

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik- und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und
Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki

C-X-C Motiv Rezeptor 2-, Endostatin- und Proteinase-aktivierter Rezeptor-1-Polymorphismen als prognostische Faktoren beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Neda Anuscheh Yavari
aus Stuttgart

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.10.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Faik Güntac Uzunoglu

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Petra Schmage

Inhaltsverzeichnis

1. Publikation	5
2. Zusammenfassende Darstellung	12
2.1 Einleitung.....	12
2.2 Material und Methoden:.....	15
2.2.1 Proben	15
2.2.2 Polymorphismen	15
2.2.3 DNA-Extraktion, Sequenzierung und Genotypbestimmung.....	16
2.3 Statistische Analyse	16
2.4 Ergebnisse	17
2.4.1 Studienkohorte.....	17
2.4.2 Polymorphismen	17
2.5 Diskussion	19
2.6 Schlussfolgerung.....	21
2.7 Zusammenfassung.....	22
2.8 Literaturverzeichnis	24
2.9 Abkürzungsverzeichnis	28
3. Erklärung des Eigenanteils	29
4. Danksagung.....	30
5. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
6. Eidesstattliche Versicherung.....	31

**Für meine Eltern
und Niklas**

1. Publikation

Lung Cancer 81 (2013) 123–129



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Lung Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan



C-X-C motif receptor 2, endostatin and proteinase-activated receptor 1 polymorphisms as prognostic factors in NSCLC[☆]

Faik Güntac Uzunoglu^{a,1}, Neda Yavari^{a,1}, Benjamin Alexander Bohn^a, Michael Fabian Nentwich^a, Matthias Reeh^a, Klaus Pantel^b, Daniel Perez^a, Tung Yu Tsui^a, Maximilian Bockhorn^a, Oliver Mann^a, Jakob Robert Izbicki^a, Harriet Wikman^b, Yogesh Kumar Vashist^{a,*}

^a Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center of Hamburg-Eppendorf, Germany

^b Department of Tumour Biology, University Medical Center of Hamburg-Eppendorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2012

Received in revised form 10 January 2013

Accepted 6 March 2013

Keywords:

Lung cancer

Angiogenesis

Polymorphisms

C-X-C motif receptor 2

Endostatin

Proteinase-activated receptor 1

Survival

ABSTRACT

The progress of non-small cell lung cancer (NSCLC) is dependent on sufficient angiogenesis. Thrombin induced activation of proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) on platelets leads to platelet secretion and aggregation. This influences cell survival, apoptosis and angiogenesis by the release of VEGF and Endostatin (ES), a potent angiogenesis inhibitor. Interleukin-8 (IL-8) induces tumor angiogenesis independent of the VEGF pathway through the chemokine C-X-C motif receptor 2 (CXCR-2). Our purpose was to evaluate germline polymorphisms of these potential therapy targets as prognostic markers for disease free survival (DFS) and overall survival (OS) in surgically treated NSCLC patients. In total 209 Caucasian patients, treated between 1996 and 2011, were included in this study. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes. Genotyping of CXCR-2 +1208 C>T and +785 C>T, PAR-1 -506 Ins/del and -14 Ivs A>T and ES +4349 G>A was performed by TaqMan[®] genotyping assays or by polymerase chain reaction (PCR) followed by capillary electrophoresis. Chi-square test, Kaplan–Meier estimator and cox regression hazard model were used to assess the prognostic value of selected polymorphisms. The PAR-1 -14 Ivs A/A genotype was associated with advanced tumor stages ($p=0.024$) and, in univariate analysis, with shorter median OS in squamous cell lung carcinoma (SqCC, $p=0.035$). The CXCR-2 +1208T/T genotype was associated with aggressive tumor biology ($p=0.038$), and shorter DFS and OS ($p=0.018$, $p=0.021$) in NSCLC and especially in SqCC a negative predictor for DFS and OS ($p=0.045$, $p=0.041$). Genotyping of the CXCR-2 +1208 C>T polymorphism could be a useful tool to identify high-risk SqCC subgroups.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The progress of non-small cell lung cancer (NSCLC), the leading cause of cancer death, is dependent on sufficient angiogenesis. Induction of tumor neovascularization (angiogenic switch) is considered as a hallmark of malignant disease progression [1]. The vascular endothelial growth factor (VEGF) and its downstream pathway is one of the key determinants for angiogenesis and promote vascular endothelial cell survival, proliferation, migration and vascular permeability. Therefore not surprisingly, alterations in VEGF or its downstream partners have been associated with tumor progression and prognosis in several tumor entities, including

NSCLC [2–9]. Accordingly, novel anti-angiogenic therapy strategies and mechanisms with assumed impact on tumor angiogenesis are currently under intense evaluation in numerous studies [10]. In NSCLC, several trials have evaluated the impact of the monoclonal antibody bevacizumab (a VEGF-A inhibitor) combined with platinum-based chemotherapy on progression free survival and overall survival [11–13]. Synchronous with an improved survival, an increase of treatment related death is reported and up to now, clinical usage indicates divergent success with a significant number of non-responders, transient short survival benefits and acquired resistance to agents targeting the VEGF pathway [14–16]. Tyrosine kinase inhibitors (TKI) are an additional antiangiogenic approach but do not seem to improve response rates or survival in NSCLC [17]. However, recently published results of the ZODIAC trial are indicating a small progression free survival benefit by combining vandetanib (multi-TKI inhibitor) and docetaxel as a second line treatment in advanced NSCLC patients [18].

These results clearly highlight the necessity of individual risk profile stratification and customized therapy for further therapy improvements. Germline polymorphism of anti-angiogenic

[☆] Financial support was provided by "Erich and Gertrud Roggenbuck Foundation", Lerchenfeld 14, 22081 Hamburg, Germany.

* Corresponding author at: Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center of Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. Tel: +49 40 7410 50170; fax: +49 40 7410 44995.

E-mail address: vashist@uke.de (Y.K. Vashist).

¹ These authors contributed equally to this work.

targets like VEGF might serve as independent prognostic markers regardless of therapy or as predictors of treatment effect on the tumor since they are easy to determine, stable and reproducible [19–21]. We have recently shown that polymorphisms of the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) could serve as potential prognostic factors for survival in NSCLC [22]. A substudy based on the E4599 trial additionally showed an improved survival of patients treated with bevacuzimab and a SNP profile including a VEGF polymorphism, indicating the eligibility of germline polymorphisms as predictors of treatment specific response [13,23]. Univariate results of the recently completed ABIGAIL trial, which aimed to assess the correlation of biomarkers with response rate in patients who receive bevacuzimab in addition to carboplatin-based chemotherapy, supported this hypothesis, although analyzed polymorphisms did not achieve significance in multivariate analysis [24].

However, especially in consideration of reported resistance to antiangiogenic therapy targeting VEGF or VEGFR-2, alternative angiogenesis related targets like the proteinase-activated receptor 1 (PAR-1, F2R), the chemokine C-X-C motif receptor 2 or endostatin (ES, COL18A1) are in focus of several studies and accordingly germline polymorphisms of these targets as well as others involved in angiogenesis might serve as prognostic or predictive markers likewise [25–30]. The aim of this retrospective study was to evaluate the suitability of genetic polymorphisms in PAR-1, ES and CXCR-2 as prognostic markers in primarily surgically treated NSCLC patients.

2. Materials and methods

2.1. Samples

This study was approved by the Ethics Committee of the chamber of physicians, Hamburg, Germany and is in concordance with the "Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies" [31]. Patients who had been diagnosed and surgically treated for primary NSCLC between 1996 and 2010 were evaluated for inclusion in this study ($n=539$). Synchronous other malignancies, palliative surgery, histopathological diagnosis aberrant of adenocarcinoma (AC) or squamous cell carcinoma (SqCC) of the lung, unavailable DNA samples or denial to sign informed consent, led to exclusion. The final study population consisted of 209 patients. Clinicopathological data was extracted from a prospective database. Follow-up data were obtained by interviews with general practitioner or patient himself at the out patient department. All patients were reclassified according to the seventh edition of the TNM Classification of malignant tumors [32]. Patients staged as \geq Stage II were evaluated for adjuvant chemotherapy with Cisplatin and Vinorelbin since 2004 ($n=75$). Patients staged as Ib were evaluated for adjuvant therapy if the tumor was >4 cm or in patients with V+ or L+ status. Adjuvant chemotherapy followed by radiation (50–60Gy) was discussed for \geq Stage III. Implementation was dependent on general condition after extended surgery ($n=38$).

