bestimmung von uPA und PAI-1 beim primären Mammakarzinom eine risikoadaptierte, individualisierte Therapieentscheidung ermöglicht, die besonders für Patienten mit nodalnegativem Status entscheidend ist.

Auch bei anderen Malignomen, wie beim Ovarial-, Ösophagus-, Magen-, Kolon-, oder Leberzellkarzinom korreliert ein erhöhter Gehalt an uPA und/oder PAI-1 mit Tumoraggressivität und schlechter Prognose. Eine prospektive klinische Studie oder Metaanalyse, d.h. Daten auf höchstem Evidenzniveau, wurden jedoch bei anderen Malignomen noch nicht vorgelegt, so dass die klinischen Konsequenzen aus der uPA und PAI-1 Bestimmung zurzeit auf das Mammakarzinom beschränkt bleiben [62].

Die überzeugenden grundlagenorientierten und klinischen Daten, die auf eine Schlüsselrolle von uPA und PAI-1 bei Invasion und Metastasierung von Tumorzellen hinweisen, machen diese beiden Faktoren außerdem zu viel versprechenden Zielstrukturen für tumorbiologische Therapieansätze [63]. Neue Therapiemöglichkeiten zur Hemmung der Interaktion zwischen uPA, PAI-1 und dem uPA- Rezeptor werden zurzeit in präklinischen Modellen getestet. Eine erste Substanz, ein synthetischer uPA- Inhibitor (WX-UK1), ist bereits in einer klinischen Krebsforschungsphase I/II (Pressemitteilung Willex AG vom 14.10.02, München Deutschland). Neuere Erkenntnisse über die prädiktive Bedeutung von uPA/PAI-1 hinsichtlich des Ansprechens auf adjuvante Chemotherapie legen den frühzeitigen Einsatz dieser neuen Substanzen in Kombination mit konventioneller Chemotherapie bei Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1 nahe [58].

Andere neue therapeutische Ansätze sind Rezeptor Liganden Imitatoren die in die zelluläre Interaktion von uPA/uPA-R eingreifen sollen und derzeit in präklinischen Krebsmodellen in der Untersuchung sind [64, 65].

Außerdem wird derzeit PAI-1 als potentielles Ziel für Therapieansätze getestet indem man Antikörper oder kleine Moleküle herstellt, die in der Lage sind seine Funktion zu inhibieren oder zu modulieren [66].

## 5. Zusammenfassung

---

Eine wichtige Voraussetzung für Invasion und Metastasierung von soliden Tumoren ist deren Fähigkeit zu Degradation der extrazellulären Matrix und der Basalmembran. Die proteolytisch aktiven Faktoren werden dadurch zu potentiellen Prognosefaktoren. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Faktoren tumorassoziierter Proteolyse (uPA und PAI-1) bei Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom untersucht.

Durch ELISA- Testverfahren wurde die Tumorzytosol- Konzentration des Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und seinem Inhibitor, Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) in 250 Primärtumoren bestimmt. Davon konnte in 243 Fällen ein ausreichendes Follow-Up erstellt werden, mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 86 Monaten (6 bis 143 Monate).

uPA und PAI-1 wurden jeweils einzeln, sowie zusammengenommen auf ihre prognostische Bedeutung hin untersucht und die Aussagekraft mit der der klassischen Prognosefaktoren verglichen.

Es ließ sich für beide tumorassozierten Faktoren uPA und PAI-1 keine signifikante Korrelation zu den konventionellen Prognosefaktoren Patientenalter oder Hormonrezeptorstatus aufzeigen. Und für uPA ergab sich ebenfalls keine signifikante Beziehung zum Tumorstadium oder zum Grading, dieses ließ sich jedoch für den Faktor PAI-1 nachweisen. Patientinnen mit erhöhten Tumorzytosol- Konzentrationen an uPA ( $>3\text{ng}/\mu\text{g}$  Protein) haben eine signifikant niedrigere Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens ( $p=0,012$ ) und des Gesamtüberlebens ( $p=0,03$ ).

