

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. Thomssen

**„Vergleich von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in präoperativer Biopsie und  
korrespondierendem chirurgischen Exzidat von Mammakarzinomen“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Brigitta Landstorfer

geboren am 20.04.1983 in Bonn-Bad Godesberg

Gutachter/innen:

Herr Prof. Dr. med. Thomssen

Frau Prof. Dr. med. Wickenhauser

Frau Prof. Dr. med. Harbeck (München)

Eröffnung des Promotionsverfahrens am: 19.01.2016

Verteidigung der Promotion am: 24.11.2016

## Referat

Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, uPA, und sein Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1, PAI-1, sind unabhängiger Prognosefaktor für das nodalnegative Mammakarzinom auf dem höchsten Evidenzniveau (Level of Evidence I). uPA- und PAI-1-Konzentrationen unter definierten Schwellenwerten im Primärtumor (niedriger uPA/PAI-1-Status) sind mit einem signifikant niedrigeren Rezidivrisiko und einer besseren Gesamtüberlebensrate für die Patientin assoziiert als uPA- und/oder PAI-1-Konzentrationen über den Schwellenwerten (hoher uPA/PAI-1-Status). Die Validierung von uPA/PAI-1 als prognostischer Faktor erfolgte mittels ELISA aus durchschnittlich 100–300 mg Gewebeproben von chirurgischen Tumorexzidaten. Durch die verbesserte und frühere Diagnose von Mammakarzinomen, dadurch bedingt oft kleinen Tumoren, stehen für die uPA/PAI-1-Bestimmung häufig nur kleinere Gewebeproben zur Verfügung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, uPA- und PAI-1-Konzentrationen mittels ELISA aus Gewebeproben von präoperativen Biopsien und korrespondierenden chirurgischen Exzidaten im klinischen Alltag zu vergleichen. In einem Studienkollektiv von 163 Patientinnen wurden die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat mit dem Verfahren nach Bland und Altman verglichen. Es wurden Sensitivitäten, Spezifitäten, sowie negative und positive prädiktive Werte ermittelt. uPA- und PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie sagten uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Exzidat mit hoher Übereinstimmung voraus. Der uPA/PAI-1-Status wurde mittels präoperativer Biopsie in hohem Maße korrekt identifiziert. Der präanalytische histologische Nachweis von Karzinomzellen in der Biopsie führte nicht zu höherer Übereinstimmung zwischen uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat. Klinische und pathologische Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat. An einer kleinen Fallzahl innerhalb des Studienkollektivs wurde gezeigt, dass der Biopsiedefekt Einfluss auf PAI-1-Konzentrationen im chirurgischen Exzidat hat. Die Bestimmung von uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus präoperativen Biopsien ist unter Standardbedingungen im klinischen Alltag möglich. Aus chirurgischen Exzidaten sollten Gewebeproben ohne Biopsiedefekt verwendet werden. Intratumorale Heterogenität muss bei der Bestimmung von uPA- und PAI-1 berücksichtigt werden. Die Zusammenführung von mindestens zwei Biopsie- oder Exzidatproben zu einer Gewebeprobe wird empfohlen.

Landstorfer, Brigitta: Vergleich der uPA- und PAI-1-Proteinkonzentrationen in Gewebe aus präoperativer Biopsie und korrespondierendem chirurgischen Exzidat von Mammakarzinomen Halle (Saale), Univ. Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms .....	1
1.2 Diagnostischer und therapeutischer Algorithmus des invasiven nicht- metastasierten Mammakarzinoms .....	1
1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren des invasiven Mammakarzinoms.....	2
1.3.1 Prognostische Faktoren .....	2
1.3.2 Prädiktive Faktoren .....	3
1.4 Therapieentscheid anhand der Klassifizierung von Mammakarzinomen.....	4
1.5 Etablierte klinische und pathologische prognostische und prädiktive Faktoren.....	5
1.5.1 Lymphknotenstatus.....	5
1.5.2 Tumorgröße .....	6
1.5.3 Alter der Patientin.....	6
1.5.4 Histologischer Typ.....	6
1.5.5 Histologischer Differenzierungsgrad – Grading .....	6
1.5.6 Hormonrezeptorstatus.....	6
1.5.7 HER2-Status.....	7
1.6 Neue tumorbiologische Prognosefaktoren .....	7
1.6.1 uPA und PAI-1: Historie und Stellenwert.....	7
1.6.2 uPA und PAI-1: die Biologie des Plasminogenaktivatorsystems .....	11
<b>2 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>14</b>
<b>3 Patientinnen, Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
3.1 Patientinnen, Einschlusskriterien, Probenasservierung.....	16
3.2 Definition der Studienkollektive und Zuordnung der Patientinnen.....	16
3.3 Material.....	20
3.3.1 Material für die Gewebepreparation .....	20
3.3.2 Material für die Gesamtproteinbestimmung.....	21
3.3.3 Material für die uPA- und PAI-1-Proteinbestimmung mittels ELISA.....	22
3.4 Methoden.....	23
3.4.1 Präparation des Tumormaterials .....	23
3.4.2 Gesamtprotein-Bestimmung.....	24
3.4.3 uPA/PAI-1-ELISA – Testprinzip und Testdurchführung .....	24
3.4.4 Methoden der Auswertung und der Statistik .....	26

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
4.1	uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1 .....	29
4.1.1	uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1	30
4.1.2	uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat, Subkollektiv 1 .....	31
4.2	Analyse der Übereinstimmung (Limits of Agreement) für uPA- und PAI-1-Konzentrationen in korrespondierenden Biopsien und Exzidaten .....	33
4.2.1	uPA-Konzentrationsbestimmung aus Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1.....	33
4.2.2	PAI-1-Konzentrationsbestimmung aus Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1.....	34
4.2.3	uPA-Konzentrationsbestimmung aus Biopsie und Exzidat, Subkollektiv 1 .....	35
4.2.4	PAI-1-Konzentrationsbestimmung aus Biopsie und Exzidat, Subkollektiv 1...	36
4.3	Verteilung von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf Schwellenwerte.....	36
4.4	Sensitivitäten, Spezifitäten, und prädiktive Werte für uPA- und PAI-1-Konzentrationen der Biopsie, Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1 .....	39
4.5	Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf Differenzen von uPA- und PAI-1-Proteinkonzentrationen in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1 .....	41
4.5.1	Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf Delta uPA .....	41
4.5.2	Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf Delta PAI-1 .....	42
4.6	Diskordante und konkordante uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat – histologische Analyse ausgewählter Fälle, Studienkollektiv 1.....	44
4.7	Fallanalyse – diskordanter uPA/PAI-1-Status in Bezug auf den Schwellenwert und Delta PAI-1 $\geq 10$ ng/mg Gesamtprotein, Studienkollektiv 1 .....	45
4.7.1	Fallanalyse – diskordant für uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf den Schwellenwert, Studienkollektiv 1 .....	46
4.7.2	Fallanalyse – diskordant für PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf den Schwellenwert, Studienkollektiv 1 .....	48
4.8	uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 2 .....	49
4.9	Verteilung von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf Schwellenwerte, Studienkollektiv 2 .....	52
4.10	Sensitivitäten, Spezifitäten, und prädiktive Werte für uPA- und PAI-1-Konzentrationen der Biopsie, Studienkollektiv 2.....	54
4.11	Einfluss des Biopsiedefektes auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Exzidat .....	54
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
5.1	Klinische und pathologische Daten der Studienkollektive 1 und 2.....	58
5.2	uPA- und PAI-1-Konzentrationen in präoperativer Biopsie und korrespondierendem chirurgischen Exzidat im Studienkollektiv 1.....	58
5.3	Einfluss des Biopsiedefektes auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Exzidat .....	62

5.4 Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf gemessene Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in präoperativer Biopsie und chirurgischem Exzidat .....	64
5.5 Diskordante und konkordante uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat – histologische Analyse ausgewählter Fälle .....	65
5.6 uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat nach histologischem Nachweis von Karzinomzellen in der Biopsie.....	67
5.7 Intratumorale Heterogenität .....	68
5.8 Zusammenfassung .....	70
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>7 Thesen der Dissertation.....</b>	<b>79</b>

Tabellarischer Lebenslauf

Selbständigkeitserklärung  
und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AGO e.V.	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCA	Bicinchoninsäure
BD	Biopsiedefekt
BET	Brusterhaltende Therapie
BMI	Bodymass Index
BSA	Bovine serum albumine
ca.	circa
COX-2	Cyclooxygenase Typ 2
d	Tage
EGF	Epidermal Growth Factor
EK	Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara Halle (Saale)
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
Fa.	Firma
FFPE	formalin fixed paraffin embedded
G	Grading
ggf.	gegebenenfalls
HE	Hämotoxylin-Eosin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hormonrezeptor
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
Ki67	Antigen Ki-67
LoE	Oxford Level of Evidence
M	Metastase
MAI	Mitotischer Aktivitätsindex
mRNA	messenger RNA
miRNA	micro RNA
MMP	Matrix-Metalloproteinase

n	Anzahl
neg.	Negativ
npv	negative predictive value
Nr.	Nummer
o.	Oder
o.g.	oben genannt
P	Gewebeprobe
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PBS	phosphate buffered saline – Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pCR	pathologic complete remission
PgR	Progesteronrezeptor
pN	Nodalstatus nach pathologischer Beurteilung
pos.	positiv
ppv	positive predictive value
pT	Tumorgröße nach pathologischer Beurteilung
qRT-PCR	quantitative realtime polymerase chain reaction
R	Pearson Korrelationskoeffizient
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RPPA	Reverse-Phase-Protein-Array
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBS	tris buffered saline – TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbiphenyl-4,4'-diamin
t-PA	Gewebetyp-Plasminogenaktivator
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
Triton (Triton X-100)	Ein p-tert-Octylphenol-Derivat mit einer Polyethylenglykol-Seitenkette, aus 9–10 Ethylenoxid-Einheiten
u.	und
u.g.	unten genannt
UKH	Universitätsklinikum Halle
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
uPA-R	uPA-Rezeptor
Vers.	Version
vgl.	vergleiche

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

In Deutschland erkranken jährlich etwa 72 000 Frauen neu an einem Mammakarzinom. Weltweit ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau. Die höchste Neuerkrankungsrate liegt in Westeuropa und den USA vor (Boyle et al., 2008). Durch die Einführung des Mammographie-Screening-Programms in Deutschland 2005 wurde zunächst ein Anstieg der Neuerkrankungsrate verzeichnet, bedingt durch die zunehmende Detektion von kleineren Mammakarzinomen (T1 – Tumorausdehnung < 2 cm) in der Screening-Altersgruppe (50 – 69 Jahre). Trotz der gestiegenen Inzidenz ist in den letzten 20 Jahren durch adjuvante Chemotherapie und antihormonelle Therapie die Mortalität des nicht-metastasierten Mammakarzinoms auf ca. 20 % gesunken (Berry et al., 2005; Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

## 1.2 Diagnostischer und therapeutischer Algorithmus des invasiven nicht-metastasierten Mammakarzinoms

In Deutschland gelten für die Diagnose und Therapie des invasiven nicht-metastasierten Mammakarzinoms definierte Standards und Algorithmen, die in der interdisziplinären S3-Leitlinie Brustkrebs der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF e.V.) und in den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie e.V. (AGO e.V.) festgelegt sind. Die histologische Diagnostik abklärungswürdiger Befunde erfolgt durch bildgestützte Stanz- oder Vakuumbiopsie. Im Biopsiegewebe wird neben dem Tumortyp der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (ER- und PgR-Status), sowie der HER2-Status (human epidermal growth factor receptor 2) und das Tumorigradung (Differenzierungsgrad der Karzinomzellen) bestimmt. Nach präoperativer Biopsie erfolgt die chirurgische Tumorexzision. Ziel der chirurgischen Therapie ist die Entfernung des Karzinoms mit einem minimalen Sicherheitsabstand von 1 mm zum gesunden Gewebe. Favorisiert werden sollte die brusterhaltende Therapie (BET). Das chirurgische Exzidat wird ebenfalls histologisch untersucht. Intraoperativ wird die Tumorfreiheit der Resektionsränder beurteilt, wenn es sich um ein Karzinom makroskopisch < 1 cm handelt. Postoperativ wird die Tumorgöße und das Tumorigradung bestimmt. Fakultativ können weitere Proliferationsmarker wie z.B. Ki67 bestimmt werden. Neben der postoperativen Radiotherapie der Brust-/Thoraxwand ist die systemische Therapie eine weitere



Säule in der Behandlung des Mammakarzinoms. Diese wird in der Mehrheit der Fälle als adjuvante Chemotherapie nach der chirurgischen Exzision des Mammakarzinoms durchgeführt. Derzeit ist die Standardtherapie eine Kombination aus einer anthrazyklin- und taxanhaltigen Chemotherapie über 18–24 Wochen. Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom wird die endokrine Therapie empfohlen. Patientinnen mit HER2-positivem nicht-metastasierten Mammakarzinom sollten eine anti-HER2-Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab über ein Jahr in Kombination mit einer taxanhaltigen Chemotherapie erhalten. Patientinnen mit hormonrezeptornegativem *und* HER2-negativem, nicht-metastasierten Mammakarzinom (sog. triple-negatives Mammakarzinom) wird eine neoadjuvante Chemotherapie empfohlen (AWMF e.V., 2012; AGO e.V. Kommission Mamma 2015).

### **1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren des invasiven Mammakarzinoms**

Das Mammakarzinom wird aufgrund seiner vielfältigen möglichen histologischen Ausprägungen und biologischen Eigenschaften als heterogene Tumorerkrankung angesehen und in Subgruppen eingeteilt. Je nach Typ weisen Mammakarzinome eine individuell unterschiedliche intrinsische Aggressivität und Aktivität auf. Das Karzinom kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten in seiner Entwicklung detektiert werden.

Die notwendige Therapie, wie die adjuvante/neoadjuvante Chemotherapie oder antihormonelle Therapie, wird daher den biologischen Eigenschaften und der histologischen Ausprägung des Karzinoms angepasst. Um diesem Umstand therapeutisch möglichst individuell für jede Patientin gerecht zu werden, leisten prognostische und prädiktive Faktoren Hilfestellung. Das Vorliegen einer bestimmten Konstellation dieser Faktoren schließt den Einsatz einer medikamentösen Therapie gegebenenfalls aus. Das Wissen um Faktoren, die eine günstige Prognose voraussagen, kann damit einer sogenannten Übertherapie von Patientinnen vorbeugen, medikamentös-toxische Nebenwirkungen vermeiden und Kosten für das Gesundheitssystem einsparen (Campbell et al., 2011; Sullivan et al., 2011; Jacobs et al., 2013).

#### **1.3.1 Prognostische Faktoren**

„Prognosefaktoren geben zum Diagnosezeitpunkt Informationen über den Krankheitsverlauf, insbesondere die Rezidivfreiheit und das Gesamtüberleben betreffend. Sie sind unabhängig von der Therapie und reflektieren die Fähigkeit des Tumors zur Proliferation, Invasion und Metastasierung“ (Decker et al., 2009).

Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO e.V.) empfiehlt folgende Prognosefaktoren unter Berücksichtigung strenger Qualitätskriterien uneingeschränkt für die Anwendung im klinischen Alltag:

1. Tumorgröße
2. axillärer Lymphknotenstatus
3. Vorliegen von Fernmetastasen
4. histologischer Typ
5. histologischer Differenzierungsgrad – Grading
6. Alter
7. Invasion in Lymph- u./o. Blutgefäße
8. pCR nach neoadjuvanter Chemotherapie (bei HR+/G3, HER2+)
9. BMI
10. Steroidhormonrezeptorstatus ER/PgR
11. HER2-Status
12. ER/PgR/HER2 als Surrogatmarker für molekulare Subtypen
13. uPA/PAI-1 bei N0 (negativer axillärer Lymphknotenstatus)
14. Marker der Zellteilungsaktivität (Ki-67, Mitotischer Aktivitätsindex – MAI)

(AGO e.V. Kommission Mamma 2015)

### **1.3.2 Prädiktive Faktoren**

„Prädiktive Faktoren treffen eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens eines Tumors auf eine bestimmte Therapie. Sie sind entweder selbst Angriffspunkt einer Therapie oder ihre Expression ist mit der Therapiewirksamkeit bzw. -resistenz verknüpft“ (Decker et al., 2009).

Die AGO e.V. empfiehlt folgende prädiktive Faktoren bezüglich einer antihormonellen Therapie, einer anti-HER2-Therapie, sowie einer adjuvanten Chemotherapie unter Berücksichtigung strenger Qualitätskriterien uneingeschränkt für die Anwendung im klinischen Alltag:

#### **antihormonelle Therapie:**

Steroidhormonrezeptorstatus ER/PgR

Färbeintensität immunhistochemisch (ER/PgR)

Menopausenstatus

**anti-HER2-Therapie:**

HER2-Status

**Adjuvante Chemotherapie:**

uPA/PAI-1

(AGO e.V. Kommission Mamma 2015)

**1.4 Therapieentscheid anhand der Klassifizierung von Mammakarzinomen**

Der Entscheid für den Einsatz einer Chemotherapie, einer endokrinen Therapie u./o. einer anti-HER2-Therapie beim Mammakarzinom wird in Deutschland anhand der Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. und der interdisziplinären S3-Leitlinie „Brustkrebs“ der deutschen Gesellschaft für Senologie sowie nach den Empfehlungen der internationalen St. Gallen Konsensuskonferenz zur Diagnose und Behandlung des primären Mammakarzinoms getroffen.

Die Konsensusempfehlungen des Expertengremiums der St. Gallen Konferenz 2013 stellen, wie bereits schon 2011, die Tumorbiologie, den sogenannten Phänotyp des Tumors für den individuellen Therapieentscheid in den Vordergrund. Die Klassifizierung des Mammakarzinoms in Subtypen erfolgt dabei durch immunhistochemisch ermittelte Tumorcharakteristika. Verschiedene prognostische und prädiktive Faktoren werden bei der Klassifikation berücksichtigt. Schon 2009 wies das Expertengremium der Konferenz auf die hohe Bedeutung der ER- und PgR-Expression im Karzinom (endokrine Sensitivität des Tumors) als wichtiges Entscheidungskriterium für oder gegen eine Chemotherapie und als Kriterium zur Einstufung in eine definierte Risikogruppe hin (Goldhirsch et al., 2009, 2011, 2013).

Tab. 1 gibt eine Übersicht über o.g. Einteilung der derzeit relevanten Mammakarzinomsubtypen nach dem St. Gallen Konsensuspapier von 2013 (Goldhirsch et al., 2013).

Tab. 1: immunhistochemisch definierte Subtypen des Mammakarzinoms

Intrinsischer Subtyp	Luminal A	Luminal B		HER2 enriched	basal-like
Immunhistochemisch bestimmte Subtypen	Luminal A-like	Luminal B-like HER2 negativ	Luminal B-like HER2 positiv	HER2 positiv	Triple negativ
	alle der folgenden Kriterien:				
	ER + (≥ 1 %)	ER + (≥ 1 %)	ER pos. PgR pos. o. neg.	ER –	ER –
	PgR + (≥ 20 %)			PgR – (< 10 %)	PgR – (< 10 %)
	HER2 –	HER2 –	HER2 +	HER2 +	HER2 –
	mindestens eines dieser Kriterien:				
	Ki-67 niedrig* (< 20 %)	Ki-67 erhöht* (≥ 20 %)	jedes Ki-67		
		PgR – (< 20 %)	jedes PgR		
<b>Therapie</b>	<b>Endokrine Therapie</b>	<b>Endokrine Therapie u. Chemotherapie</b>	<b>Endokrine Therapie u. Chemotherapie u. anti-HER2-Therapie</b>	<b>Chemotherapie u. anti-HER2-Therapie</b>	<b>Chemotherapie</b>

\*Die Mehrheit des Expertengremiums votierte für einen Schwellenwert von 20% als Indikator für einen hohen Ki-67-Status (nach Goldhirsch et al., 2013).

In der klinischen Praxis werden zusätzlich zu den in Tab. 1 relevanten Faktoren die in 1.3 genannten prognostischen und prädiktiven Faktoren zum Therapieentscheid empfohlen und angewandt. Patientinnen mit Luminal A-like- oder Luminal B-like-klassifiziertem Mammakarzinom profitieren von der Untersuchung weiterer Faktoren. So kann die Entscheidung, ob neben einer endokrinen Therapie zudem eine adjuvante Chemotherapie sinnvoll ist möglich individuell getroffen werden. Folgend werden einige dieser Faktoren in 1.5 und 1.6 präzisiert.

## 1.5 Etablierte klinische und pathologische prognostische und prädiktive Faktoren

### 1.5.1 Lymphknotenstatus

Der axilläre Lymphknotenstatus (Nodalstatus) ist der stärkste Prognosefaktor beim Mammakarzinom. Ein histologisch nachgewiesener axillärer Lymphknotenbefall (pN+ = nodalpositiv) korreliert positiv mit dem Auftreten eines Rezidivs und negativ mit der Gesamtüberlebensrate nach 5 Jahren. Die Anzahl der mitbeteiligten axillären Lymphknoten ist prognostisch entscheidend. Patientinnen mit 4 und mehr karzinominfilierten axillären Lymphknoten haben im Vergleich zu Patientinnen mit weniger befallenen axillären Lymphknoten eine bis zu 30 % höhere Mortalität (Carter et al., 1989).

### **1.5.2 Tumorgröße**

Die Größe des Primärtumors (pT) geht mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und niedrigerer Gesamtüberlebensrate einher. In der Regel haben Tumoren < 1 cm eine sehr gute Prognose bei einer nodalnegativen Krankheitssituation. Die Tumorgröße korreliert positiv mit dem Auftreten eines axillären Lymphknotenbefalls (Carter et al., 1989).

### **1.5.3 Alter der Patientin**

Patientinnen, die bei Erstmanifestation der Erkrankung jünger als 35 Jahre sind, haben eine schlechte Prognose aufgrund von häufig vorliegenden tumorbiologisch aggressiven Karzinomen (Nixon et al., 1994).

### **1.5.4 Histologischer Typ**

Die beiden am häufigsten nachgewiesenen histologischen Typen, das invasive duktales Mammakarzinom und das invasive lobuläre Mammakarzinom, weisen ein deutlich höheres Metastasierungspotenzial auf als die sehr viel seltener vorkommenden tubulären, muzinösen oder medullären Mammakarzinome (Ellis et al., 1992).

### **1.5.5 Histologischer Differenzierungsgrad – Grading**

Invasive Mammakarzinome werden anhand ihres histologischen Differenzierungsgrades nach Elston und Ellis eingestuft. Für die Graduierung in drei Gruppen werden der Differenzierungsgrad der Zellen, das Vorliegen von Kernatypien und die Mitoserate der Zellen berücksichtigt. Zellmorphologisch sehr gut differenzierte Mammakarzinome, sog. G1-Karzinome, weisen eine deutlich günstigere Prognose auf als schlecht differenzierte Karzinome, sog. G3-Karzinome (Elston und Ellis, 1991). Schätzungsweise 75 % aller Mammakarzinome sind mäßig differenziert, sog. G2-Karzinome. Daher muss in der klinischen Praxis das Grading in dieser Gruppe (noch mehr) mit anderen prognostischen und prädiktiven Faktoren in Beziehung gesetzt werden (Harbeck et al., 2002a).

### **1.5.6 Hormonrezeptorstatus**

Die Expression der Hormonrezeptoren ist sowohl prognostischer als auch prädiktiver Faktor. Die Expression von Östrogen- (ER) sowie Progesteronrezeptoren (PgR) von Mammakarzinomzellen liegt in etwa 75 % aller Mammakarzinome vor. Prognostische Stärke besitzen Hormonrezeptoren vor allem in den ersten Jahren nach Erkrankungsbeginn. Nach einigen Jahren gleichen sich die Überlebenskurven von rezeptorpositiven und -negativen Patientinnen an (Gray, 1992; Sch-

mitt et al., 1997). Bedeutender ist der Hormonrezeptorstatus als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie. Je stärker die Hormonrezeptoren exprimiert werden, desto besser ist die Therapiewirkung. Die Expression *beider* Rezeptoren (ER- und PgR) geht mit einer deutlich höheren Effizienz der endokrinen Therapie einher (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2011).

### **1.5.7 HER2-Status**

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) ist ebenfalls prognostischer und prädiktiver Faktor. Die Expression von HER2 auf der Zelloberfläche von Mammakarzinomen verschlechtert die Prognose der Erkrankung (Slamon et al., 1987). HER2 ist ein starker prädiktiver Faktor, da der Rezeptor Angriffspunkt für eine zielgerichtete anti-HER2-Therapie beispielsweise mit den Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab, dem Antikörper-Wirkstoff-Konjugat TDM-1 oder dem Tyrosinkinasehemmer Lapatinib ist. Aus einer initial schlechteren Prognose kann durch eine anti-HER2-Therapie die Prognose für die einzelne Patientin vergleichsweise verbessert werden (Ross et al., 2009; Gianni et al., 2011).

## **1.6 Neue tumorbiologische Prognosefaktoren**

Durch individualisierte Konzepte in der Therapie von Patientinnen mit Mammakarzinom haben tumorbiologische Prognosefaktoren heute einen bedeutenden Stellenwert. Zurzeit sind ca. 100 tumorbiologische Prognosefaktoren beim Mammakarzinom bekannt. Nur einige dieser biologischen Marker sind relevant für den Einsatz im klinischen Alltag. Um neue prognostische Faktoren in der klinischen Routine anwenden und etablieren zu können müssen diese international festgelegte Kriterien bezüglich ihrer Evidenz und ihres klinischen Nutzens erfüllen, sog. Level of Evidence. Prognostische und prädiktive Faktoren, die in randomisierten doppelblinden Studien prospektiv evaluiert werden, erlangen die höchste Evidenzstufe, Level of Evidence I (LoE I) (Hayes et al., 1996). Die Evidenzkriterien wurden 2009 durch Simon et al. dahingehend modifiziert, dass archiviertes Tumormaterial aus prospektiven Studien zur Validierung von prognostischen und prädiktiven Markern verwendet werden kann (Simon et al., 2009).

### **1.6.1 uPA und PAI-1: Historie und Stellenwert**

Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, uPA, und sein Inhibitor PAI-1, haben als prognostischer Faktor (uPA/PAI-1 Status) seit 2002 das höchste Level of Evidence, LoE I, für das nodal-negative Mammakarzinom erreicht (Look et al., 2002). Die Serinprotease uPA und der Serinprotease-Inhibitor PAI-1 sind an Tumorinvasion und -metastasierung beteiligt. Die Proteinkonzentrationen von uPA und PAI-1 werden mittels ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

aus Tumorfrischgewebe von Mammakarzinomen bestimmt. Bis heute gilt diese Labormethode als Goldstandard für die Bestimmung des uPA/PAI-1 Status. Klinisch validiert wurden uPA- und PAI-1 aus ca. 100–300 mg Gewebeproben von chirurgisch entnommenen Tumorexzidaten.

Bereits Ende der 1980er- und zu Beginn der 1990er Jahre belegten verschiedene Studien, dass erhöhte uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Primärtumor von Mammakarzinomen mit einer schlechten Prognose in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben assoziiert sind (Duffy et al., 1988; Grøndahl-Hansen et al., 1993; Jänicke et al., 1993; Foekens et al., 1994). In einer prospektiven Unicenter-Studie mit n = 316 Patientinnen mit nicht-metastasiertem Mammakarzinom wurden durch log-rank Statistik optimale Schwellenwerte für uPA und PAI-1-Konzentrationen ermittelt (uPA: 3 ng/mg Gesamtprotein, PAI-1: 14 ng/mg Gesamtprotein), um Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko von Patientinnen mit niedrigem Rezidivrisiko zu diskriminieren (Harbeck et al., 1999).

Um uPA und PAI-1 als Prognosefaktor für den Einsatz in der klinischen Routine zu etablieren, folgte die Evaluation von uPA/PAI-1 in der prospektiven, randomisierten Multicenter Studie Chemo N<sub>0</sub> mit n = 556 Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom. Die erste Interimsanalyse zeigte im Jahr 2001, dass Proteinkonzentrationen von uPA und PAI-1 über den Schwellenwerten (uPA >3 ng/mg Gesamtprotein, PAI-1 > 14 ng/mg Gesamtprotein) mit einer signifikant schlechteren Prognose bezüglich des rezidivfreien- und des Gesamtüberlebens einhergingen. Für die schlechte Prognose war ausreichend, wenn eins der Proteine, uPA oder PAI-1, über dem jeweiligen definierten Schwellenwert lag (**hoher uPA/PAI-1-Status**). Im Studienkollektiv konnte 44 % aller nodalnegativen Patientinnen aufgrund von uPA- und PAI-1-Konzentrationen unter den Schwellenwerten (**niedriger uPA/PAI-1-Status**) ein niedriges Rückfallrisiko zugesprochen werden. Diesen Niedrig-Risiko-Patientinnen konnte eine Chemotherapie erspart bleiben, Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1-Status profitierten, wenn auch statistisch nicht signifikant, wesentlich von einer Chemotherapie (Jänicke et al., 2001). Harbeck et al. konnten 2002 anhand der Auswertung von 2 Studienkohorten (n = 3424 Patientinnen) einen signifikanten Benefit einer Chemotherapie für Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1-Status zeigen. Sie bestätigten somit die prädiktive Aussagekraft von uPA/PAI-1 (Harbeck et al., 2002b). Eine Metaanalyse im Jahr 2002 der EORTC-RBG (European Organization for Research and Treatment of Cancer-Receptor and Biomarker Group), die Daten von 8377 Patientinnen aus 18 Zentren in Europa einschloss, bestätigte uPA/PAI-1 als unabhängigen Prognosefaktor sowohl beim nodalnegativen als auch nodalpositiven Mammakarzinom. Als erster neuer tumorbiologischer Prognosefaktor erreichte uPA/PAI-1 das höchste Evidenzniveau (Level of Evidence 1 – LoE 1) (Look et al., 2002).