2.2. Polymorphisms

Selection of polymorphisms was based on following criteria: they had to be well documented and established, a probable functional impact based on preceded publications had to exist, and a minor homozygous allele frequency of at least 5% published for Caucasian populations at National Center for Biotechnology Information Databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) was required. In total five germline polymorphisms were selected for genotyping of the NSCLC samples (CXCR-2 +1208 C>T, rs1126579; CXCR-2 +785 C>T, rs2230054; PAR-1 -506 Ins/del, rs11267092,

PAR-1 -14 Ivs A>T, rs168753 and ES (COL18A1) +4349 G>A, rs12483377).

2.3. DNA extraction, sequencing and genotyping

Peripheral blood leukocyte DNA was extracted and purified by standard procedures using a QIAamp tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentration was determined via NanoDrop® (Wilmington, DE) ND-1000 Spectrophotometer and samples were diluted to 10 ng/ μ l.

SNP genotyping was performed according to the TaqMan® genotyping protocol (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) with 20 ng DNA template. All SNPs were genotyped by existing and ready to order TaqMan® genotyping assays. Each run included positive controls for each genotype, which had been verified by sequencing.

The PAR-1 insertion or deletion (-/GGCCCGGGAAGC) at position -506 (rs11267092) was analyzed by conventional PCR with fluorescent anti-sense primer and subsequent capillary electrophoresis. A sense primer (5'-AACTGAACITTCGCCGGTTC-3') and a fluorescent anti-sense primer (5'-ATTCGCGAAGCTGTGTCAGTG-3') were used for amplification. PCRs were performed in a 10 μ l reaction mix consisting of 10 ng DNA template, 2.5 mM deoxyribonucleotide triphosphate mix (Invitrogen, Darmstadt, Germany), 2.5 pmol sense and antisense primer (MWG, Ebersberg, Germany), 0.25 U Ampli Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) and 5 μ l nuclease-free water. PCR conditions consisted of repeated cycles at 95°, 55°, and 72 °C for 30 s to 2 min. The sizes of the amplified fragments were determined by capillary electrophoresis with an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) using a composition of 40 ml formamide (Hi-Di), 0.2 μ l Genescan-500-ROX Standard as well as 0.1 μ l of PCR product and denaturation at 94 °C for 2 min. For quality assurance in total 10% of used samples were randomly selected and genotype detection was repeated. Genotype concordance was $\geq 99\%$.

2.4. Statistical analysis

For statistical analysis, SPSS 19.0 for MAC (SPSS Inc., Chicago, IL) was used. Correlation between polymorphisms and clinicopathological parameters were assessed by the Chi-square test. Homozygous and heterozygous at risk genotypes were combined together in a dominant model in case of a homozygous at risk genotype frequency of $\leq 10\%$ (PAR-1 -506 Ins/del, PAR-1 -14 Ivs A>T, and ES +4349 G>A). Survival curves of the patients were plotted using the Kaplan–Meier method and analyzed using the log rank test. Results are presented as median survival with 95% confidence interval (95% CI) and number of patients at risk. Mean values are presented and specifically indicated in case of not reaching the median survival. The overall survival (OS) was computed as the time period from the date of surgery to either the date of death or last follow-up, whichever occurred first. The disease free survival (DFS) was defined as the time period from the date of surgery to the date of recurrence, last follow-up or date of death, whichever occurred first. Patients alive without recurrence at the last follow-up date were censored and in hospital mortality (within 30 days after surgery) led to exclusion from survival analysis. Cox regression hazard model was used for multivariate analysis. Results are presented as hazard ratio (HR) and 95% CI. Significant statements refer to p -values of two-tailed tests that were <0.05 .

3. Results

3.1. Study cohort

The original study cohort consisted of 209 Caucasian patients, treated between 1996 and 2011. The median age of the study

population was 64.9 years (range 37.5–91.9). None of the patient received neoadjuvant therapy. The study cohort contained seven patients with distant metastasis (singular brain metastases, lung surgery after neurosurgical resection) and in total 19 patients displayed positive resection margins after surgery. After excluding 12 patients who died within 30 days after surgery (AC=4, SqCC=8), the study population for survival analysis consisted of 197 patients, including 106 patients with AC and 91 patients with SqCC. Out of these 68 patients received adjuvant therapy, 125 patients developed a relapse and 123 patients died within the follow up period (median 32.4 month, range 1.1–147.6). Detailed clinicopathological characteristics and survival data are shown in Table S1 for the whole study population, in Table S2 for AC subgroup and in Table S3 for SqCC subgroup (Supplemental Digital Content).

3.2. Polymorphisms

In total five germline polymorphisms were investigated. Except CXCR-2 +785 C>T polymorphism, which was excluded from analysis due to a prevailing heterozygous genotype (>95% C/T genotype), allele frequencies were in concordance to published frequencies at the National Center for Biotechnology Information Databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and were in Hardy-Weinberg equilibrium.

3.3. CXCR2 +1208 C>T polymorphism

Analysis of histopathological characteristics revealed significant a correlation between T/T genotype and risk factors such as larger with tumor size, advanced grading and higher UICC stage ($p < 0.05$, Table 1). When all patients were studied together, the majority of patients with pT3/4 had a T/T genotype (43.9%, $n = 25$, $p = 0.004$), 63% ($n = 34$) of patients with a T/T genotype had undifferentiated tumors (grade 3, $p = 0.006$) and 42.6% ($n = 23$) of patients with a T/T genotype had an UICC stage III/IV ($p = 0.018$). In AC subgroup tumor grading did not reach statistical significance and the UICC stage revealed a borderline significant correlation ($p = 0.056$), but in addition a correlation with positive nodal status was found ($p = 0.043$). In SqCC subgroup an advanced tumor grading revealed significant correlations with the T/T genotype (G3: 46.3%, $n = 19$, $p = 0.025$). Results of univariate survival analysis showed, that patients with the T/T genotype had the shortest median DFS (T/T: 14.8 month

T/T versus C/C: 35.8 month, $p = 0.018$) and OS (24.4 month versus 45.4 month, $p = 0.031$). Results of the SqCC subgroup are in line with the results of the whole study cohort (DFS 13.0 month versus 35.8 month, $p = 0.021$ and OS 15.4 month versus 68.7 month, $p = 0.016$) whereas no correlation of a genotype with survival was evident in the AC subgroup. Detailed results of univariate survival analysis are given in Tables 2 and 3. Multivariate analysis identified the T/T genotype as a negative prognostic factor for DFS ($p = 0.045$, HR 2.13) and OS ($p = 0.041$, HR 2.20) in the SqCC subgroup whereas results based on the whole study population or on AC subgroup did not reach significance (Table 4 and Fig. 1).

3.4. PAR-1 -14 Ivs A>T polymorphism

Analysis of histopathological characteristics revealed no significant correlations with clinicopathological characteristics except a borderline correlation in regard to death ($p = 0.053$, Table 1) when the whole study group was analyzed together. Results were comparable in the AC subgroup. In contrast, strong correlations were evident in the SqCC subgroup. The PAR-1 -14 Ivs A/A genotype was associated with advanced tumor size (pT3/4: 72.4%, $n = 24$, $p = 0.012$), nodal status (pN2/3: 87.5%, $n = 14$, $p = 0.045$) and tumor stage (stage III/IV: 80.6%, $n = 29$, $p = 0.024$). Furthermore, patients with A/A genotype developed predominantly a relapse and suffered from death ($p = 0.003$ and $p < 0.0001$, Table 1). Overall survival analysis underlined these correlations. Patients with A/A genotype had a shorter median overall survival in contrast to A/T and T/T genotypes (26.61 months vs. 90.50 months, $p = 0.035$). Concerning DFS, results were comparable, but statistical analysis did not reach significance ($p = 0.105$, Table 2). The multivariate analysis did not identify the PAR-1 -14 Ivs A>T polymorphism as an independent prognostic factor for OS ($p = 0.236$, Table 4 and Fig. 1).

3.5. PAR-1 -506 Ins/Del polymorphism

The Par-1 -506 Ins/Del polymorphism showed significant correlations with nodal status in AC subgroup. In nodal negative patients homozygous deletion at position -506 was predominant (65.6%, $n = 42$, $p = 0.004$). This was also observed within the whole study population but without reaching significance ($p = 0.065$, Table 1). In relation to DFS and OS no correlation was evident, neither in the whole study population nor in the subgroups (Tables 2 and 3).

Table 1
Correlation of polymorphisms with clinicopathological characteristics.