Obwohl mehrere Studien diese Wahrscheinlichkeiten ebenfalls für den Faktor PAI-1 gezeigt haben, konnte in dieser Arbeit keine signifikant niedrigere Wahrscheinlichkeit für das rezidivfreie Überleben ( $p=0,061$ ), sowie das Gesamtüberleben ( $p=0,07$ ) bei Patientinnen mit erhöhten

---

Tumorzytosolkonzentrationen an PAI-1 ( $>14\text{ng}/\mu\text{g}$  Protein) nachgewiesen werden.

Es bestand jedoch eine deutliche Korrelation der beiden Faktoren uPA und PAI-1 zueinander. Werden die Faktoren uPA und PAI-1 zusammengenommen gegenüber dem rezidivfreien Intervall und dem Gesamtüberleben betrachtet, zeigt sich auch hier die deutliche Signifikanz für die Patientinnen, eher ein Rezidiv zu entwickeln oder zu versterben, wenn sie bei beiden Faktoren zur Patientinnengruppe mit erhöhten Werten gehören als wenn sie bei beiden Faktoren zur Patientinnengruppe mit niedrigen Werten gehören.

## 6. Abkürzungen

---

Abb.	Abbildung
CART	Classification and Regression Trees
C.I.	Confidence interval
CMF	Cyclophosphamid Methotrexat-5-Flourouracil
DCC	Dextran coated charcoal
DFS	Disease-free survival (Rezidivfreies Intervall)
EC	Enzyme classification (Nomenklatur der International Union of Biochemistry)
EDTA	(Dinatriumdihydrogen )-Ethyldiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Estrogen receptor (Östrogenrezetor)
g	Gravity (Schwerkraft)
HE	Haematoxilin Eosin
HMW	High molecular weight
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MMP	Matrix metalloproteases
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1
PR	Progesterone receptor (Progesteronrezeptor)
pTNM	Pathologische Einteilung: Tumor, Nodulus, Metastase
RR	Relative Risk (relatives Risiko)

Tab.	Tabelle
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteases
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Urokinase- Typ Plasminogenaktivator
WHO	World Health Organisation



## 7. Literaturverzeichnis

---

1. Tokuda, Y., et al., *Dose escalation and pharmacokinetic study of a humanized anti-HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer*. Br.J.Cancer, 1999. **81**: p. 1419-1425.
2. Nacht, M., et al., *Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer*. Cancer Res., 1999. **59**: p. 5464-5470.
3. Kuhns, J.J., et al., *Poor binding of a HER-2/neu epitope (GP2) to HLA-A2.1 is due to a lack of interactions with the center of the peptide*. J.Biol.Chem., 1999. **274**: p. 36422-36427.
4. Lopez, A.M., et al., *A model-based approach for assessing in vivo combination therapy interactions*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1999. **96**: p. 13023-13028.
5. Pelizzola, D., et al., *Immunometric assays of ras and c-erbB-2/neu overexpression in breast cancer: a pilot study*. Int.J.Biol.Markers., 1999. **14**: p. 178-185.
6. Jacobs, T.W., et al., *Specificity of HercepTest in Determining HER-2/neu Status of Breast Cancers Using the United States Food and Drug Administration-Approved Scoring System*. J.Clin.Oncol., 1999. **17**: p. 1983.
7. Jacobs, T.W., et al., *Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry for the Evaluation of HER-2/neu in Breast Cancer*. J.Clin.Oncol., 1999. **17**: p. 1974.
8. Querzoli, P., et al., *Quantitative immunoprofiles of breast cancer performed by image analysis*. Anal.Quant.Cytol.Histol., 1999. **21**: p. 151-160.