Die abschließende 10-Jahres-Analyse der Chemo N<sub>0</sub> Studie bestätigte ein weiteres Mal den prognostischen Stellenwert von uPA/PAI-1 beim nodalnegativen Mammakarzinom. Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1-Status zeigten eine um 44 % geringere 10-Jahres-Rezidivrate (12,9 %) zu Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1-Status (23,0 %). Zudem zeigten die Daten der 10-Jahres-Analyse, dass für nodalnegative Patientinnen mit G2-klassifizierten Mammakarzinomen der uPA/PAI-1-Status zur Risikoklassifikation sinnvoll eingesetzt werden kann. Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1-Status in dieser Subgruppe zeigten eine signifikant niedrige Rezidivrate sowie eine signifikant höhere Gesamtüberlebensrate (89,8 %) zu Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1-Status (79,1 %) (Harbeck et al., 2013).

Seit 2002 wird uPA/PAI-1 als prognostischer Faktor von der Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie mit uneingeschränkter Empfehlung für den Einsatz im klinischen Alltag anerkannt und empfohlen (Harbeck und Thomssen, 2002).

2007 hat die American Society of Clinical Oncology (ASCO) uPA/PAI-1 in ihre Leitlinien als prognostischen Faktor aufgenommen (Harris et al., 2007).

Die prospektiven Daten der o.g. Studien belegen, dass der Prognosefaktor uPA/PAI-1 zur Risikostratifizierung von Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom eingesetzt werden kann. Bei einem G2 klassifizierten Mammakarzinom und niedrigem uPA/PAI-1-Status kann Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie erspart bleiben.

Anschließend an die Chemo-N<sub>0</sub> Studie und die Metanalyse der EORTC-RBG wird uPA/PAI-1 zur Risikoklassifikation von Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom in der prospektiv randomisierten Multicenter-Studie NNBC 3-Europe (Node Negative Breast Cancer III-Europe) evaluiert.

Die 2009 geschlossene Studie vergleicht die Risikostratifizierung von Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom anhand etablierter klinischer und pathologischer Risikofaktoren (vgl. 1.5) mit der Risikostratifizierung anhand des uPA/PAI-1-Status. In die Studie wurden 4 149 Patientinnen mit einem nodalnegativen Mammakarzinom eingeschlossen. Zunächst erfolgte die Klassifikation in eine Gruppe mit niedrigem und eine Gruppe mit hohem Rezidivrisiko entweder nach klinischen und pathologischen Selektionskriterien wie Alter, Grading, ER/PgR-Status, HER2-Status oder unter Berücksichtigung tumorbiologischer Selektionskriterien wie des uPA/PAI-1-Status. Für die Einteilung nach dem uPA/PAI-1-Algorithmus (im Folgenden UP-Algorithmus genannt) kamen Patientinnen infrage, die zum Rekrutierungszeitpunkt mindestens 35 Jahre alt waren und ein als G2 klassifiziertes Mammakarzinom hatten. Patientinnen, die in dieser Gruppe



einen niedrigen uPA/PAI-1-Status im Tumor aufwiesen, wurde ein niedriges Rezidivrisiko zugesprochen. Patientinnen, die in dieser Gruppe einen hohen uPA/PAI-1-Status aufwiesen, wurde ein hohes Rezidivrisiko zugesprochen. Primäres Studienziel ist der Vergleich einer adjuvanten taxanhaltigen Chemotherapie (3 Zyklen FEC – Fluouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid – gefolgt von 3 Zyklen Docetaxel) mit einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie (6 Zyklen FEC) für die Patientinnen in der Hoch-Risiko-Gruppe, ungeachtet welche Form der Risikostratifizierung gewählt wurde. Primärer Untersuchungs-Endpunkt in dieser Gruppe ist das rezidivfreie Überleben, sekundärer Endpunkt das Gesamtüberleben. Sekundäres Studienziel ist die Untersuchung, ob durch den UP-Algorithmus mehr Patientinnen in eine Niedrig-Risiko-Gruppe eingestuft werden können. Zudem wird untersucht, ob sich das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben je nach gewählter Risikoklassifikation unterscheidet.

Nach einem medianen Nachbeobachtungszeitraum von 44 Monaten konnte kein signifikanter Unterschied für das rezidivfreie Erkrankungsintervall (97,5 % für FEC-D versus 97,3 % für FEC) und für das Gesamtüberleben (99,0 % für FEC-D versus 99,5 % für FEC) zwischen den untersuchten Chemotherapieschemata für Patientinnen in der Hoch-Risiko-Gruppe gezeigt werden (Thomssen et al., 2012). Ergebnisse zum Einfluss der gewählten Risikoklassifikation (UP-Algorithmus versus klinische und pathologische Faktoren) auf rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben sind bis dato abzuwarten (Annecke et al., 2008; Harbeck et al., 2008; Kantelhardt et al., 2011).

Durch die Zunahme von neoadjuvanten Chemotherapie-Konzepten und bei Erstdiagnose häufig kleinen Tumoren ist es notwendig Prognosefaktoren wie uPA und PAI-1 in kleinen Gewebemengen, wie z.B. aus der präoperativen Biopsie, bestimmen zu können.

Thomssen et al. belegten 2009 in einer Forschungsstudie, dass die Art der Gewebeentnahme unter standardisierten Bedingungen im Labor keinen Einfluss auf die gemessenen uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Karzinomgewebe hat. Unmittelbar nach der chirurgischen Tumorexzision wurden aus dem OP-Präparat durch Stanzbiopsie drei Gewebezylinder von je 10–30 mg Probengewicht entnommen. Aus diesen wurden die uPA- und PAI-1-Konzentrationen bestimmt. Die gemessenen Proteinkonzentrationen zeigten hohe Übereinstimmungen zu den uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus 100–300 mg Gewebeproben des jeweiligen chirurgischen Exzidates ( $R_{uPA} = 0,789$ ,  $p < 0,001$ ;  $R_{PAI-1} = 0,907$ ,  $p < 0,001$ ;  $ppv = 0,94$ ,  $npv = 1,00$ ). Die in der Studie untersuchten chirurgischen Exzidate/Primärtumore wurden zur Diagnosesicherung präoperativ nicht biopsiert. Folglich wurde in der Studie nicht untersucht ob durch präoperative Biopsie bedingte Alterationen im Karzinomgewebe Einfluss auf die gemessenen uPA und PAI-1-Konzentrationen in

den Exzidat-Proben nehmen. Vielmehr belegen die Studienergebnisse überzeugend die Durchführbarkeit der uPA- und PAI-1-Bestimmung aus kleinen Gewebemengen von Biopsien (Thomssen et al., 2009).

### **1.6.2 uPA und PAI-1: die Biologie des Plasminogenaktivatorsystems**

Das Plasminogenaktivatorsystem vom Urokinasetyp besteht aus den Serinproteasen Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp uPA (offizielles Gensymbol PLAU, Größe: 52 kDa) und Plasmin (90 kDa), dem uPA-Rezeptor (PLAUR/CD87 35 kDa–55 kDa), den Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren Typ-1, PAI-1 (SERPINE-1, 48 kDa), und Typ-2, PAI-2 (SERPINE-2, 60 kDa), sowie dem Gewebe-Typ Plasminogenaktivator t-PA (PLAT, 70 kDa) (Andreasen et al., 2000).

Die Serinproteasen uPA und t-PA katalysieren die Umwandlung des Plasmaproteins Plasminogen in die enzymatisch aktive Protease Plasmin. uPA und t-PA wirken an unterschiedlichen Zielstrukturen. t-PA wird durch Endothelzellen synthetisiert und spielt eine maßgebliche Rolle in der intravaskulären Thrombolyse, uPA ist hingegen an Mechanismen perizellulärer Proteolyse, Zellwanderung und Tumorzellinvasion beteiligt (Danø et al., 1985; Collen und Lijnen, 1986; Rijken, 1995).

Plasmin ist durch seine breite Substratspezifität und hohe proteolytische Aktivität an verschiedenen Umbauprozessen der zellulären Matrix beteiligt, d.h. Auflösung von Blutgerinnseln, Gewebeumbau während Schwangerschaft und Embryonalentwicklung, bei entzündlichen Prozessen, bei Wundheilung und Angiogenese, bei Tumordinvasion und Metastasierung. Diese vielfältigen Prozesse werden durch Plasmin entweder direkt oder über die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen, die wiederum die Extrazellulärmatrix degradieren, katalysiert (Andreasen et al., 1997; Mengele et al., 2005).

uPA wird in Zellen mit unterschiedlichster biologischer Funktion wie Nierentubulizellen, Fibroblasten, Keratinozyten und malignen Tumorzellen als enzymatisch gering aktive einkettige Vorstufe pro-uPA synthetisiert. pro-uPA wird im Extrazellulärraum proteolytisch u.a. durch Plasmin gespalten und in das hoch-aktive zweikettige uPA überführt. uPA bindet mit seiner aminoterminalen Wachstumsfaktordomäne GDF an den spezifischen zellmembranständigen uPA-Rezeptor, uPA-R (Petersen et al., 1988; Ploug et al., 1994). t-PA bindet im Gegensatz dazu nicht an den uPA-Rezeptor. Durch den uPA/uPA-Rezeptor-Komplex wird Plasminogen sehr viel schneller zu Plasmin katalysiert. Außerdem werden durch die Bindung von uPA an seinen Rezeptor über Tyrosinkinaserzeptoren, G-Proteine oder LDLR (Low Density Lipoprotein Rezeptoren) Sig-

nalkaskaden aktiviert, die intrazelluläre Wachstumsfaktoren synthetisieren, Apoptosemechanismen induzieren und Zellmotilität und -proliferation begünstigen (Ploug et al., 1991; Andreasen et al., 2000).

Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren Typ 1 und Typ 2, PAI-1 und PAI-2, gehören zur Familie der Serin-Protease-Inhibitoren, sog. Serpine. PAI-1 und PAI-2 werden u.a. in Endothelzellen, Fibroblasten, Thrombozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Tumorzellen synthetisiert (Simpson et al., 1991; Dellas und Loskutoff, 2005). Durch Bindung und Inhibierung von t-PA regulieren PAI-1 und PAI-2 fibrinolytische Prozesse. Durch direkte Bindung von PAI-1- oder PAI-2 an das reaktive Zentrum des Plasminogenaktivators uPA wird dieser irreversibel gehemmt (sog. Suizidhemmung) und somit die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch uPA unterbunden. PAI-2 hemmt uPA und tPA langsamer als PAI-1 (Medcalf und Stasinopoulos, 2005; Czekay et al., 2011).

PAI-1 bindet an den uPA/uPA-Rezeptorkomplex. Dies führt zur Internalisierung des ternären uPA/uPA-R/PAI-1-Komplexes in die Zelle. Nach Internalisierung werden uPA und PAI-1 lysosomal degradiert. Der uPA-Rezeptor wird an die Zelloberfläche zurückgeführt und steht für weitere Interaktionen mit uPA und PAI-1 erneut zur Verfügung. PAI-1 besitzt eine hohe Affinität zum Adhäsionsprotein Vitronektin im Extrazellulärraum und konkurriert mit uPA/ uPA-R um dessen Bindung. PAI-1 wird durch die Bindung an Vitronektin in seiner aktiven Konformation stabilisiert. Zudem wird durch den PAI-1/Vitronektin-Komplex die Bindung von Integrinen an Vitronektin verhindert. Dies führt zur Unterbindung der Adhäsion der Zelle mit der extrazellulären Matrix, Zellmigration und Zellmotilität werden begünstigt (Waltz et al., 1997; Deng et al., 2001; Czekay et al., 2011).

In malignem Tumorgewebe wirkt PAI-1 als Inhibitor von uPA somit nicht protektiv, sondern destruktiv durch die Beteiligung an Signaltransduktion, Zellproliferation und -migration und Apoptose. Diese Prozesse sind Voraussetzung für Tumorinvasion und Metastasierung (Harbeck et al., 2001; Mengele et al., 2005).

Außerhalb von malignen Tumorgeweben nimmt PAI-1 u.a. eine Schlüsselfunktion bei Reparaturmechanismen nach Gewebsverletzungen ein. Fibroblasten und Keratinozyten an Wundrändern lokalisiert exprimieren hohe Konzentrationen von uPA und PAI-1 (Rømer et al., 1991). Durch die Interaktion von PAI-1 mit Vitronektin in der Extrazellulärmatrix wird im Wundbereich Zellproliferation und -Migration induziert (Providence et al., 2000).

Die Funktionen des Plasminogenaktivatorsystems werden in Abb. 1 schematisch dargestellt.

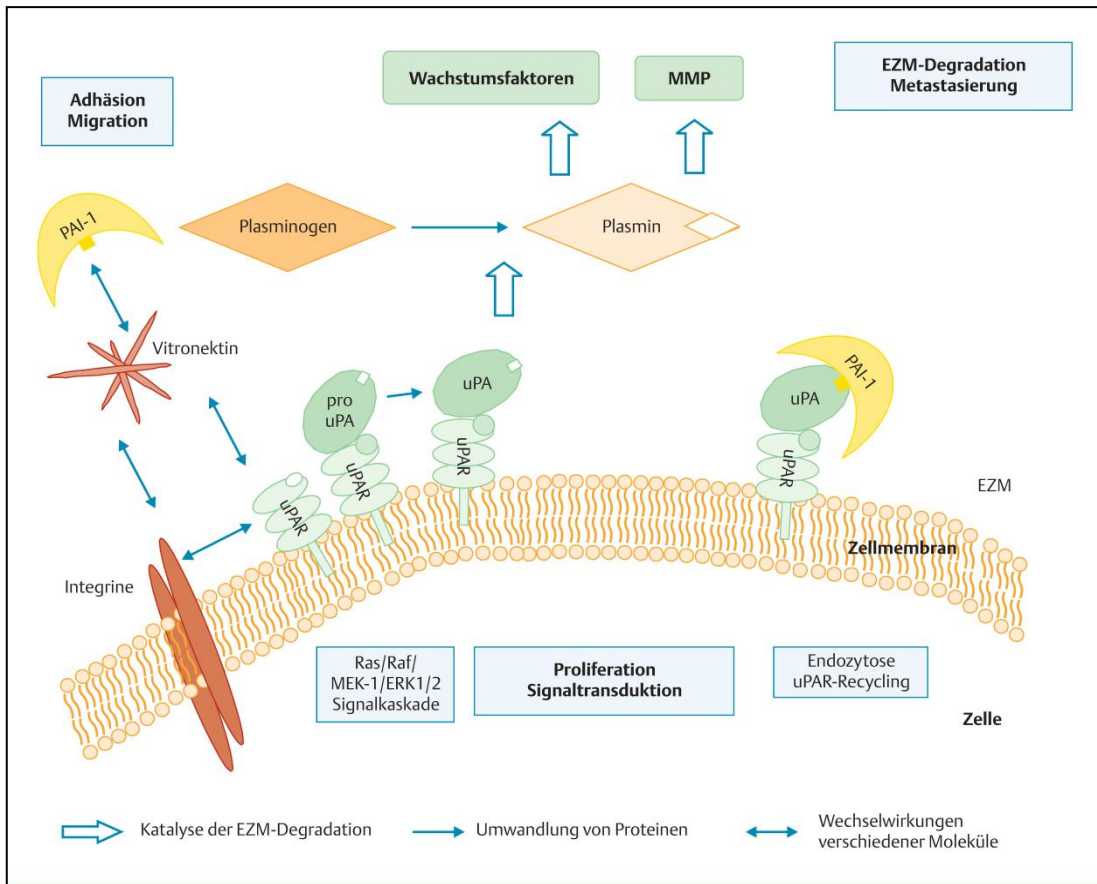


Abb. 1: Biologisches Modell des Plasminogenaktivatorsystems: durch den uPA/uPA-Rezeptorkomplex wird Plasminogen zu Plasmin katalysiert. Plasmin degradiert die extrazelluläre Matrix über MMPs und Wachstumsfaktoren. Durch die Bindung an seinen Rezeptor wird uPA aktiviert, intrazelluläre Signalkaskaden, Zellproliferation, Apoptose, Zellmigration werden induziert. PAI-1 bindet an Vitronectin, über Integrine werden Zelladhäsion und -Migration beeinflusst. Durch Bindung von PAI-1 an den uPA/uPA-Rezeptorkomplex wird dieser endozytiert, nach Abbau von uPA und PAI-1 wieder an die Zelloberfläche zurückgeführt (Vetter et al., 2007).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Bei der individualisierten Behandlung von Patientinnen mit Mammakarzinom stellt sich im klinischen Alltag die Frage, ob einer Patientin eine Chemotherapie mit den damit einhergehenden, medikamentös-toxischen Nebenwirkungen erspart bleiben kann. Zur Klärung sind prognostische und prädiktive Faktoren unerlässlich. Der Prognosefaktor uPA/PAI-1 trägt das höchste Evidenzniveau, LOE I, und wird zur Risikostratifizierung von Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom eingesetzt: Bei einem G2 klassifizierten nodalnegativen Mammakarzinom und niedrigem uPA/PAI-1-Status kann Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie erspart bleiben (Jänicke et al., 2001; Look et al., 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu prüfen, ob die mittels präoperativer Biopsie bestimmten uPA- und PAI-1-Werte im klinischen Alltag als Entscheidungsgrundlage für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie verwendet werden können, d.h. wie sicher die uPA- und PAI-1-Werte aus der präoperativen Biopsie die Werte im korrespondierenden chirurgischen Exzidat vorherzusagen.

Daraus ergibt sich die Hauptfrage:

**Wie präzise sagt ein niedriger uPA- und PAI-1-Wert in der Stanzbiopsie einen niedrigen uPA- und PAI-1-Wert im korrespondierenden chirurgischen Exzidat voraus?**

Dabei gilt es unter anderem zu beachten, dass heute Mammakarzinome gemäß der aktuellen Leitlinie vor der chirurgischen Tumorexzision durch eine präoperative Stanz- oder Vakuumbiopsie histologisch zu sichern sind. Durch die nachfolgenden Reparaturvorgänge im Tumor besteht das Risiko einer Veränderung der tumorbiologischen Prognosefaktoren wie uPA und PAI-1. Die Arbeit untersucht daher die folgenden Nebenfragen:

Nebenfragen:

1. Wie hoch ist der Anteil der nach dem UP-Algorithmus zugeordneten Patientinnen (N0, G2,  $\geq 35$  Jahre), die aufgrund des uPA/PAI-1-Status aus der präoperativen Biopsie eine andere Therapieempfehlung erhalten hätten als durch den uPA/PAI-1 Status des chirurgischen Exzidates?
2. Haben methodische, klinische und pathologische Faktoren Einfluss auf die gemessene Differenz der uPA- und PAI-1-Konzentrationen (Delta uPA und Delta PAI-1) aus präoperativer Biopsie und chirurgischem Exzidat?

3. Sind in den für die Mikroskopie angefertigten Gewebeschnitten histomorphologische und pathologische Merkmale erkennbar, die charakteristisch für konkordante und diskordante uPA- u./o. PAI-1-Konzentrationen aus präoperativer Biopsie und chirurgischem Exzidat sind?
4. Lässt sich eine höhere Übereinstimmung zwischen uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus präoperativer Biopsie und chirurgischem Exzidat erzielen, wenn in den Gewebeproben der Biopsie auch histologisch Karzinomzellen nachgewiesen wurden?
5. Hat der Defekt durch die klinisch übliche, vorausgehende Biopsie Einfluss auf die uPA- und PAI-1-Konzentrationen im chirurgischen Exzidat? Wie sind die uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Gewebeproben mit Biopsiedefekt im Vergleich zu uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Gewebeproben ohne Biopsiedefekt?

## 3 Patientinnen, Material und Methoden

### 3.1 Patientinnen, Einschlusskriterien, Probenasservierung

In den Brustzentren der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und des Krankenhauses St. Elisabeth und St. Barbara Halle (Saale) wurden im Zeitraum Juni 2005 bis September 2013 insgesamt 185 Patientinnen für die Studie rekrutiert. Das mediane Alter der Patientinnen betrug 62 Jahre (Range: 23 Jahre bis 86 Jahre).

Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war das Vorliegen eines invasiven Mammakarzinoms jeglichen Typs, das in einer präoperativen Biopsie histologisch gesichert wurde. 172 (93 %) der 185 Patientinnen in der Studie hatten eine sonographisch gestützte Stanzbiopsie, 13 (7 %) der 185 Patientinnen hatten eine mammographisch gestützte Vakuumbiopsie. Nach erfolgter Biopsie wurden zwei bis drei Biopsiezylinder unmittelbar für die spätere uPA- und PAI-1-Bestimmung auf Trockeneis ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) oder in flüssigem Stickstoff asserviert und im Forschungslabor der Universitätsklinik für Gynäkologie aufbereitet. Die histologischen Untersuchungen der Biopsiezylinder erfolgten in den beteiligten Instituten für Pathologie (Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Institut für Pathologie des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dölau).

Weitere Einschlusskriterien: weiblich, pTx, pNx, Gx, Mx, chirurgische Entfernung des Mammakarzinoms ohne neoadjuvante Chemotherapie. Vorliegen der Einverständniserklärung der Patientinnen.

Das Tumorgewebe aus dem chirurgischen Exzidat wurde vom Pathologen während der Brustoperation im Schnellschnittlabor im flüssigem Stickstoff schockgefroren ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) und an das o.g. Forschungslabor zur uPA- und PAI-1-Bestimmung weitergeleitet. Es wurde sichergestellt, dass die Probe makroskopisch Karzinomgewebe enthielt, frei von makroskopisch sichtbaren Einblutungen, Gewebedefekten durch Biopsie oder einem hohen Fettanteil war. Die Lagerung des Gewebes erfolgte, wenn erforderlich, auf Trockeneis bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 Definition der Studienkollektive und Zuordnung der Patientinnen

144 (78 %) der 185 Studienteilnehmerinnen wurden zur Beantwortung der unter 2 (Zielsetzung der Arbeit) formulierten Hauptfrage und den Nebenfragen 1 bis 3 dem sog. **Studienkollektiv 1** zugeordnet. Nach Ausschluss aller Proben mit einem im Pierce<sup>®</sup>-Test bestimmten Gesamtproteingehalt von  $< 1\text{ mg/ml}$  im Gewebeextrakt (aus Biopsie oder Exzidat) ergaben sich  $n = 127$  Fälle

im Studienkollektiv 1. Innerhalb des Studienkollektivs 1 wurden n = 35 Patientinnen nach dem UP-Algorithmus selektiert (vgl. 1.6.1), im Folgenden als **Subkollektiv 1** bezeichnet.

Die Gewebeproben der präoperativen Biopsien wogen im Median 30 mg (Range: 3 mg bis 35 mg), die Gewebeproben des chirurgischen Exzidates wogen im Median 135 mg (Range: 26 mg bis 560 mg).

Der Zeitabstand zwischen Entnahme der präoperativen Biopsie und chirurgischer Tumorexzision betrug im Median 15 Tage (Range: 2 Tage bis 48 Tage).

41 (22 %) von 185 Patientinnen wurden im Zeitraum November 2005 bis September 2007 dem sog. **Studienkollektiv 2** zugeordnet zur Beantwortung der unter 2 (Zielsetzung der Arbeit) formulierten Nebenfragen 4 und 5. Bevor die präoperativen Biopsien schockgefroren wurden, wurde der Biopsiezylinder in 4 bis 5 Gewebestücke geteilt (sog. „Fragmentierung“). Von diesen Gewebsfragmenten wurden HE-Schnitte angefertigt und vom Pathologen histologisch auf Karzinomzellen untersucht. Bei Nachweis von Karzinomzellen im HE-Schnitt wurde das gefrorene Frischgewebe unmittelbar neben der Entnahmestelle des HE-Schnittes zur uPA- und PAI-1-Bestimmung weiter aufbereitet und verwendet (siehe auch Abb. 2).

Nach Ausschluss aller Proben mit einem im Pierce®-Test bestimmten Gesamtproteingehalt von < 1 mg/ml im Gewebeextrakt (aus Biopsie oder Exzidat) ergaben sich n = 36 Fälle im Studienkollektiv 2.

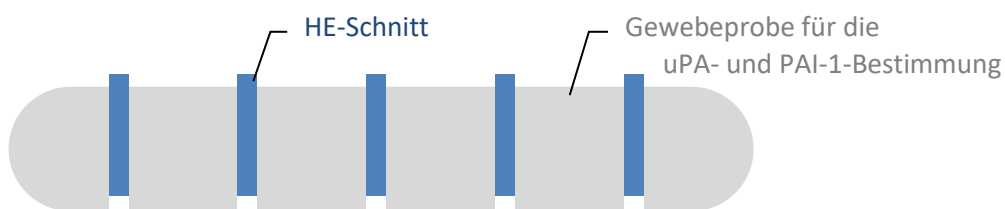


Abb. 2: Schematische Darstellung: Karzinomnachweis im Biopsiezylinder

Die Gewebeproben der präoperativen Biopsie wogen im Median 11 mg (Range: 1 mg bis 42 mg), die Gewebeproben des chirurgischen Exzidates wogen im Median 125 mg (Range: 7 mg bis 522 mg).

Der Zeitabstand zwischen Entnahme der präoperativen Biopsie und chirurgischer Tumorexzision betrug im Median 16 Tage (Range: 2 Tage bis 50 Tage).



Zudem wurden im Studienkollektiv 2 in acht Fällen im chirurgischen Tumorexizidat die uPA- und PAI-1-Konzentrationen unmittelbar aus der Region des makroskopisch sichtbaren Biopsiekanales/Biopsiedefektes gemessen und mit uPA- und PAI-1-Konzentrationen desselben chirurgischen Exzidates fern des Biopsiedefektes verglichen.

Vor Einschluss in die Studie wurde mit allen Patientinnen die Durchführung der uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung besprochen, die Bedeutung von uPA und PAI-1 als prognostischer und prädiktiver Faktor erläutert und das Einverständnis der Patientinnen eingeholt. Ebenso lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor.

**Im gesamten folgenden Text wird die präoperative Biopsie lediglich als Biopsie und das korrespondierende chirurgische Exzidat lediglich als Exzidat bezeichnet.**

Die Rekrutierung der Patientinnen für die Studie und die Zuordnung zu den unterschiedlichen Kollektiven ist in Abb. 3 dargestellt.

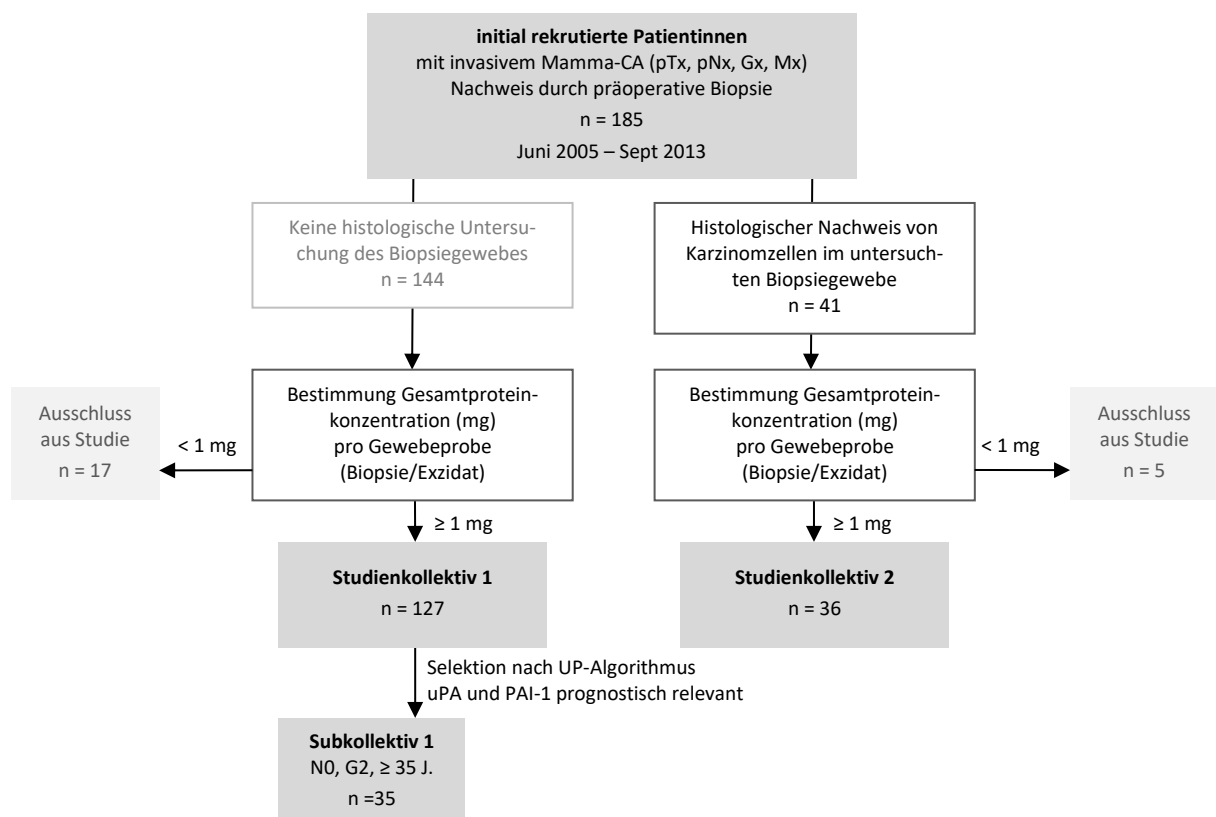


Abb. 3: Rekrutierung und Zuordnung der Patientinnen zum Studienkollektiv 1, Subkollektiv 1 und Studienkollektiv 2

Eine Übersicht über die klinischen und pathologischen Daten der Patientinnen des **Studienkollektivs 1** ist in Tab. 2 dargestellt. Angegeben sind absolute Häufigkeiten (n), sowie relative Häufigkeiten (in %).