	ALL	AC	SqCC
CXCR2 +1208 C>T			
pT category	$p = 0.004$	$p = 0.011$	n.s.
pN category	n.s.	$p = 0.043$	n.s.
Grading	$p = 0.006$	n.s.	$p = 0.025$
Tumor stage	$p = 0.018$	$p = 0.056$	n.s.
Recurrence	n.s.	n.s.	n.s.
Death	n.s.	n.s.	n.s.
Par-1 -14 Ivs A>T			
pT category	n.s.	n.s.	$p = 0.012$
pN category	n.s.	n.s.	$p = 0.045$
Grading	n.s.	n.s.	n.s.
Tumor stage	n.s.	n.s.	$p = 0.024$
Recurrence	n.s.	n.s.	$p = 0.003$
Death	$p = 0.053$	n.s.	$p < 0.0001$
Par-1 -506 Ins/Del			
pT category	n.s.	n.s.	n.s.
pN category	$p = 0.065$	$p = 0.004$	n.s.
Grading	n.s.	n.s.	n.s.
Tumor stage	n.s.	n.s.	n.s.
Recurrence	n.s.	n.s.	n.s.
Death	n.s.	n.s.	n.s.

p values are based on log rank test. ES +4349 G>A polymorphism showed no correlations with clinicopathological characteristics.

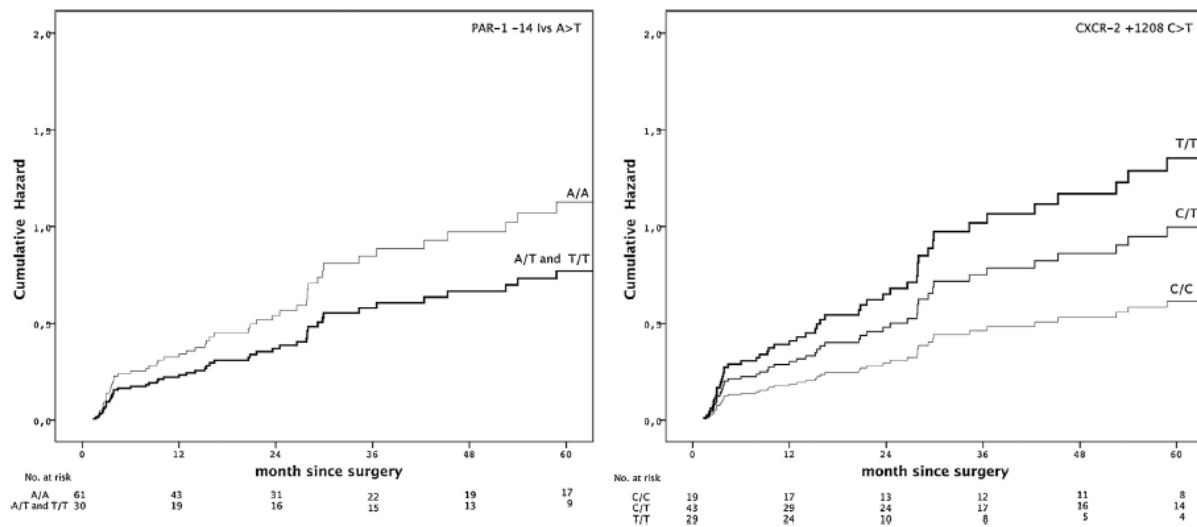


Fig. 1. Cumulative hazard plots for overall survival in 91 patients with squamous cell lung carcinoma, stratified by age, gender, tumor stage and resection status including two polymorphisms that showed significant correlations in univariate analysis. PAR-1 -14 Ivs A>T, HR 1.46, $p=0.236$ (A/A versus A/T and T/T); CXCR-2+1208 C>T, HR 2.20, $p=0.041$ (C/C versus T/T). Survival curves were truncated when the numbers at risk were less than one-third of the starting figure.

3.6. Endostatin +4349 G>A polymorphism

The endostatin +4349 G>A polymorphism did not reveal significant correlations with tumor characteristics. Univariate survival analysis of the whole study population indicates a shorter DFS in homozygous G allele carriers (24.2 month vs. 70.7 month, $p=0.036$, Table 2) but was not observed in multivariate analysis (data not shown).

4. Discussion

Tumor stage, followed by age and sex are established prognostic factors for surgically treated NSCLC patients [17]. Germline polymorphisms may contribute to further improvement of individual prognosis estimation and prediction of individual treatment effects, if they are proven to be independent of established prognostic clinicopathological characteristics [20]. Our results demonstrate that the CXCR-2 +1208 C>T polymorphism could be a prognostic biomarker in lung SqCC patients, which is independent of tumor stage, age and sex. The T/T genotype of the CXCR-2 +1208 polymorphism showed strong correlations with more aggressive tumor biology and was an independent negative prognostic marker for DFS and OS in patients with SqCC with a HR>2 ($p<0.05$, Table 4 and Fig. 1). Univariate results indicate a corresponding impact on survival also in AC, but this was not evident after stratification in multivariate analysis. A possible explanation could be a reported cell type dependent hypoxia response in NSCLC. Eilertsen et al. recently reported their in vitro results with hypoxia induced pro-angiogenic response by increase of VEGF-A expression only in AC but not in SqCC [33]. We previously reported of prognostic VEGFR-2 polymorphisms in NSCLC patients [22]. In concordance with the in vitro results of Eilertsen et al. VEGFR-2 polymorphisms were identified mostly in the AC subgroup as independent prognostic markers for DFS and OS. Cell type specific response to hypoxia could be a reason for reported dissimilar response to chemotherapy and targeted agents in clinical trials [34]. Angiogenesis in SqCC may be dependent on alternative pathways, whereas in AC VEGF mediated angiogenesis may put the impact of cytokine-mediated angiogenesis in shadow. Fukuyama et al. reported a correlation of microvessel density with Interleukin-8 (IL-8) in vitro in lung cancer

cell lines, underlining the presumed role of cytokines in angiogenesis. In line with these data, our cell type specific findings may be conclusive, since IL-8 promotes VEGF independent angiogenesis through CXCR-2 [16]. Although data on the functional impact of the +1208 C>T polymorphism are due yet, the +1208 C>T polymorphism in the 3' untranslated region of exon 3 might have an impact on mRNA processing, stability or translation and results of Snoussi et al. demonstrated that CXCR-2 +1208 T allele is associated with a poor outcome likewise in breast cancer [35,36]. The CXCR-2 +1208 C>T polymorphism might therefore be a suitable prognostic marker in SqCC lung cancer patients and in addition worth to be evaluated as a predictive biomarker to identify patients with improved response to anti-angiogenic therapy targeting chemokine mediated angiogenesis.

In addition to CXCR-2 +1208 C>T, the PAR-1 -14 Ivs A/T polymorphism showed a strong correlation with more aggressive tumor characteristics and with univariate OS analysis in SqCC patients. The presence of a T allele was associated with less aggressive tumor biology and improved OS. Dupont et al. were able to prove that the density of PAR-1 on platelets is dependent on the -14 Ivs A>T polymorphism with a significant lower expression level of PAR-1 in T allele carriers [37].

Since PAR-1 regulates the VEGF release from platelets and the T allele leads to a lower expression of PAR-1, the VEGF induced angiogenesis may be decreased in T-allele carriers [26,28]. We were not able to identify the PAR-1 -14 Ivs A>T polymorphism as an independent prognostic marker in NSCLC patients. Our results are in concordance to results of adenocarcinoma in gastric and oesophageal carcinoma published before [38,39]. In these tumor entities the PAR-1 -506 Ins/del polymorphism was identified as prognostic marker but not the PAR-1 -14 Ivs A>T polymorphism. In our AC study cohort, patients homozygous for a 13-bp (5'-CGGCCGCGGAAG-3') deletion within the promoter at position -506 of PAR-1 showed a strong correlation with lack of nodal metastasis but without impact on DFS or OS in AC subgroup.

Endostatin is a potent anti-angiogenic growth factor and the A allele of +4349 G>A polymorphism was shown to be potentially responsible for impaired anti-angiogenic function of endostatin [40]. Our results did not support the hypothesis of an impaired anti-angiogenic function and accordingly advanced tumor angiogenesis

Table 2
Polymorphisms and disease free survival.