9. Aguilar, Z., et al., *Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells.* Oncogene., 1999. **18**: p. 6050-6062.
10. Dievart, A., N. Beaulieu, and P. Jolicoeur, *Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors.* Oncogene., 1999. **18**: p. 5973-5981.
11. Zeng, Z., et al., *Benign proliferative nipple duct lesions frequently contain CAM 5.2 and anti-cytokeratin 7 immunoreactive cells in the overlying epidermis.* Am.J.Surg.Pathol., 1999. **23**: p. 1349-1355.
12. Schultz, L.B. and B.L. Weber, *Recent advances in breast cancer biology.* Curr.Opin.Oncol., 1999. **11**: p. 429-434.
13. Alpaugh, M.L., et al., *A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer.* Cancer Res., 1999. **59**: p. 5079-5084.
14. Klijanienko, J., et al., *Detection and quantitation by fluorescence in situ hybridization (FISH) and image analysis of HER-2/neu gene amplification in breast cancer fine-needle samples.* Cancer, 1999. **87**: p. 312-318.
15. Guerra-Vladusic, F.K., et al., *Constitutive expression of heregulin induces apoptosis in an erbB-2 overexpressing breast cancer cell line SKBr-3* Int.J.Oncol., 1999. **15**: p. 883-892.
16. Di Carlo, E., et al., *Analysis of mammary carcinoma onset and progression in HER-2/neu oncogene transgenic mice reveals a lobular origin.* Lab.Invest., 1999. **79**: p. 1261-1269.
17. Kim, J.S., et al., *Enhanced adenoviral transduction efficiency in HER-2/neu-overexpressing human breast cancer cells not induced by an integrin pathway.* Oncol.Rep., 1999. **6**: p. 1237-1242.

18. Agus, D.B., et al., *Response of prostate cancer to anti-Her-2/neu antibody in androgen-dependent and -independent human xenograft models.* Cancer Res., 1999. **59**: p. 4761-4764.
19. Cooley, S., et al., *Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu.* Exp.Hematol., 1999. **27**: p. 1533-1541.
20. Depowski, P.L., et al., *Prognostic significance of p34cdc2 cyclin-dependent kinase and MIB1 overexpression, and HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in breast cancer.* Am.J.Clin.Pathol., 1999. **112**: p. 459-469.
21. Stoll, B.A., *Premalignant breast lesions: role for biological markers in predicting progression to cancer.* Eur.J.Cancer, 1999. **35**: p. 693-697.
22. Bamberger, A.M., et al., *Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype.* Int.J.Cancer, 1999. **84**: p. 533-538.
23. Fiche, M., et al., *Genetic alterations in early-onset invasive breast carcinomas: correlation of c-erbB-2 amplification detected by fluorescence in situ hybridization with p53 accumulation and tumor phenotype.* Int.J.Cancer, 1999. **84**: p. 511-515.
24. Abrams, J.S., *Adjuvant therapy for breast cancer--results from the USA consensus conference.* Breast Cancer, 2001. **8**(4): p. 298-304.
25. Charpin, C., et al., *Non palpable breast carcinomas. Histological and immunohistochemical studies of 160 cases.* Pathol.Res.Pract., 1993. **189**: p. 267-274.

26. Elledge, R.M., et al., *Tumor biologic factors and breast cancer prognosis among white, Hispanic, and black women in the United States [see comments]*. J.Natl.Cancer Inst., 1994. **86**: p. 705-712.
27. Wong, W.W., S. Vijayakumar, and R.R. Weichselbaum, *Prognostic indicators in node-negative early stage breast cancer*. Am.J.Med., 1992. **92**: p. 539-548.
28. Cefai, D., et al., *Targeting HER-2/neu for active-specific immunotherapy in a mouse model of spontaneous breast cancer*. Int.J.Cancer, 1999. **83**: p. 393-400.
29. Yang, X., et al., *Functional roles of chromosomes 11 and 17 in the transformation of human breast epithelial cells in vitro*. Int.J.Oncol., 1999. **15**: p. 629-638.
30. Zhang, H., et al., *Shared antigenic epitopes and pathobiological functions of anti-p185(her2/neu) monoclonal antibodies*. Exp.Mol.Pathol., 1999. **67**: p. 15-25.
31. Hatakeyama, M. and F. Matsumura, *Correlation between the activation of Neu tyrosine kinase and promotion of foci formation induced by selected organochlorine compounds in the MCF-7 model system*. J.Biochem.Mol.Toxicol., 1999. **13**: p. 296-302.
32. De Vecchi, R., et al., *Correspondence re: Y. Chen et al., DNA vaccines encoding full-length or truncated neu induce protective immunity against neu-expressing mammary tumors. Cancer Res., 58: 1965-1971, 1998 [letter; comment]*. Cancer Res., 1999. **59**: p. 4471-4472.
33. Conese, M. and F. Blasi, *Urokinase/urokinase receptor system: internalization/degradation of urokinase-serpin complexes: mechanism and regulation*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**: p. 143-55.