Tab. 2: Klinische und pathologische Daten des Studienkollektivs 1

klinische und pathologische Faktoren		n (%)
Patientinnen Studienkollektiv 1		127 (100 %)
Alter zum Zeitpunkt der Biopsie (in Jahren)	< 35	4 (3 %)
	≥ 35–< 50	27 (21 %)
	≥ 50–<70	50 (40 %)
	≥ 70	46 (36 %)
histologischer Tumortyp	duktal	96 (75 %)
	lobulär	15 (12 %)
	muzinös	4 (3 %)
	andere	12 (10 %)
Hormonrezeptor-Status	HR positiv	107 (84 %)
	HR negativ	20 (16 %)
HER2-Rezeptor-Status	HER2 positiv	22 (17 %)
	HER2 negativ	105 (83 %)
Differenzierungsgrad (Grading)	G1	26 (20 %)
	G2	82 (65 %)
	G3	19 (15 %)
Tumorgröße	pT1 (< 2 cm)	42 (33 %)
	pT2 (≥ 2 cm – < 5 cm)	76 (60 %)
	pT3 (≥ 5cm)	6 (5 %)
	pT4 *	2 (2 %)
axillärer Lymphknotenbefall	pN0	64 (50 %)
	pN1	61 (48 %)
	darunter pN1a:n = 19 (15 %)	
	pN2: n =8 (6 %)	
	pN3: n =10 (8 %)	
	pN4: n =1 (3 %)	
Vorliegen von Fernmetastasen	pNx	2 (2 %)
	M0	115 (91 %)
	M1	4 (3 %)
	Mx	8 (6 %)

\*pT4: jegliche Tumorgröße mit Infiltration der Haut oder Brustwand

Eine Übersicht über die klinischen und pathologischen Daten des **Studienkollektivs 2** wird in Tab. 3 gezeigt. Angegeben sind absolute Häufigkeiten (n) und relative Häufigkeiten (in %).

Tab. 3: Klinische und pathologische Daten des Studienkollektivs 2

klinische und pathologische Faktoren		n (%)
Patientinnen im Studienkollektiv 2		36 (100 %)
Alter zum Zeitpunkt der Biopsie (in Jahren)	< 35	0 (0 %)
	≥35 – < 50	8 (22 %)
	≥ 50 – < 70	19 (53 %)
	≥ 70	8 (22 %)
histologischer Tumortyp	duktal	30 (83 %)
	lobulär	5 (14%)
	muzinös	0 (0%)
	andere	1 (3 %)
Hormonrezeptor-Status	HR positiv	25 (70 %)
	HR negativ	11 (30%)
HER2-Rezeptor-Status	HER2 positiv	7 (19 %)
	HER2 negativ	29 (81 %)
Differenzierungsgrad (Grading)	G1	3 (8 %)
	G2	20 (56 %)
	G3	13 (36 %)
Tumorgröße	pT1 (< 2 cm)	16 (44 %)
	pT2 (≥ 2 cm – < 5 cm)	17 (48 %)
	pT3 (≥ 5 cm)	3 (8 %)
	pT4 *	0 (0 %)
axillärer Lymphknotenbefall	pN0	17 (47 %)
	pN1	18 (50 %)
	darunter pN1a: n = 3 (8 %)	
	pN2: n =7 (19 %)	
	pN3: n =1 (3 %)	
	pN4: n =1 (3 %)	
	pNx	1 (3 %)
Vorliegen von Fernmetastasen	M0	31 (86 %)
	M1	3 (8 %)
	Mx	2 (6 %)

\*pT4: jegliche Tumorgröße mit Infiltration der Haut oder Brustwand

### 3.3 Material

#### 3.3.1 Material für die Gewebepreparation

- Tumorgewebe (aus präoperativer Biopsie und chirurgischem Exzidat)
- Laborwaage AJ 150L/9 (Mettler, Serien-Nr. L38259) zum Abwiegen der Gewebeproben
- Trockeneis (–80° C), crushed ice (4° C)
- flüssiger Stickstoff (N<sub>2</sub>) in Dewargefäß, Schutzhandschuhe, Schutzbrille

- Geräte zur Gewebepräparation: Skalpelle, Klagen, Pinzetten, Stößel/Hammer, reißfeste Alufolie
- gekühlte Schneideunterlage (z.B. Metallplatte)
- Kryovials: Kryoröhrchen 1,2 ml (TPP # 89012) zur Gewebeasservierung
- Kryoröhrchen 1,2 ml (Nalgene # 5000 /-0012) zur Gewebedismembration
- Stahlkugeln (Sartorius, BBI 8546919, Ø 9mm) zum Dismembrieren, Teflonbehälter zum Dismembrieren
- Mikro Dismembrator U (Sartorius, Serien-Nr. 8531722) zur Gewebedismembration
- Extraktionspuffer aus TBS (tris buffered saline – pH 8,5; 2,7 mM KCl; 50 mM TRIS (Trishydroxymethyl)-aminomethan); 138mM NaCl) und 1 % Triton für die Lysis des Gewebes
- Einkanalpipette für den Volumenbereich 10–1 000 µl
- Einweg-Pasteurpipette
- Eppendorf-Tubes 2 ml
- Vortex Mixer neolab 7-2020 (Gemmy Industrial Corp., Serien-Nr. 016671) zum Mischen von Proben und Lysis des Gewebes
- Roller Mixer SRT1 (Stuart, Serien-Nr. R000102493) für die Lysis des Gewebes
- Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus, Serien-Nr. 40259081) für die Gewinnung des Cytoplasts aus dem lysierten Gewebe

### **3.3.2 Material für die Gesamtproteinbestimmung**

- Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Prod # 23225)
  - Reagenz A: (1 000 ml, Zusammensetzung: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninic-Säure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid)
  - Reagenz B: (25 ml, enthält 4 % Kupfersulfat)
  - Albumin Standard 2 mg/ml: (1 ml-Ampulle, enthält Rinderserum-Albumin bovine serum albumin – BSA auf 2 mg/ml in 0,9 % NaCl und 0,05 % Natriumazid)
- Crushed ice (4° C) zum Auftauen der Gewebeprouben
- Verdünnungspuffer aus TBS pH 8,5 und 0,1 % Triton (4° C)

- Mikrotiterplatte 96-well (96 Vertiefungen)
- Multipipette für den Volumenbereich 200 µl
- Klebefolie oder Parafilm
- Wärmeschrank Innova 4230 (New Brunswick Scientific, Serien-Nr. 201040530)
- Photometer Plattenreader Anthos 2020 (Anthos, Serien-Nr. 225501228)  
Messwellenlänge 570 nm
- Microtubes 1,5 ml

### 3.3.3 Material für die uPA- und PAI-1-Proteinbestimmung mittels ELISA

- Femtelle™ uPA/PAI-1 Test – Ref 899  
(Sekisui Diagnostics, LLC; Lexington, MA, USA)
  - anti-human uPA IgG beschichtete Mikrotiterplatten (farblos): 6 Streifen mit 16 Vertiefungen, Halter u. Abdeckung
  - anti-human PAI-1 IgG beschichtete Mikrotiterplatten (rot markiert): 6 Streifen mit je 16 Vertiefungen, Halter u. Abdeckung
  - uPA Standard: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 ng/ml (lyophilisiert)
  - PAI-1 Standard: 0, 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ng/ml (lyophilisiert)
  - uPA-Detektionsantikörper, biotinyliertes anti-human uPA (lyophilisiert)
  - PAI-1-Detektionsantikörper, biotinyliertes anti-human PAI-1 (lyophilisiert)
  - uPA-Enzym-Konjugat, Streptavidin – HRP (60 µl)
  - PAI-1-Enzym-Konjugat, Streptavidin – HRP (60 µl)
  - Enzymkonjugat-Verdünner (lyophilisiert)
- TBS-Puffer, pH 8,5 (lyophilisiert)
- Probenpuffer aus PBS (Phosphate Buffered Saline – pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2 H<sub>2</sub>O; 2,0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) und 0,1 % Triton und 1 % BSA; (4° C)
- Extraktionspuffer aus TBS pH 8,5 und 1 % Triton
- Waschpuffer aus PBS pH 7,4 und 0,1 % Triton
- Peroxidase-Substrat, TMB
- 0,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Schwefelsäure)

- Rinderserum-Albumin (BSA, Sigma Life Science – A7030-50G)
- uPA/PAI-1-Reference Sample aus Nijmegen – Ref 899C  
(Sekisui Diagnostics, LLC; Lexington, MA, USA)
- 0,22 µl gefiltertes deionisiertes H<sub>2</sub>O
- Multipipette für den Volumenbereich 50–200 µl
- Einkanalpipette für den Volumenbereich 10–200 µl
- Behälter mit Deckel und mit Aqua dest. benetztem Zellstoff ausgelegt –  
feuchte Kammer
- Photometer Plattenreader Anthos 2020 (Anthos, Serien-Nr.: 225501228)  
Messwellenlänge 450 nm
- Software Microsoft Excel 2007 (für Windows, Fa. Microsoft Corp., Redmond, WA, USA,  
Vers. 2007) zur Auswertung der uPA- und PAI-1-Konzentrationen

### **3.4 Methoden**

#### **3.4.1 Präparation des Tumormaterials**

Schritt 1: Pulverisierung der Gewebeprobe

Abwiegen des kurzzeitig auf Trockeneis gelagerten Tumorgewebes. Alle Werkzeuge und Materialien sollten zwischen den Arbeitsschritten stets in N<sub>2</sub> gekühlt werden. Die Gewebeprobe haben pro Ansatz ein maximales Gewicht von 300 mg, ggf. mehrere Ansätze pro Tumorprobe. Das Gewebe darf nicht antauen. Mechanische Zerkleinerung der in Alufolie gewickelten Proben. Überführung der Gewebsbrösel in ein Kryoröhrchen und Dismembrierung der Gewebeprobe zweimal für 45 Sekunden bei 2000 rpm. Lagerung der pulverisierten Tumorproben bei –80° C auf Trockeneis.

Schritt 4: Lysis des Gewebes

Auftauen der pulverisierten Gewebeprobe für ca. 10 Minuten auf crushed ice (4° C). Entsprechend des Probengewichtes Hinzugeben des Extraktionspuffers (TBS pH 8,5 mit 1 % Triton, 4° C) zur Probe in das Kryoröhrchen. Vortexen des Proben-Puffer-Gemisches Die Suspension wird bei 4° C über Nacht für ca. 14–16 h auf dem Roller Mixer gemischt.

Schritt 5: Herstellen des cytosolischen Tris-Triton-Extrakts

Nochmaliges Vortexen der Suspension und Überführen in ein 2 ml Eppendorf Tube. Zentrifugation für eine Stunde bei 13 000 g und 4° C zur Trennung der Zelltrümmer vom Cytosol. Nach Zentrifugation Abtrennen sichtbarer Lipidreste vom Zellüberstand. Das Cytosol wird in ein gekühltes TPP-Kryoröhrchen pipettiert und aliquotiert. Lagerung der Extrakte in N<sub>2</sub>.

### **3.4.2 Gesamtprotein-Bestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Prod # 23225) entsprechend der Angaben des Herstellers.

- Verdünnung der Albumin Standardreihe laut Kit-Anleitung
- Verdünnung der Proben mit Verdünnungspuffer (TBS pH 8,5 und 0,1 % Triton, 4° C)
- Herstellen der Working Reagenz laut Kit-Anleitung
- Bestückung der Mikrotiterplatte (96 wells – Vertiefungen) und Proteinmessung:

Pipettieren von 10 µl des Verdünnungspuffers als Blank, der Standards, der Kontrollen und der Extrakte in je eine Vertiefung der Mikrotiterplatte. Hinzu pipettieren von 200 µl der Working Reagenz in jede Vertiefung. Inkubation der Proben bei 37° C für 30 Minuten. Kühlen der Proben bei 4° C über 10 Minuten. Messung der Extinktion/optischen Dichte (OD-Werte) der Proben bei A<sub>570nm</sub> im Photometer. Mittels der Excel Software wird aus den gemessenen OD-Werten der Standards eine Standardkurve erstellt. Die Konzentration des Gesamtproteins der Gewebeextrakt-Probe wird anhand der Standardkurve kalkuliert.

### **3.4.3 uPA/PAI-1-ELISA – Testprinzip und Testdurchführung**

Der Femtelle™ uPA/PAI-1-Test (Sekisui Diagnostics, LLC; Lexington, MA, USA) basiert auf dem Prinzip eines Sandwich ELISAs mit beschichtetem primärem Antikörper in der Platte und späterer Zugabe des sekundären Antikörpers

Tag 1

Schritt 1: Reagenzienvorbereitung und Probenvorbereitung

Lösen der lyophilisierten uPA- und PAI-1-Standards in Aqua dest. und Inkubation für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Lösen der uPA/PAI-1-Referenzprobe in Probenpuffer und Inkubation für 30 Minuten bei 4° C. Der Leerwert (Probenpuffer aus PBS, 0,1 % Triton, 1 % BSA) wird bereitgestellt. Verdünnung der -Proben in Abhängigkeit von der gemessenen Gesamtprotein-Konzentration.

## Schritt 2: Belegung der Mikrotiterplatten

Für die uPA-Konzentrationsbestimmung werden in die mit dem uPA-Antikörper beschichteten Vertiefungen der (ersten) Mikrotiterplatte je 100 µl Probenpuffer (Blank), uPA-Standard, Referenzkontrolle, interne Kontrolle und die verdünnten Gewebeextrakte pipettiert. Vorgehen in gleicher Weise für die PAI-1-Konzentrationsbestimmung (Verwendung der mit dem PAI-1-Antikörper beschichteten (zweiten) Mikrotiterplatte). Von allen zu messenden Proben erfolgt immer ein Doppelansatz. Abdecken der Mikrotiterplatten mit Folie und Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C.

## Tag 2

### Schritt 1: Reagenzienvorbereitung

Auflösen der uPA- und PAI-1-Detektionsantikörper und des lyophilisierten Enzymkonjugat-Verdünners in Aqua dest für die uPA und PAI-1-ELISA-Testdurchführung laut Kit-Anleitung.

### Schritt 2: uPA/PAI-1-ELISA Testdurchführung

Viermaliges Waschen der Vertiefungen mit Waschpuffer. In jede Vertiefung werden 100 µl uPA- bzw. PAI-1-Detektions-Antikörper pipettiert. Inkubation der Platten bei Raumtemperatur für eine Stunde, es erfolgt die uPA- bzw. PAI-1-Antigen-Antikörper-Reaktion. Nochmaliges Waschen (4x) der Platte mit Waschpuffer. In jede Vertiefung werden 100 µl verdünntes uPA- oder PAI-1-Enzymkonjugat pipettiert. Inkubation der Platten bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nochmaliges Waschen (4x) der Platten mit Waschpuffer. Es werden je 100 µl Peroxidase-Substratlösung (TMB) in jede Vertiefung der Platten pipettiert. Inkubation der Platten bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 min. Durch Substratabbau erfolgt ein blauer Farbumschlag. Nach 20 min. wird die Enzymaktivität durch Hinzugabe von 50 µl 0,5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Vertiefung abgestoppt. Die Lösung in den Vertiefungen färbt sich gelb.

### Schritt 3: Messung und Auswertung der uPA- und PAI-1-Konzentration

Nach Abstoppen des Substratumsatzes erfolgt die Messung der Enzymaktivität innerhalb von 10 min. bei A<sub>450nm</sub> im Photometer. Der Mittelwert der Extinktion des Nullwertes (Standard 0 ng/ml) wird von den Standards abgezogen. Der Mittelwert der Extinktion des Blank (Probenpuffer) wird von den Gewebeextrakt-Proben abgezogen.

Zur Kalkulation der uPA- und PAI-1-Konzentrationen wird in Excel eine Standardkurve erstellt. In der Standardkurve werden die gemessenen Extinktionswerte jedes uPA- und PAI-1-Standards gegen die entsprechende uPA- und PAI-1-Konzentration aufgetragen. Die Standardkurve entspricht einer quadratischen Funktion ( $f(x) = ax^2 + bx + c$ ). Mittels dieser Funktion werden die uPA- und PAI-1-Konzentrationen der Kontrollen und Proben in ng/ml kalkuliert. Die ermittelte



uPA- und PAI-1-Konzentration in ng/ml wird mit dem Verdünnungsfaktor der Gewebeextrakt-Probe multipliziert.

Die Bezugsgröße der uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Tumor ist die Konzentration des Gesamtproteins im Cytosol. Die Ratio aus der im ELISA gemessenen Konzentration in ng/ml und dem Gesamtprotein in mg/ml ist die im klinischen Alltag zur Prognoseabschätzung gebräuchliche uPA- und PAI-1-Konzentration in ng/mg Gesamtprotein.

#### **3.4.4 Methoden der Auswertung und der Statistik**

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde die SPSS-Statistik-Software (für Windows, Fa. IBM, Armonk, NY, USA, Vers. 19.0) sowie Microsoft Excel (für Windows, Fa. Microsoft Corp., Redmond, WA, USA, Vers. 2007) verwendet.

Für die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus präoperativer Biopsie und chirurgischem Exzidat wurden für beide Studienkollektive Median mit Interquartilabstand, Minimum und Maximum ermittelt und tabellarisch zusammengefasst. Die gemessenen uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat eines jeden Falles wurden für beide Studienkollektive tabellarisch erfasst und graphisch dargestellt.

Im Studienkollektiv 1 wurden die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus dem Biopsiegewebe (neue Methode – in Bezug auf die Art der Probenentnahme) und die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus dem Exzidatgewebe (etablierte Methode) nach dem Verfahren von Bland und Altman verglichen (siehe Zielsetzung unter 2) (Bland und Altman, 1986; Grouven et al., 2007).

Mithilfe des Verfahrens von Bland und Altman wurde eine Interpretation der Übereinstimmung der zwei Methoden geführt. Es wurde ermittelt, ob durch eine Methode die uPA- und PAI-1-Konzentrationen prinzipiell höher oder tiefer als durch die alternative Methode gemessen werden (systematischer Fehler). Es wurde eine Aussage über die Verzerrung und Streuung der Differenzen der einzelnen Messwertepaare getroffen. Es wurde ermittelt, ob die Streuung der einzelnen Messwertepaare von der Größe der erhobenen Messwerte abhängig ist. Die klinische Beurteilung der Ergebnisse entscheidet über die Übereinstimmungsgüte der zwei miteinander verglichenen Methoden.

In Bland-Altman-Plots wurden die gemessenen Einzeldifferenzen der Proteinkonzentrationen (Differenz von uPA oder PAI-1 aus Biopsie und Exzidat in ng/mg Gesamtprotein) gegen den Mittelwert der Proteinkonzentrationen eines jeden Falles ( $(\text{uPA oder PAI-1 aus Biopsie} + \text{uPA oder PAI-1 aus Exzidat}) / 2$ ) aufgetragen. Der Mittelwert aller Einzeldifferenzen gibt im Bland-Altman-

Plot die Verzerrung  $d$ , den sog. Bias, an. Je stärker die Annäherung von  $d$  gegen Null ist, desto geringer die Abweichung der einzelnen uPA- oder PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat eines jeden Falles. Die Übereinstimmungsgrenzen, sog. Limits of Agreement, berechnen sich aus der Verzerrung  $d$  addiert und subtrahiert mit der 2-fachen Standardabweichung  $s$  aller Einzeldifferenzen. Laut Bland und Altman begrenzen diese Limits of Agreement den Bereich in dem 95 % aller ermittelten Einzeldifferenzen liegen (Bland und Altman, 1986; Grouven et al., 2007).

In beiden Studienkollektiven wurden für die uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung in Biopsie und Exzidat Sensitivitäten, Spezifitäten, negative und positive prädiktive Werte mit Berechnung des jeweiligen 95 % Konfidenzintervalles erhoben. In einer Vierfeldertafel wurden die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat als dichotome Merkmale (uPA- und PAI-1-Konzentrationen bzw. uPA/PAI-1-Status unter den jeweiligen Schwellenwerten oder über den jeweiligen Schwellenwerten) erfasst. Mithilfe dieser Methoden wurde die Hauptfrage sowie Nebenfrage 1 und 4 beantwortet (vgl. 2).

Zur Beantwortung von Nebenfrage 2 wurde anhand eines allgemeinen linearen Modells (univariate Varianzanalyse) der Einfluss von verschiedenen klinischen und pathologischen Faktoren auf die mittlere Differenz der uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat (Delta uPA und Delta PAI-1) überprüft. Es wurde der Regressionskoeffizient für jeden untersuchten klinischen oder pathologischen Faktor mit 95 % Konfidenzintervall angegeben. Der Regressionskoeffizient beschreibt den Zusammenhang und die Stärke des untersuchten klinischen oder pathologischen Faktors auf Delta uPA oder Delta PAI-1. Der Regressionskoeffizient beschreibt, um wie viel sich der Delta uPA- oder PAI-1-Wert verändern würde, wenn der jeweilige klinische oder pathologische Faktor um eine Einheit steigen würde. Je größer der Betrag des Regressionskoeffizienten, desto größer ist der Einfluss des untersuchten Faktors auf Delta uPA oder Delta PAI-1 (Bender et al., 2007).

Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Für die untersuchten Faktoren wurden Tests auf Varianzhomogenität durchgeführt.

Zur Beantwortung von Nebenfrage 3 wurde eine qualitative/deskriptive Analyse von exemplarisch ausgewählten Fällen mit sehr abweichenden uPA- u./o. PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat im Vergleich zu Fällen mit konkordanten uPA- u./o. PAI-1-Konzentrationen anhand histopathologischer Beurteilungen des Mikroskopie-Materials der Biopsie und des Exzidates durchgeführt.

Die histologische Auswertung erfolgte unter fachärztlicher Anleitung in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Halle (Saale) und dem Institut für Pathologie des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dörlau.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1

#### Zusammenfassende Auswertung:

Im Folgenden sind die Minimal- und Maximalwerte, sowie der Median (mit Interquartilrange) der uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat für das Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1 in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Minimum, Maximum, Median (mit Interquartilrange) der uPA- und PAI-1-Konzentrationen in ng/mg Gesamtprotein, Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1

	Minimum [ng/mg]	Maximum [ng/mg]	Median (Interquartilrange) [ng/mg]
<b>Studienkollektiv 1 n = 127</b>			
uPA Biopsie	0,21	21,68	3,67 (5,3)
uPA Exzidat	0,24	13,95	2,60 (3,71)
PAI-1 Biopsie	0,89	178,10	18,04 (15,73)
PAI-1 Exzidat	1,09	179,90	15,47 (14,80)
<b>Subkollektiv 1 n = 35</b>			
uPA Biopsie	0,28	21,68	3,03 (4,12)
uPA Exzidat	0,24	13,59	2,68 (2,45)
PAI-1 Biopsie	0,89	113,39	18,04 (16,49)
PAI-1 Exzidat	1,09	179,90	15,48 (16,20)

In Tab. 4 wird deutlich, dass die Minimalwerte, Maximalwerte und der jeweilige Median mit Interquartilrange der uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat nur geringen Abweichungen zueinander unterliegen. Der jeweilige Median der uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen ist in beiden Studienkollektiven in der Biopsie gering höher als im Exzidat (um 0,35 ng/mg Gesamtprotein höher für uPA in der Biopsie im Subkollektiv 1 und um 2,57 ng/mg Gesamtprotein höher für PAI-1 der Biopsie im Studienkollektiv 1).

#### 4.1.1 uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1

Im Folgenden sind die einzelnen uPA- und PAI-1-Konzentrationen in korrespondierenden Biopsien und Exzidaten für das Studienkollektiv 1 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Fälle gruppiert nach den uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf den jeweiligen Schwellenwert. Innerhalb jeder Gruppe wurden die Fälle aufsteigend nach den Mittelwerten der uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat eines jeden Falles sortiert.

Für das Studienkollektiv 1 sind die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat in Abb. 4 und Abb. 5 graphisch dargestellt. Die Differenz zwischen der uPA- bzw. PAI-1-Konzentration aus Biopsie und Exzidat eines jeden Falles ist als Verbindungslinie visualisiert.

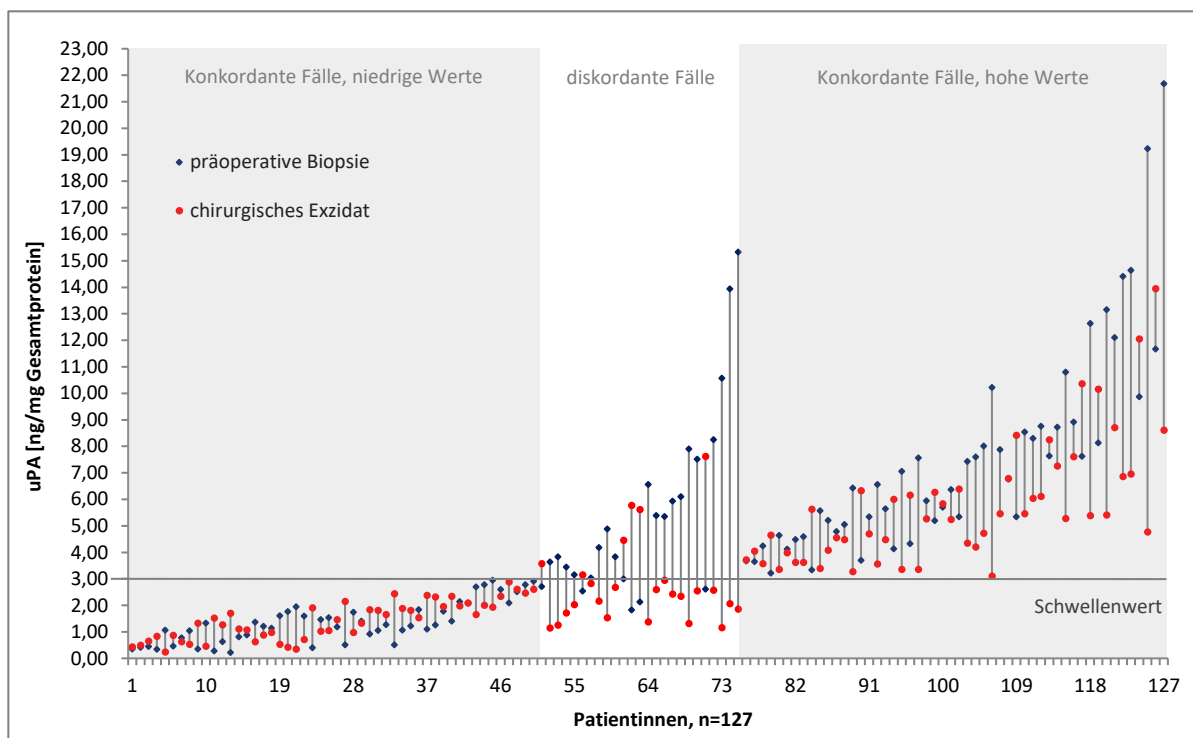


Abb. 4: Studienkollektiv 1: uPA-Konzentrationen im Gewebe der Biopsie und des Exzidates [ng/mg Gesamtprotein]

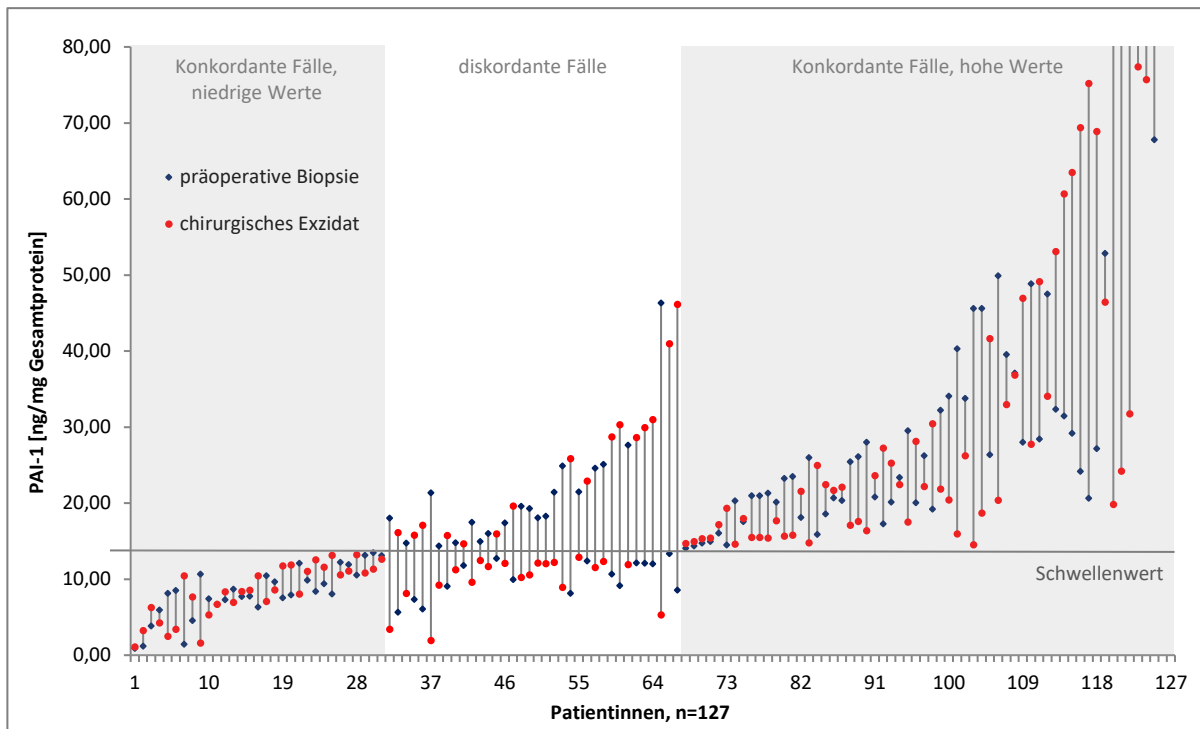


Abb. 5: Studienkollektiv 1: PAI-1-Konzentrationen im Gewebe der Biopsie und des Exzidates [ng/mg Gesamtprotein]

#### 4.1.2 uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat, Subkollektiv 1

Für das Subkollektiv 1, das nach dem UP-Algorithmus klassifiziert wurde, sind die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt. Ebenfalls ist die Differenz zwischen der uPA- bzw. PAI-1-Konzentration aus Biopsie und Exzidat eines jeden Falles als Verbindungslinie visualisiert.