NSCLC	Adenocarcinoma subgroup			Squamous cell carcinoma subgroup				
	n-197 (%)	Month (95% CI)	HR (95% CI)	p	n-106 (%)	Month (95% CI)	HR (95% CI)	p
CXCR2 +1208 C>T								
C/C	51 (25.9)	35.8 (18.2–53.4)	Reference		32 (30.2)	41.0 (4.7–77.3)	Reference	
C/T	96 (48.7)	26.2 (14.0–38.4)	1.28 (0.82–1.99)	0.280	53 (50.0)	26.5 (5.4–47.5)	1.22 (0.68–2.19)	0.489
T/T	50 (25.4)	14.8 (7.9–21.7)	1.85 (1.13–3.03)	0.018	21 (19.8)	17.4 (0.6–34.2)	1.54 (0.75–3.14)	0.320
Par-1 -14 Ivs A>T								
A/A	131 (66.5)	24.0 (17.6–30.4)	1.19 (0.81–1.73)	0.376	70 (66.0)	31.7 (14.4–49.0)	0.90 (0.54–1.49)	0.672
A/T ^a	63 (32.0)	32.4 (14.4–50.4)	Reference		36 (34.0)	21.8 (6.6–37.0)	Reference	
T/T ^a	3 (1.5)				0 (0.0)			
PAR-1 -506 Ins/del								
Del/Del	108 (54.8)	21.5 (9.0–33.9)	1.11 (0.79–1.57)	0.554	57 (53.8)	30.0 (7.5–52.5)	0.85 (0.52–1.39)	0.518
Del/Ins ^a	74 (37.6)	28.4 (19.8–37.0)	Reference		39 (36.8)	26.2 (14.0–38.4)	Reference	
Ins/Ins ^a	15 (7.6)				10 (9.4)			
ES +4349 G>A								
G/G	171 (86.8)	24.2 (27.3–114.1)	1.83 (1.03–3.26)	0.036	98 (92.5)	26.5 (15.3–37.6)	2.30 (0.72–7.34)	0.147
G/A ^a	25 (12.7)	70.7 (16.8–31.6)	Reference		8 (7.5)	70.7 (0.0–148.3)	Reference	
A/A ^a	1 (0.5)				0 (0.0)			

p values are based on log-rank test:

^a Frequencies <10% are grouped together in a dominant model.

^b Mean, median not reached.

Table 3
Polymorphisms and overall survival.

NSCLC	Adenocarcinoma subgroup			Squamous cell carcinoma subgroup				
	n-197 (%)	Month (95% CI)	HR (95% CI)	p	n-106 (%)	Month (95% CI)	HR (95% CI)	p
CXCR2 +1208 C>T								
C/C	51 (25.9)	45.4 (26.2–64.7)	Reference		32 (30.2)	40.6 (14.6–66.6)	Reference	
C/T	96 (48.7)	32.4 (20.7–44.1)	1.26 (0.81–2.00)	0.320	53 (50.0)	38.5 (19.2–57.8)	1.48 (0.75–2.92)	0.778
T/T	50 (25.4)	24.4 (7.2–41.6)	1.74 (1.05–2.88)	0.031	21 (19.8)	30.2 (4.7–55.7)	2.21 (1.07–4.58)	0.638
Par-1 -14 Ivs A>T								
A/A	131 (66.5)	29.8 (23.1–36.5)	1.33 (0.90–1.98)	0.150	70 (66.0)	36.8 (29.0–44.6)	1.91 (1.04–3.53)	0.816
A/T ^a	63 (32.0)	52.5 (14.4–90.6)	Reference		36 (34.0)	23.9 (0.00–60.7)	Reference	
T/T ^a	3 (1.5)				0 (0.0)			
PAR-1 -506 Ins/del								
Del/Del	108 (54.8)	26.6 (10.6–42.6)	1.17 (0.82–1.67)	0.386	57 (53.8)	40.6 (13.6–67.6)	1.41 (0.85–2.35)	0.817
Del/Ins ^a	74 (37.6)	34.8 (18.5–51.1)	Reference		39 (36.8)	34.6 (24.2–45.0)	Reference	
Ins/Ins ^a	15 (7.6)				10 (9.4)			
ES +4349 G>A								
G/G	171 (86.8)	29.8 (22.1–37.5)	1.65 (0.93–2.94)	0.086	98 (92.5)	34.8 (21.0–48.6)	1.92 (0.60–1.93)	0.265
G/A ^a	25 (12.7)	70.7 (35.0–106.4)	Reference		8 (7.5)	70.7 (2.3–139.1)	Reference	
A/A ^a	1 (0.5)				0 (0.0)			

p values are based on log-rank test:

^a Frequencies <10% are grouped together in a dominant model.

Table 4
Multivariable analysis for squamous cell lung carcinoma subgroup.

	Disease free survival		Overall survival	
	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
Age, years				
<60	Reference		Reference	
≥60	1.77 (0.92–3.40)	0.086	1.79 (0.93–3.45)	0.081
Gender				
male	Reference		Reference	
female	1.43 (0.79–2.59)	0.239	1.24 (0.67–2.27)	0.497
Tumor stage				
I	Reference		Reference	
II	1.22 (0.59–2.54)	0.587	1.38 (0.65–2.95)	0.408
III–IV ^a	2.85 (1.41–5.77)	0.004	3.11 (1.48–6.58)	0.003
Resection status				
negative	Reference		Reference	
positive	1.88 (0.88–3.99)	0.103	1.89 (0.88–4.05)	0.101
CXCR2 +1208 C>T				
C/C	Reference		Reference	
C/T	1.42 (0.711–2.83)	0.322	1.62 (0.81–3.28)	0.175
T/T	2.13 (1.02–4.47)	0.045	2.20 (1.03–4.71)	0.041
Par-1 -14 Ivs A>T				
A/A			1.46 (0.78–2.74)	0.236
A/T and T/T ^a			Reference	

Cox regression hazard model stratified by age, gender, tumor stage and resection status was used for disease free survival. In accordance to univariate analysis Par-1 -14 Ivs A>T was additionally included for overall survival.

^a Frequencies <10% are grouped together in a dominant model.

in presence of an A allele in SqCC or AC. In contrast, our results indicate a tendency toward longer DFS and OS of A allele carriers in SqCC. Even though heterozygous and homozygous A allele carriers were grouped together, the total number of A allele carriers was only 18. Accordingly, a bias is possible and a larger cohort is necessary to reevaluate the impact of the +4349G>A polymorphism on DFS and OS in NSCLC.

Our purpose was the evaluation of angiogenesis related germline polymorphisms in a preliminary study cohort setting and reported results obviously have to be verified in an independent larger study cohort. Furthermore, the study population consists of patients treated from 1996 to 2010. Adjuvant therapy regimes are implemented since 2004 at the study hospital and accordingly the cohort includes a clinical heterogeneous group of patients. However, multivariate analysis stratified for adjuvant therapy did not affect the significance of our results.

5. Conclusion

We were able to identify the CXCR-2 +1208 C>T polymorphism as an independent prognostic marker in patients with SqCC of the lung. The eligibility as a predictive biomarker for therapies targeting chemokine-mediated angiogenesis seems worth to be evaluated.

Conflict of interest statement

All authors disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work.

Acknowledgement

Authors thank Jolanthe Kropidowski, Ute Eicke-Kohlmorgen and Petra Merkert for excellent technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.03.007>.

References

- [1] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401–10.
- [2] Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 1997;79:233–69.
- [3] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029–39.
- [4] Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1995;177:57–63.
- [5] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011–27.
- [6] Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992;340:145–6.
- [7] Meert AP, Paesmans M, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Verdebout JM, et al. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2002;87:694–701.
- [8] O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Cox G, Turley H, Steward WP, et al. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1427–32.
- [9] Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, Liu W, Stoeltzing O, Fan F, et al. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech* 2003;60:199–207.
- [10] Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005;23:3243–56.
- [11] Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2184–91.
- [12] Reck M, von Pawel J, Zatrouk P, Ramlau R, Corbounova V, Hirsh V, et al. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAiL). *Ann Oncol* 2010;21:1804–9.
- [13] Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542–50.
- [14] Ellis LM, Hicklin DJ. Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:6371–5.
- [15] Loges S, Schmidt T, Carmeliet P. Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes Cancer* 2010;1:12–25.
- [16] Teicher BA. Antiangiogenic agents and targets: a perspective. *Biochem Pharmacol* 2011;81:6–12.
- [17] Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, et al. Non-small-cell lung cancer. *The Lancet* 2011;378:1727–40.
- [18] Herbst RS, Sun Y, Eberhardt WE, Germonpre P, Saijo N, Zhou C, et al. Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:619–26.
- [19] Coate LE, John T, Tsao MS, Shepherd FA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2009;10:1001–10.
- [20] Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer* 2008;44:946–53.
- [21] Van Ness B, Ramos C, Haznadar M, Hoering A, Haessler J, Crowley J, et al. Genomic variation in myeloma: design, content, and initial application of the bank on a cure SNP panel to detect associations with progression-free survival. *BMC Med* 2008;6:26.
- [22] Uzunoglu FG, Kaufmann C, Wikman H, Gungor C, Bohn BA, Nentwich MF, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 gene polymorphisms as predictors for tumor recurrence and overall survival in non-small-cell lung cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2159–68.
- [23] Schneider BP, Shen F, Miller KD. Pharmacogenetic biomarkers for the prediction of response to antiangiogenic treatment. *Lancet Oncol* 2012;13:e427–36.
- [24] Pallaud CMR, Juhasz E, Szima B, Yu C-J, Burdaeva O, Orlov S, et al. Clinical genotyping and efficacy outcomes: exploratory biomarker data from the phase II ABIGAIL study of 1st-line bevacizumab + chemotherapy in non-squamous non-small-cell lung cancer (NS-NSCLC). *Ann Oncol* 2012;23(Suppl 9):ix400–46.
- [25] Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258–64.
- [26] Italiano Jr JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic

- proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* 2008;111:1227–33.
- [27] Ma L, Elliott SN, Cirino G, Buret A, Ignarro LJ, Wallace JL. Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6470–5.
- [28] Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:216–20.
- [29] Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 1998;352:1775–7.
- [30] Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6735–41.
- [31] McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol* 2005;23:9067–72.
- [32] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. International union against cancer. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010.
- [33] Marte Eilertsen IP, Andersen S, Martinez I, Donnem T, Busund L-T, Bremnes RM. In NSCLC VEGF – a response to hypoxia may differ between squamous cell and adenocarcinoma histology. *Anticancer Res* 2012;32:4729–36.
- [34] Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:5311–20.
- [35] Renzoni E, Lympny P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXCR2 receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1633–40.
- [36] Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Fekih M, Khairi H, Helal AN, et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer* 2010;10:283.
- [37] Dupont A, Fontana P, Bachelot-Loza C, Reny JL, Bieche I, Desvard F, et al. An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood* 2003;101:1833–40.
- [38] Lurje G, Husain H, Power DG, Yang D, Groshen S, Pohl A, et al. Genetic variations in angiogenesis pathway genes associated with clinical outcome in localized gastric adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2010;21:78–86.
- [39] Lurje G, Leers JM, Pohl A, Oezcelik A, Zhang W, Ayazi S, et al. Genetic variations in angiogenesis pathway genes predict tumor recurrence in localized adenocarcinoma of the esophagus. *Ann Surg* 2010;251:857–64.
- [40] Iughetti P, Suzuki O, Godoi PH, Alves VA, Sertie AL, Zorick T, et al. A polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:7375–8.

c-x-c Motiv Rezeptor 2, Endostatin und Proteinase-aktivierter Rezeptor-1-Polymorphismus als prognostischer Faktor beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

2. Zusammenfassende Darstellung

2.1 Einleitung

Das Lungenkarzinom gehört zu den weltweit häufigsten Krebserkrankungen und stellt ca. 25% aller malignen Tumoren dar. Bei Frauen ist es mittlerweile die dritthäufigste Krebsform und bei Männern die häufigste Krebsart und malignombedingte Todesursache (International Agency for Research on Cancer 2012). Rauchen stellt den Hauptrisikofaktor für die Ausbildung eines Lungenkarzinoms dar (Furrukh M. 2013). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet zwischen dem kleinzelligen (SCLC, small cell lung cancer) und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC, non-small cell lung cancer). Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom wird weiter unterteilt in das Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und das großzellige Karzinom.

Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ist die Progredienz der Tumorerkrankung von einer suffizienten Angiogenese abhängig (Brown et al. 1997, Dvorak et al. 1995, Fontanini et al. 1995, Herbst et al. 2005, Hickling et al. 2005, Macchiarini et al. 1992, Meert et al. 2002, O'Byrne et al. 2000). Die Induktion der Gefäßneubildung („angiogener Schalter“) wird als das Kennzeichen der malignen Tumorprogression betrachtet (Bergers et al. 2003). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und sein nachgeschalteter Pfad sind einer der Schlüsselfaktoren für die Angiogenese und fördern das vaskuläre endotheliale Zellüberleben, die Zellproliferation und Zellmigration, sowie die Gefäßpermeabilität. Der VEGF Pfad wird deshalb mit der Tumorprogression und der Prognose einiger Tumorentitäten assoziiert, einschließlich des NSCLC (Brown et al. 1997, Dvorak et al. 1995, Fontanini et al. 1995, Herbst et al. 2005, Hickling et al. 2005, Macchiarini et al. 1992, Meert et al. 2002, O'Byrne et al. 2000, Reinmuth et al. 2003). Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit Therapien, die gegen die Tumorangiogenese gerichtet sind, intensiv und in zahlreichen Studien untersucht (Herbst et al. 2005).

Beim NSCLC haben mehrere Studien die Auswirkung des monoklonalen Antikörper Bevacizumab (ein VEGF-A-Hemmer) in Kombination mit platinbasierter Chemotherapie auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben

ausgewertet (Johnson et al. 2004, Reck et al. 2010, Sandler et al. 2006). Bis jetzt zeigt die klinische Anwendung einen divergierenden Erfolg (Ellis et al. 2008, Loges et al. 2010, Teicher et al. 2011). Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) sind ein zusätzlicher antiangiogener Ansatz, aber sie scheinen nicht die Ansprechrate oder das Überleben beim NSCLC zu verbessern (Goldstraw et al. 2011). Allerdings zeigen Ergebnisse der ZODIAC Studie (ZACTIMA in combination with Docetaxel In non-small cell lung Cancer), dass es einen kleinen progressionsfreien Überlebensvorteil durch die Kombination von Vandetanib (Multi-TKI-Inhibitor) und Docetaxel als Zweitlinientherapie bei fortgeschrittener Tumorerkrankung gibt (Herbst et al. 2010).

Die genannten Ergebnisse zeigen deutlich die Notwendigkeit der individuellen Risikoprofilerstellung und einer individuellen Therapie für weitere Behandlungsverbesserungen. Optimalerweise sollte dies anhand eines Biomarkerprofils bereits vor Therapiebeginn angestrebt werden.

Derzeit stehen jedoch insbesondere in Bezug auf antiangiogene Therapien keine etablierten prognostischen und prädiktiven Biomarker für das Bronchialkarzinom zur Verfügung. Der ideale Biomarker zeichnet sich durch Stabilität und Reproduzierbarkeit aus. Keimbahn-Polymorphismen, die funktionell aktiv sind, erfüllen diese Kriterien und können potentiell als prognostische und prädiktive Marker dienen (Coate et al. 2009, Oldenhuis et al. 2008, Van Ness et al. 2008).

Polymorphismen stellen Genvarianten innerhalb einer Population dar, die durch Mutationen entstanden sind. Polymorphismen können in unterschiedlichen Varianten auftreten, so unterscheidet man beispielsweise einen Einzelnukleotid-polymorphismus mit dem Austausch einer einzelnen Base von einem Insertions- oder Deletionspolymorphismus mit dem Einbau bzw. Verlust von mindestens einer Base. Weiterhin sind Polymorphismen zu nennen, die eine Variation der Anzahl an Kopien einzelner DNA-Abschnitte enthalten (Längenpolymorphismen).

Dass sich Keimbahnpolymorphismen als potentielle Biomarker eignen können, konnte bereits im Rahmen von Studien aufgezeigt werden (E4599-Studie, ABIGAIL-Studie) - es zeigten sich verbesserte Überlebensraten bei Patienten mit einem spezifischen Polymorphismus im VEGF – Gen, die sich einer Behandlung mit Bevacuzimab unterzogen hatten, so dass im Umkehrschluss der Polymorphismus als potentieller prädikativer Biomarker für den Therapieerfolg unter Bevacuzimab herangezogen werden kann. Voraussetzung hierfür wäre jedoch die Stratifizierung in

größeren Studienpopulationen (Sandler et al. 2006, Schneider et al. 2012, Pallaud et al. 2012)

Auch müssen, unter Berücksichtigung der berichteten Resistenzen der gegen VEGF bzw. den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (VEGFR-2) gerichteten antiangiogenetischen Therapien, alternative Angriffspunkte in Betracht gezogen werden. Zu nennen wären hier zum Beispiel der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR-1, F2R), der Chemokin CXC-Motiv-Rezeptor 2 (CXCR-2) oder Endostatin (ES, COL18A1). Die Thrombin-induzierte Aktivierung von PAR-1 auf Thrombozyten führt zur Blutplättchen-Aggregation und Sekretion. Durch die Freisetzung von VEGF und ES, der ein potentieller Angiogenesehemmer ist, wird das Zellüberleben, die Apoptose und die Angiogenese beeinflusst. Interleukin-8 (IL-8) induziert unabhängig vom VEGF-Pfad die Tumorangio-genese über CXCR-2. Keimbahn-Polymorphismen innerhalb der genannten Gene sind zuletzt im Fokus mehrerer Studien gewesen, da sie als potentielle prognostische oder prädiktive Marker genutzt werden könnten (Coughlin et al. 2000, Italiano et al. 2008, Ma et al. 2001, Pinedo et al. 1998, Waugh et al. 2008).