34. Harbeck, N., et al., *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer*. *Thromb Haemost*, 2004. **91**: p. 450-6.
35. Preissner, K., S. Kanse, and A. May, *Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication*. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. **12**: p. 621-8.
36. Rosenberg, S., *New developments in the urokinase-type plasminogen activator system*. *Expert Opin Ther Targets*, 2001. **5**: p. 711-22.
37. Blasi, F. and P. Carmeliet, *uPA-R: a versatile signaling orchestrator*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**: p. 932-43.
38. Reuning, U., V. Magdolen, and S. Hapke, *Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins*. *Biol Chem*, 2003. **384**: p. 1119-31.
39. Mitchell, M.S. and M.F. Press, *The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2/neu in assessing the prognosis of breast cancer*. *Semin.Oncol.*, 1999. **26**: p. 108-116.
40. Hung, M.C. and Y.K. Lau, *Basic science of HER-2/neu: a review*. *Semin.Oncol.*, 1999. **26**: p. 51-59.
41. Weiner, L.M., *An overview of monoclonal antibody therapy of cancer*. *Semin.Oncol.*, 1999. **26**: p. 41-50.
42. Hortobagyi, G.N., M.C. Hung, and A.U. Buzdar, *Recent developments in breast cancer therapy*. *Semin.Oncol.*, 1999. **26**: p. 11-20.
43. Elkhuizen, P.H., et al., *Risk factors for local recurrence after breast-conserving therapy for invasive carcinomas: a case-control study of histological factors and alterations in oncogene expression*. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 1999. **45**: p. 73-83.

44. de Cremoux, P., et al., *Quantitative PCR analysis of c-erb B-2 (HER2/neu) gene amplification and comparison with p185(HER2/neu) protein expression in breast cancer drill biopsies*. Int.J.Cancer, 1999. **83**: p. 157-161.
45. Jänicke, F., M. Schmitt, and L. Fache, *Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer*. Breast Cancer Res Treatm, 1993. **24**: p. 195-208
46. Jänicke, F., M. Schmitt, and H. Graeff, *Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer*. Thromb Haemost, 1991. **17**: p. 303-12.
47. Jänicke, F., M. Schmitt, and R. Hafter, *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer*. Fibrinolysis, 1990. **4**: p. 69-78.
48. Harbeck, N., et al., *Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2004. **5(5)**: p. 348-52.
49. Jänicke, F., et al., *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, 1994. **54**: p. 2527-30.
50. Abraha, R., et al., *Micromethod for determination of uPA and PAI-1 from preoperative core-needle biopsies in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **82 Suppl. 1**: p. 144.
51. Harbeck, N., et al., *Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer*. Anticancer.Res., 1998. **18**: p. 2187-2197.

52. Schmitt, M., et al., *Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapy*. *Thromb Haemost*, 1997. **78**: p. 285-96
53. Harbeck, N., et al., *Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer*. *Int J Biol Markers*, 2000. **15**(1): p. 79-83.
54. Berger, U., et al., *The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis*. *Am J Clin Pathol*, 1988. **90**(1): p. 1-6.
55. Osborne, M.P., et al., *Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow*. *Cancer Res*, 1991. **51**(10): p. 2706-9.
56. Harbeck, N., et al., *Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse*. *Breast Cancer Res Treat*, 1999. **54**(2): p. 147-57.
57. Jänicke, F., et al., *Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001. **93**: p. 913-920.
58. Manders, P., et al., *Predictive impact of urokinase-type plasminogen activator: plasminogen activator inhibitor type-1 complex on the efficacy of adjuvant systemic therapy in primary breast cancer*. *Cancer Res.*, 2004. **64**(2): p. 659-64.
59. Carraway, C.A., M.E. Carvajal, and K.L. Carraway, *Association of the Ras to mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway with microfilaments. Evidence for a p185(neu)-containing cell surface signal*