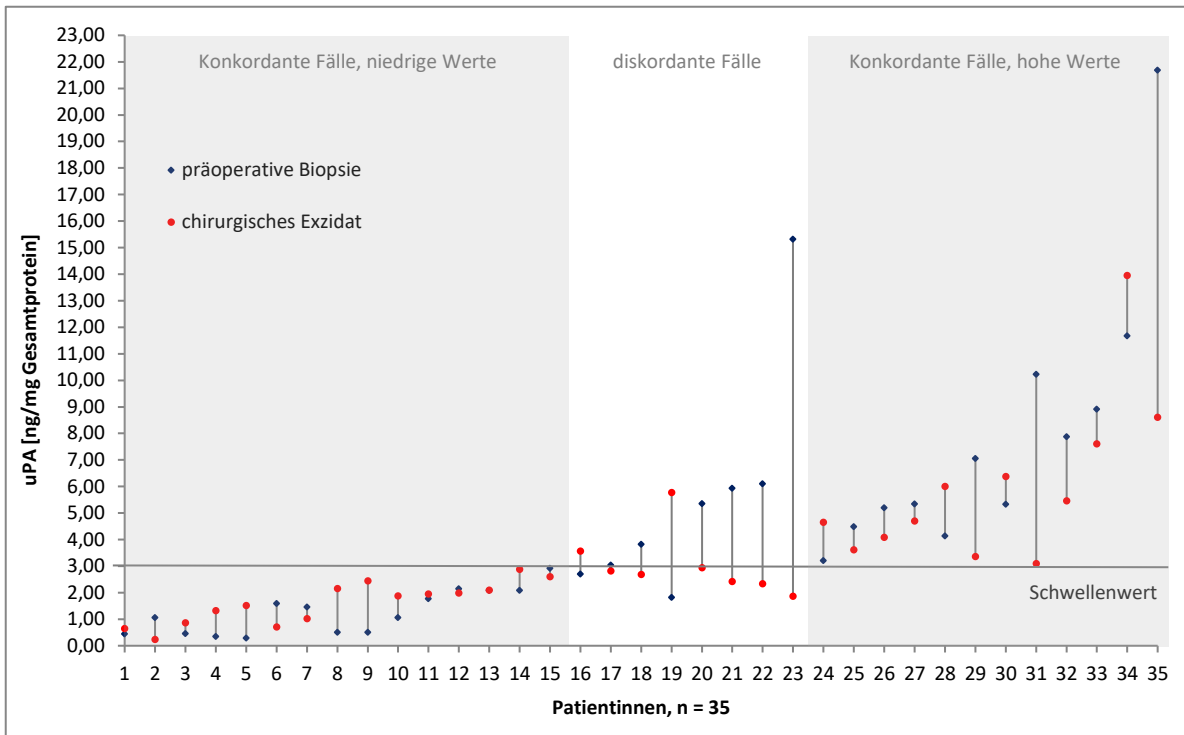


Abb. 6: Subkollektiv 1: uPA-Konzentrationen im Gewebe der Biopsie und des Exzidates [ng/mg Gesamtprotein]

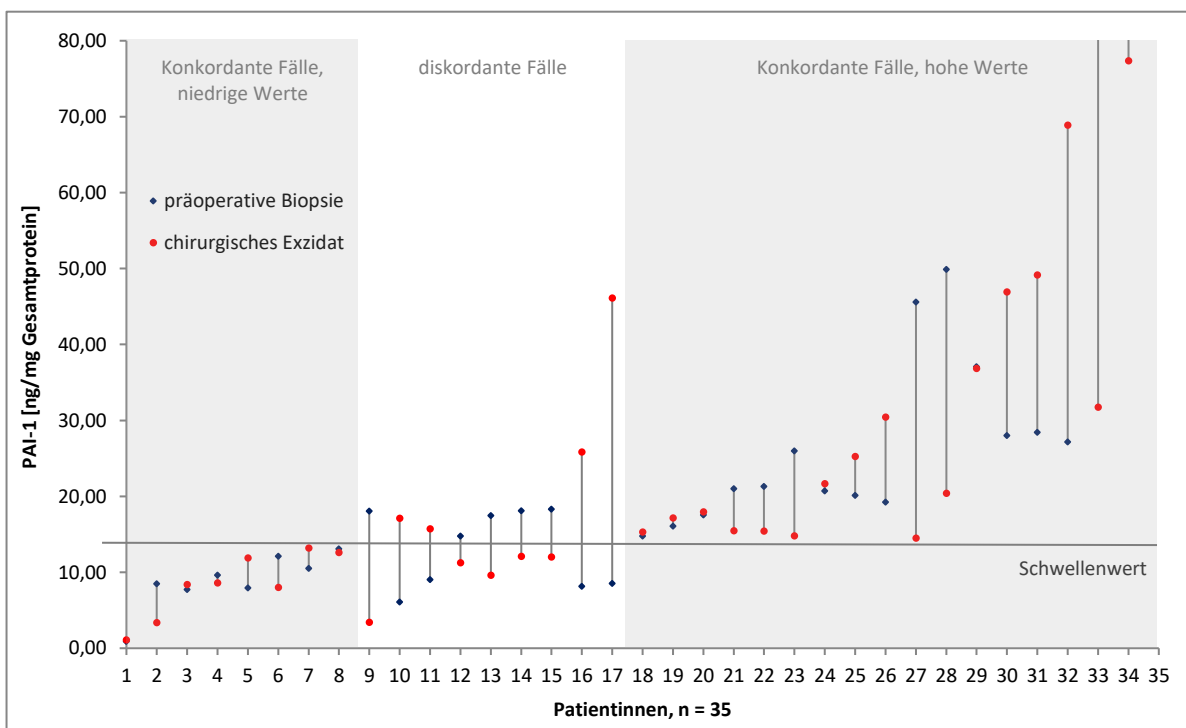


Abb. 7: Subkollektiv 1 : PAI-1-Konzentrationen im Gewebe der Biopsie und des Exzidates [ng/mg Gesamtprotein]

Im Subkollektiv 1 sind 8 Fälle diskordant für uPA (s. Abb. 6) und 9 Fälle diskordant für PAI-1. Zwei Fälle im Subkollektiv 1 sind sowohl diskordant für uPA als auch für PAI-1.

Für beide Kollektive wird in den Abb. 4 bis Abb. 7 deutlich, dass die geringste Abweichung zwischen den uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen besteht, die unter den cut-off-Werten in Biopsie und Exzidat liegen. Je höher die uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie/im Exzidat, desto höher ist die Abweichung zu den uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen im korrespondierenden Präparat (Biopsie bzw. Exzidat).

## 4.2 Analyse der Übereinstimmung (Limits of Agreement) für uPA- und PAI-1-Konzentrationen in korrespondierenden Biopsien und Exzidaten

Der Vergleich der neuen Methode, uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung aus präoperativer Biopsie, mit der etablierten Methode, uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung aus dem chirurgischen Exzidat, wird im Folgenden (Abb. 8 bis Abb. 10) in Bland-Altman-Plots dargestellt. Die Übereinstimmungsgrenzen (Limits of Agreement) sowie die Verzerrung und Streuung der uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat werden für das Studienkollektiv 1 und das Subkollektiv 1 analysiert (vgl. 3.4.4).

### 4.2.1 uPA-Konzentrationsbestimmung aus Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1

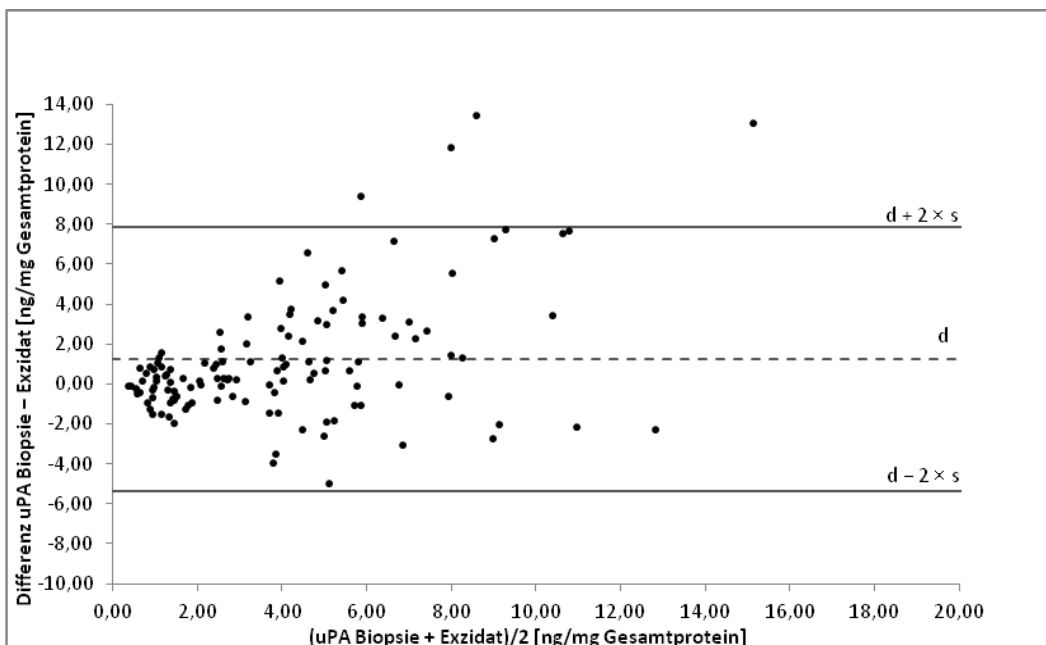


Abb. 8: Bland-Altman-Plot der uPA-Proteinkonzentrationen in ng/mg Gesamtprotein in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1



Der Mittelwert  $d$  (Verzerrung) aller Einzeldifferenzen der uPA-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat beträgt 1,25 ng/mg Gesamtprotein. Das heißt, dass die uPA-Konzentrationen im Biopsiegewebe im Mittel höher sind, als im Gewebe des chirurgischen Exzidates. Bis auf 4 von 127 Fällen liegen alle gemessenen Einzeldifferenzen von uPA aus Biopsie und Exzidat in den Übereinstimmungsgrenzen. Die Übereinstimmungsgrenzen liegen bei 7,87 ng/mg Gesamtprotein und  $-5,38$  ng/mg Gesamtprotein. Demnach liefert in 95 % der Fälle die uPA-Bestimmung in der Biopsie einen Wert, der bis zu 7,87 ng/mg Gesamtprotein größer, bzw. bis zu 5,38 ng/mg Gesamtprotein kleiner ist, als eine im Exzidat gemessene uPA-Konzentration. Der Bland-Altman-Plot zeigt, dass die Streuung der einzelnen Messwertepaare um den Mittelwert  $d$  von der Höhe der erhobenen Messwerte abhängig ist. Je höher die uPA-Konzentrationen in der Biopsie bzw. im Exzidat, desto höher die Differenz zur uPA-Konzentration im korrespondierenden Präparat (Biopsie bzw. Exzidat).

#### 4.2.2 PAI-1-Konzentrationsbestimmung aus Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1

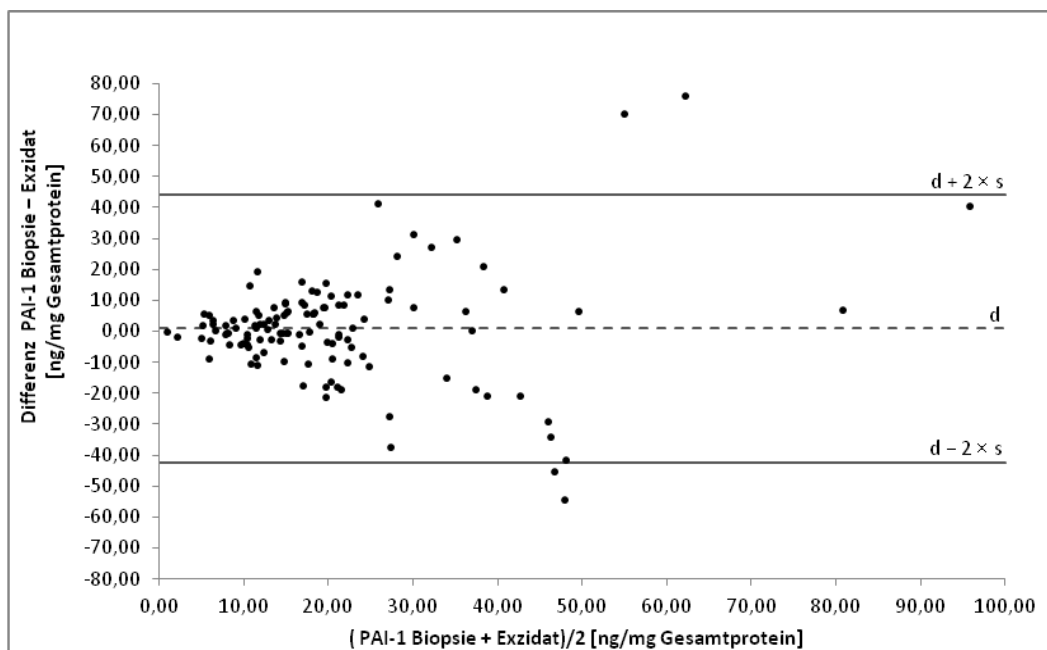


Abb. 9: Bland-Altman-Plot der PAI-1-Proteinkonzentrationen in ng/mg Gesamtprotein in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1

Der Mittelwert  $d$  (Verzerrung) aller Einzeldifferenzen der PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat beträgt 0,93 ng/mg Gesamtprotein. Das heißt, dass die PAI-1-Konzentrationen im Biopsiegewebe im Mittel etwas höher sind, als im Gewebe des Exzidates. Bis auf 4 von 127 Fällen liegen alle gemessenen Einzeldifferenzen von PAI-1 aus Biopsie und Exzidat innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen. Diese liegen bei 44,30 ng/mg Gesamtprotein und  $-42,44$  ng/mg Gesamtprotein und zeigen damit einen sehr großen Schwankungsbereich der Messwertepaare. Die

Streuung der einzelnen Messwertepaare um den Mittelwert  $d$  ist für die PAI-1-Konzentrationen ebenfalls von der Größe der erhobenen Messwerte abhängig. Je höher die PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie bzw. im Exzidat, desto höher ist die Differenz zur PAI-1-Konzentration im korrespondierenden Präparat (Biopsie bzw. Exzidat).

#### 4.2.3 uPA-Konzentrationsbestimmung aus Biopsie und Exzidat, Subkollektiv 1

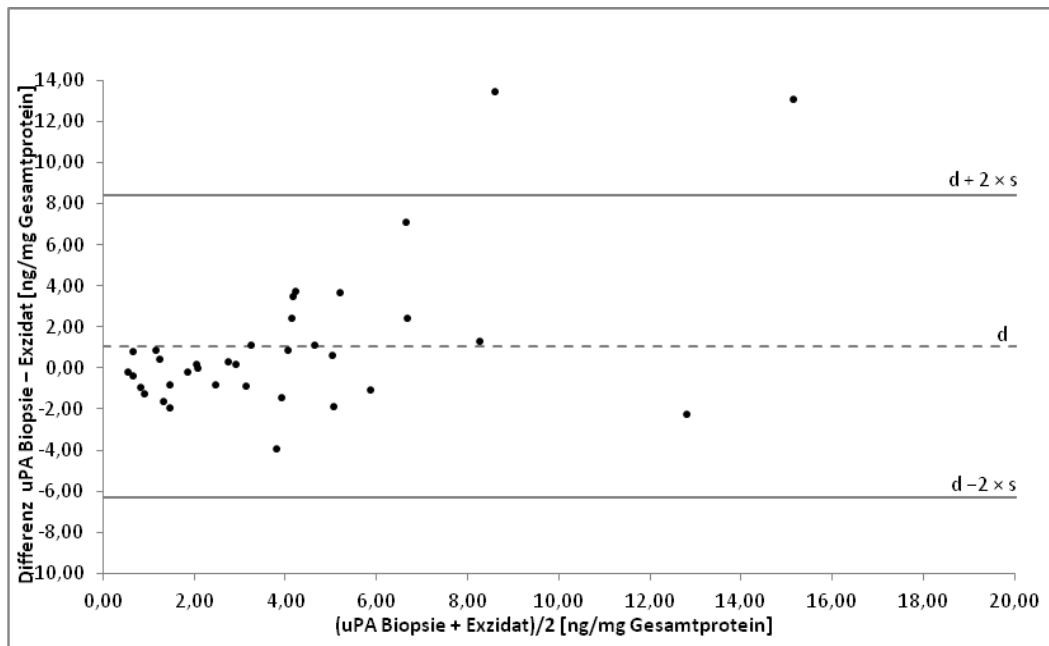


Abb. 10: Bland-Altman-Plot der uPA-Proteinkonzentrationen in ng/mg Gesamtprotein in Biopsie und Exzidat, Subkollektiv 1

Der Mittelwert  $d$  (Verzerrung) aller Einzeldifferenzen der uPA-Konzentrationen des Subkollektivs 1 beträgt 1,08 ng/mg Gesamtprotein. Die uPA-Konzentrationen in der Biopsie sind im Mittel höher als im Exzidat. Die obere Übereinstimmungsgrenze beträgt 8,40 ng/mg Gesamtprotein, die untere Übereinstimmungsgrenze  $-6,28$  ng/mg Gesamtprotein. Die Übereinstimmungsgrenzen sind nahezu identisch zu denen im Studienkollektiv 1. Der Schwankungsbereich der einzelnen Messwertepaare im Studienkollektiv 1 (13,25 ng/mg Gesamtprotein) und Subkollektiv 1 (14,68 ng/mg Gesamtprotein) ist annähernd gleich weit (siehe Abb. 8).

#### 4.2.4 PAI-1-Konzentrationsbestimmung aus Biopsie und Exzidat, Subkollektiv 1

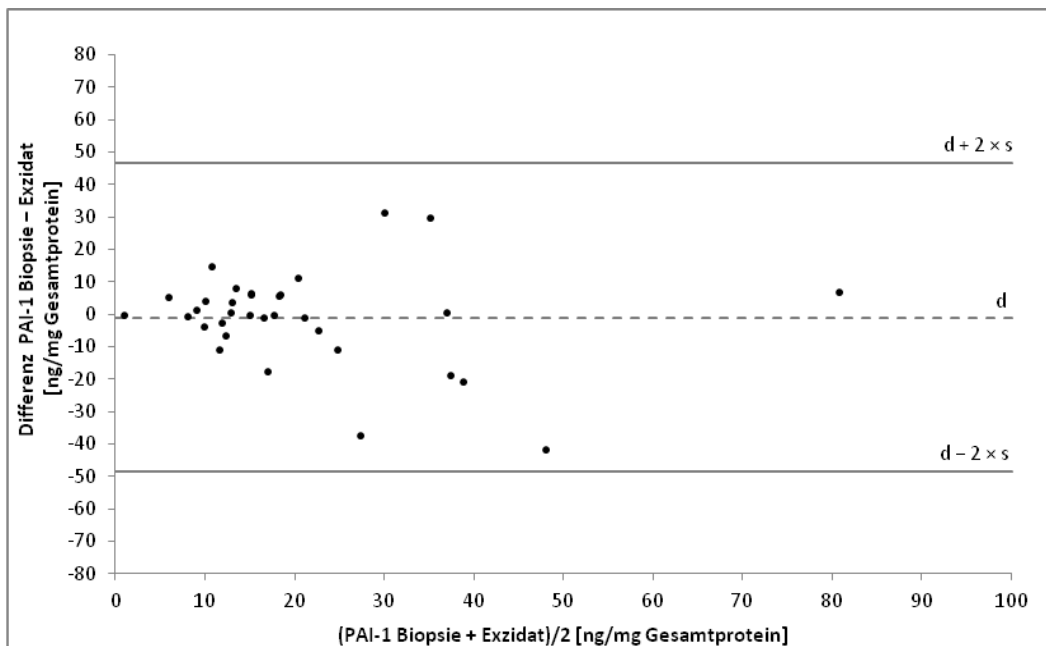


Abb. 11: Bland-Altman-Plot – PAI-1-Proteinkonzentrationen in ng/mg Gesamtprotein in Biopsie und Exzidat, Subkollektiv 1

Der Mittelwert  $d$  aller Einzeldifferenzen beträgt  $-1,01$ , das bedeutet, dass im Mittel die PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie niedriger sind als im Exzidat. Bei einer kleinen Fallzahl von  $n = 35$  beeinflussen einzelne Ausreißer den Mittelwert  $d$  maßgeblich, dies ist im hier untersuchten Subkollektiv 1 der Fall. Daher kann die Interpretation des dargestellten Vergleichs der zwei Messmethoden nur eingeschränkt erfolgen. Die Übereinstimmungsgrenzen sind  $46,60$  ng/mg Gesamtprotein und  $-48,62$  ng/mg Gesamtprotein. Aufgrund einzelner Ausreißer bei den Differenzen von PAI-1 aus Biopsie und Exzidat bilden die Übereinstimmungsgrenzen ebenfalls einen sehr großen Schwankungsbereich ab.

#### 4.3 Verteilung von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf Schwellenwerte

Im Folgenden (Tab. 5 bis Tab. 10) sind die uPA-, PAI-1-Konzentrationen und der uPA/PAI-1-Status aus Biopsie und Exzidat in Bezug auf die jeweiligen Schwellenwerte ( $\geq 3$  ng/mg Gesamtprotein für uPA,  $\geq 14$  ng/mg Gesamtprotein für PAI-1 – als cut-off bezeichnet) für das Studienkollektiv 1 und das Subkollektiv 1 dargestellt. Die Anzahl und relativen Häufigkeiten der Fälle, die für die untersuchten Proteinkonzentrationen und den uPA/PAI-1-Status in Bezug auf die jeweiligen Schwellenwerte konkordant oder diskordant sind, werden in Vierfeldertafeln dargestellt.

Tab. 5: Verteilung der uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat  
in Bezug auf den Schwellenwert, Studienkollektiv 1

uPA Studienkollektiv 1, n = 127		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	52 (41 %)	18 (14 %)	70
	< cut-off	6 (5 %)	51 (40 %)	57
Gesamt		58	69	127

Im Studienkollektiv 1 sind für die uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat 24 Fälle diskordant (19 %). In 75 % aller diskordanten Fälle liegen die uPA-Konzentrationen in der Biopsie über dem Schwellenwert, die uPA-Konzentrationen im Exzidat unter dem Schwellenwert.

Tab. 6: Verteilung der PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat  
in Bezug auf den Schwellenwert, Studienkollektiv 1

PAI-1 Studienkollektiv 1, n = 127		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	60 (47 %)	20 (16 %)	80
	< cut-off	16 (13 %)	31 (24 %)	47
Gesamt		76	51	127

Im Studienkollektiv 1 sind für die PAI-1-Konzentration in Biopsie und Exzidat 36 Fälle diskordant (29 %). In 66 % aller diskordanten Fälle liegen die PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie über dem Schwellenwert, die PAI-1-Konzentrationen im Exzidat unter dem Schwellenwert.

Tab. 7: Verteilung des uPA/PAI-1-Status in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1

uPA/PAI-1 Status Studienkollektiv 1, n = 127		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	82 (65 %)	11 (9 %)	93
	< cut-off	9 (7 %)	25 (19 %)	34
Gesamt		91	36	127

Im Studienkollektiv 1 sind für den uPA/PAI-1-Status 84 % aller Fälle (107 von 127) konkordant beurteilt worden, 20 Fälle sind diskordant (16 %). 45 % der diskordanten Fälle weisen einen niedrigen uPA/PAI-1-Status in der Biopsie bei einem hohen uPA/PAI-1-Status im Exzidat auf. 55 % aller diskordanten Fälle weisen einen hohen uPA/PAI-1-Status in der Biopsie bei einem niedrigen uPA/PAI-1-Status im korrespondierenden Exzidat auf.

Tab. 8: Verteilung der uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat  
in Bezug auf den Schwellenwert, Subkollektiv 1

uPA Subkollektiv 1 (N0, G2, ≥ 35 J.) n = 35		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	12 (34 %)	6 (17 %)	18
	< cut-off	2 (6 %)	15 (43 %)	17
Gesamt		14	21	35

Im Subkollektiv 1 sind für die uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat 8 Fälle diskordant (23 %). In 75 % aller diskordanten Fälle liegen die uPA-Konzentrationen in der Biopsie über dem Schwellenwert, die uPA-Konzentrationen im Exzidat unter dem Schwellenwert.

Tab. 9: Verteilung der PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat  
in Bezug auf den Schwellenwert, Subkollektiv 1

PAI-1 Subkollektiv 1 (N0, G2, ≥ 35 J.) n = 35		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	18 (52 %)	5 (14 %)	23
	< cut-off	4 (11 %)	8 (23 %)	12
Gesamt		22	13	35

Im Subkollektiv 1 sind für die PAI-1-Konzentrationen 9 Fälle diskordant (25%). In 66 % der diskordanten Fälle liegen die PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie über dem Schwellenwert, im chirurgischen Exzidat unter dem Schwellenwert.

Tab. 10: Verteilung des uPA/PAI-1-Status in Biopsie und Exzidat Subkollektiv 1

uPA/PAI-1-Status Subkollektiv 1 (N0, G2, ≥ 35 J.) n = 35		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	22 (63 %)	1 (3 %)	23
	< cut-off	4 (11 %)	8 (23 %)	12
Gesamt		26	9	35

Im Subkollektiv 1 sind für den uPA/PAI-1-Status 5 Fälle diskordant (14 %). Vier der diskordanten Fälle weisen einen niedrigen uPA/PAI-1-Status in der Biopsie bei einem hohen uPA/PAI-1-Status im Exzidat auf. Ein diskordanter Fall weist einen hohen uPA/PAI-1-Status in der Biopsie bei einem niedrigen uPA/PAI-1-Status im korrespondierenden Exzidat auf.

#### 4.4 Sensitivitäten, Spezifitäten, und prädiktive Werte für uPA- und PAI-1-Konzentrationen der Biopsie, Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1

Zur Ermittlung der allgemeinen Test-Güte der uPA- und PAI-1-Bestimmung aus Biopsiegewebe wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten für das Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1 in Bezug auf die Erkennung der Patientinnen, die niedrige uPA- und PAI-1-Konzentrationen in ihren Tumoren aufweisen ermittelt. Die errechneten prädiktiven Werte geben Auskunft über die diagnostische Aussagekraft der uPA- und PAI-1-Konzentrationen und des uPA/PAI-1-Status ermittelt aus präoperativen Biopsien. Die Werte werden in Tab. 11 für das Studienkollektiv 1 und das Subkollektiv 1 dargestellt.