Das Ziel dieser experimentellen Studie war es, die Eignung von ausgewählten Polymorphismen innerhalb der PAR-1-, ES und CXCR-2 Gene als prognostischen Marker bei chirurgisch behandelten NSCLC-Patienten zu evaluieren.

2.2 Material und Methoden:

2.2.1 Proben

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg bewilligt. Es wurden insgesamt 539 Patienten (n=539), bei denen ein nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom diagnostiziert und chirurgisch von 1996 bis 2010 behandelt wurde, für die Studie evaluiert. Die Ausschlusskriterien für die Studie waren: simultane anderweitige Malignome, palliative Operationen, histopathologische Diagnosen abweichend vom Adenokarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Lunge, nicht verfügbare DNA-Proben oder die Ablehnung zur Teilnahme an der Studie. Die finale Population bestand aus 209 Patienten. Die klinisch-pathologischen Daten wurden aus einer prospektiv angelegten Datenbank entnommen. Die Nachsorge-Daten (Follow-up) wurden durch Befragungen der Hausärzte oder der Patienten selbst gewonnen. Alle Patienten wurden gemäß der 7. Version der TNM-Klassifikation klassifiziert (Sobin et. Al. 2011). Patienten mit einem UICC (Union Internationale Contre le Cancer) Stadium >II erhielten nach 2004 eine adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin und Vinorelbin. Bei Patienten im Stadium Ib und einem Tumor >4cm, sowie bei Patienten mit vaskulärer oder lymphogener Invasion (V+ oder L+) wurde ebenfalls eine adjuvante Therapie durchgeführt. Die adjuvante Chemotherapie, gefolgt von einer Strahlentherapie (50-60 Gy) erfolgte für Patienten im Stadium ≥II. Die finale Implementierung der angestrebten Therapie war abhängig vom postoperativen Allgemeinzustand des Patienten.

2.2.2 Polymorphismen

Die Auswahl von Polymorphismen erfolgte nach Begutachtung bisher veröffentlichter Ergebnisse in Abhängigkeit von Funktionalität des Polymorphismus sowie einer ausreichenden Allelfrequenz von mindestens 5% entsprechend der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Insgesamt wurden fünf Keimbahnpolymorphismen für die Genotypisierung der NSCLC-Proben ausgewählt:

- CXCR-2 +1208 C>T, rs1126579
- CXCR-2 +785 C>T, rs2230054
- PAR-1 -506 Ins/del, rs11267092
- PAR-1 -14 lvs A>T, rs168753
- ES (COL18A1) +4349 G>A, rs12483377.

2.2.3 DNA-Extraktion, Sequenzierung und Genotypbestimmung

Aus den Leukozyten des peripheren Blutes wurde DNA extrahiert und der Genotyp der Einzelnukleotidpolymorphismen gemäß des TaqMan®-Protokolls (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) bestimmt. Bei jedem Durchlauf war eine Positivkontrolle für homozygote Genotypen vorhanden, die durch eine Sequenzierung verifiziert wurde.

Die PAR-1 Insertion oder Deletion (-/GGCCGCGGGAAGC) an Position -506 (rs11267092) wurde durch eine konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Kapillarelektrophorese mit einem ABI-Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Calsbad, USA) analysiert.

Zur Qualitätssicherung wurden insgesamt 10% der verwendeten Proben zufällig ausgewählt. Die Übereinstimmung der Resultate betrug $\geq 99\%$.

2.3 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde SPSS® 19.0 für MAC® (SPSS Inc., Chicago, IL) verwendet. Die Korrelationen zwischen Polymorphismen und klinisch-pathologischen Parametern wurden durch den Chi-Quadrat-Test berechnet. Allelhäufigkeiten $\leq 10\%$ und Patientencharakteristika mit Häufigkeiten $\leq 10\%$ wurden für die statistische Analyse zusammengefasst.

Das Gesamtüberleben wurde vom Zeitpunkt der Operation bis hin zum erneuten Auftreten, zur letzten Nachsorge oder bis hin zum Tod berechnet, je nachdem welches Ereignis zuerst auftrat. Das rezidivfreie Überleben wurde als die Zeitspanne ab dem Zeitpunkt der Operation bis zum Tod des Patienten oder dem letztem Follow-up, je nachdem was zuerst eintrat, definiert. Patienten ohne Rezidiv zum Zeitpunkt des letzten Nachsorgetermins wurden zensiert, ebenso Patienten die innerhalb von 30 Tagen nach der Operation verstorben sind. Die Überlebenskurven der Patienten wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mit dem Log-Rank-Test analysiert. Unter Einbeziehung von Alter, Geschlecht und UICC Stadium erfolgte eine multivariate Analyse mittels Cox-Regressionsmodell zur prognostischen Aussagekraft der untersuchten Polymorphismen. Die Ergebnisse sind als Hazard-Ratio (HR) mit einem Konfidenzintervall von 95 % dargestellt. Signifikante Aussagen beziehen sich auf P-Werte von zweiseitigen Tests bei einem Wert $< 0,05$.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Studienkohorte

Die Studienkohorte bestand aus 209 kaukasischen Patienten, die zwischen 1996 und 2011 behandelt wurden. Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer betrug 64,9 Jahre (37,5 bis 91,9 Jahre). Keiner der Patienten erhielt eine neoadjuvante Therapie. Die Studienkohorte umfasste sieben Patienten mit Fernmetastasen. Insgesamt zeigten 19 Patienten positive Resektionsränder nach der Operation. Nach Ausschluss von 12 Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach der Operation verstarben (AC=4, SqCC=8), bestand die Studienpopulation für die Überlebenszeitanalyse aus 197 Patienten, darunter 106 Patienten mit einem Adenokarzinom und 91 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom.

Von diesen Patienten, erhielten 68 Patienten eine adjuvante Therapie, 125 Patienten entwickelten ein Rezidiv und 123 Patienten verstarben innerhalb des Nachsorgezeitraums.

2.4.2 Polymorphismen

Insgesamt wurden fünf Keimbahn-Polymorphismen untersucht. Der CXCR-2 +785 C>T-Polymorphismus wurde aufgrund einer heterozygoten Allelfrequenz >95% von der Analyse ausgeschlossen. Die übrigen Allelfrequenzen stimmten mit den Zahlen der National Center for Biotechnology Information Databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) überein.

Beim CXCR-2 +1208 C>T Polymorphismus ergab die Analyse der histopathologischen Merkmale eine signifikante Korrelation zwischen dem T/T Genotyp und fortgeschrittener Tumorgröße und Tumor-Grading sowie höherem UICC-Stadium ($p < 0,05$). Basierend auf der gesamten Studienpopulation hatte die Mehrzahl der Patienten mit pT3/4 einen T/T-Genotyp (43,9%, $n=25$, $p=0,004$), 63% ($n=34$) der Patienten mit einem T/T-Genotyp hatten einen undifferenzierten Tumor (Grad 3, $p=0,006$) und 42,6% ($n=23$) der Patienten mit einem T/T-Genotyp hatten einen UICC Stadium III/IV ($p=0,018$). Bei der Adenokarzinom-Subgruppe erreichte das Tumorgrading keine statistische Signifikanz und das UICC-Stadium ergab eine grenzwertige signifikante Korrelation ($p=0,056$), jedoch zeigte sich eine zusätzlich Korrelation mit einem positivem Lymphknotenstatus ($p=0,043$). In der Plattenepithelkarzinom-Untergruppe zeigte sich eine signifikante Korrelation

zwischen fortgeschrittenem Tumorgrading und dem T/T-Genotyp (Grad 3: 46.3 %, n=19, p=0,025). In Bezug auf das Überleben zeigten die univariaten Ergebnisse, dass Patienten mit dem T/T Genotyp eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit (T/T: 14,8 Monate; T/T im Vergleich zu C/C: 35,8 Monate, p=0,018) und Gesamtüberlebenszeit (24,4 Monate gegenüber 45,4 Monate, p=0,031) hatten. Die Ergebnisse der Subgruppe des Plattenepithelkarzinoms stehen im Einklang mit den Ergebnissen der gesamten Studienkohorte (DFS 13,0 Monate im Vergleich zu 35,8 Monate, p=0,021; OS 15,4 Monate im Vergleich zu 68,7 Monate, p=0,016), wohingegen keine negative Korrelation des T/T-Genotyps mit der Überlebenszeit in der Adenokarzinom-Subgruppe bestand. Die multivariate Analyse identifizierte den T/T Genotyp als negativen prognostischen Faktor für das rezidivfreie Überleben (p=0,045, HR 2,13) und das Gesamtüberleben (p=0,041, HR 2,20) in der Plattenepithel-Subgruppe, wohingegen weder in der gesamten Studienpopulation noch in der Adenokarzinom-Subgruppe eine Signifikanz erreicht wurde.