- transduction particle linking the mitogenic pathway to a membrane-microfilament association site.* J.Biol.Chem., 1999. **274**: p. 25659-25667.
60. Jarvinen, T.A., et al., *Characterization of topoisomerase IIalpha gene amplification and deletion in breast cancer.* Genes.Chromosomes.Cancer, 1999. **26**: p. 142-150.
61. Hanna, W., H.J. Kahn, and M. Trudeau, *Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside.* Mod.Pathol., 1999. **12**: p. 827-834.
62. Duffy, M.J., *The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy.* Curr Pharm Des, 2004. **10**(1): p. 39-49.
63. Hong, R.L., W.H. Spohn, and M.C. Hung, *Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu.* Clin.Cancer Res., 1999. **5**: p. 1884-1891.
64. Krol, J., C. Kopitz, and A. Kirschhofer, *Inhibition of intraperitoneal tumor growth of human ovarian cancer cells by bi-and trifunctional inhibitors of tumor-associated proteolytic systems.* Biol Chem, 2003. **384**: p. 1097-102.
65. Reuning, U., S. Sperl, and C. Kopitz, *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R): development of antagonists of uPA/uPA-R interaction and their effects in vitro and in vivo.* Curr Pharm Des, 2003. **9**: p. 1529-43.
66. Stefansson, S., G. McMahon, and E. Petitclerc, *Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling.* Curr Pharm Des, 2003. **9**: p. 1545-64.



## 8. Anhang

---

Es werden die verwendeten Anschreiben an die Patienten mit dem dazugehörigen Fragebogen, sowie die Anschreiben an die behandelnden Ärzte, wenn die Anschrift der Patientinnen nicht mehr nachvollziehbar war, mit dem abgewandelten Fragebogen abgebildet.

### Patientinnenanschreiben:



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik  
für Frauenheilkunde  
Kernklinik  
Prof. Dr. Fritz Jänicke  
Geschäftsführender Direktor der  
Klinik

Martinstraße 52  
20246 Hamburg  
Telefon: (040) 42803-2550  
Telefax: (040) 42803-2511  
vmueller@uke.uni-hamburg.de  
www.uke.uni-hamburg.de

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Martinstraße 52 20246 Hamburg

Sehr geehrte Frau \_\_\_\_\_ ,

zur Qualitätssicherung und im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen benötigen wir Informationen über den weiteren Krankheitsverlauf der bei uns wegen eines primären Mammakarzinoms behandelten Patienten.

Leider stehen uns über Sie keine ausreichend aktuellen Daten zur Verfügung, deshalb wären wir Ihnen für Ihre Mitarbeit sehr dankbar.

Ihre Angaben unterliegen natürlich dem Datenschutz.

**Bitte senden Sie den ausgefüllten Fragebogen in dem beiliegenden Rückantwortkuvert spätestens bis zum \_\_\_\_\_ an uns zurück.**

Für Ihre freundliche Unterstützung bedanken wir uns ganz herzlich im voraus und verbleiben mit freundlichen Grüßen,

Prof. F. Jänicke  
Direktor der Klinik und Poliklinik für  
Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Prof. Ch. Thomsen  
Leitender Oberarzt

Dr. med. V. Müller

Frau L. Fall

---

Patientinnenfragebogen:
Fragebogen

Nachname:

Vorname:

Geburtsdatum:

1. Wer ist Ihr derzeitiger Frauenarzt ?

---



---



---

Letzter Arztbesuch ?

---

2. Kam es im Zusammenhang mit der Erkrankung zu weiteren Komplikationen (Rezidiv) ?

 Nein Ja, wann ?

---

3. Wo ist dieses Rezidiv aufgetreten ?

(z.B. operierte Brust oder nicht-operierte Brust)

---

4. Ist eine Metastasierung aufgetreten ?

 Nein Ja, wann und wo ?

---

5. Wurde eine weitere Therapie eingeleitet ?

 Nein Ja, welche ?

---

Ansprechen ?

 Nein Ja

Vielen Dank für Ihre schnelle Antwort !

Arztanschriften:



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik  
für Frauenheilkunde  
Kernklinik  
Prof. Dr. Fritz Jänicke  
Geschäftsführender Direktor der  
Klinik

Martinstraße 52  
20246 Hamburg  
Telefon: (040) 42803-2550  
Telefax: (040) 42803-2511  
vmueller@uke.uni-hamburg.de  
www.uke.uni-hamburg.de

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Martinstraße 52 20246 Hamburg

Zur Qualitätssicherung und im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen benötigen wir Informationen zum weiteren Krankheitsverlauf der Patientinnen, die bei uns wegen eines primären Mammakarzinoms behandelt wurden.