Tab. 11: Sensitivitäten, Spezifitäten, positive und negative prädiktive Werte für uPA- und PAI-1-Konzentrationen sowie für den ermittelten uPA/PAI-1-Status aus der Biopsie im Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1

	Sensitivität	Spezifität	ppv	npv
<b>uPA</b>				
Studienkollektiv 1, n = 127	0,90 (KI: 0,79 – 0,96)	0,74 (KI: 0,78 – 0,96)	0,74 (KI: 0,63 – 0,84)	0,89 (KI: 0,78 – 0,96)
Subkollektiv 1 n = 35	0,86 (KI: 0,57 – 0,98)	0,71 (KI: 0,48 – 0,89)	0,67 (KI: 0,41 – 0,87)	0,88 (KI: 0,64 – 0,99)
<b>PAI-1</b>				
Studienkollektiv 1 n = 127	0,79 (KI: 0,68 – 0,87)	0,61 (KI: 0,46 – 0,74)	0,75 (KI: 0,64 – 0,84)	0,66 (KI: 0,51 – 0,79)
Subkollektiv 1 n = 35	0,82 (CI: 0,60 – 0,95)	0,62 (KI: 0,32 – 0,86)	0,78 (KI: 0,56 – 0,93)	0,67 (KI: 0,35 – 0,90)
<b>uPA/PAI-1-Status</b>				
Studienkollektiv 1 n = 127	0,90 (KI: 0,82 – 0,95)	0,69 (KI: 0,52 – 0,84)	0,88 (KI: 0,80 – 0,94)	0,74 (KI: 0,56 – 0,87)
Subkollektiv 1 n = 35	0,85 (KI: 0,65 – 0,96)	0,89 (KI: 0,52 – 1,00)	0,96 (KI: 0,78 – 1,00)	0,67 (KI: 0,35 – 0,90)

Die Sensitivität beschreibt in Tab. 11, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 79 % bis 90 %, in Abhängigkeit von uPA, PAI-1, uPA/PAI-1-Status und Kollektiv, bei Patientinnen mit erhöhten Proteinkonzentrationen, bzw. erhöhtem uPA/PAI-1-Status im Exzidat (etablierte Methode) in der Biopsie (neue Methode) ebenfalls erhöhte Proteinkonzentrationen bzw. ein erhöhter uPA/PAI-1-Status gemessen wurden. Die Spezifität beschreibt in Tab. 11, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 61 % bis 89 %, je nach untersuchtem Protein, uPA/PAI-1-Status und Kollektiv, bei Patientinnen mit niedrigen Proteinkonzentrationen bzw. niedrigem uPA/PAI-1-Status im Exzidat in der Biopsie ebenfalls niedrige Proteinkonzentrationen gemessen wurden. Der negative prädiktive Wert (npv) gibt den Anteil der Patientinnen an, die bei niedrigen Proteinkonzentrationen und niedrigem uPA/PAI-1-Status in der Biopsie auch niedrige Proteinkonzentrationen und einen niedrigen uPA/PAI-1-Status im Exzidat aufwiesen. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 66 % bis 88 %, wurden Patientinnen mit niedrigen Proteinkonzentrationen bzw. niedrigem uPA/PAI-1-Status in der Biopsie mit dieser neuen Methode korrekt identifiziert. Anhand des negativen prädiktiven Wertes (npv) lässt sich beurteilen, ob ggf. eine Untertherapie durch die uPA- und PAI-1-Testung aus der Biopsie verursacht wird.

Der positive prädiktive Wert trifft in der vorliegenden Studie eine Aussage darüber, wie viele Patientinnen mit erhöhten Proteinkonzentrationen und erhöhtem uPA/PAI-1-Status in der Biopsie ebenfalls erhöhte Proteinkonzentrationen und einen erhöhten uPA/PAI-1-Status im Exzidat aufwiesen. Das heißt, mit einer Wahrscheinlichkeit von 67 % bis 96 % wurden Patientinnen mit erhöhten Proteinwerten und erhöhtem uPA/PAI-1-Status in der Biopsie durch diese Methode korrekt identifiziert. Anhand des ppv lässt sich beurteilen, ob ggf. eine Übertherapie durch die uPA- und PAI-1-Testung aus präoperativer Biopsie verursacht wird.

#### **4.5 Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf Differenzen von uPA- und PAI-1-Proteinkonzentrationen in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 1**

Anhand eines allgemeinen linearen Modells wurde der Einfluss von folgend genannten klinischen und pathologischen Faktoren, sowie der Einfluss des Zeitintervalls zwischen Biopsie und chirurgischer Tumorexzision und des teilnehmenden Brustzentrums auf die *durchschnittliche* Differenz von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat (im Folgenden Delta uPA und Delta PAI-1 genannt) *aller* Fälle des Studienkollektivs 1 überprüft:

- Zeitabstand zwischen präoperativer Biopsie und chirurgischer Tumorexzision (kategorisiert in Zeitintervallen von 0–5 d, 6–10 d, 11–15 d, > 15 d)
- Grading des Tumors (G1, G2, G3)
- Tumorgroße (pT1, pT2, pT3, pT4)
- Axillärer Nodalstatus (nodalnegativ = N0, nodalpositiv = N+)
- Hormonrezeptorstatus (negativ = HR–, positiv = HR+)
- HER2-Status (negativ = HER2–, positiv = HER2+)
- histologischer Tumortyp (gruppiert in duktal, lobulär, muzinös und andere)
- Fernmetastasierung (M0, M1, Mx)
- Zahl der Stanzbiopsien, die zur uPA/PAI-1 Analyse zur Verfügung standen und eingesetzt worden sind (n = 1, n = 2, n = 3, n = 4)
- teilnehmendes Brustzentrum (UKH = Brustzentrum des Universitätsklinikums Halle (Saale), EK = Brustzentrum des Krankenhauses St. Elisabeth und St. Barbara Halle (Saale),

Die erforderliche Varianzhomogenität für die geprüften Faktoren wurde erfüllt. In Tab. 12 und Tab. 13 sind die Regressionskoeffizienten für jeden überprüften Faktor, der Einfluss auf Delta uPA und Delta PAI-1 nimmt, mit dem jeweiligen 95 % Konfidenzintervall angegeben (vgl. 3.4.4).

##### **4.5.1 Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf Delta uPA**

Die o.g. untersuchten Faktoren haben nach statistischer Analyse keinen signifikanten Einfluss auf Delta uPA.



Tab. 12: Regressionskoeffizienten und 95 % Konfidenzintervalle der klinischen und pathologischen Faktoren, sowie des Zeitintervalls zwischen Biopsie und Exzidat und des teilnehmenden Brustzentrums.

Faktor	Regressionskoeffizient B	95 %-Konfidenzintervall für Regressionskoeffizient B	
		untere Grenze	obere Grenze
Zeitintervall Biopsie und Exzidat	-0,071	-0,775	0,632
Grading G	0,630	-0,450	1,710
Tumorgroße pT	0,777	-0,223	1,776
Nodalstatus N	-0,828	-2,017	0,360
HR-Status	0,674	-0,744	2,092
HER2-Status	-0,533	-2,076	1,009
histologischer Tumortyp	-0,135	-0,767	0,489
Fernmetastasierung	1,020	-0,158	2,197
analysierte Biopsien n	0,601	-0,333	1,601
Brustzentrum	1,216	-0,064	2,496

Die 95 % Konfidenzintervalle der Regressionskoeffizienten sind breit und beinhalten einen Vorzeichenwechsel. Der Vorzeichenwechsel deutet darauf hin, dass der berechnete Regressionskoeffizient mit hoher Wahrscheinlichkeit ein anderes Vorzeichen aufweisen kann als der wahre Regressionskoeffizient in der Grundgesamtheit. Dadurch ist die Interpretation der Regressionskoeffizienten nur eingeschränkt möglich.

Die Regressionskoeffizienten der Faktoren Fernmetastasierung und Brustzentrum zeigen an, dass diese den größten Einfluss von allen untersuchten Faktoren auf Delta uPA haben. Der Einfluss ist statistisch nicht signifikant.

#### 4.5.2 Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf Delta PAI-1

Die Tumorgroße (pT) hat nach statistischer Analyse einen signifikanten Einfluss ( $p = 0,008$ ) auf Delta PAI-1.

Patientinnen mit einem Tumor von 0,01 cm bis < 2cm Durchmesser (pT1) zeigten mittlere Differenzen von PAI-1 von 0,66 ng/mg Gesamtprotein (95 % KI: -0,67–1,99). Patientinnen mit einem Tumor von 2 bis 5 cm Durchmesser (pT2) zeigten eine mittlere Differenz von PAI-1 von 1,63 ng/mg Gesamtprotein (95 % KI: 0,57–2,68). Patientinnen mit einem Tumor von > 5 cm (pT3) zeigten eine mittlere Differenz von PAI-1 von 0,49 ng/mg Gesamtprotein (95 % KI: -2,77–3,74). Patientinnen mit einem Tumor mit Infiltration der Brustwand oder Haut (pT4) zeigten eine mitt-

lere Differenz von PAI-1 von 5,41 ng/mg Gesamtprotein (95 % KI: 0,17–10,64). In allen pT-Gruppen war die mittlere PAI-1-Konzentration in der präoperativen Biopsie höher als die mittlere PAI-1-Konzentration im Exzidat.

Im Studienkollektiv 1 hatten 2 von 127 Patientinnen einen pT4 klassifizierten Tumor. Die geringe Fallzahl von 2 Patientinnen führt zu einer Verzerrung der statistischen Analyse. Nach Ausschluss der 2 Patientinnen in der Auswertung hat die TumorgroÙe auf Delta uPA und Delta PAI-1 keinen signifikanten Einfluss.

Tab. 13: Regressionskoeffizienten und 95 % Konfidenzintervalle der klinischen und pathologischen Faktoren, sowie des Zeitintervalls zwischen Biopsie und Exzidat und des teilnehmenden Brustzentrums.

klinischer o. pathologischer Faktor	Regressionskoeffizient B	95 %-Konfidenzintervall für Regressionskoeffizient B	
		untere Grenze	obere Grenze
Zeitintervall Biopsie und Exzidat	-2,214	-6,998	2,570
Grading G	-3,198	-10,122	3,726
TumorgroÙe pT	4,642	-2,125	11,409
Nodalstatus N	-1,554	-9,624	6,516
HR-Status	0,290	-9,458	10,037
HER2-Status	-0,504	-9,978	10,987
histologischer Tumortyp	-0,705	-4,990	3,579
Fernmetastasierung	0,257	-7,682	8,196
analysierte Biopsien n	-2,102	-5,535	3,846
Brustzentrum	-4,365	-13,207	4,478

Für die untersuchten Faktoren, die Einfluss auf Delta PAI-1 nehmen, sind die 95 % Konfidenzintervalle der Regressionskoeffizienten breit und beinhalten einen Vorzeichenwechsel. Die Interpretation der Regressionskoeffizienten der untersuchten klinischen und pathologischen Faktoren ist nur eingeschränkt möglich (vgl. 4.5.1).

Die Regressionskoeffizienten der Faktoren TumorgroÙe und Brustzentrum zeigen an, dass diese Faktoren den größten Einfluss von allen untersuchten Faktoren auf Delta PAI-1 haben. Nur der Einfluss des Faktors TumorgroÙe ist statistisch signifikant.

#### 4.6 Diskordante und konkordante uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat – histologische Analyse ausgewählter Fälle, Studienkollektiv 1

Im Studienkollektiv 1 und im Subkollektiv 1 wurden, je nach betrachtetem Protein, uPA, PAI-1 und dem uPA/PAI-1-Status, 15 % bis 30 % der Fälle als diskordant in Bezug auf die Schwellenwerte eingestuft (vgl. 4.3). Bis auf die Tumorgröße pT haben klinische und pathologische Faktoren in der statistischen Betrachtung keinen signifikanten Einfluss auf die durchschnittliche Differenz von uPA- und PAI-1-Konzentration *aller* Fälle im Studienkollektiv 1 (vgl. 4.5).

In der Mikroskopie wurde der Einfluss von verschiedenen pathologischen und histomorphologischen Faktoren auf Delta uPA- und Delta PAI-1 von *Einzelfällen* analysiert. Es wurden jeweils 10 Fälle untersucht, die einen diskordanten uPA- Status oder einen diskordanten PAI-1-Status in Bezug auf den Schwellenwert aufweisen. Es wurden 10 Fälle mit Delta PAI-1  $\geq 30$  ng/mg Gesamtprotein überprüft. Drittens wurden 10 Fälle untersucht, die einen diskordanten uPA/PAI-1-Status in Biopsie und Exzidat haben und zusätzlich ein Delta PAI-1 von  $\geq 10$  ng/mg Gesamtprotein aufweisen.

Tab. 14: Stichproben für die Einzelfallanalysen

Parameter	diskordante Fälle insgesamt	Fälle in der Stichprobe (%)
uPA	24	10 (42 %)
PAI-1	36	10 (28 %)
uPA/PAI-1 Status	20	10 (50 %)

Von jedem zuvor ausgewählten Fall wurden die Mikroskopie-Präparate (HE-Schnitte) der Biopsien und Exzidate histologisch begutachtet. Pro Biopsie wurden 1 – 2 HE-Schnitte beurteilt, pro Exzidat wurden 5 – 7 HE-Schnitte beurteilt. Die HE-Schnitte wurden auf folgende Kriterien überprüft:

- Anteil von Tumorstroma (z.B. fibroblastische Gewebsanteile) in Prozent am aufgearbeiteten Gesamt-Gewebe (in Biopsie und Exzidat) als Ausdruck eines heterogenen/homogenen Tumors
- Anteil von Tumorzellen in Prozent am aufgearbeiteten Gesamt-Gewebe (in Biopsie und Exzidat) als Ausdruck eines heterogenen/homogenen Tumors
- Existenz von Lymphozyten als Indikator einer Entzündungsreaktion im Gewebe

Faktoren wie vereinzelt auftretende Nekrosen, Wachstumsmuster einzelner Tumorzellareale, Verhältnis von Biopsiekanal zum umliegenden Tumorgewebe wurden bei der histologischen Bewertung vermerkt. Diese konnten aber allenfalls für die Einzelfallanalyse verwendet werden, da sie für die Gesamtheit aller ausgewählten Fälle schwierig zu klassifizieren waren.

In der Analyse wurden zudem die Tumorformel, der histologische Typ, sowie der Hormon- und HER2-Rezeptorstatus für jeden ausgewählten Fall berücksichtigt.

#### 4.7 Fallanalyse – diskordanter uPA/PAI-1-Status in Bezug auf den Schwellenwert und Delta PAI-1 $\geq 10$ ng/mg Gesamtprotein, Studienkollektiv 1

In Tab. 15 werden pathologische und histologische Merkmale von 10 Fällen dargestellt, die zum einen bezüglich des uPA/PAI-1-Status diskordant sind, zum anderen ein Delta PAI-1  $\geq 10$  ng/mg Gesamtprotein aufweisen.

Tab. 15: Pathologische und histologische Merkmale – diskordanter uPA/PAI-1-Status, Delta PAI-1  $\geq 10$  ng/mg Gesamtprotein.

Fall Nr.	uPA [ng/mg] Biopsie	uPA [ng/mg] Exzidat	PAI-1 [ng/mg] Biopsie	PAI-1 [ng/mg] Exzidat	TNM	Hormonrezeptorstatus	HER2-Status	histologischer Typ	Stromaanteil Stanze	Stromaanteil OP	Tumorzellanteil	Tumorzellanteil OP	Lymphozyten in Biopsie	Lymphozyten in Exzidat
2	0,04	1,19	9,12	30,33	pT1b N1a M0 G2	positiv	negativ	lobulär	15	10	85	90	ja	ja
50	4,88	1,53	27,62	11,93	pT2 pN3a M0 G2	negativ	negativ	duktal	50	50	50	50	ja	ja
66	1,20	0,88	10,67	28,70	pT1c pN0 M1 G2	positiv	positiv	lobulär	80	80	20	20	nein	nein
81	1,40	1,33	25,09	12,33	pT1c pN1 M0 G2	positiv	negativ	duktulo-tubulär	50	40	50	60	ja	nein
84	0,21	1,70	5,65	16,14	pT1c pN1a M0 G2	positiv	negativ	muzinös	80	60	20	40	nein	nein
122	0,28	1,52	6,07	17,11	pT1c pN0 M0 G2	positiv	negativ	duktal	80	70	10	20	nein	nein
126	0,40	1,90	9,12	30,33	pT1b pN1a M0 G2	positiv	negativ	lobulär	85	90	15	10	ja	ja
131*	1,18	1,46	24,60	11,52	pT2 pN1 M0 G3	positiv	positiv	duktal	30	30	70	70	nein	nein
152	0,50	2,15	8,13	25,86	pT1c pN0 G2 M0	positiv	negativ	lobulär	90	70	10	30	nein	ja
164*	1,94	0,35	21,37	1,93	pT1c pN1 Mx G1	negativ	negativ	duktal	*	50	*	50	*	*

\*siehe u.g. Protokoll

Die in Tab. 15 dokumentierten Mammakarzinome haben in 8 von 10 Fällen einen positiven Hormonrezeptorstatus und sind in 8 von 10 Fällen negativ für HER2. Fünf von 10 Karzinomen sind duktalem Typ, 4 Karzinome sind lobulären Typs, zudem liegen ein muzinöses und ein duktulo-

tubuläres Karzinom vor. In 3 untersuchten Fällen konnte histologisch eine ausgeprägte Lymphozyteninvasion sowohl im Gewebe der präoperativen Biopsie als auch im Gewebe des chirurgischen Exzidates nachgewiesen werden. Sowohl Proben mit hohem prozentualem Stromaanteil als auch Proben mit geringem Stromaanteil zeigen einen diskordanten uPA-/PAI-1-Status.

Im Folgenden werden histomorphologische Charakteristika der Mikroskopie von 2 exemplarischen Fällen mit diskordantem uPA-/PAI-1-Status protokolliert.

Fall Nr. 131

„Stanzbiopsie: Stromaanteil 30 %; viele homogen verteilte Tumorzellareale, keine Lymphozyten;

Exzidat: ähnliches Bild zur Stanzbiopsie, Stromaanteil 30 %; Karzinomzellen sind über das ganze Präparat homogen verteilt, keine Lymphozyten.“

Fall Nr. 164

„Stanzbiopsie: 50 % Tumorzellanteil, 50 % Stromaanteil;

Exzidat: Tumor zentral sklerosiert, hier zentral Stanzkanal, welcher eingeblutet und makroskopisch gut zu erkennen ist, reichlich drüsenarmes Gewebe in der Peripherie rund um den Stanzkanal, daher besteht die Möglichkeit, dass aus dieser Region Gewebe für die uPA-/PAI-1-Bestimmung entnommen wurde mit einem zu geringen Karzinomanteil.“

Die Analyse von Fall Nr. 131 verdeutlicht, dass auch bei einer homogenen Verteilung von Tumorzellen und fehlender Lymphozyteninvasion diskordante PAI-1-Konzentrationen mit Differenzen  $\geq 10$  ng/mg Gesamtprotein vorliegen können.

Die Analyse von Fall Nr. 164 verdeutlicht, dass es im Einzelfall sinnvoll ist, eine histologische Beurteilung des Karzinomgewebes im HE-Präparat durchzuführen, um so Rückschlüsse auf die Ursachen für stark diskordante Werte ziehen zu können.

#### **4.7.1 Fallanalyse – diskordant für uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf den Schwellenwert, Studienkollektiv 1**

In Tab. 16 werden pathologische und histologische Merkmale von 10 Fällen mit diskordantem uPA-Status in Biopsie und Exzidat dargestellt.

Tab. 16: Pathologische und histologische Merkmale – diskordanter uPA-Status in Biopsie und Exzidat

Fall Nr.	uPA [ng/mg] Biopsie	uPA [ng/mg] Exzidat	PAI-1 [ng/mg] Biopsie	PAI-1 [ng/mg] - Exzidat	TNM	Hormonrezeptorstatus	HER2-Status	histologischer Typ	Stromaanteil Stanze	Stromaanteil – OP	Tumorzellanteil Stanze	Tumorzellanteil OP	Lymphozyten – in Biopsie	Lymphozyten – in Exzidat
10	2,61	7,62	13,15	10,82	pT2 N0 M0 G1	positiv	negativ	duktal	40	30	60	70	nein	nein
12*	15,32	1,86	18,29	12,03	pT2 N0 M0 G2	positiv	negativ	duktal	75	60	25	40	nein	nein
14	13,93	2,06	21,41	12,20	pT2 N0 M0 G1	positiv	negativ	duktal	50	50	50	50	nein	nein
18	4,88	1,53	27,62	11,93	pT2 N3a M0 G2	negativ	negativ	duktal	50	50	50	50	ja	ja
28	5,35	2,94	45,59	14,53	pT1c N0 M0 G2	positiv	negativ	duktulo-lobulär	20	50	80	50	nein	nein
60	3,64	2,12	28,56	39,58	pT1c N1 M1 G2	positiv	negativ	duktulo-lobulär	70	70	30	30	nein	nein
65	8,24	2,57	26,38	41,64	pT2 N1a M0 G3	negativ	negativ	duktal	30	70	70	30	nein	ja
69	4,47	2,10	7,04	14,22	pT2 N3a M0 G2	positiv	positiv	duktulo-lobulär	10	70	90	30	nein	nein
102	2,12	5,61	20,31	14,60	pT2 N1 M0 G2	negativ	negativ	duktal	70	60	30	40	ja	ja
123*	2,14	3,03	21,10	8,22	pT2 N0 M0 G1	positiv	negativ	duktal	80	80	20	20	nein	nein

\*siehe u.g. Protokoll

Die in Tab. 16 dokumentierten Mammakarzinome haben in 7 von 10 Fällen einen positiven Hormonrezeptorstatus und sind in 9 von 10 Fällen negativ für HER2. 8 Karzinome sind duktales Typs, drei duktulo-lobuläre Karzinome liegen vor. In 2 von 10 untersuchten Fällen konnte histologisch eine Lymphozyteninvasion sowohl im Gewebe der präoperativen Biopsie als auch im Gewebe des chirurgischen Exzidates nachgewiesen werden. In einem weiteren Fall liegt eine Lymphozyteninvasion im Exzidat bei nicht vorhandener Lymphozyteninvasion in der Biopsie vor. Sowohl Proben mit hohem prozentualen Stromaanteil als auch Proben mit geringem Stromaanteil zeigen einen diskordanten uPA-Status in Bezug auf den Schwellenwert in Biopsie und Exzidat.

Im Folgenden werden histomorphologische Charakteristika der Mikroskopie von 2 exemplarischen Fällen mit diskordantem uPA-Status protokolliert.

Fall Nr. 12

„Sowohl in der der Stanzbiopsie als auch im Exzidat ungleichmäßig disseminiertes Wachstumsmuster. Stanzbiopsie: sehr hoher Stromaanteil von 80%, keine Lymphozyteninfiltration  
Exzidat: Dichte Durchsetzung von Tumorzellen, geringe stromale Anteile in Strängen den Tumor durchsetzend, keine Lymphozyteninfiltration.“

Fall Nr. 123

„Stanzbiopsie: relativ heterogenes Erscheinungsbild bei ausgeprägter Stromakomponente; Exzidat: gleiches Bild zur Stanze, in der Randzone des Tumors DCIS mit ausgeprägten Nekrosen.“

Die Analysen von Fall Nr. 12 und Fall Nr. 123 verdeutlichen, dass bei einem heterogenen Erscheinungsbild des Karzinoms mit ausgeprägter Stromakomponente, sowohl sehr konkordante als auch sehr diskordante uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat vorliegen können. In Fall Nr. 123 führen die ausgeprägten Nekrosen im Exzidat nicht zu einer Erhöhung der PAI-1-Konzentration im Vergleich zur PAI-1-Konzentration der Stanzbiopsie.

#### 4.7.2 Fallanalyse – diskordant für PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf den Schwellenwert, Studienkollektiv 1

In Tab. 17 werden pathologische und histologische Merkmale von 10 Fällen mit diskordantem PAI-1-Status in Biopsie und Exzidat dargestellt.

Tab. 17: Pathologische und histologische Merkmale – diskordanter PAI-1-Status in Biopsie und Exzidat

Fall Nr.	uPA [ng/mg] Biopsie	uPA [ng/mg] Exzidat	PAI-1 [ng/mg] Biopsie	PAI-1 [ng/mg] Exzidat	TNM	Hormonrezeptorstatus	HER2-Status	histologischer Typ	Stromaanteil Stanze	Stromaanteil – OP	Tumorzellanteil Stanze	Tumorzellanteil OP	Lymphozyten – in Biopsie	Lymphozyten – in Exzidat
3	1,20	0,43	10,67	16,56	pT1c N0 M1 G2	positiv	positiv	lobulär	80	80	20	20	ja	ja
6	0,28	1,52	6,07	17,11	pT1c N0 M0 G2	positiv	negativ	duktal	80	70	20	30	nein	nein
7	0,21	1,70	5,65	16,14	pT1c N1a M0 G2	positiv	negativ	muzinös	80	60	20	40	nein	nein
8	1,06	0,24	9,05	15,74	pT1c N0 M0 G2	positiv	negativ	duktal	70	70	30	30	nein	nein
13	1,22	1,81	14,75	8,14	pT1c N0 M0 G1	positiv	negativ	duktal	20	20	80	80	nein	nein
16	1,40	1,33	25,09	12,33	pT1c N1 M0 G2	positiv	negativ	duktal	50	40	50	60	nein	ja
19*	1,94	0,35	21,37	1,93	pT1c N1 MX G1	positiv	negativ	duktal	50	40	50	40	ja	ja
64	13,15	5,41	12,07	29,95	pT1c N0 Mx G3	positiv	negativ	duktal	10	10	90	90	ja	ja
72	5,70	5,83	7,31	15,78	pT3 N1a M0 G2	positiv	negativ	duktal	50	50	50	50	nein	nein
83*	8,29	6,03	12,73	15,95	pT1c N1a M0 G3	positiv	positiv	duktal	20	40	80	60	ja	ja

\*siehe u.g. Protokoll

Die in Tab. 17 dokumentierten Mammakarzinome haben in 10 von 10 Fällen einen positiven Hormonrezeptorstatus und sind in 8 von 10 Fällen negativ für HER2. 8 Karzinome sind duktales

Typs, ein muzinöses und ein lobuläres Karzinom liegen vor. In 4 von 10 untersuchten Fällen konnte histologisch eine Lymphozyteninvasion sowohl im Gewebe der präoperativen Biopsie als auch im Gewebe des chirurgischen Exzidates nachgewiesen werden. Sowohl Proben mit hohem prozentualen Stromaanteil als auch Proben mit geringem Stromaanteil zeigen einen diskordanten PAI-1-Status in Bezug auf den Schwellenwert in Biopsie und Exzidat.

Im Folgenden werden histomorphologische Charakteristika der Mikroskopie von 2 exemplarischen Fällen mit diskordantem PAI-1-Status protokolliert.

Fall Nr. 19

„Stanzbiopsie: 50 % Stromaanteil, 50 % Karzinomzellen, Vorhandensein von fein disseminierten Lymphozyten;

Exzidat: Tumor erscheint zentral sklerosiert mit darstellbarem Biopsiekanal, welcher eingeblutet und makroskopisch erkennbar ist. Rund um den Biopsiekanal sehr wenige Karzinomzellen. Eventuell wurde für die uPA-/PAI-1-Bestimmung Gewebe mit zu wenig Karzinomzell-Anteil entnommen“.

Fall Nr. 83

„Stanzbiopsie: zwischen in Strängen wachsenden Karzinomzellen vereinzelt Nekrosen und ausgeprägte lymphozytäre Durchsetzung.

Exzidat: im Exzidat ebenfalls ausgeprägte lymphozytäre Infiltration sichtbar, heterogene Stroma-Anteile, prozentual höher als in der Stanzbiopsie.“

Die Analyse von Fall Nr. 19 demonstriert ein weiteres Mal dass es im Einzelfall hilfreich ist das Karzinomgewebe im HE-Schnitt histologisch zu analysieren um eine möglichst korrekte uPA- und PAI-1-Bestimmung gewährleisten zu können.

Die Analyse von Fall Nr. 83 zeigt, dass trotz einer ausgeprägten lymphozytären Infiltration die uPA- und PAI-1-Werte nur gering voneinander abweichen.

#### **4.8 uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 2**

Aus den präoperativen Biopsien des Studienkollektivs 2 wurde vor der uPA- und PAI-1-Bestimmung an 4 bis 5 Stellen des Biopsiezylinders ein HE-Schnitt angefertigt. Bei histologischem Nachweis von Karzinomzellen wurden aus dem fragmentierten Biopsiegewebe laut geltenden Laborstandards die uPA- und PAI-1-Konzentrationen bestimmt (vgl. 3.4.4). Die uPA- und PAI-1-



Bestimmung des korrespondierenden Exzidates erfolgte in gleicher Art und Weise wie im Studienkollektiv 1.

### Zusammenfassende Auswertung

Im Folgenden sind die Minimal- und Maximalwerte, sowie der Median (mit Interquartilrange) der uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat für das Studienkollektiv 2 in Tab. 18 zusammengefasst.

Tab. 18: Studienkollektiv 1: uPA-Konzentrationen im Gewebe der Biopsie und des Exzidates [ng/mg Gesamtprotein]

Studienkollektiv 2 n = 36	Minimum [ng/mg]	Maximum [ng/mg]	Median (Interquartilrange) [ng/mg]
uPA Biopsie	0,37	16,38	2,59 (2,47)
uPA Exzidat	0,31	13,71	2,12 (3,20)
PAI-1 Biopsie	5,34	159,24	14,49 (14,19)
PAI-1 Exzidat	3,44	50,21	14,57 (12,84)

In Tab. 18 wird deutlich, dass die Minimalwerte, und der jeweilige Median mit Interquartilrange der uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat nur geringen Abweichungen zueinander unterliegen (vgl. auch dazu Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1 unter 4.1).

Für das Studienkollektiv 2 sind in Abb. 12 und Abb. 13 die einzelnen uPA-/PAI-1-Konzentrationen in korrespondierenden Biopsien und Exzidaten graphisch dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Fälle gruppiert nach den uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf den jeweiligen Schwellenwert. Innerhalb jeder Gruppe wurden die Fälle aufsteigend nach den Mittelwerten der Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat eines jeden Falles sortiert. Die Differenz zwischen der uPA- bzw. PAI-1-Konzentration aus Biopsie und Exzidat eines jeden Falles ist als Verbindungslinie visualisiert.

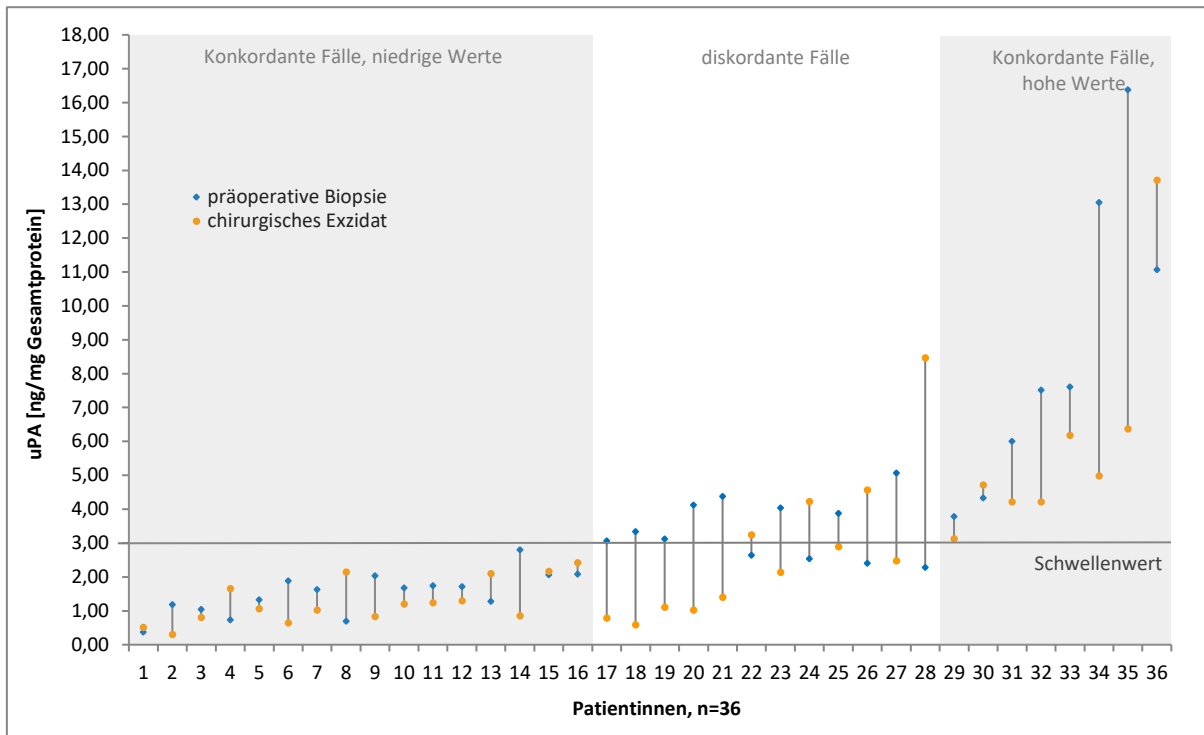


Abb. 12: uPA-Konzentrationen in ng/mg Gesamtprotein in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 2

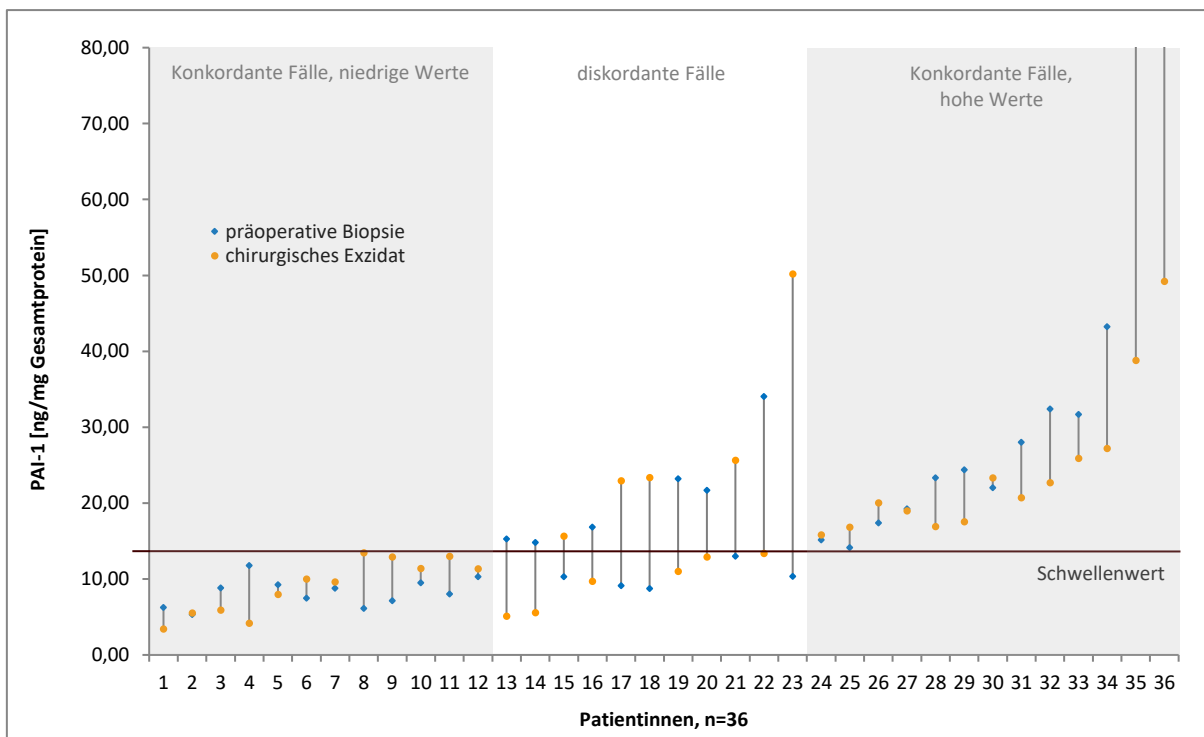


Abb. 13: PAI-1-Konzentrationen in ng/mg Gesamtprotein in Biopsie und Exzidat, Studienkollektiv 2

Wie bereits im Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1 zu beobachten (vgl.4.1.1 und 4.1.2), gilt für das Studienkollektiv 2 ebenfalls, dass die geringste Abweichung zwischen uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen besteht, die unter den cut-off-Werten in Biopsie und Exzidat liegen. Je höher die uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie/im Exzidat, desto höher ist die Abweichung zu den uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen im korrespondierendem Präparat (Biopsie bzw. Exzidat).

#### 4.9 Verteilung von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf Schwellenwerte, Studienkollektiv 2

Im Folgenden (Tab. 19 bis Tab. 21) ist die Verteilung der uPA und PAI-1-Konzentrationen und des uPA/PAI-1-Status aus Biopsie und Exzidat in Bezug auf die jeweiligen Schwellenwerte für das Studienkollektiv 2 dargestellt. Die Anzahl und relativen Häufigkeiten der Fälle, die für die untersuchten Proteinkonzentrationen bzw. den uPA/PAI-1-Status in Bezug auf die jeweiligen Schwellenwerte konkordant oder diskordant sind, werden in Vierfeldertafeln dargestellt.

Tab. 19: Verteilung der uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat in Bezug auf den Schwellenwert, Studienkollektiv 2

uPA Studienkollektiv 2 n = 36		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	8 (22%)	8 (22%)	16
	< cut-off	4 (11%)	16 (45%)	20
Gesamt		12	24	36

Im Studienkollektiv 2 sind für die uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat 12 Fälle diskordant (33 %). In 8 der 12 diskordanten Fälle liegt die gemessene uPA-Konzentration in der Biopsie über dem Schwellenwert und im Exzidat unter dem Schwellenwert. Im Vergleich zum Studienkollektiv 1 gibt es im Studienkollektiv 2 prozentual mehr diskordante Fälle in Bezug auf die uPA-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat (19 % bzw. 33 %).

Tab. 20: Verteilung der PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat  
in Bezug auf den Schwellenwert, Studienkollektiv 2

PAI-1 Studienkollektiv 2 n = 36		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	13 (22 %)	6 (22 %)	19
	< cut-off	5 (11 %)	12 (45 %)	17
Gesamt		18	18	36

Im Studienkollektiv 2 sind für die PAI-1-Konzentrationen 11 Fälle (33 %) diskordant. In 6 der 11 diskordanten Fälle liegt die gemessene PAI-1-Konzentration in der Biopsie über dem Schwellenwert und im Exzidat unter dem Schwellenwert. Im Vergleich zum Studienkollektiv 1 werden bezüglich PAI-1 im Studienkollektiv 2 prozentual ähnlich viele diskordante Fälle nachgewiesen (29 % bzw. 25%).

Tab. 21: Verteilung des uPA/PAI-1-Status in Biopsie und Exzidat  
in Bezug auf die Schwellenwerte, Studienkollektiv 2

uPA/PAI-1 Studienkollektiv 2 n = 36		Exzidat		Gesamt
		≥ cut-off	< cut-off	
Biopsie	≥ cut-off	16 (44%)	5 (14%)	21
	< cut-off	6 (17%)	9 (25%)	15
Gesamt		22	14	36

Im Studienkollektiv 2 sind für den uPA/PAI-1-Status 25 von 36 Fällen als konkordant beurteilt worden (69 %). 11 Fälle sind diskordant (31 %). Sechs der elf diskordanten Fälle weisen einen niedrigen uPA/PAI-1-Status in der Biopsie bei einem hohen uPA/PAI-1-Status im Exzidat auf. Fünf der diskordanten Fälle weisen einen hohen uPA/PAI-1-Status in der Biopsie bei einem niedrigen uPA/PAI-1-Status im korrespondierenden Exzidat auf. Im Vergleich zum Studienkollektiv 1 liegen für den uPA/PAI-1-Status ca. doppelt so viele diskordante Fälle vor (16 % bzw. 31 %).

#### 4.10 Sensitivitäten, Spezifitäten, und prädiktive Werte für uPA- und PAI-1-Konzentrationen der Biopsie, Studienkollektiv 2

Im Studienkollektiv 2 wurden zur Ermittlung der Test-Güte und der diagnostischen Aussagekraft der uPA- bzw. PAI-1-Bestimmung aus Biopsiegewebe Sensitivitäten, Spezifitäten und prädiktive Werte ermittelt. Zur besseren Übersicht ist ebenfalls das Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1 tabellarisch dargestellt.

Tab. 22: Sensitivitäten, Spezifitäten, positive und negative prädiktive Werte für uPA- und PAI-1-Konzentrationen sowie für den uPA/PAI-1-Status aus der Biopsie im Studienkollektiv 2 (vergleichend dargestellt Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1)

	Sensitivität	Spezifität	ppv	npv
<b>uPA</b>				
<b>Studienkollektiv 2 n = 36</b>	0,67 (KI: 0,35–0,90)	0,67 (KI: 0,45–0,84)	0,50 (KI: 0,25–0,75)	0,80 (KI: 0,56–0,94)
Studienkollektiv 1 n = 127	0,90 (KI: 0,79–0,96)	0,74 (KI: 0,78–0,96)	0,74 (KI: 0,63–0,84)	0,89 (KI: 0,78–0,96)
Subkollektiv 1 n = 35	0,86 (KI: 0,57–0,98)	0,71 (KI: 0,48–0,89)	0,67 (KI: 0,41–0,87)	0,88 (KI: 0,64–0,99)
<b>PAI-1</b>				
<b>Studienkollektiv 2 n = 36</b>	0,72 (KI: 0,47–0,90)	0,67 (KI: 0,41–0,87)	0,68 (KI: 0,43–0,87)	0,71 (KI: 0,44–0,90)
Studienkollektiv 1 n = 127	0,79 (KI: 0,68–0,87)	0,61 (KI: 0,46–0,74)	0,75 (KI: 0,64–0,84)	0,66 (KI: 0,51–0,79)
Subkollektiv 1 n = 35	0,82 (KI: 0,60–0,95)	0,62 (KI: 0,32–0,86)	0,78 (KI: 0,56–0,93)	0,67 (KI: 0,35–0,90)
<b>uPA/PAI-1-Status</b>				
<b>Studienkollektiv 2 n = 36</b>	0,73 (KI: 0,50–0,89)	0,64 (KI: 0,35–0,87)	0,76 (KI: 0,53–0,92)	0,60 (KI: 0,32–0,84)
Studienkollektiv 1 n = 127	0,90 (KI: 0,82–0,95)	0,69 (KI: 0,52–0,84)	0,88 (KI: 0,80–0,94)	0,74 (KI: 0,56–0,87)
Subkollektiv 1 n = 35	0,85 (KI: 0,65–0,96)	0,89 (KI: 0,52–1,00)	0,96 (KI: 0,78–1,00)	0,67 (KI: 0,35–0,90)

Mit Ausnahme des npv von PAI-1 ist die im Studienkollektiv 2 ermittelte Sensitivität, Spezifität und der positive und negative prädiktive Wert für uPA und/oder PAI-1 niedriger als im Studienkollektiv 1.

#### 4.11 Einfluss des Biopsiedefektes auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Exzidat

Nebenfrage 5 der Zielstellung (vgl. 2) soll beantworten, ob ein Biopsiedefekt Einfluss auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Exzidat hat. Von 8 Mammakarzinomen des Studienkollektivs 2 wurden jeweils mindestens eine Gewebeprobe unmittelbar aus dem Bereich des makroskopisch sichtbaren Biopsiedefektes entnommen, mindestens eine weitere Gewebeprobe, bei größeren Tumoren auch mehr, aus den makroskopisch sichtbaren Biopsiedefekt-freien Tumorarealen.

Die uPA- und PAI-1-Konzentrationen in ng/mg Gesamtprotein aus den Gewebeproben der untersuchten Mammakarzinome sowie pathologische Daten der Tumore sind in Tab. 23 aufgezeigt.

Tab. 23: uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Gewebeproben ohne Biopsiedefekt (Gewebeprobe P1–P4) und Gewebeproben mit Biopsiedefekt (BD1–BD2), pathologische Merkmale der Tumore.

Tumornummer/ pathologische Merkmale	uPA [ng/mg] Gewebeprobe ohne Biopsiedefekt (P1–P4)	uPA [ng/mg] Gewebeprobe mit Bi- opsiedefekt (BD1–BD2)	PAI-1 [ng/mg] Gewebeprobe ohne Biopsiedefekt (P1–P4)	PAI-1 [ng/mg] Gewebeprobe mit Bi- opsiedefekt (BD1–BD2)
<b>1</b>				
pT2 pN1 G2 HR pos., HER2 neg. duktral	1,01 (P1) 1,05 (P2) 0,72 (P3) 0,62 (P4)	1,24 (BD1)	4,53 (P1) 14,30 (P2) 6,54 (P3) 6,56 (P4)	5,45 (BD1)
<b>2</b>				
pT1c pN0 G3 HR neg., HER2 neg. duktral	5,76 (P1) 3,37 (P2)	5,97 (BD1)	14,08 (P1) 18,97 (P2)	14,81 (BD1)
<b>3</b>				
pT1c pN0 G3 HR neg., HER2 neg. duktral	1,59 (P1) 3,25 (P2)	1,72 (BD1)	11,88 (P1) 34,03 (P2)	50,00 (BD1)
<b>4</b>				
pT1c pN1 G3 HR neg., HER2 neg. duktral	1,32 (P1) 7,13 (P2)	3,73 (BD1)	16,83 (P1) 18,31 (P2)	64,33 (BD1)
<b>5</b>				
pT2 pN3a G3 HR pos., HER2 neg. duktral	2,48 (P1)	4,44 (BD1)	5,57 (P1)	22,17 (BD1)
<b>6</b>				
pT1c pN0 G1 HR pos., HER2 neg. duktral	2,17 (P1)	0,41 (BD1) 9,71 (BD2)	15,66 (P1)	107,90 (BD1) 13,61 (BD2)
<b>7</b>				
pT1c pN0 G2 HR pos., HER2 neg. duktral	2,89 (P1)	1,33 (BD1)	16,82 (P1)	18,90 (BD1)
<b>8</b>				
pT1c pN1a G3 HR pos., HER2 pos. duktral	4,90 (P1) 7,85 (P2)	3,70 (BD1) 3,89 (BD2)	33,13 (P1) 18,69 (P2)	38,21 (BD1) 23,23 (BD2)

Die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus den Gewebeproben ohne Biopsiedefekt (P1–P4) und aus den Gewebeproben mit Biopsiedefekt (BD1–BD2) sind in Abb. 14 und Abb. 15 für die 8 untersuchten Mammakarzinome graphisch dargestellt.

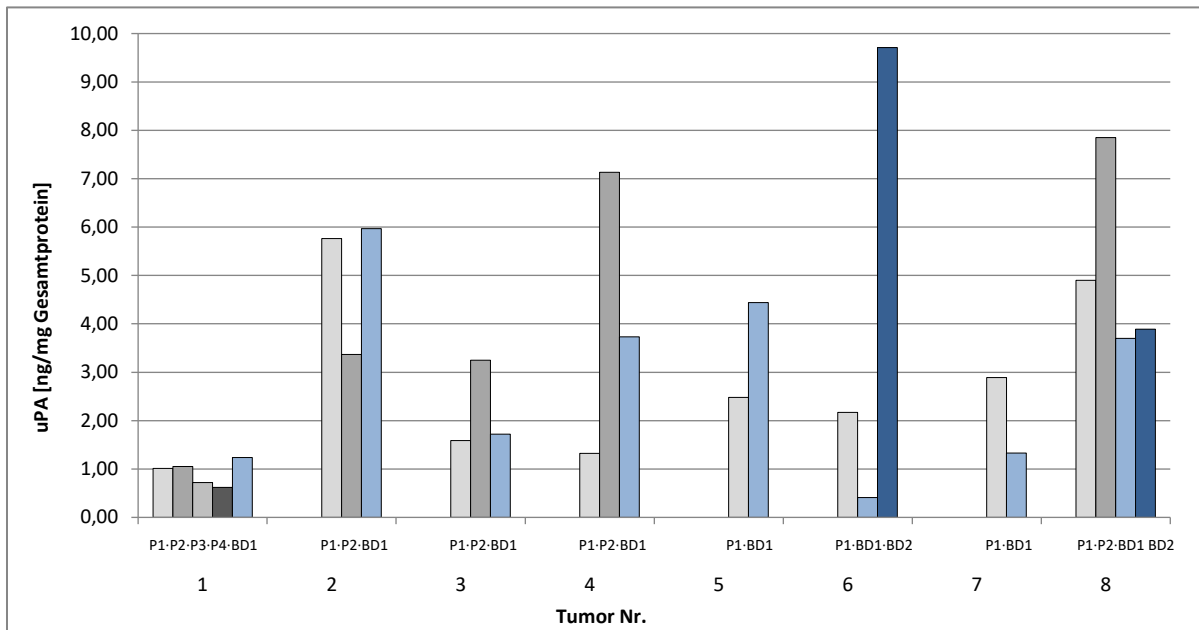


Abb. 14: Verteilung der uPA-Proteinkonzentrationen in ng/mg Gesamtprotein im Exzidat; Gewebeproben ohne Biopsiedefekt (P1–P4) und Gewebeproben mit Biopsiedefekt (BD1–BD2).

Aus Tab. 23 und Abb. 14 wird deutlich, dass die Abweichungen zwischen den uPA-Konzentrationen aus Karzinomgewebe mit und ohne Biopsiedefekt gering sind. In 6 von 8 Fällen zeigen die uPA-Konzentrationen eine Differenz von < 4 ng/mg Gesamtprotein zwischen kleinster uPA-Konzentration im Gewebe ohne Biopsiedefekt und uPA-Konzentration im Gewebe mit Biopsiedefekt. Es besteht kein Trend zu höheren uPA-Konzentrationen im Karzinomgewebe mit Biopsiedefekt. In nur 2 von 8 Fällen wurde im Gewebe mit Biopsiedefekt eine uPA-Konzentration bestimmt, die mindestens 1 ng/mg Gesamtprotein höher ist als die uPA-Konzentration im korrespondierenden Gewebe ohne Biopsiedefekt. In Tumor Nr. 6 ist die uPA-Konzentration im Gewebe mit Biopsiedefekt 2 (BD2) im Gegensatz zur Gewebeprobe ohne Biopsiedefekt (P1) zwar in etwa 4-fach erhöht, jedoch liegt die uPA-Konzentration im Gewebe mit Biopsiedefekt 1 unter der uPA-Konzentration der Gewebeprobe ohne Biopsiedefekt (P1). Dies ist ebenfalls für die Tumore Nr. 3, Nr. 4, Nr. 7 und Nr. 8 zu beobachten.

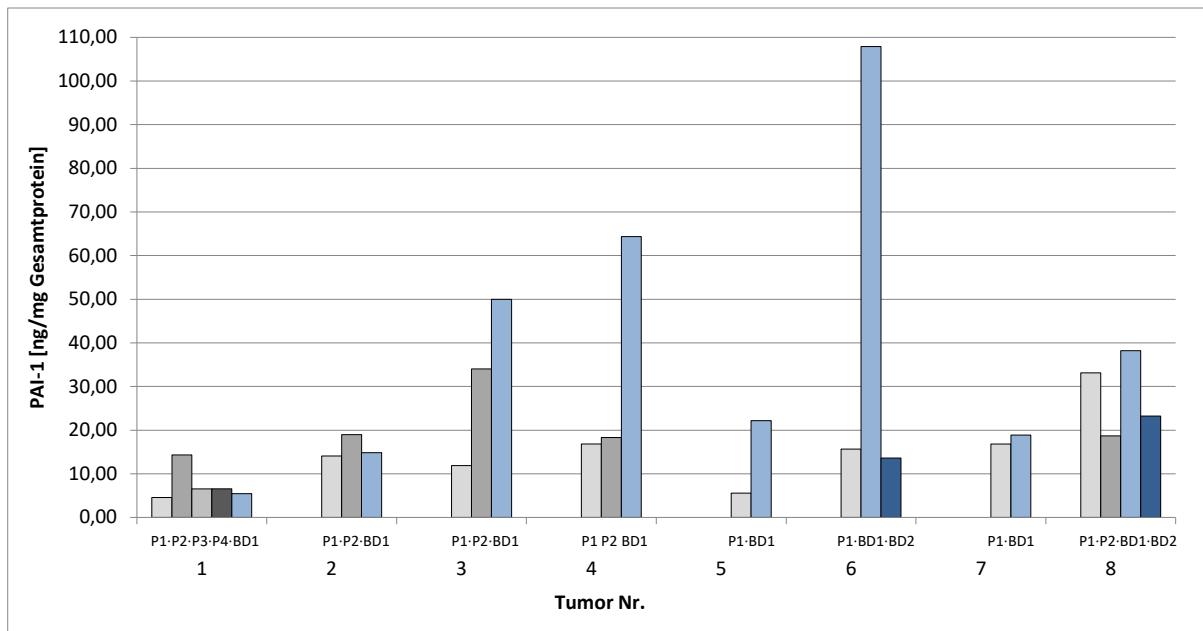


Abb. 15: Verteilung der PAI-1-Proteinkonzentrationen in ng/mg Gesamtprotein im Exzidat; Gewebeproben ohne Biopsiedefekt (P1–P4) und Gewebeproben mit Biopsiedefekt (BD1–BD2)

In Tab. 23 und Abb. 15 sind in 6 von 8 Fällen die PAI-1-Konzentrationen im Karzinomgewebe mit Biopsiedefekt höher als im Karzinomgewebe ohne Biopsiedefekt. Die Tumore Nr. 3, Nr. 4, Nr. 5 und Nr. 6 zeigen in etwa 4-fach bis 10-fach erhöhte PAI-1-Konzentrationen im Tumorgewebe mit Biopsiedefekt 1 (BD1). Jedoch liegt im Tumor Nr. 6 und Nr. 8 die PAI-1-Konzentration im Gewebe mit Biopsiedefekt 2 (BD2) unter der PAI-1-Konzentration der Gewebeprobe ohne Biopsiedefekt (P1).



## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Gewebeproben von konventionellen präoperativen Biopsien mit uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Gewebeproben des korrespondierenden chirurgischen Exzidates von Mammakarzinomen verglichen. Es wurde untersucht, wie präzise die Bestimmung der uPA- und PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie die uPA- und PAI-1-Konzentrationen im korrespondierenden Exzidat voraussagt. Abweichungen der uPA- und PAI-1-Werte zwischen Biopsie und Exzidat wurden analysiert. Mögliche klinische, pathologische, histomorphologische und mechanische (Biopsiedefekt) Einflussfaktoren auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat wurden untersucht. Dies ist von Relevanz, da heutzutage abklärungswürdige Befund der Brust fast immer zunächst biopsiert werden. Die mechanische Alteration der Biopsie kann im Mammakarzinom Änderungen in Gen- und Proteinexpressionsmustern verursachen.

In der vorliegenden Studie wurden prospektiv erhobene Daten ausgewertet. Für die Studie wurden bewusst nur sehr wenige Ausschlusskriterien definiert, da primär die Bestimmung der uPA- und PAI-1-Konzentrationen und dessen Vergleich in präoperativer Biopsie und korrespondierendem Exzidat im Fokus standen. Zudem wurde der Vergleich von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat für die Gruppe von Patientinnen analysiert, für die uPA/PAI-1 als prognostischer Faktor relevant ist (Subkollektiv 1).

### 5.1 Klinische und pathologische Daten der Studienkollektive 1 und 2

Die prozentuale Verteilung der klinischen und pathologischen Merkmale der Studienkollektive 1 und 2 entspricht in etwa der Verteilung in deutlich größeren Studienpopulationen in Deutschland und den USA, die basierend auf epidemiologischen Daten der nationalen Krebsregister ausgewertet wurden (Glass et al., 2007; Holleczeck und Brenner, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde die uPA- und PAI-1-Bestimmung in einem repräsentativen Kollektiv durchgeführt (n=163).

### 5.2 uPA- und PAI-1-Konzentrationen in präoperativer Biopsie und korrespondierendem chirurgischen Exzidat im Studienkollektiv 1

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Arten der Probenentnahme (im Folgenden als Methoden bezeichnet) miteinander verglichen. Als klinisch etablierte Methode für die uPA- und PAI-1-Bestimmung gilt die Proteinmessung mittels ELISA aus Tumorfrischgewebe von ca. 100–300 mg Gewebeproben (Harbeck et al., 2004). Die neue Methode ist in unserer Studie die uPA- und PAI-

1-Konzentrationsbestimmung aus kleineren, ca. 10–30 mg Gewebeproben der präoperativen Biopsie. Die Übereinstimmung der uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat wurde mithilfe des Verfahrens nach Bland und Altman analysiert. In ihren Arbeiten belegen Bland und Altman, dass die Übereinstimmung von (Mess)Methoden durch eine einzelne statistische Maßzahl nicht umfassend beschrieben wird. Beim Vergleich von zwei (Mess)Methoden ist vor allem die Abweichung der *einzelnen* Messungen für die Ergebnisinterpretation interessant und nicht die mittlere Abweichung *aller* Messungen der zwei miteinander verglichenen Methoden (Bland und Altman, 1986, 1995). Grouven et al. bestätigten in einer Übersichtsarbeit 2007, dass „das Hauptinteresse bei Methodenvergleichen in der Quantifizierung des Unterschiedes liegen sollte und nicht im Testen statistischer Hypothesen auf Gleichheit der Methoden“ (Grouven et al., 2007). Die Quantifizierung der individuellen Abweichungen zwischen uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat wird mit dem Verfahren nach Bland und Altman in der vorliegenden Studie sehr gut veranschaulicht. Die nach Bland und Altman ermittelten Übereinstimmungsgrenzen unterliegen der klinischen, nicht der statistischen Interpretation. Die Übereinstimmungsgrenzen sind im Studienkollektiv 1 und im Subkollektiv 1 vor allem für die Differenzen der PAI-1-Konzentrationen sehr weit, sie werden durch einzelne Ausreißer beeinflusst. PAI-1 unterliegt im Vergleich zu uPA im Karzinomgewebe entweder höheren Schwankungen durch biologische Prozesse oder PAI-1 ist im Karzinomgewebe heterogener verteilt. Die Bland-Altman-Plots verdeutlichen die Zunahme der Streuung und Varianz der gemessenen Einzeldifferenzen von uPA- u./o. PAI-1-Konzentrationen eines jeden Falles mit höheren Proteinkonzentrationen. Für die untersuchten Kollektive und Proteine (uPA, PAI-1) steigt mit höheren Proteinkonzentrationen in der Biopsie die Differenz zur Proteinkonzentration im Exzidat. Daraus lässt sich schließen, dass niedrige uPA- und PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie im klinischen Alltag eine präzisere Aussage treffen als hohe uPA- u./o. PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie. Im Studienkollektiv 1 waren in der Biopsie die uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Mittel etwas höher. Dies widerlegt die Vermutung, dass durch Biopsie induzierte biologische Prozesse zu durchschnittlich höheren uPA- und PAI-1-Konzentrationen im chirurgischen Exzidat führen. Der Einfluss des Biopsiedefektes auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen im chirurgischen Exzidat wird anschließend diskutiert.