Die Analyse der histopathologischen Merkmale in Korrelation mit dem PAR-1 -14 Ivs A>T Polymorphismus zeigte keine signifikanten Ergebnisse mit Ausnahme einer grenzwertigen Korrelation mit der Mortalität innerhalb der gesamten Studienpopulation (p=0,053). Während die Adenokarzinom-Subgruppe vergleichbare Ergebnisse aufwies, bot die Plattenepithel-Subgruppe signifikante Korrelationen mit klinisch-pathologischen Merkmalen. Der PAR-1 -14 Ivs A/A Genotyp korrelierte mit fortgeschrittener Tumorgröße (pT3/4: 72,4%, n=24, p=0,012), Lymphknotenstatus (pN2/3: 87,5%, n=14, p=0,045) und fortgeschrittenem Tumorstadium (Stadium III/IV: 80,6%, n=29, p=0,024). Darüber hinaus erlitten Patienten mit dem A/A-Genotyp überwiegend ein Rezidiv oder verstarben innerhalb des Nachsorgezeitraums (p=0,003 und p<0,0001). Die Ergebnisse spiegelten sich in den univariaten Überlebensanalysen wieder. Patienten mit dem A/A Genotyp hatten im Vergleich zu Patienten mit dem A/T und T/T-Genotyp eine kürzere mediane Überlebenszeit (26,61 Monate vs. 90,50 Monate). In Bezug auf das rezidivfreie Überleben waren die Ergebnisse vergleichbar, erreichten aber keine Signifikanz (p=0,105). In der multivariaten Analyse konnte der PAR-1 -14 Ivs A>T Polymorphismus nicht als unabhängigen prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben (p=0,236) identifiziert werden.

Der PAR-1 -506 Ins/Del Polymorphismus zeigte signifikante Korrelationen mit dem Lymphknotenstatus in der Adenokarzinom-Subgruppe. Bei nodal-negativen Patienten lag überwiegend eine homozygote Deletion an Position -506 vor (65,6%, n=42, p=0,004). Dies wurde auch in der gesamten Studienpopulation beobachtet, allerdings ohne statistische Signifikanz (p=0,065). In Bezug auf das rezidivfreie Überleben und die Gesamtüberlebenszeit waren keine signifikanten Korrelationen ersichtlich, weder in der gesamten Studienkohorte noch in den Untergruppen.

Der Endostatin 4349 G>A-Polymorphismus bot keine signifikanten Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern. Die univariate Überlebensanalyse zeigte ein kürzeres rezidivfreies Überleben bei homozygoten G-Allel Trägern in der Gesamtstudienpopulation (24,2 Monate im Vergleich zu 70,7 Monaten, p=0,036). Der G/G Genotyp konnte aber in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert werden.

2.5 Diskussion

Das Tumorstadium, gefolgt vom Alter und Geschlecht haben sich als prognostische Faktoren für chirurgisch behandelte NSCLC-Patienten etabliert (Goldstraw et al. 2011). Keimbahn-Polymorphismen könnten zur weiteren Verbesserung der individuellen Prognoseeinschätzung und zur Vorhersage von individuellen Behandlungseffekten beitragen, unabhängig von etablierten prognostisch klinisch-pathologischen Merkmalen (Oldenhuis et al. 2008). Die Resultate dieser Studie zeigen, dass der CXCR-2 +1208 C>T-Polymorphismus ein prognostischer Biomarker für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom, unabhängig vom Tumorstadium, Alter und Geschlecht, sein könnte. Der T/T-Genotyp des CXCR-2 +1208 Polymorphismus zeigte starke Korrelationen mit einer aggressiveren Tumorbiologie und konnte als unabhängiger negativer prognostischer Marker für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom identifiziert werden. Die univariaten Ergebnisse zeigen zwar einen korrespondierenden Einfluss auf das Überleben bei Adenokarzinomen, allerdings ist dies nach einer Stratifikation in der multivariaten Analyse statistisch nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine zelltyp-abhängige Hypoxie-Antwort beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sein. Eine Studie von Eilertsen et al. konnte zeigen, dass eine Hypoxie induzierte Erhöhung der VEGF-A-

Expression nur bei Adenokarzinomen nachgewiesen werden konnte (in-vitro Ergebnisse, Marte Eilertsen et al. 2012). In Übereinstimmung mit den in vitro Ergebnissen von Eilertsen et al., konnte die Studiengruppe der vorliegenden Arbeit bereits zeigen, dass VEGFR-2 Polymorphismen meist in der Adenokarzinom-Untergruppe als unabhängige prognostische Marker für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben dienen könnten (Uzunoglu et al. 2012). Eine zelltypspezifische Reaktion auf Hypoxie könnte somit auch ein Grund für die berichteten unterschiedlichen Reaktionen auf die Chemotherapie und zielgerichteten Wirkstoffen bei klinischen Studien sein (Langer et al. 2010).

Das T-Allel im PAR-1 -14 Ivs A/T Polymorphismus war mit einer weniger aggressiven Tumorbilogie und einem verbessertem Gesamtüberleben (univariat) in der Plattenepithel-Subgruppe assoziiert.

Dupont et al. (2003) konnten nachweisen, dass die Dichte von PAR-1 auf Thrombozyten abhängig ist von dem -14 Ivs A>T-Polymorphismus, mit einem signifikant niedrigeren Expressionslevel von PAR-1 bei Vorhandensein eines T Allels. Da PAR-1 die VEGF-Freisetzung aus Thrombozyten reguliert und das T-Allel zu einer geringeren Expression von PAR-1 führt, kann die VEGF induzierte Angiogenese bei Vorhandensein eines T-Allels verringert sein (Italiano et al. 2008, Ma et al. 2005).

In dieser Studie konnte der PAR-1 -14 Ivs A>T-Polymorphismus jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert werden. Die Ergebnisse sind übereinstimmend mit den Ergebnissen von vorherigen Studien zu Adenokarzinomen des Magens und des Ösophagus (Lurje et al. 2010). Bei letztgenannten Tumorentitäten wurde der PAR-1 -506 Ins/del-Polymorphismus als prognostischer Marker identifiziert, aber nicht der PAR-1 -14 Ivs A>T-Polymorphismus. In der Adenokarzinom-Subgruppe zeigten Patienten, die homozygot sind für eine 13-bp Deletion (5'CGGCCGCGGGAAG-3 ') innerhalb des Promotors an Position -506 von PAR-1, eine geringere Anzahl an Lymphknotenmetastasen. Dies hatte allerdings keine Auswirkungen auf das rezidivfreie Überleben oder das Gesamtüberleben.

Endostatin ist ein potenter anti-angiogener Wachstumsfaktor. Es konnte im Vorwege gezeigt werden, dass das A-Allel im 4349 G>A-Polymorphismus potentiell mit einer schlechteren anti-angiogenen Wirkung assoziiert ist (Iughetti et al. 2001).

Die Resultate der vorliegenden Studie unterstützen jedoch nicht die Hypothese einer beeinträchtigten anti-angiogenen Funktion und einer entsprechenden fortgeschrittenen Tumorangiose in Gegenwart eines A-Allels bei Plattenepithelkarzinomen oder Adenokarzinomen. Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom die gleichzeitig ein A-Allel aufwiesen, boten eine Tendenz zu einem besseren rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben. Obwohl heterozygote und homozygote A-Allel-Träger zusammengefasst wurden, betrug die Gesamtzahl der A-Allel-Träger nur 18 Patienten. Dementsprechend ist eine Verfälschung der Ergebnisse möglich, so dass eine größere Kohorte notwendig ist, um die Auswirkungen des 4349 G>A-Polymorphismus auf das rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben bei NSCLC zu beurteilen.

2.6 Schlussfolgerung

Der CXCR-2 1208 C>T Polymorphismus ist ein potentiell unabhängiger prognostischen Marker für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Lunge. Aufgrund der kleinen Studienpopulation ist eine Evaluation der Ergebnisse in einer größeren Studienpopulation notwendig. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Eignung als prädiktiven Biomarker für Therapien die gegen die Chemokin-vermittelte Angiogenese gerichtet sind erscheinen sinnvoll.