Leider stehen uns nicht zu allen Patientinnen genügend Daten über den weiteren Krankheitsverlauf zur Verfügung.

Deshalb bitten wir Sie, soweit Sie über weitere Informationen verfügen, um Ihre freundliche Mitarbeit. Ihre Angaben unterliegen natürlich dem Datenschutz.

Für weitere Fragen stehen wir Ihnen unter der Telefonnummer 42803-2550 (Hr. Dr. Müller / Frau Fall) gerne zur Verfügung.

**Wir bitten um Zusendung des ausgefüllten Fragebogens an die Faxnummer 42803-2511.**

Für Ihre freundliche Unterstützung bedanken wir uns ganz herzlich im voraus und verbleiben mit freundlichen kollegialen Grüßen,

Prof. F. Jänicke  
Direktor der Klinik und Poliklinik für  
Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Prof. Ch. Thomsen  
Leitender Oberarzt

Dr. med. V. Müller

Frau L. Fall

Arztfragebogen:

Absender (Stempel)

An das

**Universitätsklinikum**

Hamburg- Eppendorf

Klinik und Poliklinik für  
Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Martinistrasse 52

20246 Hamburg

Telefon:(040)42803-2350

Telefax:(040)42803-2511

**Patienten Fragebogen**

Nachname:

Vorname:

Geburtsdatum:

1. Ist die Patientin noch in Ihrer Behandlung ?

 Nein, wo dann ? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

 Ja, letzter Besuch ?

\_\_\_\_\_

2. Ist ein lokales Rezidiv aufgetreten ?

 Nein Ja, wann ?

\_\_\_\_\_

3. Ist ein intramammäres Rezidiv aufgetreten ?

 Nein Ja, wann ?

\_\_\_\_\_

4. Ist eine distante Metastasierung aufgetreten ?

 Nein Ja, wann und wo ?

\_\_\_\_\_

5. Wurde eine weitere Therapie eingeleitet ?

 Nein Ja, welche ?

\_\_\_\_\_

Ansprechen ?

 Nein  Ja

6. Ist die Patientin verstorben ?

 Nein Ja, wann ?

\_\_\_\_\_

 Todesursache ? Brustkrebs  Andere

Vielen Dank für Ihre schnelle Antwort !

## 9. Danksagungen

---

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Fritz Jänicke für die Überlassung des Themas und für die stete Bereitschaft zur Diskussion meiner Ergebnisse.

Herrn Dr. med. Volkmar Müller danke ich für die stete Begleitung während aller Phasen der Arbeit.

Frau Dr. med. Isabell Witzel möchte ich ebenfalls für die stete Bereitschaft als Ansprechpartner zur Diskussion der Vorgehensweisen und Auswertung der Ergebnisse danken.

Darüber hinaus danke ich Frau Oberschwester Amy Oben für die freundliche Einarbeitung in die Bürotechnik.

Und Frau Sylke Krenkel, sowie Frau Milde-Langosch für die freundliche und lehrreiche Einarbeitung in die Labortechnik und die Beantwortung sämtlicher Fragen zu dem Thema der rezeptorgebundenen Fängerantikörper Diagnosetests.

## 10. Lebenslauf

---

Christopher Tobias Leib geboren am 23. Juni 1978 in Hamburg, Rissen.

Als Sohn von Marianne und Jürgen Leib.

Jüngerer Bruder von Melanie Kobsa, geborene Leib.

Zeitlicher Werdegang:

- von 1984 bis 1988 Besuch der Grundschule in der Musäusschule Iserbrook
- von 1988 bis 1997 Besuch des Gymnasium Osdorf
- 1997 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
- 1997 bis 1998 Ableisten des Grundwehrdienstes im Pionierbataillon 620 in Schleswig
- 1998 bis 1999 Beginn zur Ausbildung als Zahntechniker im Labor Paul Tax in Wandsbek
- 1999 bis 2005 Studium der Zahnmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
- 2005 Abschluss des Staatsexamens Zahnmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
- 2006 Anstellung als Assistenz Zahnarzt in einer Gemeinschaftspraxis in Hamburg Eidelstedt

## 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.

.....  
Christopher Leib