

Frauenklinik, Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität München
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M.B. Marion Kiechle-Bahat)

Vom Primärtumor zur Metastase:
uPA (Urokinasetyp-Plasminogenaktivator) und PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1)
Gehalt im primären Mammakarzinomgewebe und korrespondierenden axillären Lymphknoten

Celik Kamer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. N. Harbeck
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt

Die Dissertation wurde am 12.04.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 18.07.2007 angenommen.

Meinen Eltern
und meiner
Tante Ceker

INHALTSVERZEICHNIS

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	2
2.1	Das Mammakarzinom.....	2
2.2	Klassische Prognosefaktoren und Therapiemöglichkeiten.....	3
2.3	Neue tumorbiologische Prognosefaktoren.....	6
2.3.1	Das Plasminogenaktivatorsystem.....	6
2.3.1.1	Urokinasetyp-Plasminogenaktivator (uPA).....	7
2.3.1.2	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1).....	8
2.3.2	Prognostische Bedeutung von uPA und PAI-1.....	9
2.3.2.1	Mammakarzinom.....	9
2.3.2.2	Andere maligne solide Tumoren.....	10
3	Zielsetzung	12
4	Material und Methoden	13
4.1	Patientengut.....	13
4.1.1	Patientenkollektiv.....	13
4.1.2	Subgruppen: Patientinnen mit befundeten, befallenen axillären Lymphknoten und Patientinnen mit befundeten, tumorfreien axillären Lymphknoten.....	15
4.2	Untersuchungsmaterial und Auswahlprinzipien.....	17
4.3	Bestimmung von uPA und PAI-1 durch ELISA.....	19
4.4	Datenerfassung und statistische Auswertung.....	19
5	Ergebnisse	20
5.1	PAI-1 Konzentrationen im Tumorgewebe und im Lymphknoten.....	20
5.1.1	Primärtumor.....	20
5.1.2	Lymphknoten.....	21
5.1.3	Vergleich zwischen Primärtumor und Lymphknoten.....	21

5.2 UPA Konzentrationen im Tumorgewebe und im Lymphknoten.....	24
5.2.1 Primärtumor.....	24
5.2.2 Lymphknoten.....	25
5.2.3 Vergleich zwischen Primärtumoren und Lymphknoten.....	25
5.3 Krankheitsverlauf.....	28
5.3.1 Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus.....	29
5.3.2 Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von den PAI-1 Konzentrationen.....	30
5.3.2.1 Primärtumor.....	30
5.3.2.2 Lymphknoten.....	31
5.3.2.3 Vergleich zwischen Primärtumoren und Lymphknoten.....	33
5.3.3 Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom uPA im Primärtumor.....	34
6 Diskussion.....	36
6.1 Vergleich der PAI-1 und uPA-Konzentrationen von Primärtumoren mit ihrem korrespondierenden befallenen sowie unbefallenen Lymphknoten.....	37
6.2 UPA und PAI-1 als Prognosefaktoren für rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit	40
6.3 Therapieansätze.....	43
7 Zusammenfassung.....	46
8 Literaturverzeichnis.....	48
9 Danksagung.....	58
10 Lebenslauf.....	59

1 Abkürzungsverzeichnis

DFS	Rezidivfreies Überleben
ELISA	Enzyme-linked-immunsorbent-assay
HWM-uPA	„high-molecular-weight“ Urokinasetyp-Plasminogenaktivator
kDa	Kilodalton
LK-	untersuchter unbefallener Lymphknoten
LK+	untersuchter mit Tumorzellen befallener Lymphknoten
LMW-uPA	„low-molecular-weight“ Urokinasetyp-Plasminogenaktivator
No	Lymphknotenstatus unbefallen
N+	Status der mit Tumorzellen befallenen Lymphknoten
OS	Gesamtüberleben
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ-1
PAI-2	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ-2
tPA	Gewebetyp-Plasminogenaktivator
uPA	Urokinasetyp-Plasminogenaktivator
uPA-R	Urokinasetyp-Plasminogenaktivator Rezeptor

2 Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in den westlichen Industrieländern die häufigste bösartige Erkrankung der Frau und manifestiert sich meist in der 5.-6. Lebensdekade. Etwa jede 10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Beim Mann ist das Mammakarzinom sehr selten. In der Bundesrepublik Deutschland treten mehr als 40000 Neuerkrankungen jährlich auf, wobei die Inzidenz wie in den meisten westlichen Industrieländern weiter ansteigt.

Die Fähigkeit der Tumorzellen zur Invasion benachbarten Gewebes sowie die frühe lymphogene und hämatogene Disseminierung stellen ungelöste Probleme bei der Therapie des Mammakarzinoms dar. Bedingt durch die sehr frühe Metastasierung haben viele Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits okkulte Fernmetastasen. So erleiden 30% der Patientinnen ohne axillären Lymphknotenbefall bei der Primäroperation dennoch ein Rezidiv innerhalb der ersten 10 Jahre nach Primärtherapie (Clark & McGuire, 1988). Bei den nodalpositiven Patientinnen erkranken etwa 75% an einem Rezidiv. Trotz neuer Therapiestrategien sterben zur Zeit etwa 45% aller Mammakarzinompatientinnen an ihrer Erkrankung.

Nach der WHO-Klassifikation 2003 unterscheidet man histologisch zwischen nicht invasiven Mammakarzinomen, zu denen das intraduktale Karzinom und das Carcinoma lobulare in situ zählen, und das invasive Mammakarzinom. Bei den invasiven Karzinomen ist das invasive duktales Karzinom mit 65-80% der am häufigsten auftretende Typ gefolgt vom invasiv lobulärem Karzinom und selteneren Typen wie tubulären, muzinösen und papillären und anderen invasiven Karzinomen. Malignität und Metastasierungsmuster der einzelnen histologischen Subtypen sind unterschiedlich (Ellis et al. 1992).

In den letzten Jahren wurde im klinischen Alltag deutlich, dass vermehrt Mammakarzinompatientinnen in frühen, d.h. potentiell heilbaren, Stadien der Erkrankung zur Primärtherapie kommen. Bei vielen Patientinnen ist zum Zeitpunkt der Primärtherapie die Tumorerkrankung klinisch und apparativ auf die Brust begrenzt. Die Unterscheidung der Patientinnen in hohes und niedriges Rezidivrisiko fällt hier mit Hilfe der etablierten klassischen Prognosefaktoren besonders schwer. Neue tumorbiologische Faktoren aus dem mit Krebs befallenen Gewebe, die eine wichtige Rolle in der Invasion, Proliferation und Metastasierung des Primärtumors spielen, können eine genauere Aussage bezüglich der Rezidivfreiheit bzw. des Gesamtüberlebens machen. Diese neuen tumorbiologischen

Prognosefaktoren, zu denen auch die Faktoren des Plasminogenaktivatorsystems wie der Urokinasetyp-Plasminogenaktivator (uPA) und der Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) zählen, können eine genauere Zuordnung der Mammakarzinompatientinnen in eine Hoch- oder Niedrigrisikogruppe ermöglichen und eine risikoadaptierte Selektion von Patientinnen für eine adjuvante systemische Behandlung ermöglichen.

2.2 Klassische Prognosefaktoren und Therapiemöglichkeiten

Im letzten Jahrzehnt haben neue Erkenntnisse über das Mammakarzinom die Therapieformen modifiziert. Heutzutage gilt, dass es beim Mammakarzinom einen lymphogenen und einen hämatogenen Metastasierungsweg gibt. Bei der lymphogenen Ausbreitung gelangen Tumorzellen zunächst vor allem in die regionalen Lymphknotenstationen. Die hämatogene Streuung in den Blutkreislauf kann direkt durch Eindringen der Tumorzellen in Blutgefäße und dadurch in andere Organe (z.B. Knochen, Lunge) erfolgen. Die Disseminierung kann beim Mammakarzinom sehr frühzeitig geschehen. Bereits zum Zeitpunkt der Primärtherapie können bei etwa 35% der Patientinnen im Stadium M0 durch immunhistochemische Färbetechniken Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden (Diaz-Cano et al. 2000).

Die Tatsache, dass es sich beim Mammakarzinom um eine potentiell systemische Erkrankung handelt und nicht, wie ursprünglich angenommen, um einen sich überwiegend lokal ausbreitenden Prozeß, führte zunehmend zur Reduzierung der radikalen operativen Eingriffe. Neben der modifizierten Radikaloperation (mit oder ohne Wiederaufbau der Mamma) wird immer häufiger brusterhaltend operiert. Quadrantenresektion, Segmentresektion oder auch nur die Entfernung des Tumors im Gesunden setzen aber voraus, dass die Lymphknoten in der Axilla entfernt und histologisch auf Tumorbefall hin untersucht werden. Nach brusterhaltenden Operationen sollte eine Strahlentherapie des Restdrüsenkörpers durchgeführt werden, um die eventuell verbliebenen Tumorzellen zu vernichten. Neben Operation und Strahlentherapie wird aufgrund der potenziell frühzeitigen systemischen Ausbreitung des Mammakarzinoms eine adjuvante systemische Therapie durchgeführt. Durch diese Behandlung werden im Körper möglicherweise apparativ noch nicht nachweisbare Tumorzellen getötet. In der Metaanalyse der Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (1998) wurden die Erfolge der adjuvanten Chemo- und Hormontherapien hinsichtlich verbesserter Heilungswahrscheinlichkeit nachgewiesen.

Für die Auswahl der adjuvanten systemischen Therapiemaßnahmen werden in der Klinik obligat bei allen Mammakarzinompatientinnen klassische Prognosefaktoren bestimmt. Diese klassischen Prognosefaktoren (Tabelle 1) erlauben eine Einschätzung des individuellen Risikos bezüglich des Auftretens von Rezidiv und Metastase.

Der Lymphknotenstatus stellt zur Zeit den stärksten prognostischen Faktor für Rezidiv und Überleben bei Mammakarzinompatientinnen dar. Die Anzahl der befallenen axillären Lymphknoten korreliert mit dem Risiko, ein Rezidiv zu erleiden bzw. an der Erkrankung zu sterben.

Klassische Prognosefaktoren
TNM- Status:
T: Tumorgröße
N: axillärer Lymphknotenbefall
M: Fernmetastasen
Histomorphologie:
Nuclear Grading (Scarff-Bloom-Richardson)
histologischer Typ
vaskuläre Invasion
Steroidhormonrezeptorstatus für
Östrogenrezeptor
Progesteronrezeptor

Tabelle 1: Klassische Prognosefaktoren (nach Tumormanual, Tumorzentrum München 2005).

Die Größe des Primärtumors hat bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall eine wichtige prognostische Aussagekraft. Bei nodal-positiven Patientinnen wird die prognostische Aussagekraft der Tumorgröße vom Lymphknotenbefall überdeckt.

Der histologische Typ und die morphologischen Kriterien haben auch eine gewisse prognostische Bedeutung. So sind duktales invasives Karzinom in der Regel schlechtere Prognosen und eine höhere Inzidenz positiver axillärer Lymphknoten eigen als den weniger häufigen histologischen Typen. Zu den etablierten Prognosefaktoren gehören auch die Steroidhormonrezeptoren wie Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor. Ihre Bedeutung liegt jedoch mehr bei der eines prädiktiven Faktors, der das Ansprechen auf die endokrine Therapie vorhersagt.

Auf den klassischen Prognosefaktoren basierende standardisierte Therapiekonzepte werden jedoch der Heterogenität des Mammakarzinoms nicht gerecht. Vor allem bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall wird das deutlich:

Im Jahre 1990 empfahl das National Cancer Institute in den USA eine adjuvante Chemotherapie bei allen Patientinnen ohne Lymphknotenbefall. Auch die Metaanalyse der Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group hat 1992 den Nutzen einer adjuvanten systemischen Therapie nachgewiesen. Die Analyse zeigte, dass durch eine adjuvante Therapie das relative Rezidivrisiko unabhängig vom Lymphknotenbefall durch eine Chemotherapie um ca. 28% und durch eine Tamoxifen-Therapie um ca. 25% reduziert wird. Deshalb wurde empfohlen, allen Mammakarzinompatientinnen eine adjuvante systemische Therapie zukommen zu lassen. Geht man jedoch davon aus, dass etwa 70% der Mammakarzinompatientinnen ohne Lymphknotenbefall allein durch die operative Entfernung des Primärtumors (und ggf. Nachbestrahlung) geheilt sind und keine Rezidive und/oder Metastasen erleiden werden, profitieren nach 10 Jahren absolut nur 8,6% der Patientinnen ohne Lymphknotenbefall von einer standardisierten adjuvanten Therapie, während 24,4% der Patientinnen erfolglos und 67% unnötig mit potentiellen Nebenwirkungen behafteten Therapien ausgesetzt wurden (Tumormanual, Tumorzentrum München 1998/2005). Auch in dem in St. Gallen 2003 formulierten Konsensus bleibt eine Therapieempfehlung für Patientinnen ohne Lymphknotenbefall mit einem Steroidhormonrezeptorpositiven Tumor zwischen 1 und 2 cm Größe sowie Tumoren kleiner als 1 cm weiter unschlussig (Goldhirsch et al. 2003).

Um die Effizienz der Therapiemaßnahmen zu erhöhen und überflüssige, teure und nebenwirkungsreiche adjuvante Therapien zu vermeiden, erscheint eine individuelle, auf die Tumorbiologie Rücksicht nehmende, Therapieplanung sehr wichtig. Hierzu werden weitere Entscheidungshilfen für die klinische Behandlung benötigt, die Auskunft über das individuelle Rezidivrisiko geben. Eine bessere Abschätzung des individuellen Risikos erhofft man sich, neben den klassischen Prognosefaktoren, vor allem von neuen tumorbiologisch begründeten Prognosefaktoren.

2.3 Neue tumorbiologische Prognosefaktoren

Mit Hilfe neuer Prognosefaktoren wird versucht, eine noch genauere Zuordnung der Mammakarzinompatientinnen in Hoch- oder Niedrigrisikogruppen bezüglich der Rezidivfreiheit bzw. des Gesamtüberlebens zu ermöglichen. Diese neueren Prognosefaktoren berücksichtigen tumorbiologische Eigenschaften wie die Proliferation, Invasion und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen. Zur Zeit werden weit über 100 Faktoren diskutiert. Die Faktoren müssen bestimmte Kriterien erfüllen, bevor sie als neue Prognoseparameter anerkannt werden (Tumormanual 2005, Tumorzentrum München). Einige dieser neuen Prognosefaktoren sind in Tabelle 2 aufgelistet. Mit diesen Faktoren wird versucht, eine genauere Aussage über den Krankheitsverlauf der Mammakarzinompatientinnen zu geben und eine individuelle Therapie zu ermöglichen, die der Aggressivität des Tumors angepasst ist. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt bei den zur Zeit wichtigen tumorassoziierten Proteasen uPA und PAI-1, die eine entscheidende Funktion bei der Invasion und Metastasierung haben (Andreasen et al. 1997; Schmitt et al. 1997; Harbeck et al. 2001, Meo et al. 2004).

Neue Prognosefaktoren
Tumorassoziierte Proteolysefaktoren
Urokinasetyp Plasminogenaktivator
Urokinasetyp Plasminogenaktivatorinhibitor Typ-1
Immunzytochemischer Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark
HER neu-Status

Tabelle 2: Neue Prognosefaktoren (nach Tumormanual, Tumorzentrum München 2005).

2.3.1 Das Plasminogenaktivatorsystem

Das Plasminogenaktivatorsystem besteht unter anderem aus Plasminogen bzw. Plasmin, dem Urokinasetyp-Plasminogenaktivator (uPA), Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAI-1, PAI-2) und dem Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPA-R). Es spielt bei vielen physiologischen

Prozessen wie der Fibrinolyse, Wundheilung (Gross et al. 1983) und Spermatogenese (Vihko et al. 1987) eine wichtige Rolle. Zusätzlich haben die Faktoren der tumorassoziierten Proteolyse (uPA und PAI-1) eine wichtige Funktion bei Invasion und Metastasierung der Tumorzellen (Andreasen et al. 1997, Schmitt et al. 2004).

2.3.1.1 Urokinasetyp-Plasminogenaktivator (uPA)

Um Ausbreitung und Metastasierung zu ermöglichen, besitzen Tumorzellen die Fähigkeit, die umgebende extrazelluläre Matrix abzubauen und die Basalmembran zu durchbrechen. Hierbei spielen Proteasen, die sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von gesunden Zellen gebildet werden, eine wichtige Rolle. Unter den Proteasen findet vor allem der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp große Beachtung.

Es existieren zwei verschiedene Typen von Plasminogenaktivatoren: der Urokinasetyp (uPA) und der Gewebetyp (tPA). Beide haben die Fähigkeit, inaktives Plasminogen in aktives Plasmin umzuwandeln. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass der Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA) hauptsächlich in der Gerinnung eine wichtige Rolle spielt, während der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) bei Abbauvorgängen der extrazellulären Matrix involviert ist (Andreasen PA et al. 1997).

UPA ist eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 55 kDa und wird von verschiedenen gesunden Zellen und Tumorzellen als einkettiges Proenzym (pro-uPA) mit geringer oder fehlender intrinsischer Enzymaktivität synthetisiert. (Pro-)uPA setzt sich aus drei Domänen zusammen: einer aminoterminalen wachstumsfaktorähnlichen Domäne, der sog. „kringle“-Domäne und der Serinproteaseregion mit dem aktiven Zentrum. Die Spaltung von pro-uPA in das aktive zweikettige „high-molecular-weight“ HMW-uPA erfolgt durch Plasmin (Danö et al. 1985), Kallikrein, Gerinnungsfaktor XIIa (Ichinose et al. 1986), Cathepsin B (Kobayashi et al. 1991) und Cathepsin L (Goretzki et al. 1992). Diese Spaltung findet an der aminoterminalen wachstumsfaktorähnlichen Domäne statt (Schmitt et al. 1997). Das aktive HMW-uPA kann rezeptorgebunden am Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPA-R) oder in freier Form Plasminogen in Plasmin umwandeln. Plasmin ist eine Protease mit breitem Wirkungsspektrum. Es kann u.a. Fibrin und Komponenten der Extrazellulärenmatrix und der Basalmembran abbauen (Mignatti und Rifkin 1993). Durch die Bindung von HMW-uPA an den uPA-Rezeptor an der Zelloberfläche wird die Effektivität der Plasminogenaktivierung erhöht (Ellis V et al. 1989) und eine Konzentrierung der proteolytischen Aktivität erreicht. Außerdem kann an der Zelloberfläche gebundenes Plasmin

durch seine natürlichen Inhibitoren α 2-Antiplasmin und α 2-Makroglobin nicht gehemmt werden (Ellis V et al. 1992). So findet der Abbau der Extrazellulärmatrix an der Tumorzelloberfläche verstärkt statt und dies verleiht der Tumorzelle die Fähigkeit zur Invasion, zum Durchbruch der Basalmembran und letztendlich zum Einbruch in die Gefäße. HMW-uPA kann u.a. durch Plasmin in das sog. „low-molecular-weight“ (LMW)-uPA abgebaut werden. Hierbei wird die aminoternale wachstumsfaktorähnliche Domäne freigesetzt und die Bindung an den uPA-Rezeptor unmöglich (Andreasen et al. 1997).

2.3.1.2 Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

Der zu den Serinproteasen gehörende Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. PAI-1 wird von Thrombozyten, Endothelzellen, Granulozyten und Tumorzellen gebildet (Schmitt et al. 1997) und kann im Plasma nachgewiesen werden. Durch die Bildung eines stabilen 1:1-stöchiometrischen Komplexes mit uPA inhibiert PAI-1 uPA und verhindert den Abbau der Extrazellulärmatrix (Shirasuna et al. 1993). Ferner spielt der PAI-1 bei Signaltransduktion, Zelladhäsion und Zellmigration (Andreasen et al. 1997) eine wichtige Rolle.

Der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 inaktiviert neben u-PA auch t-PA. Er inhibiert die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Die labile aktive Form von PAI-1 wird durch die Bindung an das extrazelluläre Matrix- und Adhäsionsprotein Vitronektin stabilisiert (Andreasen et al. 1997). Ferner blockiert PAI-1 die Bindung von Vitronektin, einem Bestandteil der Extrazellulärmatrix, an Zelloberflächenintegrine und an uPA-R. Dadurch wird die Adhäsion der Zelle an Vitronektin erschwert (Stefansson et al. 1996; Wei et al. 1996). Die Bindung von PAI-1 an uPA am zelloberflächengebundenen uPA-R führt zur Internalisierung des uPAR/uPA/PAI-1 Komplexes, wodurch Signaltransduktionsmechanismen und Zellproliferation ausgelöst werden (Cubellis et al. 1990). Der uPA-Rezeptor gelangt nach der Internalisierung wieder auf die Zelloberfläche und kann seine Aktivität dort fortsetzen (Andreasen et al. 1997). Das Zusammenspiel von uPA, uPA-R und PAI-1 ermöglicht einerseits durch Anheftung und Loslösung der Zelle von der Extrazellulärmatrix die Migration und andererseits durch Proteolyse der Extrazellulärmatrix die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen (Schmitt et al. 1997).

2.3.2 Prognostische Bedeutung von uPA und PAI-1

2.3.2.1 Mammakarzinom

1988 konnten Duffy et al. anhand von Aktivitätsmessungen zeigen, dass eine erhöhte Aktivität von uPA im Primärtumorgewebe mit einer ungünstigen Prognose bei Patientinnen mit Mammakarzinom korreliert. Jänicke et al. berichteten 1989, dass Patientinnen mit einem erhöhten uPA-Antigengehalt im Primärtumor eine signifikant kürzere rezidivfreie Überlebenszeit hatten als Patientinnen mit niedrigem uPA-Gehalt. Dies wurde sowohl durch in den folgenden Jahren durchgeführte Studien anderer Arbeitsgruppen (Duffy et al. 1990; Grøndahl-Hansen et al. 1993; Foekens et al. 1994; Fernö et al. 1996) als auch durch neuere Daten bestätigt (Cufer et al. 2003; Harbeck et al. 2004). Es wurde ebenfalls für PAI-1 eine signifikante prognostische Bedeutung beim nodalpositiven und nodalnegativen Mammakarzinom festgestellt (Jänicke et al. 1991; Jänicke et al. 1993). Zahlreiche Studien validierten auch diesen Zusammenhang (Grøndahl-Hansen et al. 1993; Foekens et al. 1994; Harbeck et al. 1999, Harbeck et al. 2000).

Zusätzlich konnte durch die Kombination von uPA und PAI-1 („uPA/PAI-1“) mit der Einteilung in „uPA und PAI-1 niedrig“ versus „uPA und bzw. oder PAI-1 hoch“ eine stärkere Differenzierung des Rezidivrisikos erreicht werden. Es wurde auch gezeigt, dass uPA und PAI-1 stärkere Prognosefaktoren sind als andere tumorbiologische Faktoren wie z.B. HER2, S-Phase, MIB 1, oder p53 (Harbeck et al. 1999). Weiterhin ermöglichte die Bestimmung von uPA/PAI-1 eine Einteilung in klinisch relevante Subgruppen, wie z.B. bei nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen in solche mit hohem und solche mit niedrigem Rezidivrisiko (Harbeck et al. 2001; Meo et al. 2004).

uPA und PAI-1 erreichten das höchste Level of Evidence (LOE I) und erfüllten alle Kriterien zur Evaluierung prognostischer Faktoren (Tumormanual München, 2005). Eine Metaanalyse bestätigte, dass hohe Konzentrationen von uPA und PAI-1 im primären Mammakarzinom mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko und einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen (Look et al. 2002). Jänicke et al. (2001) zeigten, dass nodalnegative Mammakarzinompatientinnen mit niedrigem uPA und PAI-1 im Primärtumor eine sehr gute Prognose haben. Eine adjuvante Chemotherapie erscheint bei diesen Patientinnen nicht erforderlich.

Beim Vergleich der PAI-1 Konzentrationen zwischen Metastasengewebe und Primärtumorgewebe wurden höhere PAI-1 Konzentrationen in den Metastasen als im Primärtumor gefunden (Jänicke et al. 1990). Auch Mayerhofer et al. fanden statistisch

signifikant höhere PAI-1 Konzentrationen in den Metastasen (20 Haut-, 13 Lymphknotenmetastasen) im Vergleich zu den Primärtumoren. Mittels in situ-Hybridisierung wurde die PAI-1 m-RNA im Mammakarzinomgewebe mit der PAI-1 m-RNA in Knochenmetastasen verglichen. Dabei war die Ausprägung in den Knochenmetastasen mäßig bis niedriger (Fischer et al. 2000).

Ebenso wurden uPA im Primärtumor mit uPA in den Metastasen gegenübergestellt. Jänicke et al. (1990) fanden keine unterschiedlichen uPA-Werte in beiden Lokalisationen. Bei Mammakarzinompatientinnen mit immunzytologisch nachweisbarer uPA-Expression im Knochenmark wurde ein signifikant kürzeres metastasenfreies Intervall und eine kürzere Überlebenszeit beobachtet als bei Mammakarzinompatientinnen mit uPA-negativem Knochenmark (Solomayer et al. 1997).

2.3.2.2 Andere maligne solide Tumoren

Lange vor den Erkenntnissen über die bedeutende Rolle von uPA und PAI-1 beim Mammakarzinom stellten Astedt und Holmberg (1976) zum ersten Mal hohe uPA-Konzentrationen in kultivierten Ovarialkarzinomgeweben fest.

Nachfolgende Studien zeigten, dass die uPA-Konzentrationen in malignen Tumoren signifikant höher waren als im korrespondierenden normalen Gewebe oder in benignen Tumoren vom gleichen Gewebetyp (Duffy et al. 1993 und 1996).

In den letzten 10-20 Jahren wurden hohe uPA-Werte im Tumorgewebe von Lungen- (Oka et al. 1991), Blasen- (Hasui et al. 1992), Intestinal- (Nekarda et al. 1994; Mulcahy et al. 1992; Ganesh et al. 1994), Zervix- (Kobayashi et al. 1994), Nieren- (Hoffmann et al. 1996) und Gehirntumoren (Bindahl et al. 1994) festgestellt und uPA bei vielen dieser Karzinome als Prognosefaktor angesehen.

Dieser Zusammenhang konnte auch für PAI-1 nachgewiesen werden. So korrelieren hohe PAI-1 Werte im Magenkarzinomgewebe mit kürzeren Überlebenszeiten (Nekarda et al. 1994). Ebenso zeigte sich PAI-1 im Adenokarzinomgewebe der Lunge als unabhängiger Prognosefaktor für ein Rezidiv (Petersen et al. 1994). Auch bei Patientinnen mit hohen PAI-1 Werten im fortgeschrittenen Ovarialkarzinomgewebe konnte eine kürzere Überlebenszeit festgestellt werden (Kuhn et al. 1994).

Es folgten weitere Studien, die uPA/PAI-1 Messungen im Primärtumor mit den uPA/PAI-1 Werten in korrespondierenden Metastasen verglichen. Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurden in den Metastasen signifikant höhere uPA und PAI-1 Konzentrationen gemessen als

im Primärtumor selbst (Schmalfeld et al. 1995). Auch in Lebermetastasen von Patient/-innen mit Colorektalkarzinom wurden signifikant höhere PAI-1 Konzentrationen gemessen als im Primärtumor; im Gegensatz dazu war die uPA-Konzentration und die uPA-Aktivität in den Lebermetastasen niedriger (Sier et al. 1994). Die Messungen der uPA-Aktivität in Knochenmetastasen und in Primärtumoren bei Patienten mit Prostatakarzinom ergab eine signifikant höhere uPA-Aktivität im Metastasengewebe im Vergleich zum Primärtumor (Kirchheimer et al. 1985). Beim Vergleich zwischen uPA-positiven Tumorzellen im Metastasengewebe (befallene Lymphknoten) mit denen im primären Adenokarzinom der Lunge wurden im Metastasengewebe vermehrt uPA-positive Tumorzellen gefunden (Takeshi et al. 1991).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigen die Komplexität des Themas. Die verschiedenen Primärtumoren mit ihren unterschiedlichen Metastasierungsarten und das komplexe Zusammenwirken des Plasminogenaktivatorsystems erschweren klinische Studien hinsichtlich der Rolle von uPA/PAI-1 bei Invasion und Metastasierung.

3 Zielsetzung

Mehrere Arbeitsgruppen konnten uPA und PAI-1 im Primärtumor von Mammakarzinompatientinnen als signifikanten Prognosefaktor für die rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit ermitteln (Jänicke et al. 1989; 1991; 1993; Duffy et al. 1990; Grøndahl-Hansen et al. 1993, Foekens et al. 1994; Fernö et al. 1996; Cufier et al. 2003). Jedoch sind uPA und PAI-1 nicht nur im Primärtumor von entscheidender Bedeutung, sondern spielen auch bei der Metastasierung eine wichtige Rolle. So wurden uPA und PAI-1 in Knochenmetastasen vom Mammakarzinom und in Metastasen anderer maligner Tumoren wie Colonkarzinom, Lungenkarzinom, Prostatakarzinom und Ovarialkarzinom analysiert und mit dem Primärtumor verglichen (Kirchenheimer et al. 1985; Takeshi et al. 1991; Solomayer et al. 1997; Fischer et al. 2000; Cornelis et al. 1994; Schmalfeldt et al. 1995).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, bei 73 an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen, uPA und PAI-1 Konzentrationen sowohl im Primärtumor als auch in einem korrespondierenden, histologisch begutachteten befallenen bzw. unbefallenen axillären Lymphknoten zu bestimmen. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines **Enzyme-linked-immunsorbent-assay** (ELISA).

Zielsetzung der Arbeit ist es, Aussagen bezüglich folgender Fragestellungen machen zu können:

1. Unterscheiden sich die uPA und PAI-1 Konzentrationen im Mammakarzinomprimärtumor und in befallenen bzw. unbefallenen axillären Lymphknoten als Model für Primärtumor und Metastase?
2. Haben die uPA und PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor und im befallenen bzw. unbefallenen Lymphknoten eine prognostische Bedeutung hinsichtlich rezidivfreier und Gesamtüberlebenszeit?
3. Ergeben sich aus den Daten Rückschlüsse auf die tumorbiologische Bedeutung von uPA und PAI-1 bei der Metastasierung?

4 Material und Methode

4.1 Patientengut

4.1.1 Patientenkollektiv

73 Patientinnen unterzogen sich ihrer Primärtherapie bei Mammakarzinom in den Jahren 1991-1998 an der Frauenklinik der Technischen Universität München (Direktorin: Prof. Dr. med. M. Kiechle). Bei allen Patientinnen wurden etablierte klassische und histomorphologische Prognosefaktoren (Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Steroidhormonrezeptorstatus, Grading, Menopausenstatus) sowie die tumorassoziierten Proteasefaktoren uPA und PAI-1 im Primärtumorgewebe und in einem axillären Lymphknoten bestimmt. Die klinischen Daten der Patientinnen zeigt die Tabelle 3.

Das mediane Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Primärtherapie betrug 59,8 Jahre (35,2-89,4 Jahre). Je nach Tumorgröße und Histologie wurde bei den Patientinnen eine modifizierte radikale Mastektomie durchgeführt oder brusterhaltend operiert. Nach einer vorhergehenden Lymphonodektomie erfolgte anschließend ggf. eine Strahlentherapie. Bei axillärem Lymphknotenbefall wurde nach den jeweils gültigen Leitlinien je nach Menopausen- und Hormonrezeptorstatus eine systemische adjuvante Therapie eingeleitet. Insgesamt erhielten 35 Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie. 31 Patientinnen bekamen eine adjuvante Hormontherapie mit Tamoxifen.

Die Östrogen- und Progesteronrezeptoren wurden immunhistochemisch bestimmt und nach dem Remmele Score (0-12 Scorepunkte) ausgewertet. Jede spezifische Anfärbung wurde als positiv betrachtet. Falls mindestens einer der beiden Hormonrezeptoren positiv war, wurde der Steroidhormonrezeptorstatus als positiv gewertet. Bei zwei Patientinnen fehlten die Angaben über den Rezeptorstatus.

Zum Zeitpunkt der Primärtherapie litten 3 Patientinnen an Fernmetastasen und 42 Patientinnen hatten mindestens einen befallenen Lymphknoten. Die Patientinnen wurden im Rahmen der Tumornachsorgesprechstunde zunächst alle 3 Monate, nach zwei Jahren alle 6 Monate und nach 5 Jahren jährlich klinisch, laborchemisch und apparativ nachuntersucht. Einige Patientinnen wurden beim eigenen Frauenarzt weiter betreut. Bei diesen Patientinnen wurden telefonisch die Nachsorgeuntersuchungsergebnisse erfragt. So wurden alle Patientinnen bis ins Jahr 2000 nachbeobachtet. Während dieser Zeit erlitten 22 Patientinnen ein Rezidiv. 13 Patientinnen verstarben im Beobachtungszeitraum an ihrer Erkrankung.

Patientinnen (n=73)		
Alter	median	59,1
	Mittelwert	59,9
Menopausenstatus	prämenopausal	19
	postmenopausal	52
	perimenopausal	2
histologischer Typ	duktal-invasiv	52
	lobulär-invasiv	14
	andere Histologie	7
Tumorgroße (cm)	<2	22
	≥2 und <5	42
	≥5	7
	ohne Angabe	2
Lymphknotenstaus	N0	31
	N1	34
	N2	8
befundeter Lymphknoten, befallen		34
befundeter Lymphknoten, nicht befallen		39
Östrogenrezeptorstatus	positiv	57
	negativ	14
	ohne Angabe	2
Progesteronrezeptorstatus	positiv	45
	negativ	26
	ohne Angabe	2
Nuclear Grading (Bloom-Richardson)	G I	2
	G II	30
	G III	38
	G IV	1
	ohne Angabe	2
Metastasenhäufigkeit bei Primärdiagnose	vorhanden	3
	ohne Angabe	2
Rezidivhäufigkeit	vorhanden	22
Anzahl verstorbener Patientinnen		13

*Tabelle 3:
Zusammenfassung der histologischen und klinischen Daten der 73 Mammakarzinom-Patientinnen.*

4.1.2 Subgruppen: Patientinnen mit befundeten, befallenen axillären Lymphknoten und Patientinnen mit befundeten, tumorfreien axillären Lymphknoten

Für die weitere Auswertung wurde das Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom Befall des im Rahmen dieser Arbeit befundeten Lymphknotenstatus in zwei Subgruppen unterteilt. Die erste Untergruppe bestand aus 39 Patientinnen, bei denen der befundete axilläre Lymphknoten unbefallen war. Die zweite Untergruppe beinhaltete 34 Patientinnen, bei welchen der befundete axilläre Lymphknoten einen Tumorbefall aufwies. Die Einteilung in die Subgruppen erfolgte somit anhand des Befallzustandes des befundeten Lymphknotens, unabhängig davon, ob andere Lymphknoten befallen waren, und unabhängig vom TNM Status der Patientin. So waren bei acht Patientinnen mit befundeten tumorfreien Lymphknoten andere Lymphknoten befallen.

Tabelle 4 gibt die klinischen Daten für Patientinnen mit befundeten tumorfreien axillären Lymphknoten und für Patientinnen mit befundeten tumorzellpositiven axillären Lymphknoten wieder.

Die Altersverteilung war in beiden Gruppen ähnlich. Patientinnen mit untersuchten befallenen axillären Lymphknoten wiesen einen deutlich größeren Primärtumor und vermehrten Lymphknotenbefall auf. Die Therapie war bei diesen Patientinnen intensiver. Während 24 von 34 Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten eine Chemotherapie erhielten, wurden nur 11 von 39 Patientinnen mit untersuchten unbefallenen axillären Lymphknoten mit Chemotherapie behandelt. Entsprechend ihrer erhöhten Risiken war die Rezidiv- und Sterberate bei Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten höher.

Patientinnen mit befundenen tumorzellfreien Lymphknoten (n=39)			Patientinnen mit befundenen tumorzellpositiven Lymphknoten (n=34)	
Alter	Mittelwert	58,3	61,7	
	Median	59,1	59,3	
histologischer Typ	duktal-invasiv	24	28	
	lobulär-invasiv	9	5	
	andere	6	1	
TNM-Status	T1	16	3	
	T2	21	18	
	T3	2	5	
	T4	0	8	
N0		31	0	
	N1	8	26	
	N2	0	8	
M0		38	30	
	M1	1	2	
	ohne Angabe	0	2	
Nuclear Grading	G I	2	0	
	G II	18	12	
	G III	17	21	
	G IV	0	1	
	ohne Angabe	2	0	
Therapie	Chemotherapie erhielten	11	24	
	Radiatio erhielten	20	22	
	Hormontherapie erhielten	11	20	
	Chemotherapie und Hormontherapie erhielten	18	10	
	keine Therapie erhielten	6	1	
Rezidivhäufigkeit	5	17		
Anzahl verstorbener Patientinnen im Zeitraum (Monate)		3	10	
	Median	22	27	
	Mittelwert	23,3	29,2	

*Tabelle 4:
Zusammenfassung der histologischen und klinischen Daten der 73 Mammakarzinom-Patientinnen verteilt nach dem Status der untersuchten axillären Lymphknoten.*

4.2 Untersuchungsmaterial und Auswahlprinzipien

Bei allen Mammakarzinompatientinnen, die sich der Primäroperation an der Frauenklinik der TU München unterzogen haben, wurden Mammakarzinomgewebe und axilläre Lymphknoten entnommen. Diese wurden im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München untersucht und bewertet. Abbildung 1 zeigt als Beispiel die Histologiepräparate (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) von vier mit Tumorzellen befallenen Lymphknoten. Den Proben wurde eine Gewebekennnummer zugeordnet. Diese Nummer wurde mit den entsprechenden Patientendaten wie Name, Vorname und anatomische Herkunft des Gewebes schriftlich bzw. in einer Computerdatei aufgezeichnet. Eine repräsentative Gewebeprobe wurde vom Pathologen an das Labor der Frauenklinik der TU München geschickt und dort zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren gelagert. Im Labor wurden alle eingehenden Proben im Gewebeeingangsbuch eingetragen und die tumorassoziierten Proteasen uPA und PAI-1 in Mammakarzinomgewebe und axillärem Lymphknoten bestimmt.

Das Patientenkollektiv erfüllte folgende Auswahlkriterien:

- Bei allen Patientinnen war sowohl klinisch als auch histologisch ein Mammakarzinom festgestellt worden.
- Es bestanden bei allen Patientinnen keine weiteren malignen Tumorerkrankungen.
- Sowohl das primäre Tumorgewebe als auch das entsprechende axilläre Lymphknotengewebe wurden im Labor der Frauenklinik aufbewahrt und waren im Gewebeeingangsbuch eingetragen.
- Die Angaben im Gewebeeingangsbuch wurden mit den Angaben im histologischen Befund verglichen. Bei Unstimmigkeiten wurde auf das Gewebe verzichtet.
- Alle in den Computer eingegebenen Werte stimmten mit den Werten auf den entsprechenden Befundzetteln überein.
- Der befundete, mit dem Primärtumor korrespondierende axilläre Lymphknoten war mit Hilfe des zugehörigen histologischen Befundes aus der Pathologie und des Gewebeeingangsbuches des Labors gut von den anderen axillären Lymphknoten zu unterscheiden.
- Es existierte ein separater histologischer Befund zu dem in dieser Arbeit untersuchten Lymphknoten.

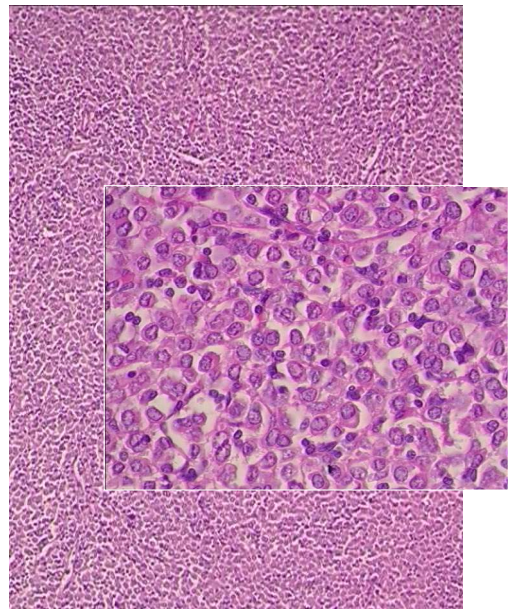
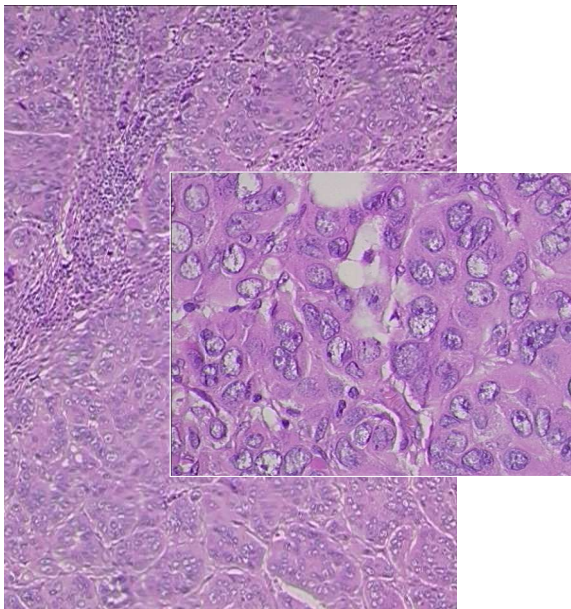
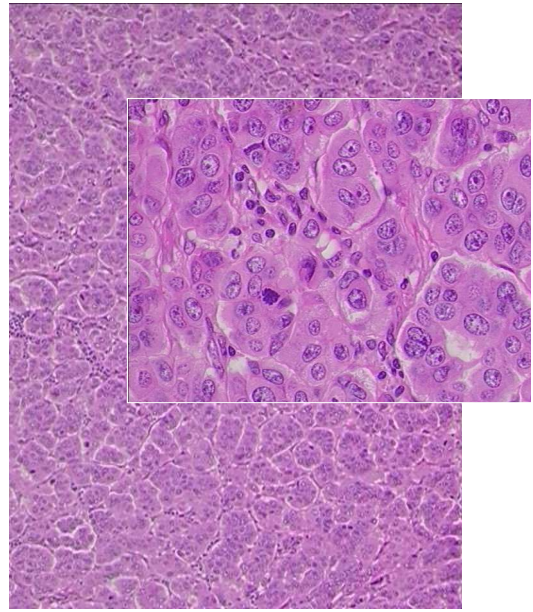
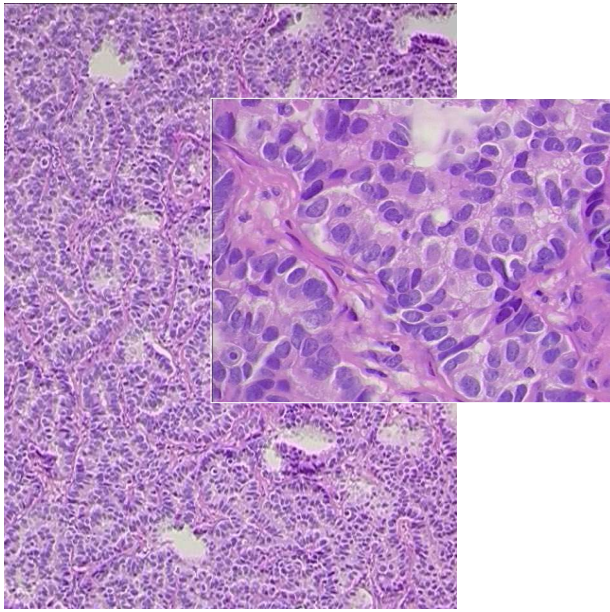


Abbildung 1: Befallene axilläre Lymphknotenpräparate von vier Mammakarzinompatientinnen, HE-Färbung

4.3 Bestimmung von uPA und PAI-1 durch ELISA

Alle biochemischen Bestimmungen wurden im Labor der Frauenklinik der Technischen Universität München durchgeführt.

Die u-PA und PAI-1 Konzentrationen im primären Mamakarzinomgewebe wurden seit 1987 prospektiv bei allen Patientinnen, die sich der Primäroperation an der Frauenklinik der TU München unterzogen haben, bestimmt. Bei einigen Lymphknoten mussten die Faktoren retrospektiv nachbestimmt werden. Die Antigenbestimmung für u-PA und PAI-1 erfolgte mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits in Detergenzextrakt (Triton-X-100) von Mamakarzinom- und Lymphknotengewebe. (u-PA: Imubind # 894. PAI-1: Imubind # 821; beide von American Diagnostica, Greenwich, CT, USA). Die Ergebnisse wurden in der Form ng / mg Protein angegeben. Der Proteingehalt wurde mit dem BCA-Protein Assay Reagent Kit von Pierce (Rockford, IL, USA) bestimmt.

Bei drei Patientinnen in der Subgruppe „Unbefallener Lymphknoten“ konnten die uPA und PAI-1 Messungen in den Lymphknoten nicht erfolgen, weil das Gewebe bei der Aufbereitung schlecht aufgeschlossen wurde.

4.4 Datenerfassung und statistische Auswertung

Alle Daten der Patientinnen wurden in eine Datenbank „Mamakarzinom“ eingegeben. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit SPSS im Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München durchgeführt.

Für die Vergleiche der Proteolysefaktoren untereinander wurde für unverbundene Stichproben der Mann-Whitney Test und für verbundene Stichproben der Wilcoxon Signed Ranks Test verwendet. Die Berechnung und deskriptive Darstellung der Überlebenskurven wurde mit univariaten Kaplan-Meier-Analysen mittels des SPSS-Programms durchgeführt. Das Signifikanzniveau für alle Analysen lag bei $p < 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 PAI-1 Konzentration im Tumorgewebe und im Lymphknoten

5.1.1 Primärtumor

Es wurde die PAI-1 Konzentration in den Primärtumoren der Patientinnen mit unbefallenen Lymphknoten mit der PAI-1 Konzentration in den Primärtumoren der Patientinnen mit befallenen Lymphknoten verglichen.

Der Median der PAI-1 Konzentration im Primärtumor der Patientinnen mit unbefallenen Lymphknoten betrug 10,14 ng/mg Protein (Minimum: 0,78 ng/mg Protein-Maximum: 41,95 ng/mg Protein), der Median der PAI-1 Konzentration im Primärtumor der Patientinnen mit befallenen Lymphknoten lag bei 10,81 ng/mg Protein (2,62-187,38 ng/mg Protein). Der Vergleich der PAI-1 Konzentrationen in den Primärtumoren beider Gruppen war statistisch nicht signifikant verschieden ($p=0,89$) (Abbildung 2).

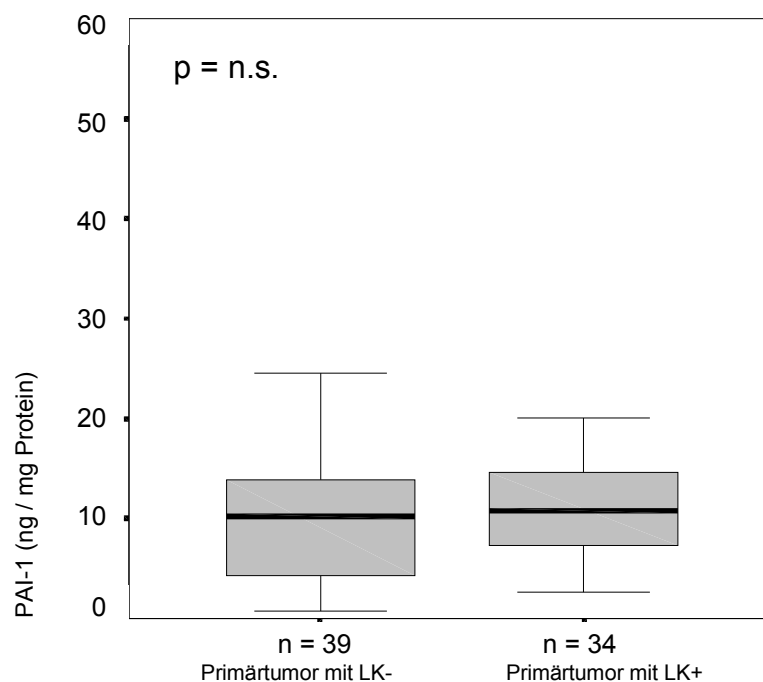


Abbildung 2:

PAI-1 Konzentrationsverteilung im Mammakarzinomgewebe bei Patientinnen mit unbefallenen Lymphknoten (LK-) im Vergleich zu PAI-1 Konzentrationsverteilung im Mammakarzinomgewebe bei Patientinnen mit befallenen Lymphknoten (LK+). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,89$).

5.1.2 Lymphknoten

Die PAI-1 Konzentrationen in den befundeten unbefallenen axillären Lymphknoten wurden mit der PAI-1 Konzentrationen in den befundeten befallenen axillären Lymphknoten verglichen.

Der Median der PAI-1 Konzentrationen in unbefallenen Lymphknoten war 1,59 ng/mg Protein (0,07-26,61 ng/mg Protein), der Median der PAI-1 Konzentrationen in den befallenen Lymphknoten lag bei 14,58 ng/mg Protein (2,64-91,19 ng/mg Protein). In befallenen Lymphknoten wurden signifikant ($p < 0,001$) höhere PAI-1 Konzentrationen gemessen als in den unbefallenen Lymphknoten (Abbildung 3).

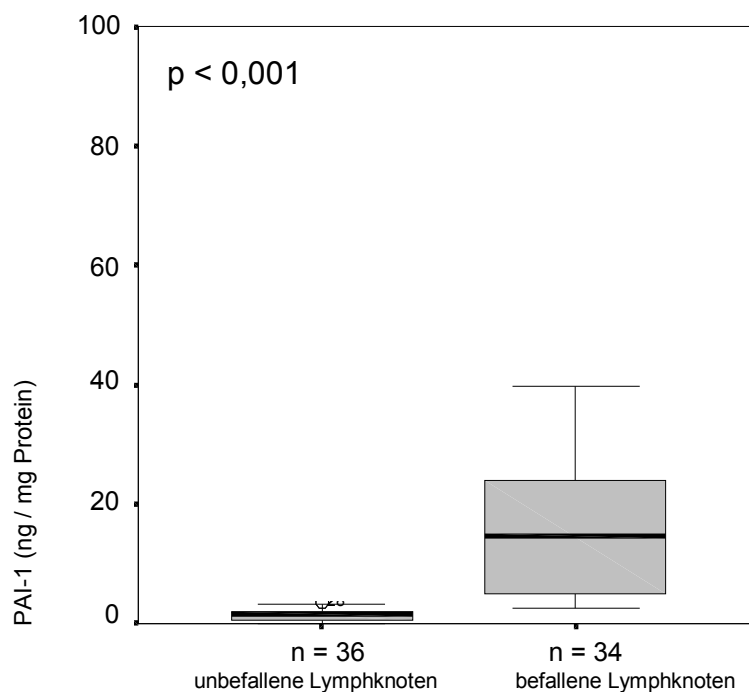


Abbildung 3:

PAI-1 Konzentrationsverteilung in unbefallenen und befallenen Lymphknoten.

Die durchschnittliche PAI-1 Konzentration in den unbefallenen Lymphknoten lag bei 2,46 ng/mg und die durchschnittliche PAI-1 Konzentration in den befallenen war 19,58 ng/mg. Es bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$)

5.1.3 Vergleich zwischen Primärtumor und Lymphknoten

Beim Vergleich der PAI-1 Konzentrationen in den Primärtumoren mit den PAI-1 Konzentrationen in ihren korrespondierenden axillären Lymphknoten im Gesamtkollektiv waren die PAI-1 Werte in den Primärtumoren signifikant ($p = 0,014$) höher als in den

Lymphknoten. Abbildung 4 zeigt in Boxplot beide Gruppen nebeneinander. Der Median der PAI-1 Konzentrationen in den Lymphknoten betrug 3,55 ng/mg Protein (0,07-91,19 ng/mg Protein). Der Median der PAI-1 Konzentration in den Primärtumoren lag bei 10,45 ng/mg Protein (0,78-187,38 ng/mg Protein).

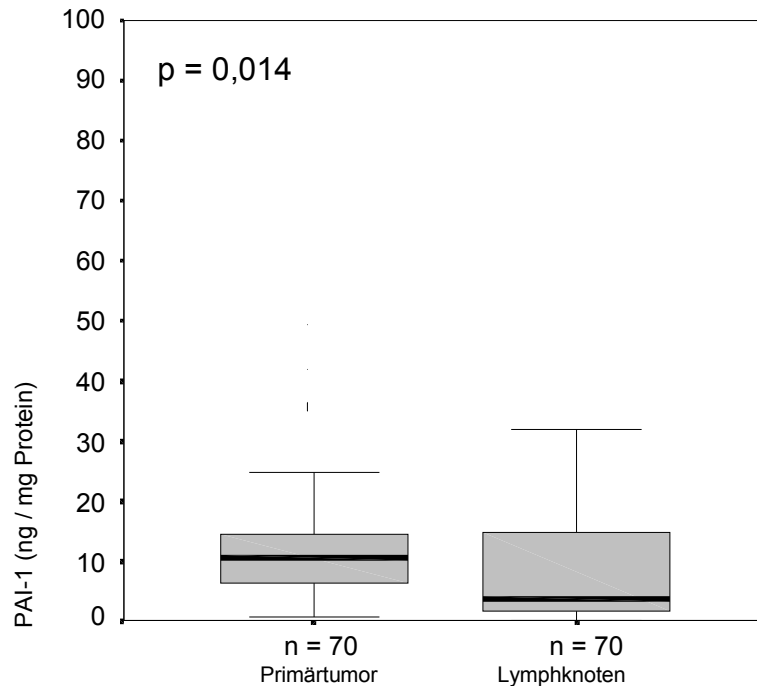


Abbildung 4:
PAI-1 Konzentrationsverteilung in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknoten im Gesamtkollektiv. Die PAI-1 Konzentrationen waren in den Primärtumoren signifikant höher ($p=0,014$) als in den Lymphknoten.

Auch in der Subgruppe wurden die PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor den PAI-1 Konzentrationen im korrespondierenden unbefallenen axillären Lymphknoten gegenüber gestellt. Der Median der PAI-1 Konzentration in Primärtumoren betrug 10,14 ng/mg Protein (0,78-41,95 ng/mg Protein), im Vergleich zu 1,59 ng/mg (0,07-26, 61 ng/mg Protein) in unbefallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten. Es ergaben sich auch hier signifikant ($p<0,001$) höhere PAI-1 Konzentrationen in den Primärtumoren als in den unbefallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten (Abbildung 5).

In der Subgruppe von Patientinnen mit befallenen befundeten Lymphknoten wurde beim Vergleich der PAI-1 Konzentrationen in den Primärtumoren mit den PAI-1 Konzentrationen in den befallenen korrespondierenden Lymphknoten ein merkbarer, aber nicht signifikanter

($p=0,256$) Unterschied festgestellt. Im Gegensatz zu der Subgruppe von Patientinnen mit befundenen unbefallenen Lymphknoten fielen die PAI-1 Konzentrationen in der Subgruppe von Patientinnen mit befundenen befallenen Lymphknoten im befallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten höher aus als in den Primärtumoren. Der Median der PAI-1 Konzentrationen in den Primärtumoren betrug 10,81 ng/mg Protein (2,62-187,38 ng/mg Protein) und der Median der PAI-1 Konzentrationen in den befallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten lag bei 14,58 ng/mg Protein (2,64-91,19 ng/mg Protein). Abbildung 6 zeigt die PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor und im korrespondierenden befallenen Lymphknoten für die einzelnen Patientinnen.

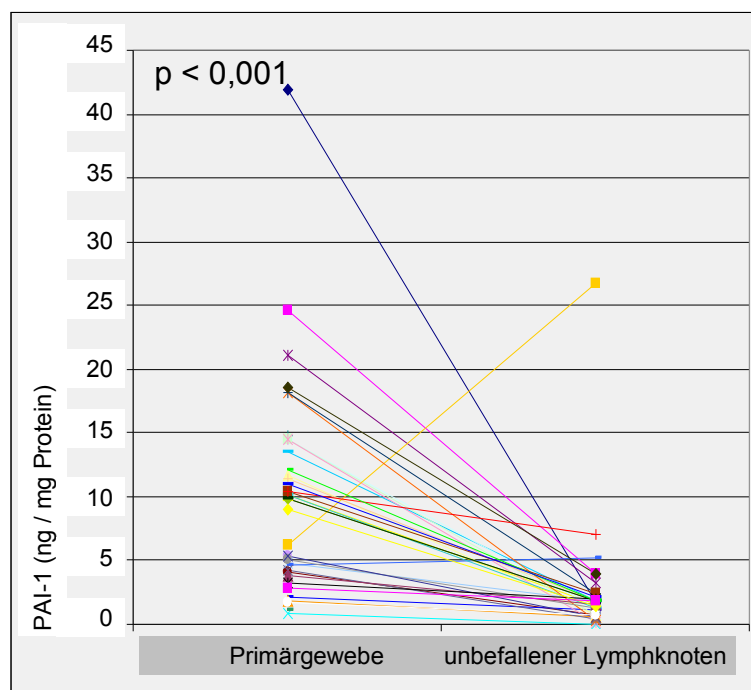


Abbildung 5:
Den PAI-1 Konzentrationen in unbefallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten gegenübergestellte PAI-1 Konzentrationen in Primärgewebe. In der Abbildung wird deutlich, dass die Konzentration in unbefallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten abnimmt. Der Unterschied ist signifikant ($p<0,001$).

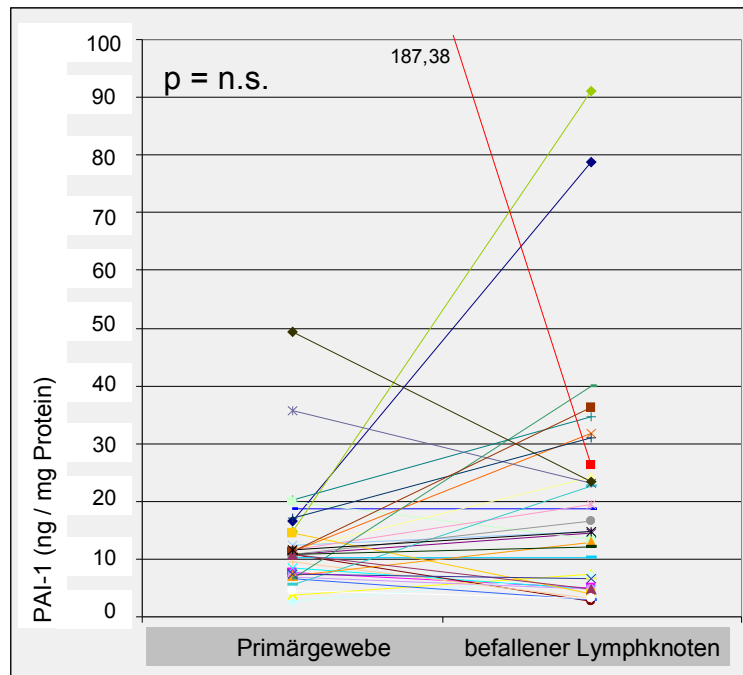


Abbildung 6:
Gegenüberstellung von PAI-1 Konzentrationen im Primärgewebe mit den PAI-1 Konzentrationen in befallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten bei 34 Patientinnen. Obwohl im befallenen Lymphknoten durchschnittlich höhere Werte gemessen wurden als im Primärtumor ($19,58 \text{ ng/mg} \leftrightarrow 17,76 \text{ ng/mg}$) war der Unterschied nicht signifikant ($p=0,256$).

5.2 UPA Konzentrationen im Tumorgewebe und im Lymphknoten

5.2.1 Primärtumor

Wie für PAI-1 wurden auch die uPA-Konzentrationen in den Primärtumoren der Subgruppe der Patientinnen mit befundeten unbefallenen Lymphknoten mit uPA-Konzentration in den Primärtumoren der Subgruppe der Patientinnen mit befallenen Lymphknoten verglichen.

Die Mediane der uPA-Konzentrationen in den Primärtumoren für beide Gruppen waren nahe beieinander: $1,52 \text{ ng/mg Protein}$ ($0,22\text{-}15,17 \text{ ng/mg Protein}$) bei Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten und $1,38 \text{ ng/mg Protein}$ ($0,19\text{-}7,04 \text{ ng/mg Protein}$) bei Patientinnen mit unbefallenen axillären Lymphknoten.

Es gab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,623$) zwischen beiden Subgruppen. Auf eine Abbildung wurde hier verzichtet.

5.2.2 Lymphknoten

Die Unterschiede für die uPA-Konzentrationen in befallenen und unbefallenen axillären Lymphknoten waren nicht signifikant ($p=0,158$). Der Median für die uPA-Konzentrationen in unbefallenen axillären Lymphknoten lag bei 0,69 ng/mg Protein (0,14–1,94 ng/mg Protein). Bei den befallenen axillären Lymphknoten errechneten wir einen Median von 0,84 ng/mg Protein (0,13–7,13 ng/mg Protein) (Abbildung 7).

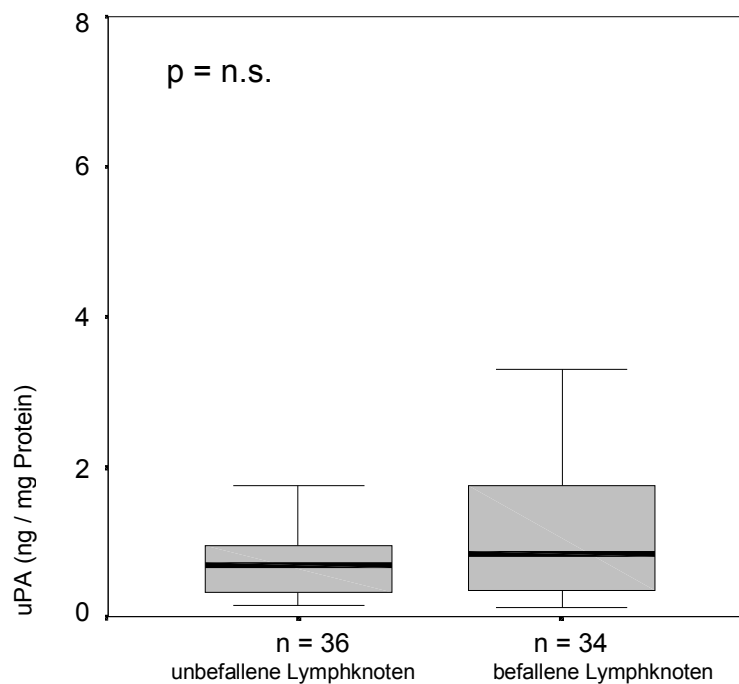


Abbildung 7:

UPA Konzentrationsverteilung in befallenen und unbefallenen axillären Lymphknoten. Es konnte eine Zunahme der uPA Konzentrationen in den befallenen Lymphknoten festgestellt werden (Mittelwert für befallene Lymphknoten: 1,33 ng/mg und für unbefallene Lymphknoten: 0,75 ng/mg), diese war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,158$).

5.2.3 Vergleich zwischen Primärtumor und Lymphknoten

Wie für PAI-1 waren auch beim Vergleich der uPA-Konzentrationen in Primärtumoren und ihren korrespondierenden axillären Lymphknoten im Gesamtkollektiv die uPA-Werte in den Primärtumoren signifikant ($p<0,001$) höher. Der Median der uPA Konzentrationen in den Primärtumoren lag bei 1,46 ng/mg Protein (0,19-15,17 ng/mg Protein) und der Median der

uPA-Konzentrationen in den axillären Lymphknoten war 0,78 ng/mg Protein (0,13–7,13 ng/mg Protein) (Abbildung 8).

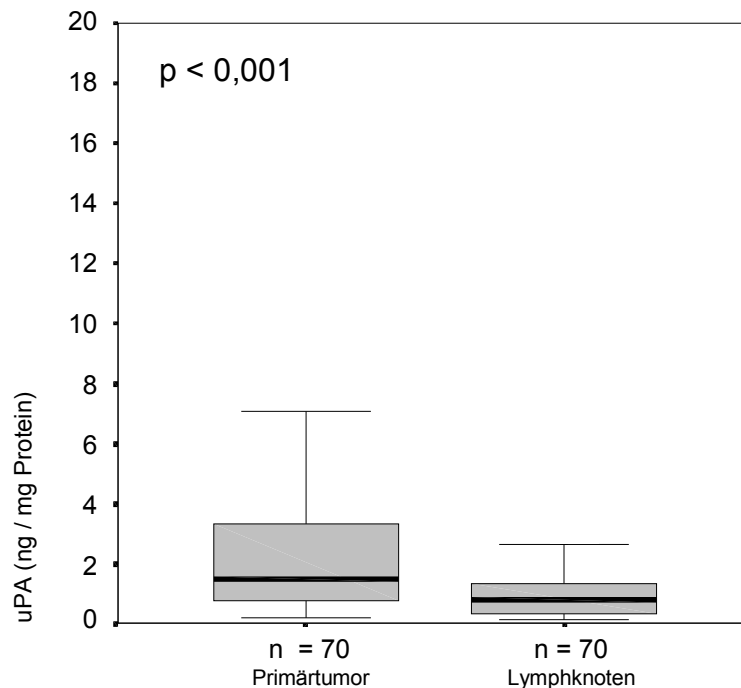


Abbildung 8:
UPA Konzentrationsverteilung in den Primärtumoren und ihren korrespondierenden Lymphknoten bei allen Patientinnen. Die uPA-Konzentrationen waren in den Primärtumoren signifikant höher ($p < 0,001$) als in den Lymphknoten.

Beim Vergleich der uPA-Konzentrationen in den Primärtumoren mit den uPA-Konzentrationen in den korrespondierenden unbefallenen axillären Lymphknoten waren die uPA-Konzentrationen in den Primärtumoren signifikant höher ($p < 0,001$ nach Wilkoxon-Rang-Test). Der Median der uPA-Konzentrationen in den Primärgeweben lag bei 1,38 ng/mg Protein (0,19-7,04 ng/mg Protein); in unbefallenen axillären Lymphknoten bei 0,69 ng/mg Protein (0,14-1,94 ng/mg Protein) (Abbildung 9).

Die uPA-Konzentrationen waren im Primärtumor auch signifikant ($p < 0,001$) höher als in seinem befallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten. Der Median der uPA-Konzentrationen in den Primärtumoren lag bei 1,52 ng/mg Protein (0,22-15,17 ng/mg Protein), während der Median der uPA Konzentrationen in den befallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten 0,84 ng/mg Protein betrug (0,13–7,13 ng/mg Protein) (Abbildung 10).

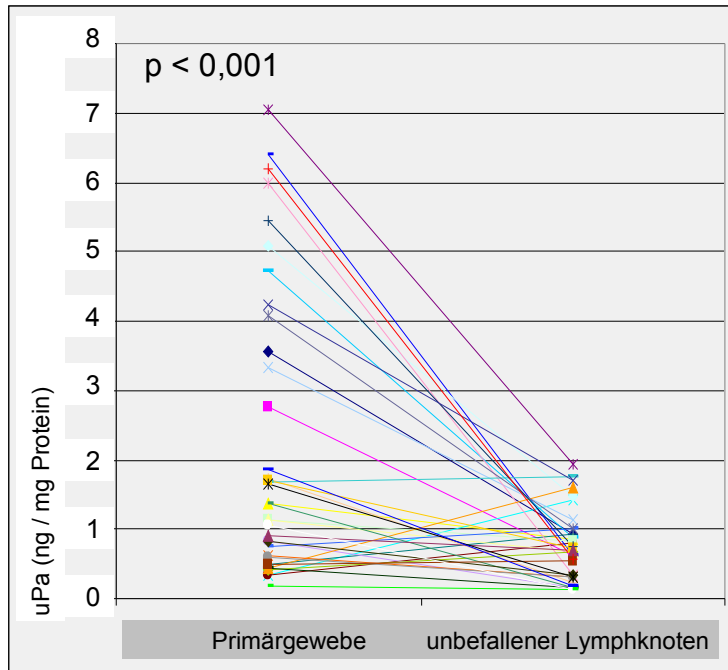


Abbildung 9: Gegenüberstellung von uPA-Konzentrationen im Primärgewebe mit den uPA-Konzentrationen in unbefallenen korrespondierenden Lymphknoten (n=36). Während im Karzinomgewebe hohe uPA Konzentrationen gemessen wurden, nahmen sie in unbefallenen Lymphknoten signifikant ($p < 0,001$) ab.

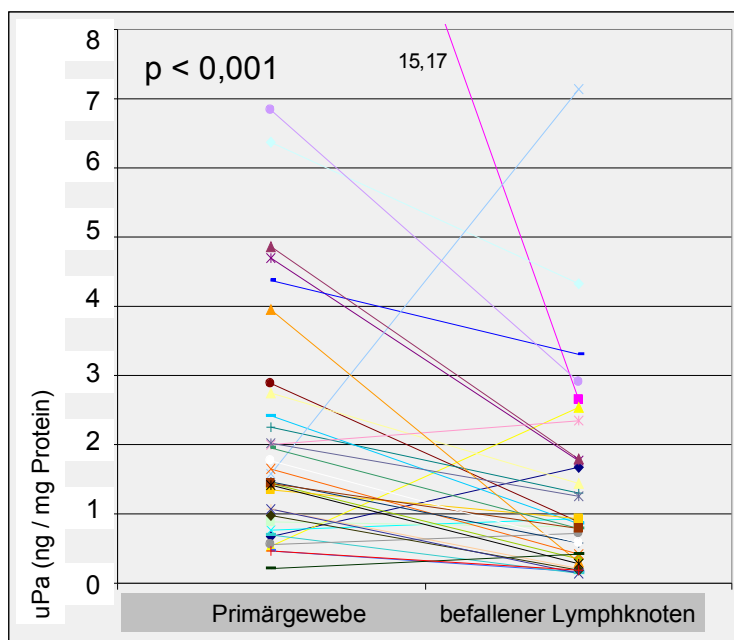


Abbildung 10: Gegenüberstellung von uPA-Konzentrationen im Primärgewebe mit den uPA-Konzentrationen in befallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten (n=34). Die uPA-Konzentrationen waren im Primärtumor signifikant höher als im befallenen korrespondierenden axillären Lymphknoten ($p < 0,001$).

5.3 Krankheitsverlauf

Das Zeitintervall zwischen Operation und Tod der Patientin wurde als Gesamtüberlebenszeit, das Intervall zwischen Operation und Rezidiv als rezidivfreie Überlebenszeit definiert.

Insgesamt trat bei 22 Patientinnen im Verlauf ein Rezidiv auf, bei 3 Patientinnen lagen bereits zum Zeitpunkt der Operation Metastasen vor. 13 Patientinnen verstarben an Folge ihrer Tumorerkrankung. Der Median der rezidivfreien Überlebenszeit für das Gesamtkollektiv betrug 39 Monate, der Mittelwert 38 Monate.

Mit Hilfe von univariaten Kaplan-Meier-Analysen wurde die prognostische Signifikanz des Lymphknotenbefalls und der Proteolysefaktoren uPA und PAI-1 für die rezidivfreie Überlebens- (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) berechnet. Um eine Unterteilung in Hoch- und Niedrigrisikogruppen zu ermöglichen, wurden die Messwerte für uPA und PAI-1 bewertet. Als Schwellenwerte für uPA und PAI-1 im Mammakarzinomgewebe wurden die von der bekannten Arbeitsgruppe in der Frauenklinik im Klinikum Rechts der Isar (Harbeck et al BCRT 1999) optimierten und in einer prospektiven Multicenterstudie (Jänicke et al. JNCI 2001) bestätigten Werte übernommen. Für PAI-1 in der Subgruppe mit befallenen axillären Lymphknoten wurden mittels Log-rank Statistik optimierte Schwellenwerte errechnet. Auf die Optimierung eines Schwellenwertes für uPA wurde verzichtet, weil die befallenen axillären Lymphknoten signifikant niedrigere uPA-Konzentrationen aufwiesen als die Primärtumoren. Für das Lymphknotengewebe unabhängig vom Befallszustand wurde der Schwellenwert für PAI-1 vom Primärtumor übernommen (Tabelle 5).

Cutoff-Werte für PAI-1 und uPA		n
PAI-1		
Mammakarzinomgewebe (cutoff: 14 ng/mg Protein, Harbeck et al. 1999, Jänicke et al. 2001)		
niedrig (≤ 14 ng/mg Protein)		53
hoch (> 14 ng/mg Protein)		20
alle Lymphknoten (cutoff: 14 ng/mg Protein, Harbeck et al. 1999, Jänicke et al. 2001)		
niedrig (≤ 14 ng/mg Protein)		51
hoch (> 14 ng/mg Protein)		19
befallene Lymphknoten (cutoff: 14 ng/mg Protein, Harbeck et al. 1999, Jänicke et al. 2001, optimiert)		
niedrig (≤ 14 ng/mg Protein)		10
hoch (> 14 ng/mg Protein)		23
befallene Lymphknoten (cutoff optimiert für das vorliegende Patientenkollektiv: 6,58 ng/ml Protein)		
niedrig ($\leq 6,58$ ng/mg Protein)		16
hoch ($> 6,58$ ng/mg Protein)		17
uPA		
Mammakarzinomgewebe (cutoff: 3 ng/mg Protein, Harbeck et al. 1999, Jänicke et al. 2001)		
niedrig (≤ 3 ng/mg Protein)		16
hoch (> 3 ng/mg Protein)		18

Tabelle 5: Cutoff-Werte für PAI-1 und uPA.

Für befallene Lymphknoten wurden mittels Log-rank Statistik optimierte Schwellenwerte errechnet. Neben dem besten Schwellenwert (6,58 ng/mg Protein) wurden auch mit dem zweitbesten Schwellenwert (14 ng /mg Protein) Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt.

5.3.1 Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

Die Subgruppe der Patientinnen mit befundeten unbefallenen axillären Lymphknoten bestand aus 39 Patientinnen. Acht dieser Patientinnen hatten jedoch auch andere befallene Lymphknoten. Die Subgruppe der Patientinnen mit befundeten befallenen axillären Lymphknoten bestand aus 34 Patientinnen.

Abbildung 11 zeigt Kaplan-Meier-Analysen für die rezidivfreie (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus. Patientinnen mit befundeten befallenen axillären Lymphknoten litten signifikant ($p < 0,001$) häufiger an Rezidiven als Patientinnen mit untersuchten unbefallenen axillären Lymphknoten. Die Wahrscheinlichkeit an der Krebserkrankung zu sterben, war bei Patientinnen mit befundeten befallenen Lymphknoten signifikant höher.

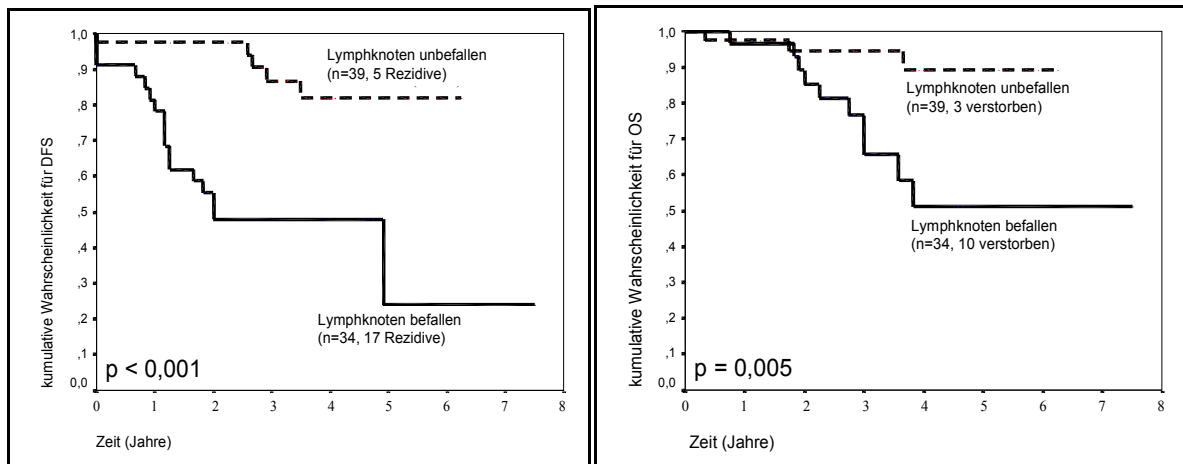


Abbildung 11:
Rezidivfreie (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit vom Status des untersuchten Lymphknotens.

5.3.2 Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von PAI-1 Konzentrationen

5.3.2.1 Primärtumor

53 Patientinnen hatten im Primärtumor PAI-1 Konzentrationen unterhalb von 14 ng/mg Protein und 20 Patientinnen hatten PAI-1 Konzentrationen oberhalb des Schwellenwertes von 14 ng/mg Protein. Beim Vergleich der rezidivfreien Überlebenszeiten mit Hilfe der Kaplan-Meier Analysen (Abbildung 12) wird deutlich, dass Patientinnen mit hohem PAI-1 früher ein Rezidiv erleiden als Patientinnen mit niedrigen PAI-1 Konzentrationen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,379$). Auch die Wahrscheinlichkeit für eine längere Gesamtüberlebenszeit ist bei Patientinnen mit niedrigen PAI-1 Konzentrationen höher ($p=0,199$), allerdings statistisch nicht signifikant für das untersuchte Patientenkollektiv.

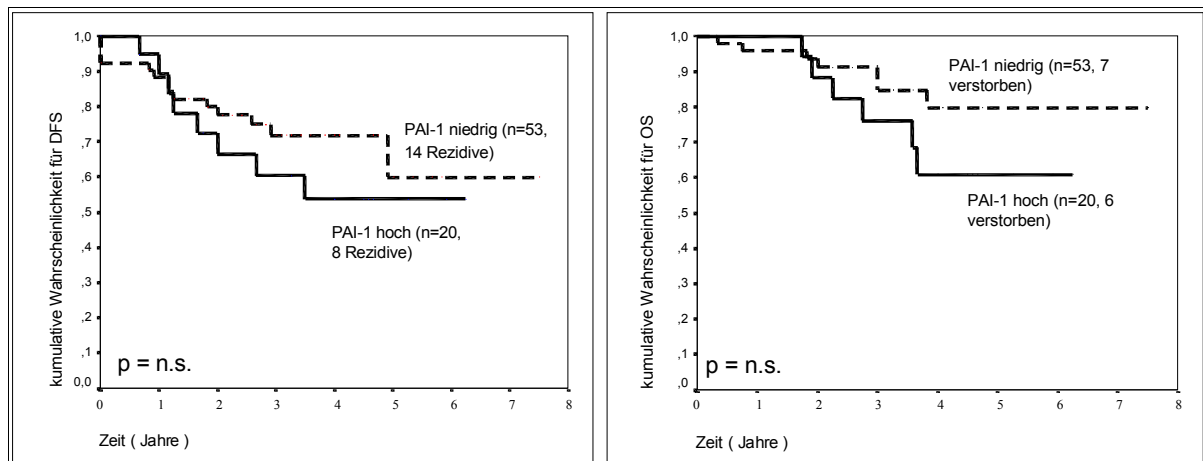


Abbildung 12:

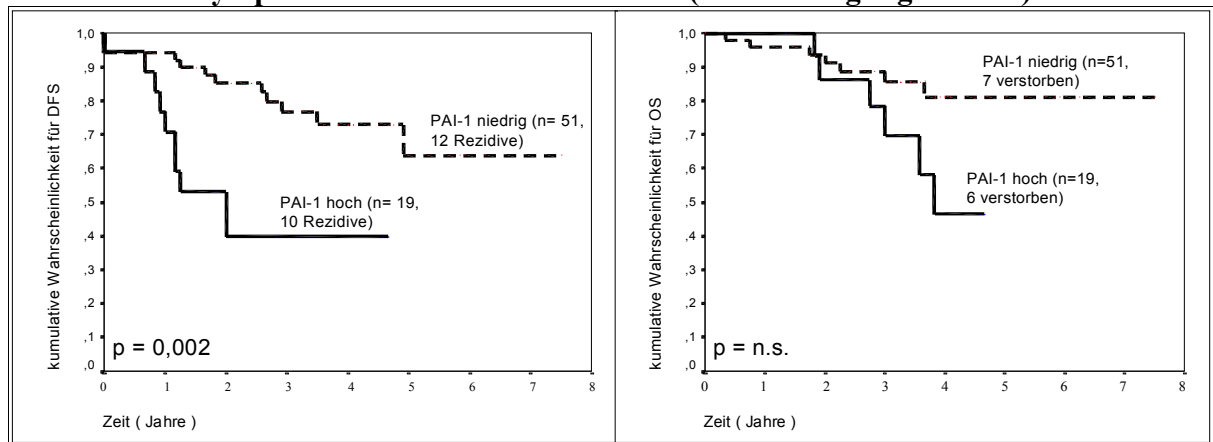
Rezidivfreie (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von PAI-1 Konzentrationen im Primärtumorgewebeextrakt. PAI-1 niedrig entspricht PAI-1 Konzentration ≤ 14 ng/mg und PAI-1 hoch entspricht PAI-1 Konzentration > 14 ng/mg.

5.3.2.2 Lymphknoten

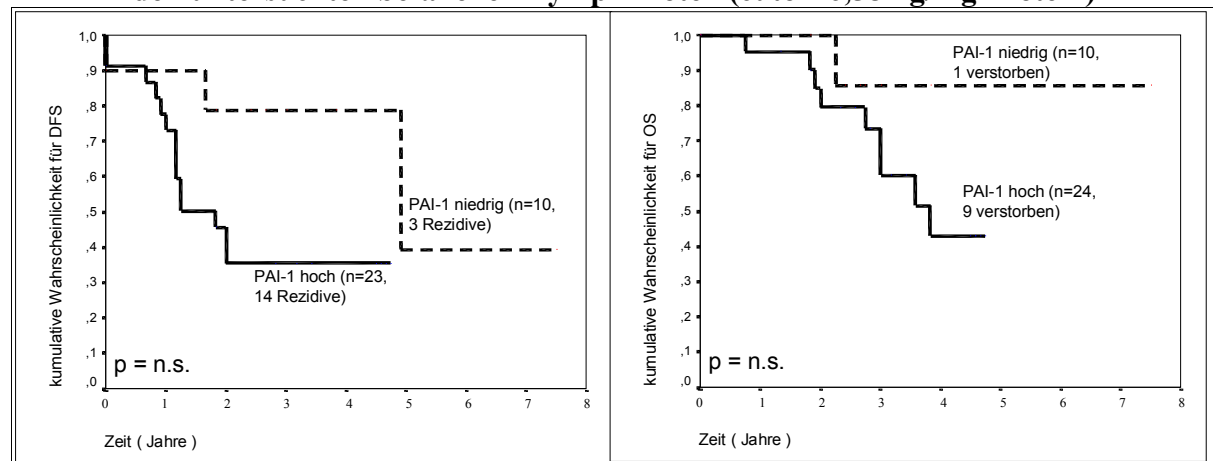
Da für das Lymphknotengewebe unabhängig vom Befallszustand kein Schwellenwert für PAI-1 existierte, wurde der Schwellenwert vom Primärtumor (14 ng/mg Protein) übernommen. Für befallene axilläre Lymphknoten errechneten wir mittels Log-rank Statistik optimierte Schwellenwerte. Neben dem besten Schwellenwert (6,58 ng/mg Protein) wurden auch mit dem zweitbesten Schwellenwert (14 ng/mg Protein) Kaplan-Meier Analysen durchgeführt. Im Gesamtkollektiv hatten 51 Patientinnen niedrigere PAI-1 Konzentrationen als der Schwellenwert 14 ng/mg Protein in den Lymphknoten. Bei 19 Patientinnen waren die PAI-1 Konzentrationen im Lymphknoten höher als dieser Schwellenwert.

In der Subgruppe der Patientinnen mit befundenen befallenen Lymphknoten wiesen 16 Patientinnen niedrigere PAI-1 Konzentrationen als den Schwellenwert 14 ng/mg Protein auf. 18 Patientinnen hatten höhere Werte als den Schwellenwert. Bei einem Schwellenwert von 6,58 ng/mg Protein überschritten 24 Patientinnen diesen, während 10 Patientinnen niedrigere Konzentrationen aufwiesen. Patientinnen mit PAI-1 Konzentrationen unterhalb des Schwellenwertes zeigten eine längere rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit. Nur in den Lymphknoten des Gesamtkollektivs erwies sich PAI-1 als signifikanter ($p=0,002$) Parameter für die rezidivfreie Überlebenszeit (Abbildung 13).

PAI-1 in den Lymphknoten des Gesamtkollektivs (cuttoff 14 ng/mg Protein)



PAI-1 in den untersuchten befallenen Lymphknoten (cuttoff 6,58 ng/mg Protein)



PAI-1 in den untersuchten befallenen Lymphknoten (cuttoff 14 ng/mg Protein)

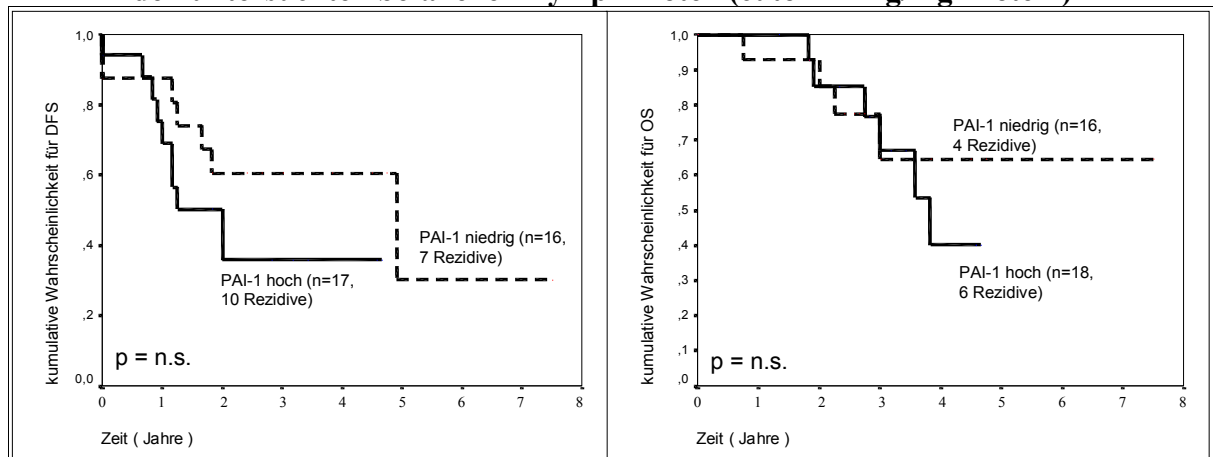


Abbildung 13:
 Rezidivfreie (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von PAI-1
 Konzentrationen in Lymphknoten bei allen Patientinnen und bei Patientinnen mit befallenen
 Lymphknoten (zweier verschiedener cutoffs).

5.3.2.3 Vergleich zwischen Primärtumor und Lymphknoten

Ein Vergleich der PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor und im korrespondierenden axillären Lymphknoten des Gesamtkollektives (unabhängig vom Befallszustand des axillären Lymphknotens) ergab, dass bei 49 Patientinnen die Werte im Primärtumor höher waren als in den korrespondierenden Lymphknoten. Bei 21 Patientinnen waren die PAI-1 Konzentrationen im Lymphknoten höher als im Primärtumor. In der univariaten Analyse nach Kaplan-Meier erwies sich, dass Patientinnen mit höheren PAI-1 Konzentrationen im Lymphknoten als im korrespondierenden Primärtumor signifikant früher ein Rezidiv erlitten und früher starben als Patientinnen mit niedrigeren Konzentrationen im Lymphknoten (Abbildung 14).

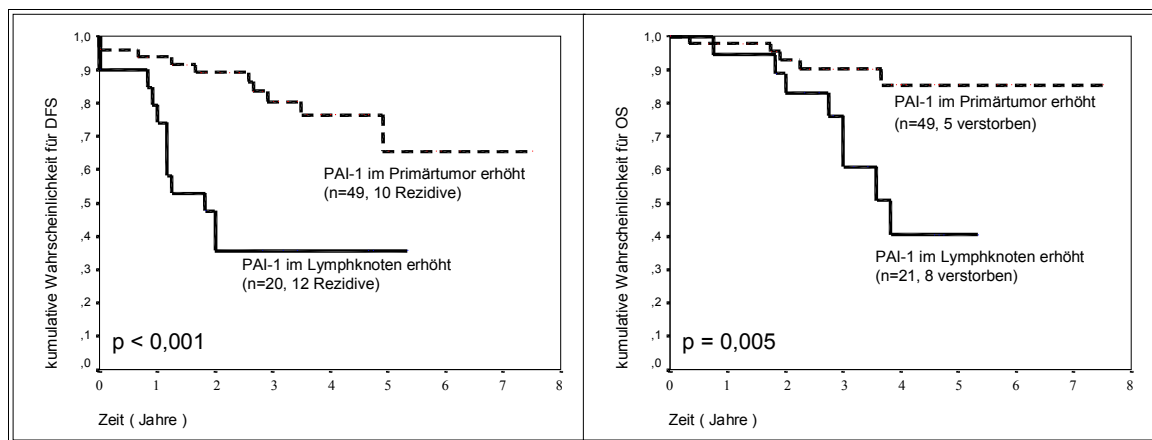


Abbildung 14: Rezidivfreie (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit davon, ob die PAI-1 Konzentrationen in den Lymphknoten oder in den Primärtumoren höhere Werte aufweisen (Gesamtkollektiv).

In der Subgruppe der Patientinnen mit untersuchten befallenen axillären Lymphknoten waren bei 15 Patientinnen die PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor höher als im korrespondierenden befallenen axillären Lymphknoten. 19 Patientinnen wiesen höhere PAI-1 Konzentrationen im befallenen axillären Lymphknoten auf als im Primärtumor. In der univariaten Analyse erwiesen sich höhere PAI-1 Konzentrationen im befallenen axillären Lymphknoten als signifikanter Parameter für die rezidivfreie Überlebenszeit (Abbildung 15).

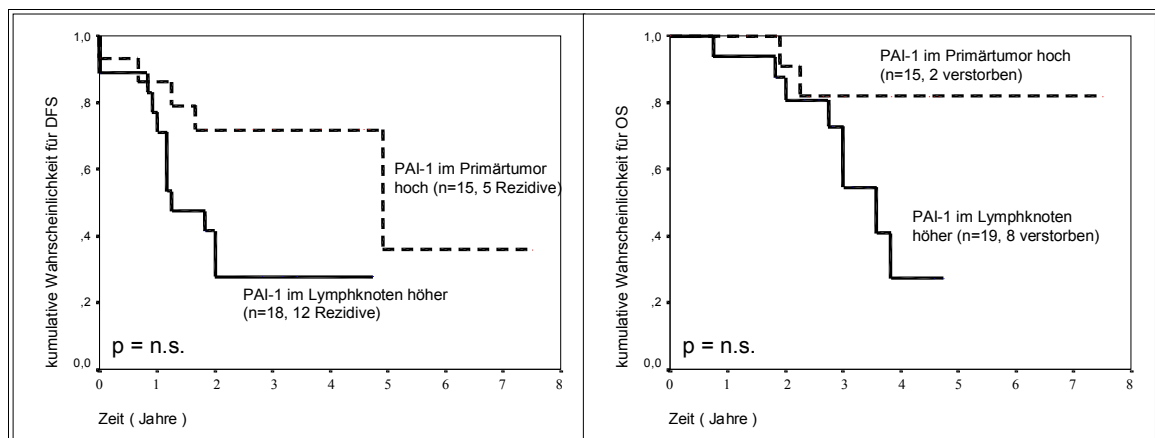


Abbildung 15:

Rezidivfreie (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit davon, ob die PAI-1-Konzentrationen in den Lymphknoten oder in den Primärtumoren höhere Werte aufweisen (für die Subgruppe der Patientinnen mit untersuchten befallenen Lymphknoten: LK+).

5.3.3 Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom uPA im Primärtumor

Im gesamten Kollektiv waren bei 54 Patientinnen die uPA-Konzentrationen im Primärtumor kleiner als der Schwellenwert (3 ng/mg Protein), während 19 Patientinnen diesen Wert überschritten. In den Kaplan-Meier-Analysen für die rezidivfreie (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Es zeigt sich ein Trend für ein längeres rezidivfreies Überleben und ein längeres Gesamtüberleben bei niedrigen uPA-Werten (Abbildung 16).

Für den uPA erwiesen sich unabhängig vom Tumorbefall immer niedrigere uPA-Konzentrationen im Lymphknoten. Eine Auslegung in ein Hoch- und ein Niedrigisiko in Abhängigkeit der uPA-Konzentration im Lymphknoten wäre somit klinisch nicht relevant.

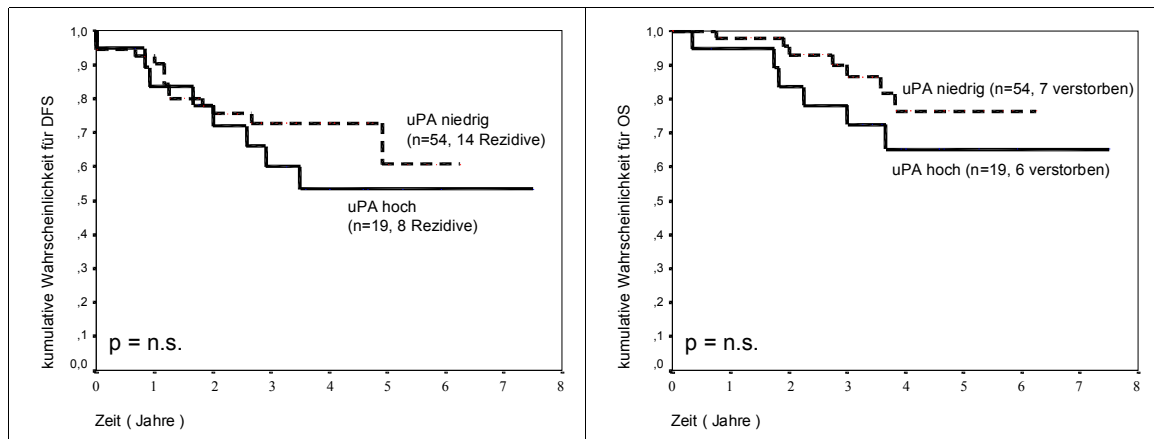


Abbildung 16:

Rezidivfreie (DFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von uPA-Konzentrationen im Primärtumor. UPA niedrig entspricht uPA Konzentration ≤ 3 ng/mg und uPA hoch entspricht uPA Konzentration > 3 ng/mg

6 Diskussion

Bis jetzt gibt es hinsichtlich der uPA und PAI-1 Konzentrationen im primären Mammakarzinom versus dem korrespondierenden befallenen oder unbefallenen axillären Lymphknoten wenig Informationen. Dies scheint jedoch für die Einschätzung des individuellen Risikos und bei der weiteren Therapieplanung von Bedeutung zu sein.

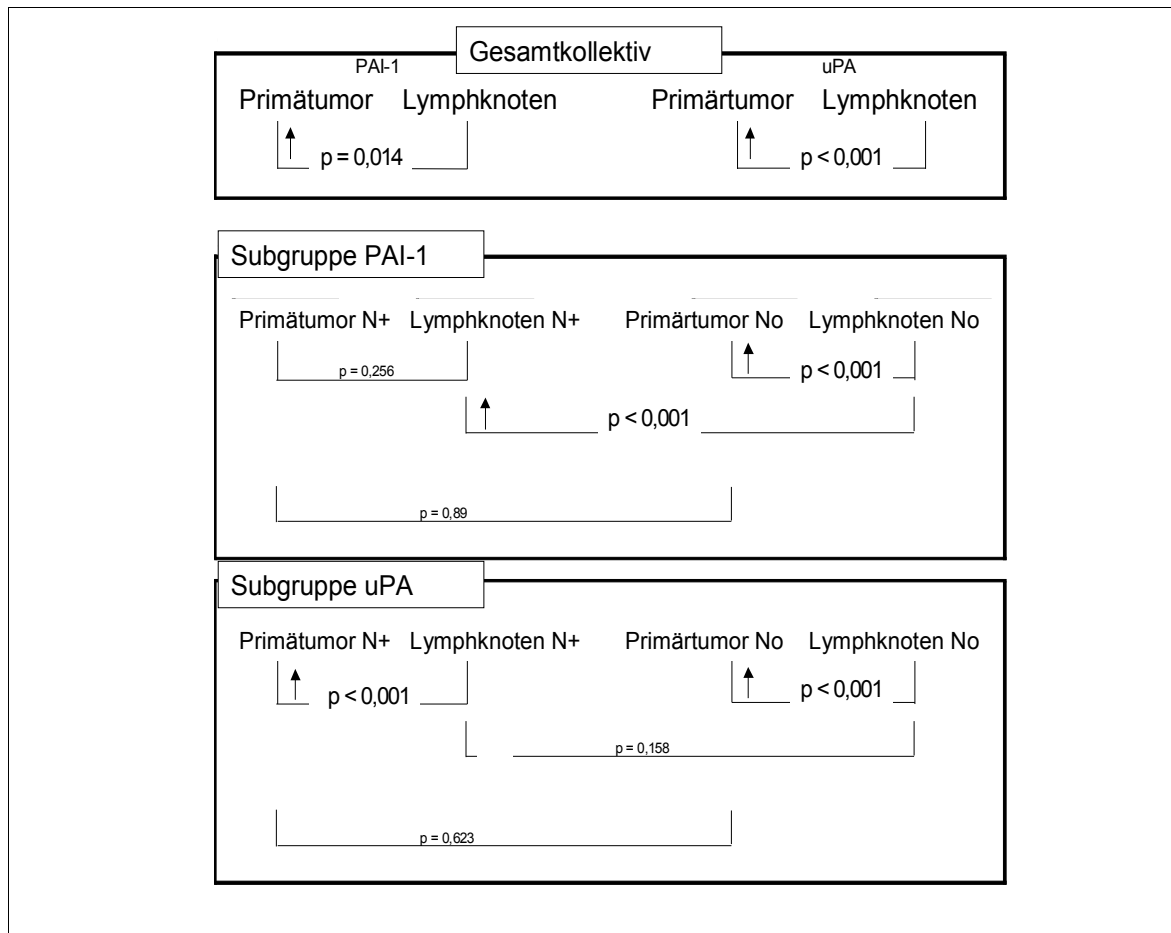


Abbildung 17:

Vergleich der uPA und PAI-1 Konzentrationen im Gesamtkollektiv und in den Subgruppen mit befundenen befallenen axillären Lymphknoten (N+) und befundenen unbefallenen axillären Lymphknoten (No). Die Pfeile zeigen auf das Gewebe mit höheren Konzentrationen von uPA bzw. PAI-1 als im Vergleichsgewebe.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 73 Mammakarzinompatientinnen die uPA/PAI-1 Konzentration im primären Mammakarzinomgewebe und in ihren korrespondierenden befallenen bzw. unbefallenen axillären Lymphknoten gemessen und die Werte miteinander verglichen (Abbildung 17).

6.1 Vergleich der PAI-1 und uPA-Konzentrationen von Primärtumor mit ihrem korrespondierenden befallenen sowie unbefallenen Lymphknoten

Bei der Untersuchung der 73 am Mammakarzinom erkrankten Patientinnen wurden im Primärtumor der Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten als auch im Primärtumor der Patientinnen mit unbefallenen axillären Lymphknoten keine signifikant unterschiedlichen PAI-1 und uPA-Konzentrationen gemessen. In der Subgruppe der Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten war der Median für PAI-1 im Primärtumor leicht höher als in der Vergleichsgruppe der Patientinnen mit unbefallenen axillären Lymphknoten. Die uPA-Konzentration lag im Primärtumor der Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten etwas höher als im Primärtumor der Patientinnen mit unbefallenem axillären Lymphknoten.

Angesichts der Tatsache, dass es sich in beiden Subgruppen um ein histologisch abgesichertes primäres Mammakarzinomgewebe handelt, ist die kongruente uPA und PAI-1 Konzentration im Primärtumor in beiden Subgruppen nicht verwunderlich. Berücksichtigt man jedoch die entscheidende Rolle der Plasminogenfaktoren beim Matrixabbau, bei der Invasion und der Metastasierung, dann sollten vergleichbar hohe Konzentrationen im Primärtumor in bereits in den Lymphknoten metastasierten Primärtumoren messbar sein. So berichteten Jänicke et al. (1991) in einer Studie von einer Korrelation zwischen PAI-1 und dem Lymphknotenstatus. Ebenso fanden Foucre et al. eine direkte Korrelation zwischen dem PAI-1 Gehalt und der Zahl der befallenen Lymphknoten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die PAI-1 und uPA-Konzentrationen sowohl in befallenen als auch in unbefallenen axillären Lymphknoten gemessen und verglichen. In den befundeten befallenen axillären Lymphknoten konnte nur für PAI-1 eine statistisch signifikante Zunahme der Konzentration im Vergleich zu den unbefallen axillären Lymphknoten festgestellt werden. Die uPA-Konzentrationen in den befallenen axillären Lymphknoten hingegen fielen zwar durchschnittlich höher als in den unbefallen axillären Lymphknoten aus, jedoch nicht signifikant.

Im Gesamtkollektiv wurden signifikant höhere PAI-1 und uPA-Konzentrationen im axillären Lymphknoten gemessen als im Primärtumor. In unbefallenen axillären Lymphknoten wurden für beide Faktoren (uPA und PAI-1) signifikant ($p < 0,001$) niedrigere Werte gemessen als im korrespondierenden Primärtumor. Betrachtet man jedoch die Subgruppe der Patientinnen mit befallenen Lymphknoten, wird eine unterschiedliche Ausprägung für PAI-1 und uPA deutlich. Es wurden in den befallenen axillären Lymphknoten durchschnittlich höhere PAI-1 Konzentration gemessen (Median: 14,58) als im korrespondierenden Primärtumor (Median:

10,81) ($p=n.s.$). Doch im Gegensatz dazu war die uPA-Konzentration in den befallenen axillären Lymphknoten signifikant ($p<0,001$) niedriger als in den korrespondierenden Primärtumoren. Es besteht also eine Divergenz bei den Konzentrationen für uPA und PAI-1 in den befallenen axillären Lymphknoten im Vergleich zu ihren korrespondierenden Primärtumoren. Zu der gleichen Feststellung kamen Jänicke et al. in einer kleinen Studie (1990). Sie stellten bei fünf Patientinnen mit Mammakarzinom signifikant höhere PAI-1 Konzentrationen in befallenen Lymphknoten als im Primärtumor fest (4,98 ng/mg Protein versus 2,46 ng/mg Protein; $p<0,05$). Auch bei ihrer Studie konnten sie keine signifikante Veränderung hinsichtlich der uPA-Konzentration in beiden Tumorgeweben feststellen. Mayerhofer et al. (1996) fanden in 33 Metastasen (davon 13 Lymphknotenmetastasen) signifikant hohe PAI-1 Konzentrationen im Vergleich zu den primären Mammakarzinomgeweben.

Weitere Untersuchungen bei anderen bösartigen Malignomen und deren Metastasen zeigen ein vorerst unklareres Bild. So war die PAI-1 Konzentration in den Lebermetastasen von Patienten mit einem Colorectalkarzinom signifikant höher als im Primärtumor. Im Gegensatz dazu war die uPA-Konzentration und die uPA-Aktivität in den Lebermetastasen niedriger (Sier et al. 1994). Diese Ergebnisse sind mit den gewonnenen Daten kongruent. Untersuchungen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigten jedoch keine unterschiedliche Ausprägung für uPA und PAI-1 in den Metastasen. Sowohl die uPA als auch die PAI-1 Konzentrationen waren in den Metastasen signifikant höher als in den primären Ovarialkarzinomen (Schmalfeld et al. 1995). Auch bei den Knochenmetastasen von Patienten mit Prostatakarzinom maßen Kirchheimer et al. signifikant höhere uPA-Aktivität im Vergleich zum Primärtumor (1985) (Tabelle 6). Ferner kommen in den Lymphknotenmetastasen von Adenokarzinom uPA-positive Zellen häufiger vor als im Primärtumor der Lunge (Takeshi et al. 1991).

Als eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Beobachtungen der Plasminogenfaktoren uPA und PAI-1 in den Metastasen der verschiedenen Malignomen im Vergleich zu den Primärtumoren wären zum einen die unterschiedliche Metastasierungsart und zum anderen das unterschiedliche Tumorwachstum zu nennen. Das Mamma- und das Kolonkarzinom metastasiert hauptsächlich hämatogen und/oder lymphogen. Dabei müssen Tumorzellen den Transport im Blutkreislauf überwinden, ohne von der Immunabwehr vernichtet zu werden, und sich dann an den Kapillaren anheften und diese durchwandern, um die Invasion in das Parenchymgewebe des Ziel-Organes zu gewährleisten. Fibrinabsetzungen um die zirkulierenden Tumorzellen und die Bildung eines kleinen Thrombus, bestehend aus Tumorzellen, Thrombozyten und Fibrin verhindern möglicherweise ihre Erkennung und

Vernichtung durch die Killerzellen des Immunsystems, die für die Vernichtung dieser malignen Zellen zuständig sind (Gorelik 1992). Eine überhöhte proteolytische Aktivität, wie die Funktion von uPA zu einer falschen Zeit, könnte nicht vorteilhaft für die Tumorzellen im Mikrothrombus sein. Dies könnte die unterschiedliche Konzentration in den Primärtumoren und den befallenen Lymphknoten, wie in dieser Studie gezeigt, erklären. Die niedrige uPA-Konzentration in den befallenen axillären Lymphknoten könnte die Eigenschaft der zirkulierenden Tumorzellen, die unbeschadet ins Metastasegewebe eingedrungen sind, wiedergeben und somit die „Mikrothrombus-Theorie“ unterstützen (Markus et al. 1983). Abgesehen von der Schutzfunktion ermöglicht die Bildung eines kleinen Mikrothrombus die Lagerung in kleinen Blutgefäßen des Zielorgans (Malone JM et al. 1979).

Das Ovarial- und Prostatakarzinom unterscheidet sich vom Mamma- und Kolonkarzinom durch seine Metastasierungsart. Beim Ovarial- und Prostatakarzinom kommt es zu einer primären lokoregionären Ausbreitung bzw. Metastasierung. Dabei kommt den uPA/PAI-1 Systemen als Proteolysefaktoren eine wichtige Bedeutung bei der lokoregionären Invasion und beim Abbau der extrazellulären Matrix zu (Andreasen et al. 1997). Hierbei erfolgt die Metastasierung nicht durch einen „Mikrothrombus“.

Zusätzlich sollte auch das befallene Wirtsgewebe berücksichtigt werden. Es könnte die Plasminogenfaktoren beeinflussen.

Vergleich Primärtumor - Metastase				
Primärtumor	Metastase	Faktoren	Ergebnis	Zitat
Mammakarzinom	Lymphknoten	uPA/PAI-1	PAI-1 sig. höher in LK	Jänicke et al. 1990
Mammakarzinom	Lymphknoten Hautmetastasen	PAI-1	PAI-1 sig. höher in LK bzw. Hautmetastasen	Mayerhofer et al. 1996
Adenokarzinom der Lunge	Lymphknoten	uPA	uPA in LK sig. höher	Takeshi et al. 1991
Kolorektal- karzinom	Lebermetastasen	uPA/PAI-1	PAI-1 sig. höher in Leber- metastasen	Cornelis et al. 1994
Ovarialkarzinom	Peritoneal- bzw. LK-Metastasen	uPA/PAI-1	uPA und PAI-1 in Peritonealmetastase sig. höher	Schmalfeld et al. 1995

*Tabelle 6:
Vergleich von uPA und PAI-1 Werten im Primärtumor und dessen Metastasen*

6.2 UPA und PAI-1 als Prognosefaktoren für rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit

Bis heute ist der axilläre Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom der stärkste Prognosefaktor für Rezidiv und Überleben (Tumormanual Tumorzentrum München, 2003). Dies zeigte sich auch bereits in unserem Patientenkollektiv. In der Subgruppe mit befallenen axillären Lymphknoten erleiden Patientinnen signifikant ($p < 0,001$) früher ein Rezidiv als in der Vergleichsgruppe mit untersuchten axillären nicht befallenen Lymphknoten. Auch die Gesamtüberlebenszeit war bei Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten signifikant ($p = 0,005$) kürzer als bei Patientinnen mit unbefallenen axillären Lymphknoten. Jedoch sollte darauf hingewiesen werden, dass bei acht Patientinnen in der Subgruppe mit untersuchten unbefallenen axillären Lymphknoten andere befallene Lymphknoten vorhanden waren. Ungeachtet dieses Störfaktors konnten für die rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht noch einmal die Aussagekraft des Lymphknotenbefalls als Prognosefaktor.

Für die Abschätzung des individuellen Risikos reichen der Lymphknotenstatus und andere etablierte klassische Prognosefaktoren (Tumorgröße, Grading, Menopausen-, Steroidhormonrezeptorstatus) nicht aus. Sie geben nicht ausreichend Aufschluss über das Metastasierungspotential der Tumorzellen.

Die Berechnungen der Überlebenszeit wurden mit Hilfe von univariaten Kaplan-Meier-Analysen berechnet. Für uPA und PAI-1 wurden mittels Log-rank-Statistik optimierte Schwellenwerte zur Unterteilung in Hoch- und Niedrigrisikogruppen verwendet.

In der Studie zeigte sich bei Patientinnen mit niedrigerer PAI-1 oder uPA-Konzentration im Primärtumor, verglichen mit dem Schwellenwert, ein Trend für eine längere rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Zahlreiche andere Studien konnten bei hohen uPA und/oder PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor eine signifikant kürzere rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit feststellen (Tabelle 7). Eine mögliche Ursache für die nicht erreichte Signifikanz der Untersuchung ist, verglichen mit anderen Studien, die geringe Patientenzahl und die kürzere Beobachtungszeit. Außerdem zeigten Jänicke et al. (2001) in ihrer ersten Zwischenauswertung der multizentrisch prospektiv randomisierten Therapiestudie („Chemo N0“) eine noch nicht statistisch signifikante Verbesserung des rezidivfreien Überlebens durch die adjuvante Chemotherapie bei Patientinnen mit hohem uPA und/oder PAI-1. Auch in der vorliegenden Studie erhielten

Studien bezüglich der prognostischen Aussagekraft von uPA und/oder PAI-1 beim Mammakarzinom

Arbeitsgruppe	Jahr	Land	Patienten (N0)	Follow-Up Median Monate	Literatur
Duffy et al.	1988	Irland	52 (25)	17	Cancer 62:531
Jänicke et al.	1990	Deutschland	115 (54)	12,5	Fibrinolysis 4:69
Schmitt et al.	1990	Deutschland	115 (54)	12,5	Blood Coag Fibrin 1:695
Jänicke et al.	1991	Deutschland	115 (53)	26	Seam Throm Haemost 17:303
Foekens et al.	1992	Niederlande	671 (273)	48	Cancer Res 52:6101
Jänicke et al.	1993	Deutschland	247 (101)	30	BCRT 24:195
Foekens et al.	1994	Niederlande	657 (273)	48	J Clin Oncol 12:1648
Grohdahl-H. et al.	1995	Dänemark	505 (193)	54	Clin Cancer Res 1:1079
Foekens et al.	1995	Niederlande	1012 (460)	71	Cancer Res 55:1423
Fernö et al.	1996	Schweden	688 (265)	42	Eur J Cancer 32:793
Eppenberger et al.	1998	Schweiz	305 (159)	37	J Clin Oncol 16:3129
Kim et al.	1998	Japan	130 (130)	53	Clin Cancer Res 4:177
Kute et al.	1998	USA	168 (168)	58	BCRT 47:9
Knoop et al.	1998	Dänemark	429 (178)	61	Br J Cancer 77:932
Bouchet et al.	1999	Frankreich	499 (233)	72	J Clin Oncol 17:3048
de Witte	1999	Niederlande	865 (434)	100	Br J Cancer 80:286
Foekens et al.	2000	Niederlande	2780 (1405)	88	Cancer Res 60:636
Ferrero-Pous	2000	Frankreich	488 (226)	120	Clin Cancer Res 6:4745
Harbeck et al.	2001	Deutschland	276 (130)	109	Clin Cancer Res 7:2757
Jänicke et al.	2001	Deutschland	556 (556)	32	JNCI 93:913
Konecny et al.	2001	USA / Deutschland	587 (283)	26	Clin Cancer Res 7:2448
Harbeck et al.	2002	Deutschland	3424 (1736)	83	Cancer Res 62:4617
Harbeck et al.	2002	Deutschland	761 (269)	60	J Clin Oncol 20:1000
Look et al.	2002	europäische Studie	8377 (4676)	79	J Natl Cancer Inst 94:116
Luqmani et al.	2002	Kuwait	145 (72)	48	Oncol Rep 9:645
Bouchet et al.	2003	Frankreich	488 (226)	120	Int J Biol Markers 18:207
Pedersen et al.	2003	Dänemark	164 (164)	102	Eur J Cancer 39:899
Schrol et al.	2003	Dänemark	341 (164)	102	Mol Cell Proteomics 2:164
Cufer et al.	2003	Slovenien	460 (214)	33	J Biol Markers 18:106
Hansen et al.	2003	Dänemark	228 (101)	144	Br J Cancer 88:102
Zemzoum et al.	2003	Deutschland	128 (128)	126	J Clin Oncol 21:1022
Desruisseau et al.	2004	Frankreich	193 (94)	94	Int J Cancer 111:733
Dorssers et al.	2004	Niederlande	2593 (1311)	96	Clin Cancer Res 10:6194
Manders et al.	2004	Niederlande	576 (576)	61	Cancer 101:486
Manders et al.	2004	Niederlande	1119 (594)	59	Cancer Res 64:659
Meo et al.	2004	Italien	196 (196)	65	Int J Biol Markers 19:282
Zhou et al.	2005	Schweiz	56 (56)	52	Int J Biochem Cell Biol 37:1130

Tabelle 7:

Prognostische Aussagekraft von uPA und PAI-1 gemessen in Extrakten des Primärtumorgewebes vom Mammakarzinompatientinnen.

35 Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie. Harbeck et al. (2002) konnte ebenfalls zeigen, dass Patientinnen mit hohen uPA/PAI-1 besonders von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. Somit besteht auch hier die Möglichkeit einer Verbesserung des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens durch die Chemotherapie bei hohen PAI-1 oder uPA-Konzentrationen. Dies kann bei adjuvant systemisch therapierten Patientinnen zu einer Verbesserung der prognostischen Behandlung führen (Harbeck et al. 2001).

UPA und PAI-1 sind nicht nur Prognosefaktoren beim Mammakarzinom, sondern spielen auch eine prognostische Rolle bei Ovarial- (Kuhn et al. 1994), Zervix- (Kobayashi et al.

1994), Blasen- (Hasui et al. 1996), Nieren- (Hoffmann et al. 1996b), Magen- (Nekarda et al. 1994 b) und Kolorektalcarcinomen (Verspaget et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die prognostische Aussagekraft der PAI-1-Konzentrationen in den axillären Lymphknoten im Hinblick auf die rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit untersucht. Es wurden zur Unterscheidung in Hoch- oder Niedrigrisikogruppen „cutoff“ Werte verwendet. Dabei erlitten im Gesamtkollektiv Patientinnen mit hohen PAI-1 Konzentrationen in den axillären Lymphknoten signifikant früher ein Rezidiv. Für die Gesamtüberlebenszeit zeigte sich im Gesamtkollektiv bei Patientinnen mit niedrigeren PAI-1 Konzentrationen in den axillären Lymphknoten ein Trend für ein verlängertes Gesamtüberleben. Es zeigte sich jedoch keine Signifikanz. Auch in der Subgruppe der Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten zeigte sich ein Trend für eine längere rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit bei niedrigen PAI-1 Konzentrationen im axillären Lymphknoten.

Die Überprüfung der prognostischen Aussagekraft der uPA-Konzentration in den Lymphknoten wurde nicht durchgeführt, weil in den befallenen axillären Lymphknoten signifikant ($p < 0,001$) niedrigere uPA-Konzentrationen als im korrespondierenden Primärtumor gemessen wurden. Eine Einteilung in Hoch- und Niedrigrisiko konnte somit nicht erfolgen.

Solomayer et al. beobachteten bei Mammakarzinompatientinnen mit immunzytologisch nachgewiesener uPA-Expression auf Knochenmarkzellen eine signifikant kürzere metastasenfreie Zeit verglichen mit Mammakarzinompatientinnen mit uPA-negativem Knochenmark (1997). In der Literatur konnten bei Niederschrift dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen bezüglich der prognostischen Aussagekraft der uPA oder PAI-1 in Metastasen vom Mammakarzinom gefunden werden.

Beim Vergleich der PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor mit den PAI-1 Konzentrationen in den korrespondierenden axillären Lymphknoten in ihrer Aussagekraft bezüglich der rezidivfreien und Gesamtüberlebenszeit im Gesamtkollektiv zeigte sich für Patientinnen mit niedrigeren PAI-1 Werten im axillären Lymphknoten als im Primärtumor eine signifikant längere rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit. Auch in der Subgruppe der Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten erlitten Patientinnen mit höheren PAI-1 Konzentrationen im befallenen axillären Lymphknoten als im korrespondierenden Primärtumor signifikant früher ein Rezidiv.

Die Tatsache, dass hohe PAI-1 Konzentrationen sowohl im Primärtumor als auch im Lymphknoten mit einer schlechten Prognose einhergehen, scheint zunächst verwunderlich. Da es die proteolytische Aktivität des uPA hemmt und somit den Abbau der

Extrazellulärmatrix verlangsamt, sollte es eher protektiv wirken. Jedoch ist die biologische Funktion von PAI-1 komplexer. So zeigen neue Untersuchungen, dass die Bindung von PAI-1 an uPA auf dem uPA-Rezeptor zur Internalisierung des uPA-R/uPA/PAI-1-Komplexes führt, und intrazellulär Signaltransduktionsmechanismen (z.B. Proliferation) auslöst (Andreasen et al. 1997). Dies führt zu einer schnellen Vergrößerung des Tumors. Außerdem könnten uPA und PAI-1 eine entscheidende Mitwirkung an der Angiogenese, der Gefäßneubildung des Tumors, haben. Zwei der Wachstumsfaktoren, nämlich der endothelzellspezifische vaskuläre Wachstumsfaktor (VEGF) sowie das HGF (human growth factor) werden durch den uPA aktiviert, was einerseits die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen gewährleisten und andererseits die Invasion in die benachbarten Gefäße erleichtern würde (Montesano et al. 1990; Folkman et al. 1992; Mignatti und Rifkin 1993,). Die hohen PAI-1 Konzentrationen spielen auch bei der Reimplantation der zirkulierenden Tumorzellen eine Rolle (Malone JM et al. 1979). Ferner kann PAI-1 das Tumorgewebe vor der proteolytischen uPA-Aktivität schützen.

6.3 Therapieansätze

Die Tatsache, dass uPA und PAI-1 eine entscheidende Funktion bei Invasion und Metastasierung der Tumorzellen übernehmen (Andreasen et al. 1997), eröffnet neue Ansätze für eine Rezidivrisiko adaptierte und weniger nebenwirkungsvolle Therapie. Die Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO), sowie das Tumorzentrum München berücksichtigen in ihren Therapieleitlinien über das Mammakarzinom die neuen Daten zu uPA und PAI-1 (Tumormanual, Tumorzentrum München 2005). Besonders Patientinnen mit unbefallenen Lymphknoten könnten von den uPA und PAI-1 Messungen im Primärtumor profitieren. Die Messung der uPA und PAI-1 Konzentration im Primärtumor in dieser Subgruppe ermöglicht eine Einteilung in Hoch- und Niedrigrisiko bezüglich des Rezidivs und eine individuell angepasste Chemotherapie (Jänicke et al. 2001; Harbeck et al. 2001b). Zudem profitieren Patientinnen mit erhöhtem uPA/PAI-1 sogar signifikant besser von einer adjuvanten Chemotherapie und weisen eine verlängerte rezidivfreie Überlebenszeit auf als Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1 (Harbeck et al. 2004). Überdies zeigten Foekens et al und Jänicke et al. (1994,1995), dass Patientinnen mit erhöhten uPA und/oder PAI-1 im Primärtumor einen schlechteren Nutzen von einer palliativen endokrinen Therapie mit Tamoxifen haben als Patientinnen mit niedrigeren Werten.

In der vorliegenden Arbeit konnten auch anhand von PAI-1 Konzentrationen in den axillären Lymphknoten prognostische Aussagen über die rezivfreie und Gesamtüberlebenszeit gemacht werden. Patientinnen mit höherem PAI-1 Konzentrationen in axillären Lymphknoten als im Primärtumor erlitten signifikant früher ein Rezidiv. Hier handelt es sich also um besonders gefährdete Patientinnen. Ob diese ausreichend von der konventionellen Systemtherapie (z.B. Chemotherapie, endokrine Therapie) profitieren ist nicht bekannt.

Aufgrund seiner Schlüsselrolle bei Invasion und Metastasierung ist das uPA/PAI-1 System auch als Zielstruktur für neue tumorbiologische Therapien interessant (Schmitt et al. 2000). Daher wurde auch an der Möglichkeit gearbeitet, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen u.a. durch Antikörper oder Antagonisten gegen uPA-Rezeptoren zu verhindern. Ossowski et al. untersuchten 1991 in einem Experiment, inwieweit eine Hemmung von uPA durch uPA-Antikörperinjektion in mit menschlichen Plattenepithelkarzinomzellen (HEp3) induzierten Mäusen möglich ist. Dabei konnte die lokale Tumorausbreitung gehemmt werden, auf die Metastasierung jedoch übten die Antikörper keinen Einfluß aus. Eine weitere Gruppe zeigte, dass durch Blockade der uPA-Rezeptoren die metastatische Kapazität von menschlichen PC3-Prostatakarzinomzellen in vitro verringert werden kann (Crowley et al. 1993). Durch Neuentwicklung eines niedermolekularen Serin-Proteasen Inhibitors WK-UK1, ein Derivat aus 3-Aminophenylalanin in L-Conformation, konnten erstaunliche Fortschritte erzielt werden (Stürzenbecher et al. 1999). Ertongul et al. berichteten 2004 von einer Reduzierung der Tumorzellinvasion von bis zu 50% in vitro bei HNO-Karzinomen und Zervixkarzinomen nach einer Behandlung mit WK-UK1. In einer Studie von Buddy et al. (2005) konnte in vivo an Ratten mit Brustkrebs nach Verabreichung des WK-UK1 eine deutlich signifikante Größenabnahme des Primärtumors sowie eine verminderte Metastasierung beobachtet werden. Dabei wurden keine schweren Nebenwirkungen wie bei herkömmlichen Zytostatikatherapien beobachtet. Zur Zeit laufen klinische Studien der Phasen I und II mit WX-UK1 in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Capecitabine an Patienten mit soliden Tumoren (Phase I) und an Brustkrebspatientinnen (Phase II) am Fox Chase Cancer Center (www.Wilex.com).

Auch mit Hilfe von PAI-1 könnten neue Ansatzpunkte für tumorbiologische Therapiemöglichkeiten gewonnen werden. Durch eine gezielt provozierte überhöhte PAI-1 Sezernierung aus der Tumorzelle oder Nachbarzelle könnte die uPA-Aktivität vermindert werden. Bei mit Prostatakarzinomzelllinien PC3 infizierten Nacktmäusen führte PAI-1 zu einer signifikanten Verminderung des Tumorwachstums und der Metastasierung (Soff et al. 1995). In einer weiteren Studie wurden Fibrosarkomzellen (HAT 1080) in vitro mit einem

vorbehandelten Adenovirus, das die Zelle zur vermehrten PAI-1 Produktion anregt, infiziert. Mit diesen Zellen wurden dann Mäuse beimpft. In Abhängigkeit von der durch die Genveränderung verursachten Erhöhung der PAI-1 Dosis reduzierte sich die Häufigkeit der Lungenmetastasen (Praus et al. 1999).

Diese Arbeiten verdeutlichen die Durchführbarkeit der Interaktion mit dem Plasminogensystem und ihren Nutzen als Therapieform. Mit Hilfe neuer Grundlagen und Erkenntnisse könnten die Ansatzpunkte erweitert und eine gezielte Bekämpfung der Tumorzellmetastasierung ermöglicht werden.

7 Zusammenfassung

Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, uPA, und sein Inhibitor Typ 1 sind am Abbau der Extrazellulärmatrix bzw. der Basalmembran beteiligt und befähigen die Zelle zur Adhäsion, Migration und mittels interner Signaltransduktion zur Proliferation. Dadurch ermöglichen sie Invasion, Metastasierung und Wachstum der Tumorzellen.

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten die prognostische Aussagekraft beider Faktoren bezüglich der rezidivfreien und Gesamtüberlebenszeit beim primären Mammakarzinom belegen. Patientinnen mit hohen uPA- und/oder PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor erleiden häufiger ein Rezidiv und versterben häufiger an ihrer Erkrankung.

In der vorgelegten Arbeit wurde bei 73 am Mammakarzinom erkrankten Patientinnen die uPA- und PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor und in einem korrespondierenden befallenen bzw. unbefallenen axillären Lymphknoten mit Hilfe eines Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA) gemessen. Das gesamte Kollektiv wurde in Abhängigkeit vom axillären Lymphknotenbefall in zwei Subgruppen unterteilt.

Beim Vergleich der PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor der Patientinnen in den beiden Subgruppen konnte kein signifikanter Unterschied berechnet werden. Dem entgegen wurden in befallenen Lymphknoten signifikant ($p < 0,001$) höhere PAI-1 Konzentrationen gemessen als in unbefallenen Lymphknoten. Ein Vergleich zwischen Primärtumor und Lymphknoten zeigte, dass im Gesamtkollektiv ($p = 0,014$) und in der Subgruppe der Patientinnen mit unbefallenen Lymphknoten ($p < 0,001$) signifikant höhere PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor gemessen wurden als in den Lymphknoten. In der Untergruppe von Patientinnen mit befallenen Lymphknoten hingegen präsentierte sich statistisch kein signifikanter Trend für höhere PAI-1 Konzentration in den Lymphknoten als im Primärtumor.

Bezüglich der uPA-Konzentration im Primärtumor wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Subgruppen gefunden. In befallenen Lymphknoten konnten höhere uPA-Konzentrationen gemessen werden als in den unbefallenen, dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Im Gesamtkollektiv und in beiden Subgruppen (Patientinnen mit befallenen Lymphknoten und Patientinnen mit unbefallenen Lymphknoten) wurden in den Primärtumoren signifikant höhere uPA-Konzentrationen beobachtet als in den Lymphknoten.

Im Hinblick auf den klinischen Verlauf der Erkrankung in Abhängigkeit von der uPA und PAI-1 Konzentration im Primärtumor zeigte sich ein Trend für längere rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeiten bei niedrigen Werten. Im Gesamtkollektiv erlitten Patientinnen mit niedrigeren PAI-1 Konzentrationen in den Lymphknoten signifikant seltener ein Rezidiv als Patientinnen mit höheren PAI-1 Konzentrationen ($p=0,002$). In der Subgruppe der Patientinnen mit befallenen axillären Lymphknoten zeigte sich ein kürzeres rezidivfreies Intervall bei Patientinnen mit höheren PAI-1 Konzentrationen (cutoff optimiert: 6,58 ng/mg Protein) in den befallenen Lymphknoten. Eine Signifikanz wurde mit $p=0,059$ verfehlt.

Beim Vergleich der PAI-1 Konzentrationen im Primärtumor mit den PAI-1 Konzentrationen in den korrespondierenden Lymphknoten im Hinblick auf die rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit zeigte sich im Gesamtkollektiv, dass Patientinnen mit höheren PAI-1 Konzentrationen in den korrespondierenden Lymphknoten als in den Primärtumoren signifikant ($p<0,001$) früher ein Rezidiv erlitten und auch signifikant ($p=0,005$) früher verstarben. Auch in der Subgruppe mit befallenen Lymphknoten erlitten Patientinnen mit höheren PAI-1 Konzentrationen in den korrespondierenden Lymphknoten als in den Primärtumoren signifikant ($p=0,031$) früher ein Rezidiv.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei den Mammakarzinompatientinnen unterschiedliche Konzentrationen an uPA und PAI-1 in den befallenen axillären Lymphknoten beobachtet wurde. Während sich die PAI-1 Konzentrationen in den befallenen axillären Lymphknoten im Vergleich zu ihren Primärtumoren durchschnittlich erhöhen, vermindern sich die uPA-Konzentrationen in denselben Lymphknoten signifikant. Zudem gingen höhere PAI-1 Konzentrationen im Lymphknoten als im Primärtumor mit einer signifikant verschlechterten Prognose einher. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse der Grundlagenforschung, dass PAI-1 und uPA bei der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen. Dies eröffnet bei der Behandlung der Patientinnen mit Mammakarzinom neue Therapiemöglichkeiten. Durch gezielte Therapie am uPA und/oder PAI-1 könnte die Metastasierung und somit ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert werden.

8 **Literaturverzeichnis**

Andreas PA, Kjöllner L, Christensen L, Duffy MJ: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int. J Cancer* 72:1-22, 1997

Asted B, Holmberg L: Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature (Lond)*, 261:595-597, 1976

Bindahl AK, Hammoud M, Shi WM, Wu SZ, Sawaya R, Rao JS: Prognostic significance of proteolytic enzymes in human brain tumors. *J. Neurooncol.* 22:101-110, 1994

Bouchet C, Hacene K, Martin PM, Becette V, Tubiana-Hulin M, Lasry S, Oglobin J, Spyratos F: Dissemination index based on plasminogen activator system components in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 17:3048-3057, 1999

Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63:181, 1989

Clark GM, McGuire W: Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 15:20-25, 1988

Crowley CW, Cohen RL, Lucas BK, Liu G, Shuman MA, Levinson AD: Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 90:5021-5025, 1993

Cubellis MV, Wun TC, Blasi F: Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J.* 9:1079-1085, 1990

Cufer T, Borstnar S, Vrhovec I: Prognostic and predictive value of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitors PAI-1 and PAI-2 in operable breast cancer. *Int J Biol Markers*, 18:106-115, 2003

Danö K, Andreasen PA, Grøndal-Hansen K, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L: Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44:139-266, 1985

Diaz-Cano S J, Funke I, Schraut W, Pikarsy E, Peretz T, Braun S Schlimok G, Pantel K N
Engl J: Med 2000; 343:577-578, 2000

Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lunen HJ: Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast cancers. *Cancer* 62:531-533, 1988

Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennely JJ, Andreason P: Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.* 50:6827-6829, 1990

Duffy MJ: Urokinase-type plasminogen activator and malignancy. *Fibrinolysis* 7:295-303, 1993

Duffy MJ: Protease as prognostic marker in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2:613-618, 1996

Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW: 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, 1992

Ellis V, Scully F, Kakkar VV: Plasminogen activation initiated by single chain urokinase-type plasminogen activator. Potentiation by U937 monocytes. *J. biol. Chem.* 264:2184-2188, 1989

Ellis V, Dano K: The urokinase receptor and the regulation of cell surface plasminogen activation. *Fibrinolysis* 6, suppl. 4:27-34, 1992

Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppi JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmitt M, Foekens JA, Eppenberger-Castori S: Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 16:3129-3136, 1998

Fernö M, Bendahl PO, Borg A, Brundell J, Hirschenberg L, Olsson H, Killander D: Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay. *Europ. J Cancer* 32A:793-801, 1996

Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Kramer MD, Jänicke F, Klijn JGM: Plasminogen aktivator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J clin. Oncol.* 12:1648-1658, 1994

Foekens JA, Look MP, Peters HA, Peters HA, van Putten WL, Portengen H, Klijn JG: Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87:751-756, 1995

Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brunner N, Janicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putter WL, Klijn JG: Urokinase system of plasminogen activator and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 60:636-643, 2000

Ganesh S, Sier CFM, Griffioen G, Vloedgrafen H, de Boer A, Welvaart K, van de Velde C, van Kieken J, Verheijen J, Lamers C, Verspaget HW: Prognostic relevance of plasminogen activator and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Res.* 54:4065-4071, 1994

Goldhirsch A, Wood W C, Gelber R D G, Coates A S, Thürlimann B, Senn H-J: Meeting Highlights: Updated International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *JCO* 3357-336, 2003

Gorelik E: Protective effect of fibrin on tumor metastasis. *Fibrinolysis* 6 (Suppl 1):35-38, 1992

Goretzki L, Schmitt M, Mann K, Calvete J, Chucholowski N, Kramer M, Günzler WA, Jänicke F, Graeff H: Effective activation of the pro-enzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett.* 297:112-118, 1992

Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brünner N, Mouridsen HT, Danö K, Blichert-Toft M: 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, 1993

Grondahl-Hansen J, Peters HA, van Putten WL, Look MP, Paappot H, Ronne E, Dano K, Klijn JG, Brunner N, Foekens JA. Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10:1079-1087, 1995

Hansen S, Overgaard J, Rose C, Knoop A, Laenkholm AV, Andersen J, Sorensen FB, Andreassen PA. Independent prognostic value of angiogenesis and the level of plasminogen activator inhibitor type 1 in breast cancer patients. *Br J Cancer* 88:102-108, 2003

Harbeck N, Abdulsalam A, Jänicke F. Clinical relevance of the tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at the time of primary therapy: A review. *Onkologie* 20: 387-392, 1997

Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Henselman B, Kuhn W, Ulm K, Jänicke F, Höfler H, Graeff H, Schmitt M: Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer. *Anticancer Res.* 18:2187-2198, 1998

Harbeck N, Dettmar P, Thomas C, Berger U, Ulm K, Kates R, Hofler H, Janicke F, Graeff H, Schmitt M: Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: six-year median follow-up. *Br J Cancer* 80:419-426, 1999a

Harbeck N, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt M: 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. Treatm.* 1314:1-11, 1999b

Harbeck N, Krüger A, Sinz S, Kates RE, Thomsen C, Schmitt M, Jänicke F: Clinical Relevance of the Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 – a Multifaceted Proteolytic Factor. Review Article. *Onkologie* 24:238-244, 2001

Harbeck N, Alt U, Krüger A, Berger U, Thomssen C, Jänicke F, Kates R, Schmitt M. Prognostic impact of proteolytic factors (uPA, PAI-1 cathepsins B, D, L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 7:2757-2764, 2001b

Harbeck N, Kates R, Schmitt M: Clinical relevance of invasion factors uPA and PAI-1 for individualized therapy decision in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 20:1000-1009, 2002

Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, Kruger Am Kiechle M, Janicke F, Schmitt M, Foekens JA: Enhanced benefit from adjuvant systemic chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to uPA and PAI-1 (n=3424). *Cancer Res* 62:4617-4622, 2002

Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C, Look M P, Foekens J A: Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor Type 1 Predict Disease Outcome and Therapy Response in Primary Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 5:348-352, 2004

Hasui Y, Marutsuka K, Suzumiya J, Kitada S, Osada Y, Sumiyoshi A: The content of urokinase-type plasminogen activator as a prognostic factor in bladder cancer. *Int. Cancer* 50:871-873, 1992

Hasui Y, Marutsuka K, Asada Y, Osada Y: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 47:34-37, 1996

Hoffmann R, Lehmer A, Buresch M, Hartung A, Ulm K: Clinical relevance of urokinase plasminogen activator, its receptor, and its inhibitor in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 78:487-492, 1996

Hoffmann R, Lehmer A, Hartung R, Robrecht C, Buresch M, Grothe F: Prognostic value of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in renal cell cancer. *J Urol.* 155:858-862, 1996b

Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T: The activation of prourokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J. Biol. Chem.* 261:3486-3489, 1986

Jänicke F, Schmitt M, Hafter R, Hollrieder A, Babic R, Ulm K, Gössner W, Graeff H: Urokinase-type Plasminogen Activator (u-PA) Antigen is a Predictor of Early Relapse in Breast Cancer. *Fibrinolysis* 4:69-73, 1990

Jänicke F, Schmitt M, Graeff H: Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin Thromb Hemostasis* 17: 303-312, 1991

Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H: Urokinase plasminogen activator (u-PA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 24:195-208, 1993

Jänicke F, Thomssen C, Pache L, Schmitt M, Graeff H: Urokinase (uPA) and PAI-1 as selection criteria for adjuvant chemotherapy in axillary node-negative breast cancer patients. *Prospectts in Diagnosis and Treatment of Cancer*. Amsterdam: Elsevier Science 207-218, 1994

Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M, for the German Chemo No Study Group. Randomized adjuvant therapy trial in high-risk lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type I. *J Natl Cancer Inst* 93 (12):913-920, 2001

Kim SJ, Siba E, Kobayashi T, Yayoi E, Furukawa J, Takatsuka Y, Shin E, Koyama H, Inajia H, Takai S: Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (PA), PA inhibitor type-1 and tissue-type PA antigen levels in node-negative breast cancer: a prospective study on multicenter basis. *Clin Cancer Res.* 4:177-182, 1998

Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M, Günzler WA, Jänicke F, Graeff H: Catepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *J Biol. Chem.* 266:5147-5152, 1991

Kobayashi H, Fujishiro S, Terao T: Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer Res.* 54:6539-6548, 1994

Konecny G, Untch M, Arboled J, Wilson C, Kahlert S, Boettcher B, Felber M, Beryt M, Lude S, Hepp H, Pegram M: HER-2/neu and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 7:2448-2457, 2001

Kuhn W, Pache L, Schmalfeldt B, Dettmar P, Schmitt M, Jänicke F, Graeff H: Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical and platinum-based chemotherapy. *Gynecol. Oncol.* 55:401-409, 1994

Kute TE, Grondahl-H, Shao SM, Long R, Russek G, Brunner N: Low cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols defines a group of nodal negative breast cancer patients with low risk of recurrence. *Breast Cancer Res. Treat* 47:9-16 1998

Knoop A, Andreasen PA, Andersen JA, Hansen S, Laenkholm AV, Simson AC, Andersen J, Overgaard J, Rose C.: Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 77: 932-940, 1998

Lauffenburger D: Making connections count. *Nature* 383:390-391, 1996

Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Brünner N, Kates R, Ferno M, Eppensberger S, Spyrtos F, Thomssen C, Sweep CGJ, Peyrat JP, Martin PM, Blankenstein MA, Magdelenat H, Quillien-Pouvreau V, Daver, Ricolleau G, Dexanbichler G, Cufer T, Bendahl PO, Lisboa B, Ulm K, Christensen IJ, Meijer-van Gelder ME, Fiets E, Manders P, Broet P, Romian S, Windbichler G, Borstnar S, Beex LVRM, Jänicke F, Klijn JGM, Eppenberger U, Schmitt M, Foekens JA: Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Typ Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *J Natl. Cancer Inst.* 94:116-128

Malona JM, Wangenstein SL, Moore WS, Keown K: The fibrinolytic system. A key to tumor metastasis? *Ann Surg* 190:342-349, 1979

Markus G, Camiolo SM, Kohga S, Madeja JM, Mittelman A: Plasminogen activator secretion of human tumors in short-term organ culture including a comparison of primary and metastatic colon tumors. *Cancer Res.* 43:5517-5525, 1983

Mayerhofer K, Stolzlechner J, Yildiz S, Haider K, Heinzl H, Jakesz R, Pecherstorfer M, Rosen H, Sevelde P, Zeillinger R, Speiser P: Plasminogen activator inhibitor1 and prognosis in breast carcinoma. *Geburtshilfe Frauenheulkd.* 56(1):23-7, 1996

Meo S, Dittadi R, Pelose L, Gion. The prognostic value of vascular endothelial growth factor, irokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in node-negative breast cancer. *Int J Biol Markers.* 19(4):282-8, 2004

Mignatti P, Rifkin DB: Biology and Biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73:161-195, 1993

Montesano R, Pepper MS, Mohlenstein U: Increased proteolytic activity is responsible for aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T-oncogene. *Cell* 62:435-445, 1990

Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons P, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP, Sheahan K: Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Duke's B colorectal cancer. *Lancet* 344:583-584, 1994

Nekarda H, Siewert J, Schmitt M, Ulm K: Tumor-associated proteolytic factors u-PA and PAI-1 and survival in totally resected gastric cancer. *Lancet* 343:117, 1994

Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder JD, Fink U, Siewert JR: Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 54:2900-2907, 1994b

Oka T, Ishida T, Nishino T, Sugimachi K: Immunohistochemical evidence for urokinase plasminogen activator in primary and metastatic tumors of pulmonary carcinoma. *Cancer Res.* 51:3522-3525, 1991

Ossowski L, Russo-Payner H, Wilson EL. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator by antibodies: the effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. *Cancer Res.* 51:274-281, 1991

Petersen H, Gröndal-Hansen J, Francis D, Österlind K, Hansen HH, Danö K, Brünner N: Urokinase and plasminogen activator inhibitor type-1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 54:120-123, 1994

Praus M, Wauterickx K, Collen D, Gerard RD: Reduction of tumor cell migration and metastasis by adenoviral gene transfer of plasminogen activator inhibitor. *Gene Ther* 6:227-236, 1999

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H: Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thrombosis Haemostasis* 78: 285-296, 1997

Schmitt M, Wilhelm OG, Reuning U, Jänicke F, Magdolen V: The plasminogen activation system as a novel target for therapeutic strategies. *Fibrinolysis* 14:114-132, 2000

Schmitt M, Harbeck N, Daidone MG, Brynner N, Duffy MJ, Foekens JA, Sweep FC. Identification, validation, and clinical implementation of tumor-associated biomarkers to improve therapy concepts, survival, and quality of life of cancer patients: tasks of the Receptor and Biomarker Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Int J Oncol.* 25(5):1397-406, 2004

Shirasuna K, Saka M, Hayashido Y, Yoshioka H, Sugiura T, Matsuya T: Extracellular matrix production and degradation by adenoid cystic carcinoma cells: participation of plasminogen activator and its inhibitor in matrix degradation. *Cancer Res.* 53:147-152, 1993

Soff GA, Sanderowitz J, Gately S, Verrusio E, Weiss I, Brem S, Kwaan HC: Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest* 96:2593-2600, 1995

Stefansson S, Lawrence DA: The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin $\alpha\beta 3$ binding to vitronectin. *Nature* 383: 441-443, 1996

Stürzenbecher J, Vieweg H, Steinmetzer T, Schweinitz A, Stubbs MT: 3-Aminophenylalanine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett* 1999 9:3147-52

Tumormanual Tumorzentrum München: Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome, 1998

Tumormanual Tumorzentrum München: Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome, 2005

Verspaget HW, Sier CF, Ganesh S, Griffioen G, Lamers CB: Prognostic value of plasminogen activator and their inhibitors in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 31a:1105-1109, 1995

Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Chapman HA: Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273:1551-1555, 1996

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Dr. med. Marion Kiechle für die Möglichkeit, diese Forschungsarbeit an ihrer Klinik durchzuführen.

Meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck, für die sehr gute Unterstützung bei der Verwirklichung der Arbeit.

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt, Leiter der Klinischen Forschergruppe.

Den Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe sowie dem Labor-Personal.

Den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie im Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich bei der Niederschrift dieser Arbeit angeregt und unterstützt haben.

10 Lebenslauf

*14.07.1972	Pülümür / Türkei
Eltern	Mehmet Celik Imos Celik geb. Gül
1978–1980	Grundschule Pülümür / Türkei
1980–1983	Grundschule München
1983–1984	Hauptschule München
1984–1993	Asam-Gymnasium München
9. Juli 1993	Abitur
WS 93/94–SS 94	Studiengang Bauingenieurwesen an der TU München
ab WS 94/95	Medizinstudium an der LMU
WS 94/95–SS96	vorklinischer Studienabschnitt
September 96	Physikum
ab WS 96/97	klinischer Studienabschnitt
August 97	I. Staatsexamen
April 2000	II. Staatsexamen
04–08/2000	1. PJ-Tertial Pneumologie und Onkologie im Krankenhaus München Harlaching
08–12/2000	2. PJ-Tertial Orthopädie am Klinikum Großhadern
12–03/2001	3. PJ-Tertial Allg. Chirurgie an der med. Fak. Uni. Uludag / Türkei
Mai 2001	III. Staatsexamen
11/01- 04/03	Arzt im Praktikum, II. Internistische Abteilung, Krankenhaus Freising
Seit 07/03	Assistenzarzt, Klinikum Passau