Die Verwendung von uPA/PAI-1 als prognostischer und prädiktiver Faktor erfolgt im klinischen Alltag anhand von definierten Schwellenwerten. Die Kombination von uPA- und PAI-1-Konzentrationen (uPA/PAI-1-Status) ist prognostisch und therapeutisch relevant. Sowohl im Studienkollektiv 1 als auch im Subkollektiv 1 wird in über 80 % der Fälle eine korrekte Risikoeinteilung der Patientin durch die uPA/PAI-1-Konzentrationen aus präoperativer Biopsie erzielt. In beiden Kollektiven wurden vor allem für die Bestimmung des uPA/PAI-1-Status aus Biopsiegewebe sehr

hohe Sensitivitäten (90 % im Studienkollektiv 1 und 85 % im Subkollektiv 1) und positive prädiktive Werte (88 % im Studienkollektiv 1 und 96 % im Subkollektiv 1) erzielt. Das heißt, dass Patientinnen mit erhöhtem uPA/PAI-1-Status im Exzidat, somit ungünstigerer Prognose, auch mittels präoperativer Biopsie in hohem Maße korrekt identifiziert werden. Diese neue Methode der uPA-/PAI-1-Konzentrationsbestimmung bietet diagnostische Sicherheit. Zudem ist das Risiko, dass eine Patientin aufgrund von uPA/PAI-1-Konzentrationen aus der präoperativen Biopsie eine Übertherapie erhalten würde durch die hohen positiven prädiktiven Werte (88 % im Studienkollektiv 1 und 96 % im Subkollektiv 1) sehr gering. Die Entscheidungsgrundlage für eine adjuvante Chemotherapie aufgrund des uPA/PAI-1-Status, der aus einer präoperativen Biopsie bestimmt wurde, wird durch diese Ergebnisse gestützt. Zu diskutieren bleibt dennoch, ob negative prädiktive Werte von 74 % (Studienkollektiv 1) und 67 % (Subkollektiv 1) ausreichend sind im Hinblick auf die Vermeidung einer Untertherapie, resultierend aus uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus präoperativer Biopsie. Die Sensitivitäten, Spezifitäten und negativen und positiven prädiktiven Werte sind im Studienkollektiv 1 und Subkollektiv 1 trotz der unterschiedlichen Fallzahl ähnlich. Für weiterführende klinische Aussagen ist es notwendig, die Ergebnisse an einem sehr viel größeren Studienkollektiv ebenfalls prospektiv zu überprüfen.

Die vorliegende Arbeit stellt nach unserem aktuellen Kenntnisstand und Literaturrecherche die erste Studie dar, die uPA- und PAI-1-Proteinkonzentrationen im ELISA von präoperativer Stanz- oder Vakuum-Biopsie und korrespondierendem chirurgischen Exzidat im klinischen Alltag vergleicht. Kuner et al. untersuchten im Jahre 2000 an 63 Mammakarzinomen Proteinkonzentrationen von ER-, PgR- und EGF-Rezeptoren, Kathepsin-D und uPA und PAI-1 in Gewebeproben aus Stanzbiopsie und chirurgischem Exzidat. Die Stanzbiopsie wurde in dieser Studie unmittelbar nach der chirurgischen Exzision am Tumorpräparat durchgeführt. Die uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels ELISA unter geltenden Standardbedingungen. Kuner et al. ermittelten für uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat Sensitivitäten von 90 % und 86 %, sowie Spezifitäten von 85 % und 87 %. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten sie, dass in Gewebeproben von Stanzbiopsien uPA- und PAI-1-Konzentrationen bestimmt werden können (Kuner et al., 2000).

In den letzten Jahren untersuchten und bestätigten viele Arbeiten die diagnostische Aussagekraft von klassischen Prognosefaktoren wie Tumorgrading, histologischer Tumortyp, ER- und PgR-Expression und HER2-Expression aus konventionell entnommenen präoperativen Stanzbiopsien (Cahill et al., 2006; Usami et al., 2007; Wood et al., 2007; Lebeau et al., 2010). Im klinischen Alltag werden diese prognostischen und prädiktiven Informationen aus präoperativen

Biopsien verwendet. Chen et al. bestätigten 2012 in einer Metaanalyse die diagnostische Genauigkeit von ER-, PgR- und HER2-Expression, die in präoperativen Stanzbiopsien bestimmt wurden. Chen et al. ermittelten aus den Ergebnissen von 27 Studien absolute Sensitivitäten von 97 % für ER-, 91 % für PgR- und 81 % für HER2-Expression, sowie Spezifitäten von 79 % für ER-, 73 % für PgR- und 97 % für HER2-Expression in Stanzbiopsie und chirurgischem Exzidat. Sie wiesen nach, dass ER- und PgR-Expression in Stanzbiopsien etwas häufiger als positiv klassifiziert wurden. Aus diesem Grund empfehlen Chen et al. die Expression von Hormonrezeptoren an präoperativer Biopsie *und* chirurgischem Exzidat durchzuführen. Zudem weisen sie darauf hin, dass intratumorale Heterogenität zu diskordanten Resultaten führen kann (Chen et al., 2012).

Das Ki67-Antigen ist ein Proliferationsmarker in Mammakarzinomen und wird seit einigen Jahren als prognostischer und prädiktiver Faktor angewendet (Yerushalmi et al., 2010). 2013 untersuchten Chen et al. die Expression von Ki67 in formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeproben von Stanzbiopsien und korrespondierenden chirurgischen Exzidaten von 298 Mammakarzinomen. Die Studienergebnisse zeigten, dass Ki67 in den Exzidaten zu einem höheren prozentualen Anteil exprimiert wird als in der Stanzbiopsie. Chen et al. wiesen für die Expression von Ki67 eine Sensitivität von durchschnittlich 79 % nach. In der Subanalyse von 60 ER-negativen Mammakarzinomen lag die Sensitivität bei 100 %. Chen et al. interpretieren die Abweichungen der Ki67 Expression in Stanzbiopsie und chirurgischem Exzidat als Ausdruck intratumoraler Heterogenität und empfehlen die Aufarbeitung von mehreren Stanzbiopsien oder die Bestimmung von Ki67 sowohl in Gewebeproben der Stanzbiopsie als auch des chirurgischen Exzidates (Chen et al., 2013).

Genexpressionsanalysen in Mammakarzinomen haben in den vergangenen Jahren einen starken prognostischen Stellenwert erlangt. Bis dato werden diese Genexpressionsanalysen mittels kommerziell erhältlicher Tests in Gewebeproben von chirurgischen Exzidaten durchgeführt (Paik et al., 2004; Buyse et al., 2006; Filipits et al., 2011). Drury et al. verglichen in einer sog. Machbarkeitsstudie („proof of concept study“) an 8 Fällen für den Genexpressionstest Oncotype DX® die mittels qRT-PCR bestimmten Daten aus präoperativer Stanzbiopsie und chirurgischem Exzidat. Drury et al. wiesen nach, dass die Genexpressionsdaten in sehr kleinen FFPE-Gewebeproben von Stanzbiopsien unter Laborbedingungen mit den Genexpressionsdaten aus konventionell verwendeten größeren FFPE-Gewebeproben des chirurgischen Exzidates sehr gut korrelierten (Pearson Korrelationskoeffizient  $r = 0,91$ ). Dennoch weisen Drury et al. in ihrer Studie darauf hin, dass größere Variationen der Genexpression in den Stanzbiopsien gemessen wurden. Sie empfehlen die Aufarbeitung von konventionellen FFPE-Gewebeproben des chirurgischen Exzidates (Drury et al., 2010).

Müller et al. untersuchten ebenfalls mittels qRT-PCR retrospektiv in FFPE-Gewebeproben von 40 Stanzbiopsien und korrespondierenden chirurgischen Exzidaten für den Genexpressionstest EndoPredict® die Übereinstimmung der Expression von 11 Genen. Für die 11 Gene zeigten sie Korrelationen zwischen  $r = 0,65$  und  $r = 0,89$  (Pearson Korrelationskoeffizient). Für den auf der Genanalyse basierenden Risikoscore konnten sie eine Übereinstimmung von 95 % in Gewebeproben aus Stanzbiopsie und chirurgischem Exzidat nachweisen. Müller et al. schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass der untersuchte Genexpressionstest auch in Gewebeproben von Stanzbiopsien durchgeführt werden kann. Zudem interpretieren sie aus ihren Ergebnissen, dass ein Biopsiedefekt in Gewebeproben keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten 11 Gene hat (Müller et al., 2012). Die von Müller et al. dargestellten Studienergebnisse sind im Hinblick auf die Verwendbarkeit von Gewebeproben aus präoperativen Biopsien vielversprechend, sollten aber möglichst prospektiv unter Bedingungen des klinischen Alltags überprüft werden.

Die vorliegende Arbeit hat dies an einem Kollektiv von über 100 Patientinnen mit Mammakarzinom erfüllt. Unsere Studienergebnisse bestätigen die Aussage, dass uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Gewebeproben der präoperativen Biopsie im ELISA bestimmt werden können. Dennoch müssen Einflussfaktoren, die zu diskordanten uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat führen können, berücksichtigt werden. Mögliche Einflussfaktoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht und werden im Folgenden diskutiert.

### **5.3 Einfluss des Biopsiedefektes auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Exzidat**

Im Studienkollektiv 2 wurden von 8 chirurgischen Exzidaten die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus mindestens einer Gewebeprobe mit Biopsiedefekt mit mindestens einer Gewebeprobe ohne Biopsiedefekt desselben Tumors verglichen. Die Abweichungen der uPA-Konzentrationen aus Gewebeproben mit und ohne Biopsiedefekt waren gering. In 4 von 8 Tumoren waren die uPA-Konzentrationen im Gewebe mit Biopsiedefekt sogar niedriger als im Gewebe ohne Biopsiedefekt. Die PAI-1-Konzentrationen waren im Gewebe mit Biopsiedefekt in 6 von 8 Fällen erhöht, in 4 von 6 Fällen in etwa 4-fach bis 10-fach.

Die Biopsie verursacht ein Gewebstrauma, das eine lokale Entzündungsreaktion und Gewebereparaturmechanismen auslöst. In zahlreichen Studien konnte die Beteiligung von PAI-1 an Entzündungsreaktionen und Wundheilung belegt werden (Rømer et al., 1991; Wysocki et al., 1999; Schäfer und Werner, 2007). Providence et al. wiesen in Nierenepithelzellen von Ratten eine er-

höhte PAI-1-Expression auf mRNA-Ebene nach, wenn diese Epithelzell-Linien im Labor zuvor mechanisch alteriert wurden (Providence et al., 2000). Renckens et al. wiesen die Mitbeteiligung von PAI-1 bei lokalen (und systemischen) Entzündungsreaktionen nach. Sie induzierten in Wild-Typ-Mäusen eine lokale Entzündungsreaktion durch Terpentininjektion. Mittels ELISA wiesen Renckens et al. bereits 8 Stunden nach induzierter Inflammation deutlich erhöhte PAI-1-Konzentrationen in Gewebeproben aus der entzündeten Injektionsstelle nach. Zudem wiesen sie eine erhöhte lokale Expression von PAI-1-mRNA aus Makrophagen und Endothelzellen der Injektionsstelle nach (Renckens et al., 2005).

Trotz der geringen Zahl von acht untersuchten chirurgischen Exzidaten lässt sich ein Trend für höhere PAI-1-Konzentrationen in Gewebeproben mit Biopsiedefekt erkennen. Ob die erhöhten PAI-1-Konzentrationen durch eine Biopsie-bedingte lokale Entzündungsreaktion und Gewebstrauma-induzierte Prozesse verursacht sind, sollte an sehr viel größerer Fallzahl untersucht werden. Zudem wurden in 2 von 8 Exzidaten die uPA- und PAI-1-Konzentrationen jeweils in zwei Gewebeproben mit Biopsiedefekt bestimmt. Trotz jeweils vorhandenem Biopsiedefekt waren die uPA- und PAI-1-Konzentrationen in den zwei Gewebeproben sehr unterschiedlich. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Haas et al. in ihrer Arbeit zum Einfluss eines Biopsiedefektes auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen in chirurgischen Exzidaten von Mammakarzinomen. In FFPE-Proben von 55 Exzidaten wurde u.a. mittels Immunhistochemie semiquantitativ die Expression von uPA und PAI-1 in intaktem Karzinomgewebe und in Gewebe mit Biopsiedefekt bestimmt (gemessen als Färbeintensität von monoklonalem anti-uPA-Antikörper und anti-PAI-1-Antikörper). Haas et al. wiesen immunhistochemisch nach, dass ungeachtet eines Biopsiedefektes uPA und PAI-1 in den Karzinomzellen relativ homogen exprimiert wird. Im Tumorstroma wurden uPA und PAI-1 deutlich heterogener exprimiert, sowohl innerhalb eines Tumors als auch im Vergleich von verschiedenen Tumoren. Die Expression von uPA und PAI-1 im Tumorstroma war unabhängig von einer Lymphozyteninfiltration. Die Expression von uPA und PAI-1 im Tumorstroma mit Biopsiedefekt war nur für uPA signifikant höher (21 von 55 Tumorproben (38 %)), jedoch nicht für PAI-1 (16 von 55 Tumorproben (29 %)). Zudem zeigten 31 (56%) von 55 Tumorproben eine homogene Expression von uPA im intakten Gewebe *und* im Gewebe mit Biopsiedefekt. 22 (40 %) von 55 Tumorproben zeigten diese homogene Expression für PAI-1. In 6 (11 %) von 55 Tumoren konnte sogar eine höhere PAI-1-Expression im intakten Tumorgewebe im Gegensatz zum Gewebe mit Biopsiedefekt gemessen werden, in 3 (5 %) von 55 Tumorproben war dies für uPA der Fall (Haas et al., 2008). Die Ergebnisse der Studie belegen, dass es sinnvoll ist, die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Gewebeproben ohne Biopsiedefekt zu bestimmen. Die Studienergebnisse verdeutlichen aber auch sehr klar, dass die Expression von uPA und PAI-1 im

Mammakarzinom unabhängig eines Biopsiedefektes variieren kann. Vor allem unterlagen die uPA- und PAI-1-Konzentrationen stärkeren Schwankungen im Tumorstroma. Daraus lässt sich folgern, dass die intratumorale Gewebsheterogenität maßgeblich an Expressionsunterschieden von uPA und PAI-1 innerhalb eines Tumors verantwortlich ist. Zanetti-Dällenbach et al. untersuchten 2006 mittels Genexpressionprofilen den Einfluss einer Stanzbiopsie auf die Genexpression im korrespondierenden chirurgischen Exzidat. Die analysierten Daten von 22 Mammakarzinomen zeigten signifikant erhöhte Expressionen von Genen, die an der Kodierung der Proteine PAI-1, des uPA-Rezeptors (uPAR), der Matrix-Metallo-Proteinase 1 (MMP1) und der Cyclooxygenase-2 (COX-2) beteiligt sind. Diese Proteine sind an Entzündungsprozessen u./o. Wundheilung beteiligt (Rømer et al., 1994; Williams et al., 1999; Baker und Leaper, 2000). Zanetti-Dällenbach et al. schlussfolgern, dass die erhöhten Genexpressionen dieser Proteine in den chirurgischen Exzidaten Folge eines Gewebstraumas durch Stanzbiopsie sein können, aber auch durch ihre Funktion in der Kanzerogenese selbst, z.B. bei Angiogenese und Tumorzellprogression bedingt (Zanetti-Dällenbach et al., 2006).

#### **5.4 Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf gemessene Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in präoperativer Biopsie und chirurgischem Exzidat**

Im Studienkollektiv 1 wurde der Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf die gemessenen Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat (Delta uPA und Delta PAI-1) statistisch untersucht. Es wurde ein signifikanter Einfluss der TumorgroÙe (ausgedrückt in pT) auf Delta PAI-1 ermittelt. Das Ergebnis ergibt sich durch ein sehr hohes Delta PAI-1 für die Patientinnen mit einem pT4 klassifizierten Tumor. Da nur 2 von 127 Patientinnen einen pT4-Tumor hatten, ist das Ergebnis verzerrt. Nach Ausschluss der zwei Patientinnen hatte die TumorgroÙe keinen signifikanten Einfluss auf Delta PAI-1. Alle anderen untersuchten klinischen und pathologischen Faktoren hatten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf Delta uPA und Delta PAI-1. Dies zeigt, dass die uPA- und PAI-1-Bestimmung sowohl aus präoperativer Biopsie als auch aus dem chirurgischen Exzidat eine von klinischen und pathologischen Einflüssen weitgehend unabhängige Methode ist. Das Zeitintervall zwischen Entnahme der präoperativen Biopsie und der chirurgischen Tumorexzision hatte in unserer Studie keinen Einfluss auf Delta uPA und Delta PAI-1. Haas et al. untersuchten in der in 5.3 zitierten Studie ebenfalls den Einfluss des Zeitintervalls zwischen Stanzbiopsie und chirurgischer Tumorexzision auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Karzinomgewebe. Sie konnten immunhistochemisch und im ELISA nachweisen, dass im Tumorstroma ohne Biopsiedefekt die uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Tumoren,

die nach 9 oder mehr Tagen nach Biopsie exzidiert wurden, geringer waren als im Tumorstroma am Biopsiedefekt (Haas et al., 2008). Diese Beobachtung stützt die These des Einflusses eines Biopsiedefektes auf uPA- und PAI-1-Konzentrationen. Zumindest makroskopisch sollte ein Biopsiedefekt vor der uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung in der Gewebeprobe ausgeschlossen werden.

In unserer Arbeit hatte die Institution/das Brustzentrum, in der die präoperative Biopsie und das korrespondierende Tumorexzidat entnommen wurden, keinen Einfluss auf Delta uPA und Delta PAI-1. Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen zwischen Biopsie und Exzidat sind demnach unabhängig von äußeren Faktoren wie dem ärztlichen Personal, das die Probe entnimmt oder der (korrekten) Lagerung und Transport des Tumorfrischgewebes. Wichtiger ist die Aufarbeitung und Messung der Gewebeprobe in einem für die uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung etablierten Labor, in dem regelmäßige externe Qualitätskontrollen und standardisierte Laborverfahren garantiert sind (Sweep et al., 1998). Dieser Umstand ist in der vorliegenden Studie gegeben und sorgt für bestmöglich reproduzierbare Ergebnisse.

## **5.5 Diskordante und konkordante uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat – histologische Analyse ausgewählter Fälle**

Zur weiterführenden Analyse starker und geringer Abweichungen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat wurden ausgewählte Fälle auf histologische und pathologische Merkmale überprüft. In den drei untersuchten Gruppen gab es keine nennenswerten Unterschiede in der Verteilung des histologischen Tumortyps, die Mehrzahl der untersuchten Fälle waren duktale Mammakarzinome. In der Gruppe mit diskordanten uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Bezug auf die Schwellenwerte wurden 4 lobuläre Karzinome mit Delta PAI-1  $\geq 10$  ng/mg Gesamtprotein untersucht. Daraus lässt sich in der vorliegenden Arbeit nicht schließen, dass lobuläre Karzinome mit einer heterogeneren Verteilung von PAI-1 einhergehen. Die analysierte Fallzahl ist für diese Aussage zu klein. Die Einzelfallanalyse erbrachte keinen Trend in der Verteilung des Hormonrezeptor- und HER2-Status. Es wurden alle ausgewählten Fälle der drei Gruppen auf das Vorhandensein von Lymphozyten als Ausdruck inflammatorischer Prozesse überprüft. Wie bereits in 5.3 zitiert, ist bekannt, dass in entzündetem Gewebe und biopsiertem Mammakarzinom-Gewebe PAI-1 und weitere Entzündungsmediatoren in erhöhter Konzentration vorliegen (Rømer et al., 1991; Wysocki et al., 1999; Zanetti-Dallenbach et al., 2006; Schäfer und Werner, 2007; Haas et al., 2008). Die Einzelfallanalyse sollte klären, ob ein hohes Delta PAI-1 zwischen Biopsie und Exzidat mit einer in der Mikroskopie nachweisbaren Lymphozyteninfiltration einhergeht. Dies konnte nicht bestätigt werden. Lymphozyten waren in für uPA u./o. PAI-



1 konkordanten und diskordanten Fällen gleichermaßen nachweisbar. Aufgrund des beobachteten Verteilungsmusters scheint das Vorhandensein von Lymphozyten tumorassoziiert zu sein. Verschiedene Studien belegen, dass Lymphozyten und Makrophagen im Mammakarzinom-Gewebe Tumorzellwachstum hemmen und Tumorzellen sogar eliminieren (Shankaran et al., 2001; Smyth et al., 2006). Mahmoud et al. wiesen in einer Studie an 1 334 Mammakarzinomen immunhistochemisch nach, dass das Vorhandensein von CD 8+ T-Lymphozyten im Tumor ein unabhängiger prognostischer Faktor in Bezug auf krankheitsfreies Überleben beim Mammakarzinom ist und positiv mit dem Tumorgrading und negativ mit dem Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus korreliert (Mahmoud et al., 2011). Denkert et al. konnten an 1058 Mammakarzinomen zeigen, dass eine tumorassoziierte, lymphozytäre Infiltration mit einem deutlich besseren Ansprechen auf eine antrazyklin-/taxanhaltige, neoadjuvante Chemotherapie einhergeht (Denkert et al., 2010). Aus der vorliegenden Arbeit kann nur geschlossen werden, dass das Vorhandensein von Lymphozyten in einer kleinen untersuchten Fallzahl keinen Effekt auf Delta uPA- und Delta PAI-1 hat und keinen Effekt auf hohe PAI-1-Konzentrationen generell hat. Die o.g. Studien zeigen, dass Lymphozyten im Mammakarzinomgewebe eine komplexe Funktion im Hinblick auf die Tumorimmunogenität einnehmen. Ob eine tumorassoziierte lymphozytäre Infiltration mit hohen oder niedrigen PAI-1-Konzentrationen im Mammakarzinom korreliert, ist nach aktueller Literaturrecherche noch nicht untersucht worden.

Ebenfalls lässt sich kein Einfluss der prozentualen Verteilung von Tumorstroma und Tumorzellen im histologischen Präparat auf Delta uPA und Delta PAI-1 erkennen. Sowohl für uPA und/oder PAI-1 diskordante als auch konkordante Fälle zeigten ein ausgewogenes Stroma- zu Tumorzell-Verhältnis, andere Fälle wiederum zeigten sehr heterogene Stroma- und Tumorzellanteile. Dies war zu beobachten, sowohl innerhalb eines Biopsie- oder Exzidat-Präparates, als auch zwischen Biopsie und Exzidat.

Hildenbrand und Schaaf untersuchten an 30 Mammakarzinomen die Konzentrationen von uPA-, PAI-1 und uPAR in Tumorzellen und im Tumorstroma. Durch laser capture microdissection wurde jeweils ein Teil des gefrorenen Tumor-Frischgewebes in Tumorzellen und Tumorstroma separiert. Anschließend wurde in beiden Gewebefractionen und in dem nicht separierten Gewebe die uPA-, PAI-1- und uPAR-Konzentrationen mittels ELISA unter Standardbedingungen gemessen. Hildenbrand und Schaaf konnten keine signifikanten Unterschiede in den durchschnittlichen Konzentrationen von uPA, PAI-1 und uPAR zwischen Tumorzellen, Tumorstroma und nicht separiertem Gewebe feststellen. Daraus schlussfolgern sie, dass der prozentuale Anteil von Tumorstroma im Karzinom nicht zu veränderten uPA-, PAI-1- und uPAR-Konzentrationen im ELISA führt. Allerdings untersuchten Hildenbrand und Schaaf in ihrer Studie nicht, ob innerhalb eines

Tumors Konzentrationsunterschiede von uPA, PAI-1 und uPAR vorlagen, die zu diskordanten Proteinkonzentrationen in Biopsie und Exzidat führen können. Hildenbrand und Schaaf wiesen zudem immunhistochemisch nach, dass in fibroblastischem Stroma aus normalem Brustdrüsen-gewebe uPA, PAI-1 und uPAR nur in 50 % aller stromalen Zellen exprimiert werden, im Karzi-nomgewebe hingegen in 100 % der stromalen Zellen (Hildenbrand und Schaaf, 2009). Dieser Erkenntnis sollte bei der Aufarbeitung von Karzinomgewebe für die uPA- und PAI-1-Bestimmung Rechnung getragen werden. Zum einen ist es wichtig, dass makroskopisch Karzinomgewebe für den ELISA ausgewählt wird. Diese Auswahl ist sowohl aus (größeren) chirurgischen Exzidaten als auch aus präoperativen (kleineren) Biopsien möglich. Zum anderen ist nach den o.g. Studiener-gebnissen der Anteil an Tumorzellen im Karzinomgewebe nicht relevant.

Die durch Mikroskopie untersuchten Kriterien – Lymphozyteninvasion und prozentualer Anteil von Tumorstroma und Karzinomzellen – können nicht zur Erklärung von diskordanten und kon-kordanten uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat herangezogen werden. Es wurde exemplarisch nur eine kleine Fallzahl untersucht. Zudem wird die Analyse durch den Ver-gleich einer quantitativen Messmethode, der uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung im ELISA, mit einer qualitativen Messmethode, der histologischen Beurteilung von Lymphozytenin-vasion und Stromaanteil im Mikroskopie-Präparat, limitiert. Dadurch können allenfalls klinische Hypothesen generiert werden. Die detailliertere Darstellung einzelner Fälle in dieser Arbeit un-terstreicht jedoch, dass bei diskordanten uPA- und PAI-1-Konzentrationen durchaus die Einzel-fallanalyse weiterführende Informationen bietet. Mechanische Alterationen des Biopsie-Präpa-rates und ein im HE-Schnitt sichtbarer Stanzkanal können diskordante uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat bedingen. Die histologische Einzelfallanalyse leistet hier einen Beitrag zur Entscheidung, ob uPA- und PAI-1-Werte klinisch verwendet werden können.

## **5.6 uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat nach histologischem Nachweis von Karzinomzellen in der Biopsie**

Im Studienkollektiv 2 wurde geprüft ob der ergänzende präanalytische histologische Nachweis von Karzinomzellen in den Gewebeproben der Biopsiezylinder die für die Präparation benutzt werden, zu einer höheren Übereinstimmung von uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat führt (vgl. 3.1).

Die Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zum Studienkollektiv 1 im Studienkollektiv 2 keine hö-here Übereinstimmung von uPA- und PAI-1-Konzentrationen durch die ergänzende histologi-

sche Untersuchung auf Karzinomzellen erzielt wird. Zudem wurde keine höhere Sensitivität, Spezifität und positive und negative Vorhersagewerte für die uPA- und/ oder PAI-1-Konzentrationen aus dem Biopsiegewebe erzielt. Mit Ausnahme des npv von PAI-1 (0,71 im Studienkollektiv 2 bzw. 0,66 im Studienkollektiv 1) lagen die im Studienkollektiv 2 ermittelten Werte unter denen des Studienkollektivs 1 (vgl. Tab. 22). Die Aussage wird limitiert durch das kleinere Studienkollektiv 2 von n = 36 Fällen. Die Ergebnisse wurden mit denen des Studienkollektivs 1 von n = 127 Fällen verglichen. Dadurch kann eine Verzerrung der Ergebnisse vorliegen. Jedoch wurden die uPA- und PAI-1-Konzentrationen in beiden Studienkollektiven unter gleichen standardisierten Bedingungen im selben Labor bestimmt. Dies führt grundsätzlich in dieser Studie zu gut reproduzierbaren Ergebnissen.

Die Ergebnisse bestätigen, dass Gewebeproben von Biopsiezylindern, die nicht zusätzlich histologisch auf Karzinomzellen untersucht wurden, für die uPA- und PAI-1-Konzentrationsbestimmung mittels eines standardisierten ELISA im klinischen Alltag verwendet werden können. Wie zuvor in 5.3 diskutiert, empfiehlt es sich vielmehr, mehrere Biopsiezylinder zu einer Probe zusammenzuführen, da uPA- und PAI-1 im Mammakarzinom heterogen exprimiert sein können. So können möglichst valide uPA- und PAI-1-Konzentrationen gemessen werden.

## **5.7 Intratumorale Heterogenität**

In der Analyse und Interpretation der Ergebnisse müssen intratumorale Heterogenität und Homogenität als mögliche Ursachen für diskordante und konkordante uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat diskutiert werden.

In den letzten Jahren steht die intratumorale Heterogenität von Mammakarzinomen zunehmend im Fokus der Forschung und wissenschaftlichen Diskussion. Die Arbeitsgruppe von Raychaudhuri et al. konnte intratumorale Heterogenität durch Expressionsanalysen von pro-metastatischer und anti-metastatischer miRNA in verschiedenen Tumorregionen von Mammakarzinomen nachweisen. Dazu bestimmten sie mittels qRT-PCR die Expression von miRNA in 16 Karzinomen jeweils aus 2 – 3 Proben der Tumorperipherie, der Intermediärzone und des Tumorzentrums (n = 132 Proben). Innerhalb eines Tumors waren alle vier untersuchten miRNA sehr heterogen exprimiert. Statistisch wurde die heterogene Expression als Coefficient of Variation ausgedrückt, der innerhalb eines Tumors zwischen den drei untersuchten Tumorzonen bei durchschnittlich 40 % lag. Raychaudhuri et al. schlussfolgern aus den Ergebnissen ihrer Studie, dass die nachgewiesene intratumorale Heterogenität der miRNA-Expression zu einem sog.

sampling bias, einer Verzerrung des Probenergebnisses, führen kann. Zudem sollten von unterschiedlichen Regionen eines Tumors Proben entnommen werden, um ein möglichst repräsentatives Expressionsprofil zu erhalten (Raychaudhuri et al., 2012). Die o.g. Studie hat intratumorale Heterogenität auf Genexpressionsebene in Mammakarzinomen nachgewiesen. Eine andere Arbeitsgruppe um Malinowsky et al. konnte intratumorale Heterogenität in Mammakarzinomen auf Proteinexpressionsebene nachweisen. Die Studie stellt nach Literaturodatenbankrecherche die einzige Studie dar, die u.a. die intratumorale heterogene Expression von uPA und PAI-1 untersucht hat. Mittels Reverse-Phase-Protein-Arrays (RPPA) wurde in 15 Mammakarzinomen die Expression von 35 verschiedenen Proteinen in Proben der Tumorperipherie, der Intermediärzone und des Tumorzentrums gemessen (n = 106 Proben). Ziel war es, die intratumorale heterogene Expression von Proteinen die prognostische und prädiktive Relevanz haben zu untersuchen. Dazu zählten uPA und PAI-1, HER2, Proteine des Östrogen- und Progesteron-Rezeptors, sowie verschiedene Proteine aus den uPA-, PAI-1-, HER2-, und Hormonrezeptor-Signalkaskaden. Malinowsky et al. konnten für alle untersuchten Proteinexpressionen eine deutliche intratumorale Heterogenität von durchschnittlich 31 % (ausgedrückt als Coefficient of Variation) innerhalb desselben Tumors nachweisen. Es konnte keine signifikante Korrelation der intratumoralen, heterogenen Expression einzelner Proteine zur Tumorgroße und zum Verhältnis von Tumorzellanteil und Stromaanteil nachgewiesen werden. Malinowsky et al. schlussfolgern aus ihren Studienergebnissen, dass intratumorale Heterogenität die Bestimmung von prognostischen und prädiktiven Faktoren beeinflussen kann. Zudem stellen sie fest, dass intratumorale Unterschiede in der Tumorzellproliferation und unterschiedlich lokalisierte Tumorzellklone ein Grund für die heterogene Expression von Proteinen im Mammakarzinom sein kann, diese dadurch aber nicht gänzlich erklärt werden kann (Malinowsky et al., 2012).

Trotz einer relativ kleinen Zahl von untersuchten Mammakarzinomen (n = 16 und n = 15) verdeutlichen beide Studien das Phänomen der intratumoralen Heterogenität für die Expression von unterschiedlichen Genen und Proteinen in Mammakarzinomen. Die Studie von Malinowsky et al. zeigt zudem, dass uPA und PAI-1 in Mammakarzinomen durchaus heterogen exprimiert sein können. In der vorliegenden Arbeit wurden im Studienkollektiv 2 uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb eines Tumors gemessen und mit uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Gewebe mit Biopsiedefekt desselben Tumors verglichen. Die an unterschiedlichen Stellen im Tumor (ohne Biopsiedefekt) bestimmten uPA- und PAI-1-Konzentrationen waren ebenfalls teilweise heterogen. Im klinischen Alltag sollte bei der Bestimmung von uPA- und PAI-1-Konzentrationen sowohl aus präoperativen Biopsien als auch aus chirurgischen Exzidaten eine mögliche intratumorale heterogene Expression dieser Proteine

berücksichtigt werden. Durch das Zusammenführen von Karzinomgewebe aus unterschiedlichen Biopsien zu einer Probe und die Entnahme von Biopsien aus unterschiedlichen Regionen eines Tumors kann der Einfluss der heterogenen intratumoralen Proteinexpression so gering wie möglich gehalten werden.

## **5.8 Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus kleinen, ca. 10 – 30 mg Gewebeproben von präoperativen Biopsien mit ca. 100 – 300 mg Gewebeproben des chirurgischen Exzidates, die jeweils unter Standardbedingungen mittels ELISA bestimmt wurden, zu vergleichen. uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus präoperativen Biopsien können im klinischen Alltag zur Prognoseabschätzung verwendet werden. uPA- und PAI-1-Konzentrationen in der Biopsie sagen uPA- und PAI-1-Konzentration im Exzidat mit hoher Übereinstimmung voraus. Der uPA/PAI-1-Status wurde mittels präoperativer Biopsie in hohem Maße korrekt identifiziert. Der präanalytische histologische Nachweis von Karzinomzellen im Biopsiegewebe führte in der vorliegenden Arbeit nicht zu höheren Übereinstimmungen zwischen uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat. Nach Ausschluss von zwei pT4-Tumoren konnte kein signifikanter Einfluss von klinischen und pathologischen Faktoren auf Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat ermittelt werden. Die histologische Analyse ausgewählter Fälle zeigte, dass Lymphozyteninvasion und die prozentuale Verteilung von Tumorstroma und Tumorzellen im Karzinom kein Surrogatmarker für diskordante oder konkordante uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat sind. Dennoch bestätigte die histologische Untersuchung, dass bei hohen Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat die Einzelfallanalyse zur Ursachenklärung beitragen kann. An einem kleinen Subkollektiv konnten erhöhte PAI-1-Konzentrationen in Exzidatproben mit Biopsiedefekt im Vergleich zu PAI-1-Konzentrationen in Exzidatproben ohne Biopsiedefekt gemessen werden. Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass für die uPA- und PAI-1-Bestimmung Proben ohne makroskopisch sichtbaren Biopsiedefekt ausgewählt werden sollten. In Gewebeproben aus verschiedenen Regionen eines Tumors wurden teilweise deutliche Konzentrationsunterschiede von uPA und PAI-1 ermittelt. Trotz kleiner untersuchter Fallzahl weist dies auf eine heterogene Expression von uPA und PAI-1 in Mammakarzinomen hin. Die intratumorale Heterogenität sollte bei der Bestimmung von uPA und PAI-1 unbedingt berücksichtigt werden. Das Zusammenführen von mindestens 2 Biopsien oder Exzidatproben zu einer Probe wird empfohlen.

## 6 Literaturverzeichnis

AGO e.V. Kommission Mamma 2015 Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs. Verfügbar unter: <http://www.ago-online.de/de/infothek-fuer-aerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/> [Stand: 15.6.2015].

Andreasen, P.A., Kjøller, L., Christensen, L. und Duffy, M.J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer* 72, 1–22.

Andreasen, P.A., Egelund, R. und Petersen, H.H. (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57, 25–40.

Anneck, K., Schmitt, M., Euler, U., Zerm, M., Paepke, D., Paepke, S., von Minckwitz, G., Thomssen, C. und Harbeck, N. (2008). uPA and PAI-1 in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Adv Clin Chem* 45, 31–45.

AWMF e.V. (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Verfügbar unter: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-045OL\\_I\\_S3\\_\\_Brustkrebs\\_Mammakarzinom\\_Diagnostik\\_Therapie\\_Nachsorge\\_2012-07.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_I_S3__Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf) [Stand: 26.2.2015].

Baker, E.A. und Leaper, D.J. (2000). Proteinases, their inhibitors, and cytokine profiles in acute wound fluid. *Wound Repair Regen* 8, 392–398.

Bender, R., Ziegler, A. und Lange, S. (2007). Multiple Regression. *Dtsch Med Wochenschr* 132, e30–e32.

Berry, D.A., Cronin, K.A., Plevritis, S.K., Fryback, D.G., Clarke, L., Zelen, M., Mandelblatt, J.S., Yakovlev, A.Y., Habbema, J.D.F., Feuer, E.J., et al. (2005). Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 353, 1784–1792.

Bland, J.M. und Altman, D.G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307–310.

Bland, J.M. und Altman, D.G. (1995). Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 346, 1085–1087.

Boyle, P., Levin, B. und International Agency for Research on Cancer (2008). *World cancer report 2008* (Lyon: IARC Press).

Buyse, M., Loi, S., Veer, L. van't, Viale, G., Delorenzi, M., Glas, A.M., d'Assignies, M.S., Bergh, J., Lidereau, R., Ellis, P., et al. (2006). Validation and Clinical Utility of a 70-Gene Prognostic Signature for Women With Node-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 98, 1183–1192.

Cahill, R.A., Walsh, D., Landers, R.J. und Watson, R.G. (2006). Preoperative profiling of symptomatic breast cancer by diagnostic core biopsy. *Ann Surg Oncol* 13, 45–51.

Campbell, H.E., Epstein, D., Bloomfield, D., Griffin, S., Manca, A., Yarnold, J., Bliss, J., Johnson, L., Earl, H., Poole, C., et al. (2011). The cost-effectiveness of adjuvant chemotherapy for early breast cancer: A comparison of no chemotherapy and first, second, and third generation regimens for patients with differing prognoses. *Eur J Cancer* 47, 2517–2530.

Carter, C.L., Allen, C. und Henson, D.E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63, 181–187.

Chen, X., Yuan, Y., Gu, Z. und Shen, K. (2012). Accuracy of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status between core needle and open excision biopsy in breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 134, 957–967.

Chen, X., Sun, L., Mao, Y., Zhu, S., Wu, J., Huang, O., Li, Y., Chen, W., Wang, J., Yuan, Y., et al. (2013). Preoperative core needle biopsy is accurate in determining molecular subtypes in invasive breast cancer. *BMC Cancer* 13, 390.

Collen, D. und Lijnen, H.R. (1986). Tissue-type plasminogen activator. Mechanisms of action and thrombolytic properties. *Haemostasis* 16 Suppl 3, 25–32.

Czekay, R.-P., Wilkins-Port, C.E., Higgins, S.P., Freytag, J., Overstreet, J.M., Klein, R.M., Higgins, C.E., Samarakoon, R. und Higgins, P.J. (2011). PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *Int J Cell Biol* 2011, 562481.

Danø, K., Andreasen, P.A., Grøndahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L.S. und Skriver, L. (1985). Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44, 139–266.

Decker, T., Hungermann, D. und Böcker, W. (2009). [Prognostic and predictive factors of invasive breast cancer: update 2009]. *Pathologe* 30, 49–55.

Dellas, C. und Loskutoff, D.J. (2005). Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 93, 631–640.

Deng, G., Curriden, S.A., Hu, G., Czekay, R.P. und Loskutoff, D.J. (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Cell Physiol* 189, 23–33.

Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., et al. (2010). Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 28, 105–113.

Drury, S., Salter, J., Baehner, F.L., Shak, S. und Dowsett, M. (2010). Feasibility of using tissue microarray cores of paraffin-embedded breast cancer tissue for measurement of gene expression: a proof-of-concept study. *J Clin Pathol* 63, 513–517.

Duffy, M.J., O’Grady, P., Devaney, D., O’Siorain, L., Fennelly, J.J. und Lijnen, H.J. (1988). Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 62, 531–533.

Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG) (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378, 771–784.

Ellis, I. o., Galea, M., Broughton, N., Locker, A., Blamey, R. w. und Elston, C. w. (1992). Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 20, 479–489.

- Elston, C. w. und Ellis, I. o. (1991). pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403–410.
- Filipits, M., Rudas, M., Jakesz, R., Dubsky, P., Fitzal, F., Singer, C.F., Dietze, O., Greil, R., Jelen, A., Sevelda, P., et al. (2011). A New Molecular Predictor of Distant Recurrence in ER-Positive, HER2-Negative Breast Cancer Adds Independent Information to Conventional Clinical Risk Factors. *Clin Cancer Res* 17, 6012–6020.
- Foekens, J.A., Schmitt, M., van Putten, W.L., Peters, H.A., Kramer, M.D., Jänicke, F. und Klijn, J.G. (1994). Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 12, 1648–1658.
- Gianni, L., Dafni, U., Gelber, R.D., Azambuja, E., Muehlbauer, S., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Baselga, J., Jackisch, C., et al. (2011). Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 12, 236–244.
- Glass, A.G., Lacey, J.V., Carreon, J.D. und Hoover, R.N. (2007). Breast Cancer Incidence, 1980–2006: Combined Roles of Menopausal Hormone Therapy, Screening Mammography, and Estrogen Receptor Status. *J Natl Cancer Inst* 99, 1152–1161.
- Goldhirsch, A., Ingle, J.N., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thürlimann, B. und Senn, H.-J. (2009). Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20, 1319–1329.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B. und Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22, 1736–1747.
- Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.-J., Albain, K.S., André, F., Bergh, J., et al. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24, 2206–2223.
- Gray, R.J. (1992). Flexible Methods for Analyzing Survival Data Using Splines, With Applications to Breast Cancer Prognosis. *J Am Stat Assoc* 87, 942–951.
- Grøndahl-Hansen, J., Christensen, I.J., Rosenquist, C., Brünner, N., Mouridsen, H.T., Danø, K. und Blichert-Toft, M. (1993). High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 53, 2513–2521.
- Grouven, U., Bender, R., Ziegler, A. und Lange, S. (2007). [Comparing methods of measurement]. *Dtsch Med Wochenschr* 132 *Suppl* 1, e69–e73.
- Haas, S., Park, T.-W., Hahne, J.C. und Fischer, H.-P. (2008). Influence of preoperative core biopsies on uPA/PAI-1 expression in breast cancer tissue. *Virchows Arch* 452, 277–283.



Harbeck und Thomssen (2002). Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. In Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome, (München: Zuckschwerdt Verlag), S. 16–23.

Harbeck, N., Thomssen, C., Berger, U., Ulm, K., Kates, R.E., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H. und Schmitt, M. (1999). 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* 54, 147–157.

Harbeck, N., Krüger, A., Sinz, S., Kates, R.E., Thomssen, C., Schmitt, M. und Jänicke, F. (2001). Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1--a multifaceted proteolytic factor. *Onkologie* 24, 238–244.

Harbeck, N., Aigner, M., Kuschel, B. und Kiechle, M. (2002a). Mammakarzinom - prognostische und prädiktive Faktoren. *Der Onkologe* 8, 808–816.

Harbeck, N., Kates, R.E., Look, M.P., Gelder, M.E.M., Klijn, J.G.M., Krüger, A., Kiechle, M., Jänicke, F., Schmitt, M. und Foekens, J.A. (2002b). Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (n = 3424). *Cancer Res* 62, 4617–4622.

Harbeck, N., Kates, R.E., Gauger, K., Willems, A., Kiechle, M., Magdolen, V. und Schmitt, M. (2004). 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* 91, 450–456.

Harbeck, N., Schmitt, M., Vetter, M., Krol, J., Paepke, D., Uhlig, M., Paepke, S., Jänicke, F., Geurts-Moespot, A., von Minckwitz, G., et al. (2008). Prospective Biomarker Trials Chemo N0 and NNBC-3 Europe Validate the Clinical Utility of Invasion Markers uPA and PAI-1 in Node-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 3, 11–15.

Harbeck, N., Schmitt, M., Meisner, C., Friedel, C., Untch, M., Schmidt, M., Sweep, C.G.J., Lisboa, B.W., Lux, M.P., Beck, T., et al. (2013). Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer* 49, 1825–1835.

Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F. und Bast, R.C., Jr (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25, 5287–5312.

Hayes, D.F., Bast, R.C., Desch, C.E., Fritsche, H., Jr, Kemeny, N.E., Jessup, J.M., Locker, G.Y., Macdonald, J.S., Mennel, R.G., Norton, L., et al. (1996). Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 88, 1456–1466.

Hildenbrand, R. und Schaaf, A. (2009). The urokinase-system in tumor tissue stroma of the breast and breast cancer cell invasion. *Int J Oncol* 34, 15–23.

Holleczeck, B. und Brenner, H. (2012). Trends of population-based breast cancer survival in Germany and the US: Decreasing discrepancies, but persistent survival gap of elderly patients in Germany. *BMC Cancer* 12, 317.

- Jacobs, V.R., Kates, R.E., Kantelhardt, E., Vetter, M., Wuerstlein, R., Fischer, T., Schmitt, M., Jaenicke, F., Untch, M., Thomssen, C., et al. (2013). Health economic impact of risk group selection according to ASCO-recommended biomarkers uPA/PAI-1 in node-negative primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 138, 839–850.
- Jänicke, F., Schmitt, M., Pache, L., Ulm, K., Harbeck, N., Höfler, H. und Graeff, H. (1993). Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24, 195–208.
- Jänicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., Sweep, C.G.J.F., Selbmann, H.-K., Graeff, H., Schmitt, M., et al. (2001). 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* 93, 913–920.
- Kantelhardt, E.J., Vetter, M., Schmidt, M., Veyret, C., Augustin, D., Hanf, V., Meisner, C., Paepke, D., Schmitt, M., Sweep, F., et al. (2011). Prospective evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6×FEC versus 3×FEC/3×Docetaxel. *BMC Cancer* 11, 140.
- Kuner, R., Pollow, K., Lehnert, A., Pollow, B., Scheler, P., Kruppenauer, F., Casper, F. und Hoffmann, G. (2000). [Needle biopsy vs. conventional surgical biopsy - biochemical analysis of various prognostic factors]. *Zentralbl Gynakol* 122, 160–164.
- Lebeau, A., Turzynski, A., Braun, S., Behrhof, W., Fleige, B., Schmitt, W.D., Grob, T.J., Burkhardt, L., Hölzel, D., Jackisch, C., et al. (2010). Reliability of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemistry in Breast Core Needle Biopsies. *J Clin Oncol* 28, 3264–3270.
- Look, M.P., van Putten, W.L.J., Duffy, M.J., Harbeck, N., Christensen, I.J., Thomssen, C., Kates, R., Spyrtos, F., Fernö, M., Eppenberger-Castori, S., et al. (2002). Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst* 94, 116–128.
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O. und Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 29, 1949–1955.
- Malinowsky, K., Raychaudhuri, M., Buchner, T., Thulke, S., Wolff, C., Höfler, H., Becker, K.-F. und Avril, S. (2012). Common Protein Biomarkers Assessed by Reverse Phase Protein Arrays Show Considerable Intratumoral Heterogeneity in Breast Cancer Tissues. *PLoS One* 7, e40285.
- Medcalf, R.L. und Stasinopoulos, S.J. (2005). The undecided serpin. *FEBS J* 272, 4858–4867.
- Mengele, K., Harbeck, N., Reuning, U., Magdolen, V. und Schmitt, M. (2005). [Tumor-associated prognostic factors of the plasminogen activator family: determination and clinical value of u-PA, t-PA, PAI-1, and PAI-2]. *Hamostaseologie* 25, 301–310.
- Müller, B.M., Brase, J.C., Haufe, F., Weber, K.E., Budzies, J., Petry, C., Prinzler, J., Kronenwett, R., Dietel, M. und Denkert, C. (2012). Comparison of the RNA-based EndoPredict multigene test between core biopsies and corresponding surgical breast cancer sections. *J Clin Pathol* 65, 660–662.

- Nixon, A.J., Neuberg, D., Hayes, D.F., Gelman, R., Connolly, J.L., Schnitt, S., Abner, A., Recht, A., Vicini, F. und Harris, J.R. (1994). Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 12, 888–894.
- Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F.L., Walker, M.G., Watson, D., Park, T., et al. (2004). A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 351, 2817–2826.
- Petersen, L.C., Lund, L.R., Nielsen, L.S., Danø, K. und Skriver, L. (1988). One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J Biol Chem* 263, 11189–11195.
- Ploug, M., Behrendt, N., Løber, D. und Danø, K. (1991). Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator. *Semin Thromb Hemost* 17, 183–193.
- Ploug, M., Ellis, V. und Danø, K. (1994). Ligand interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor probed with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. Evidence for a hydrophobic binding site exposed only on the intact receptor. *Biochemistry* 33, 8991–8997.
- Providence, K.M., Kutz, S.M., Staiano-Coico, L. und Higgins, P.J. (2000). PAI-1 gene expression is regionally induced in wounded epithelial cell monolayers and required for injury repair. *J Cell Physiol* 182, 269–280.
- Raychaudhuri, M., Schuster, T., Buchner, T., Malinowsky, K., Bronger, H., Schwarz-Boeger, U., Höfler, H. und Avril, S. (2012). Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer. *J Mol Diagn* 14, 376–384.
- Renckens, R., Roelofs, J.J.T.H., De Waard, V., Florquin, S., Lijnen, H.R., Carmeliet, P. und Van Der Poll, T. (2005). The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. *J Thromb Haemost* 3, 1018–1025.
- Rijken, D.C. (1995). Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol* 8, 291–312.
- Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010* (Berlin).
- Rømer, J., Lund, L.R., Eriksen, J., Ralfkiaer, E., Zeheb, R., Gelehrter, T.D., Danø, K. und Kristensen, P. (1991). Differential expression of urokinase-type plasminogen activator and its type-1 inhibitor during healing of mouse skin wounds. *J Invest Dermatol* 97, 803–811.
- Rømer, J., Lund, L.R., Eriksen, J., Pyke, C., Kristensen, P. und Danø, K. (1994). The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during re-epithelialization of mouse skin wounds. *J Invest Dermatol* 102, 519–522.
- Ross, J.S., Slodkowska, E.A., Symmans, W.F., Puztai, L., Ravdin, P.M. und Hortobagyi, G.N. (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 14, 320–368.

Schäfer, M. und Werner, S. (2007). Transcriptional Control of Wound Repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 69–92.

Schmitt, M., Thomssen, C., Ulm, K., Seiderer, A., Harbeck, N., Häfner, H., Jänicke, F. und Graeff, H. (1997). Time-varying prognostic impact of tumour biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer. *Br J Cancer* 76, 306–311.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. und Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.

Simon, R.M., Paik, S. und Hayes, D.F. (2009). Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 101, 1446–1452.

Simpson, A.J., Booth, N.A., Moore, N.R. und Bennett, B. (1991). Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *J Clin Pathol* 44, 139–143.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. und McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182.

Smyth, M.J., Dunn, G.P. und Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoeediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90, 1–50.

Sullivan, R., Peppercorn, J., Sikora, K., Zalberg, J., Meropol, N.J., Amir, E., Khayat, D., Boyle, P., Autier, P., Tannock, I.F., et al. (2011). Delivering affordable cancer care in high-income countries. *Lancet Oncol* 12, 933–980.

Sweep, C.G., Geurts-Moespot, J., Grebenschikov, N., de Witte, J.H., Heuvel, J.J., Schmitt, M., Duffy, M.J., Jänicke, F., Kramer, M.D., Foekens, J.A., et al. (1998). External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *Br J Cancer* 78, 1434–1441.

Thomssen, C., Harbeck, N., Dittmer, J., Abraha-Spaeth, S.R., Papendick, N., Paradiso, A., Lisboa, B., Jänicke, F., Schmitt, M. und Vetter, M. (2009). Feasibility of measuring the prognostic factors uPA and PAI-1 in core needle biopsy breast cancer specimens. *J Natl Cancer Inst* 101, 1028–1029.

Thomssen, C., Kantelhardt, E., Meisner, C., Vetter, M., Schmidt, M., Martin, P., Veyret, C., Augustin, D., Hanf, V., Paepke, et al. (2012). First planned efficacy analysis of the NNBC 3-Europe trial: Addition of docetaxel to anthracycline containing adjuvant chemotherapy in high risk node-negative breast cancer patients. *Cancer Res* 72.

Usami, S., Moriya, T., Amari, M., Suzuki, A., Ishida, T., Sasano, H. und Ohuchi, N. (2007). Reliability of prognostic factors in breast carcinoma determined by core needle biopsy. *Jpn J Clin Oncol* 37, 250–255.

Vetter, M., Kantelhardt, E., Annecke, K., Dittmer, J., Paepke, D., Prechtel, A., Schmitt, M., Jänicke, F., Minckwitz, G. v., Kiechle-Bahat, M., et al. (2007). Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 im Tumorge-

webe bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom: Von Forschungsergebnissen zur klinischen Anwendung am Beispiel der NNBC 3-Europe-Studie. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 67, 1144–1152.

Waltz, D.A., Natkin, L.R., Fujita, R.M., Wei, Y. und Chapman, H.A. (1997). Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest* 100, 58–67.

Willams et al. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. , Published Online: 24 December 1999; | doi:10.1038/sj.onc.1203286 18.

Wood, B., Junckerstorff, R., Sterrett, G., Frost, F., Harvey, J. und Robbins, P. (2007). A comparison of immunohistochemical staining for oestrogen receptor, progesterone receptor and HER-2 in breast core biopsies and subsequent excisions. *Pathology* 39, 391–395.

Wysocki, A.B., Kusakabe, A.O., Chang, S. und Tuan, T.-L. (1999). Temporal expression of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and gelatinase-B in chronic wound fluid switches from a chronic to acute wound profile with progression to healing. *Wound Repair Regen* 7, 154–165.

Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P.M., Hayes, M.M. und Gelmon, K.A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 11, 174–183.

Zanetti-Dallenbach, R., Vuaroqueaux, V., Wight, E., Labuhn, M., Singer, G., Urban, P., Eppenberger, U., Holzgreve, W. und Eppenberger-Castori, S. (2006). Comparison of gene expression profiles in core biopsies and corresponding surgical breast cancer samples. *Breast Cancer Res* 8, R51.

## 7 Thesen der Dissertation

1. uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp)- und PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1)- Konzentrationen in der präoperativen Biopsie sagen uPA- und PAI-1-Konzentrationen im korrespondierenden chirurgischen Exzidat mit hoher Übereinstimmung voraus.
2. Der uPA/PAI-1-Status wird mittels präoperativer Biopsie in hohem Maße korrekt identifiziert.
3. Der präanalytische histologische Nachweis von Karzinomzellen im Biopsiegewebe führt nicht zu höheren Übereinstimmungen zwischen uPA- und PAI-1-Konzentrationen aus Biopsie und Exzidat.
4. Klinische, pathologische und histomorphologische Faktoren haben keinen signifikanten Einfluss auf Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in präoperativer Biopsie und korrespondierendem chirurgischen Exzidat.
5. Die histologische Analyse kann im Einzelfall zur Klärung von Differenzen von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in Biopsie und Exzidat beitragen.
6. Biopsie-bedingte Alterationen können im chirurgischen Exzidat zu erhöhten PAI-1-Konzentrationen führen.
7. uPA- und PAI-1-Konzentrationen sollten im chirurgischen Exzidat aus Gewebeproben ohne makroskopisch sichtbaren Biopsiedefekt bestimmt werden.
8. uPA und PAI-1 können im Primärtumor von Mammakarzinomen heterogen exprimiert sein.
9. Die intratumorale Heterogenität sollte bei der Bestimmung von uPA und PAI-1 berücksichtigt werden. Das Zusammenführen von mindestens zwei Biopsien oder Exzidatproben zu einer Gewebeprobe wird empfohlen.

# Lebenslauf

## persönliche Daten

Name Brigitta Landstorfer, geb. Gemmeke  
Geburtsdatum 20. 04. 1983 in Bonn Bad Godesberg  
Familienstand verheiratet, ein Kind

## beruflicher Werdegang

01/2010–05/2013 Facharztausbildung in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Halle (Saale)  
09/2011 Dissertationsbeginn: „Vergleich von uPA- und PAI-1-Konzentrationen in präoperativer Biopsie und korrespondierendem chirurgischen Exzidat von Mammakarzinomen“  
06/2013 – 07/2014 Elternzeit  
seit 08/2014 Facharztausbildung in der Klinik für Geburtsmedizin am Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin

## Hochschulausbildung

2003–2009 Studium der Humanmedizin an der Otto von Guericke Universität Magdeburg  
2006–2007 Auslandsstudienjahr an der medizinischen Fakultät der Université Claude Bernard, Lyon, Frankreich  
05. 11. 2009 2. Staatsexamen

## Praktisches Jahr

08/2008–12/2008 Zentrum für Innere Medizin, Johanniter Krankenhaus Stendal  
12/2008–03/2009 Klinik für Chirurgie, Hospital Santa Barbara, Sucre, Bolivien  
04/2009–07/2009 Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Städtisches Klinikum Magdeburg

## Schulbildung

29. 06. 2002 Abitur an der Friedenschule, bischöfliche Gesamtschule, Münster  
08/1999–08/2000 Auslandsschuljahr an der Manasquan Highschool, New Jersey, USA

## besondere Aktivitäten

2002–2003 freiwilliges soziales Jahr im Comedor Popular Infantil (Kinderheim und Volksküche) in Sopachuy, Bolivien

Berlin, den 19.01.2016

## **Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09). Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 19.01.2016



## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Thomssen für die Vergabe des Themas und die sehr gute fachliche Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Martina Vetter aus dem Forschungslabor der Universitätsklinik für Gynäkologie. Ich bedanke mich für die intensive fachliche und kollegiale Betreuung während der gesamten Zeit der Erstellung der Arbeit. Frau Dr. Vetter stand mir stets mit Ideen und konstruktiver Kritik zur Seite und hat mich in allen Phasen der Dissertation motiviert die Arbeit voranzubringen.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Forschungslabors der Universitätsklinik für Gynäkologie. Insbesondere Kathrin Stückrath und Sandy Kaufhold danke ich für die Hilfsbereitschaft mich in die Methodik einzuarbeiten und die vielen Stunden, die sie in das Gelingen der Studie investiert haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. Holzhausen und Herrn PD Dr. med. habil. Buchmann für die Kooperation und intensive Unterstützung bei der Mikroskopie einzelner Fälle des Studienkollektivs.

Ich danke Frau Dr. Unverzagt vom Institut für medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die ausführliche und verständliche statistische Beratung.

Ich danke Herrn CA Dr. med. Lantzsch für die Ermöglichung der Promotion während meiner Tätigkeit als Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe am Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara Halle (Saale).

Meiner kleinen Familie, insbesondere meinem Mann, bin ich außerordentlich dankbar für die grenzenlose Unterstützung, den Zuspruch und die Motivation, die ich während des gesamten Prozesses der Dissertation und darüber hinaus erfahren habe und erfahre.