2.7 Zusammenfassung

Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ist die Progredienz der Tumorerkrankung von einer suffizienten Angiogenese abhängig. Die Thrombin-induzierte Aktivierung von PAR-1 auf Thrombozyten führt zur Blutplättchen-Sekretion und Aggregation. Durch die Freisetzung von VEGF und ES, der ein potentieller Angiogenesehemmer ist, wird das Zellüberleben, die Apoptose und die Angiogenese beeinflusst. Interleukin-8 (IL-8) induziert unabhängig vom VEGF-Pfad die Tumorangiogenese über CXCR-2. Das Ziel dieser experimentellen Studie war es, die Eignung von ausgewählten Polymorphismen innerhalb der PAR-1-, ES und CXCR-2 Gene als prognostischen Marker bezüglich dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben bei chirurgisch behandelten NSCLC-Patienten zu evaluieren. Die multivariate Analyse identifizierte den T/T Genotyp als negativen prognostischen Faktor für das rezidivfreie Überleben ($p=0,045$, HR 2,13) und das Gesamtüberleben ($p=0,041$, HR 2,20) bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom. Der CXCR-2 +1208 C>T-Polymorphismus könnte somit als unabhängiger prognostischer Biomarker für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom, unabhängig vom Tumorstadium, Alter und Geschlecht, dienen. Aufgrund der kleinen Studienpopulation ist eine Evaluation der Ergebnisse in einer größeren Studienpopulation notwendig.

Summary

The progress of non-small cell lung cancer depends on sufficient angiogenesis. Thrombin induced activation of proteinase-activated receptor 1 on platelets leads to platelet secretion and aggregation. This influences cell survival, apoptosis and angiogenesis by releasing VEGF and Endostatin, a potent angiogenesis inhibitor. Interleukin-8 induces tumor angiogenesis independent of the VEGF pathway through the chemokine C-X-C motif receptor 2. Our purpose was to evaluate germline polymorphisms of these potential therapy targets as prognostic markers for disease free survival and overall survival in surgically treated NSCLC patients. The CXCR-2 +1208 T/T genotype was shown to be a negative prognostic marker for disease free and overall survival in patients squamous cell lung carcinoma. Genotyping of the CXCR-2 +1208 C>T polymorphism could be a useful tool to identify high-risk patients with squamous cell lung carcinoma.

2.8 Literaturverzeichnis

- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:401-10.
- Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*. 1997;79:233-69.
- Coate LE, John T, Tsao MS, Shepherd FA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2009;10:1001-10
- Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407:258-64.
- Dupont A, Fontana P, Bachelot-Loza C, Reny JL, Bieche I, Desvard F, et al. An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood*. 2003;101:1833-40.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146:1029-39.
- Ellis LM, Hicklin DJ. Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6371-5.
- Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol*. 1995;177:57-63.
- Furrukh M. Tobacco Smoking and Lung Cancer: Perception-changing facts. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2013 Aug;13(3):345-58.
- Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, et al. Non-small-cell lung cancer. *The Lancet*. 2011;378:1727-40.
- Herbst RS, Sun Y, Eberhardt WE, Germonpre P, Saijo N, Zhou C, et al. Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:619-26.
- Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2005;23:3243-56.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005;23:1011-27.

Italiano Jr JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111:1227-33.

Iughetti P, Suzuki O, Godoi PH, Alves VA, Sertie AL, Zorick T, et al. A polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2001;61:7375-8.

Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22:2184-91.

Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:5311-20.

Loges S, Schmidt T, Carmeliet P. Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes Cancer*. 2010;1:12-25.

Lurje G, Husain H, Power DG, Yang D, Groshen S, Pohl A, et al. Genetic variations in angiogenesis pathway genes associated with clinical outcome in localized gastric adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 2010;21:78-86.

Lurje G, Leers JM, Pohl A, Oezcelik A, Zhang W, Ayazi S, et al. Genetic variations in angiogenesis pathway genes predict tumor recurrence in localized adenocarcinoma of the esophagus. *Ann Surg*. 2010;251:857-64.

Ma L, Elliott SN, Cirino G, Buret A, Ignarro LJ, Wallace JL. Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6470-5.

Ma L, Perini R, McKnight W, Dicay M, Klein A, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:216-20.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 1992;340:145-6.

Marte Eilertsen IP, Andersen S, Martinez I, Donnem T, Busund L-T, Bremnes RM. In NSCLC VEGF – a response to hypoxia may differ between squamous cell and adenocarcinoma histology. *Anticancer Res*. 2012;32:4729-36.

McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol*. 2005;23:9067-72.

Meert AP, Paesmans M, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Verdebout JM, et al. The role of microvessel density in the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2002;87:694-701.

O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Cox G, Turley H, Steward WP, et al. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2000;82:1427-32.

Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*. 2008;44:946-53.

Pallaud CMR, Juhasz E, Szima B, Yu C-J, Burdaeva O, Orlov S, et al. Clinical genotyping and efficacy outcomes: exploratory biomarker data from the phase II ABIGAIL study of 1st-line bevacizumab + chemotherapy in non-squamous non-small-cell lung cancer (NS-NSCLC). *Ann Oncol*. 2012;23(Suppl.9):ix400-46.

Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkmann J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet*. 1998;352: 1775-7.

Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, et al. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAL). *Ann Oncol*. 2010;21:1804-9.

Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, Liu W, Stoeltzing O, Fan F, et al. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech*. 2003;60:199-207.

Renzoni E, Lympany P, Sestini P, Pantelidis P, Well A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXCR2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:1633-40.

Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:2542-50.

Schneider BP, Shen F, Miller KD. Pharmacogenetic biomarkers for the prediction of response to antiangiogenic treatment. *Lancet Oncol*. 2012; 13:e427-36.

Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Fekih M, Khairi H, Helal AN, et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer*. 2010;10:283.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. International union against cancer. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010.

Teicher BA. Antiangiogenic agents and targets: a perspective. *Biochem Pharmacol*. 2011;81:6-12.

Uzunoglu FG, Kaufmann C, Wikman H, Gungor C, Bohn BA, Nentwich MF, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 gene polymorphisms as predictors for tumor recurrence and overall survival in non-small-cell lung cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:2159-68.

Van Ness B, Ramos C, Haznadar M, Hoering A, Haessler J, Crowley J, et al. Genomic variation in myeloma: design, content, and initial application of the bank on a core SNP panel to detect associations with progression-free survival. *BMC Med*. 2008;6:26.

Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6735-41.

2.9 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenocarcinoma
CI	Confidence interval
DFS	Disease free survival
DNA	Deoxyriboneucleic acid
HR	Hazard Ratio
mRNA	Messenger riboneucleic acid
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OS	Overall Survival
PCR	Polymerase chain reaction
SLCLC	Small cell lung cancer
SqCC	Squamous cell carcinoma
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
UICC	Union for International Cancer Control
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
ZODIAC	ZACTIMA in Combination with Docetaxel In non-small cell lung Cancer

3. Erklärung des Eigenanteils

Die Konzeption der publizierten Originalarbeit erfolgte mit Herrn Prof. Dr. med. Prof. h. c. Jakob R. Izbicki, Herrn Dr. med. F. G. Uzunoglu und Herrn Dr. med. Y. K. Vashist.

Die Durchführung der Datenerhebung erfolgte durch Herrn Dr. med. F. G. Uzunoglu, Frau Neda Yavari, Herrn Dr. B. A. Bohn, Herrn Dr. med. M. F. Nentwich, Herrn Dr. med. M. Reeh und Herrn Dr. med. Y. K. Vashist.

Die laboranalytischen Arbeiten (Genotypbestimmung, DNA-Sequenzierung, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Kapillarelektrophoresen) wurden durch mich, Frau Neda Yavari, durchgeführt.

Die anschließende Datenanalyse geschah durch Herrn Dr. med. F. G. Uzunoglu, Frau Neda Yavari, Herrn Dr. B. A. Bohn, Herrn Dr. med. M. F. Nentwich, Herrn Dr. med. M. Reeh, Herr Prof. Dr. med. K. Pantel, Herrn Prof. Dr. med. T. Y. Tsui, Herrn Prof. Dr. med. M. Bockhorn, Herrn Prof. Dr. med. O. Mann und Herrn Dr. med. Y. K. Vashist.

Die Verfassung des Manuskripts der Originalarbeit erfolgte in Zusammenarbeit durch Herrn Dr. med. F. G. Uzunoglu und Frau Neda Yavari.

Die Promotionsschrift wurde von mir, Neda Yavari, ohne fremde Hilfe und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen verfasst.

4. Danksagung

Mein Dank gilt dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki für die Überlassung des Themas, der Patientenmaterialien, Patientendaten und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. med. F. G. Uzunoglu, aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, bedanken für die herausragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meinen Eltern gebührt ein besonderer Dank für Ihre großartige Unterstützung während meines gesamten Studiums. Auch meinem Freund Niklas Frederik Körner bin ich zutiefst dankbar, er hat im Wesentlichen dazu beigetragen diese Arbeit zu beenden und mich immer wieder motiviert.

6. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: