

**Klinische Bedeutung der Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 sowie
der HER-2-Genamplifikation und HER-2-Proteinüberexpression
für die Risikogruppeneinstufung beim nodal-negativen Mammakarzinom**

Moushumi Dutta

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität

Klinikum München rechts der Isar

(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. M. B. Kiechle)

**Klinische Bedeutung der Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 sowie
der HER-2-Genamplifikation und HER-2-Proteinüberexpression
für die Risikogruppeneinstufung beim nodal-negativen Mammakarzinom**

Moushumi Dutta

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. F. Fend (schriftliche Beurteilung)
Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 18.05.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.06.2007 angenommen.

*Meinen Eltern Elisabeth und Samresh Dutta,
meinen Schwestern Bidisha und Kavita
&
meinem Mann Shitanshu Uppal*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	Definition und Klassifikation des Mammakarzinoms.....	4
1.2	Epidemiologie des Mammakarzinoms	4
1.3	Prognosefaktoren und therapierelevante Faktoren	7
1.3.1	Definition und Anforderungen an Prognosefaktoren	7
1.3.2	uPA und PAI-1	11
1.3.3	HER-2.....	16
2	ZIELSETZUNG.....	22
3	MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1	Patientinnenkollektiv	24
3.2	Bestimmungsmethoden	26
3.2.1	Biochemische Bestimmung von uPA und PAI-1 mit Enzyme-Linked Immunsorbent Assays (ELISAs).....	26
3.2.2	Bestimmung der HER-2-Genamplifikation durch Fluoreszenz-In-situ Hybridisierung (FISH)	27
3.2.3	Immunhistochemische Bestimmung der HER-2-Proteinüberexpression.....	28
3.3	Statistische Auswertung	29
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Verteilung traditioneller und tumorbiologischer Faktoren.....	30
4.2	Prognostische Aussagekraft der tumorbiologischen Faktoren anhand des rezidivfreien Überlebens (DFS)	31
4.3	Einfluss der tumorbiologischen Faktoren auf das Gesamtüberleben (OS)	35
4.3.1	Univariate Analyse	35
4.3.2	Multivariate Analyse	35
4.4	Risikogruppenabschätzung durch uPA/PAI-1 und HER-2	39
4.4.1	uPA/PAI-1 und HER-2-Genamplifikation	39
4.4.2	uPA/PAI-1 und HER-2-Proteinüberexpression.....	41
5	DISKUSSION.....	43
5.1	Bestimmungsmethoden der tumorbiologischen Faktoren.....	43
5.1.1	ELISA zur Quantifizierung von uPA und PAI-1 aus Frischgewebe.....	43
5.1.2	IHC und FISH sind die bewährten Bestimmungsmethoden von HER-2-Proteinüberexpression und -Genamplifikation im Tumorgewebe.....	44

5.2	Die klinisch unterschiedliche Bedeutung von uPA/PAI-1 und HER-2-Status für den Krankheitsverlauf sowie Auswirkung des Beobachtungszeitraumes auf den Einfluss der Prognosefaktoren.....	45
5.2.1	Informationen aus uPA/PAI-1 und HER-2-Status ergänzen sich	45
5.2.2	Zeitabhängige Varianz der prognostischen Aussagekraft	51
5.3	Fazit und Ausblick.....	52
6	ZUSAMMENFASSUNG	54
7	LITERATURVERZEICHNIS	55
8	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	68
8.1	Abbildungsverzeichnis	68
8.2	Tabellenverzeichnis	70
9	DANKSAGUNG	71
10	LEBENS LAUF	72

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge

AGO	Arbeitsgemeinschaft G ynäkologische O nkologie
AMP	(HER-2-)Gen am plifikation
CISH	Chromogen- In-situ-Hy bridisierung
CMF	Cyclophosphamid M ethotrexat F luorouracil-Chemotherapieschema
DFS	D isease- f ree survival = rezidivfreie Überlebenszeit: Intervall zwischen Primärtherapie und Auftreten von Rezidiv/Metastasen
ELISA	Enzyme- l inked I mmunosorbent Assay
EORTC RGB	R eceptor and B iomarker G roup der E uropean O rganisation for R esearch and T reatment of C ancer
EXP	(HER-2-)Proteinüber exp ression
EZM	extrazelluläre Matrix
FISH	Fluoreszenz- In-situ-Hy bridisierung
HER-2	Kurzform für HER-2/ <i>neu</i> (<i>s. Text</i>)
HRT	H ormone- r eplacement therapy = Hormonersatztherapie
IHC	Immun h istochemie
LOE	L evel of e vidence = Evidenzniveau L evel of e vidence = Evidenzniveau
LRP	LDL-R ezeptor-assoziiertes Lipoprotein
N0	Nodal-negativ = axilläre Lymphknoten zum Zeitpunkt der Primärtherapie nicht von Karzinom infiltriert
OS	O verall survival = Gesamtüberlebenszeit nach Primärtherapie
PAI-1	Plasminogenaktivator I nhibitor T yp 1
TOP2A	T opoiso m erase II α
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ, Urokinase- P lasminogenaktivator
uPAR	u PA- R ezeptor
VN	V itronectin

1 Einleitung

1.1 Definition und Klassifikation des Mammakarzinoms

Der Begriff **Mammakarzinom**, „Brustkrebs“, fasst alle malignen epithelialen Neoplasien der Brust zusammen, die von den Epithelien der Milchgänge (duktales Karzinom) oder von Zellen der lobulären Drüsenendstücke (lobuläres Karzinom) ausgehen. Er beinhaltet auch diverse, viel seltener vorkommende Sonderformen.

Duktale und lobuläre Karzinome können jeweils als **in situ** Karzinome oder **invasive** Karzinome auftreten. Während in situ Tumoren keine Stromainvasion aufweisen, also nicht in das umgebende Bindegewebe einbrechen, haben Zellen eines invasiven Karzinoms die Basalmembran durchbrochen und das umgebende Bindegewebe infiltriert. Naturgemäß weisen letztere einen hohen Malignitätsgrad auf. Die Gruppe der sogenannten Sonderformen besteht aus invasiven Tumoren und beinhaltet neben weiteren v.a. medulläre, tubuläre, papilläre, muzinöse und adenoid-zystische Karzinome. In ihrer Reinform sind sie meist prognostisch günstiger.

Insgesamt ist das **invasiv duktales Mammakarzinom am häufigsten**. Es macht 40-75% aller Malignome der Brustdrüse aus (*Tumorzentrum München, 2005*).

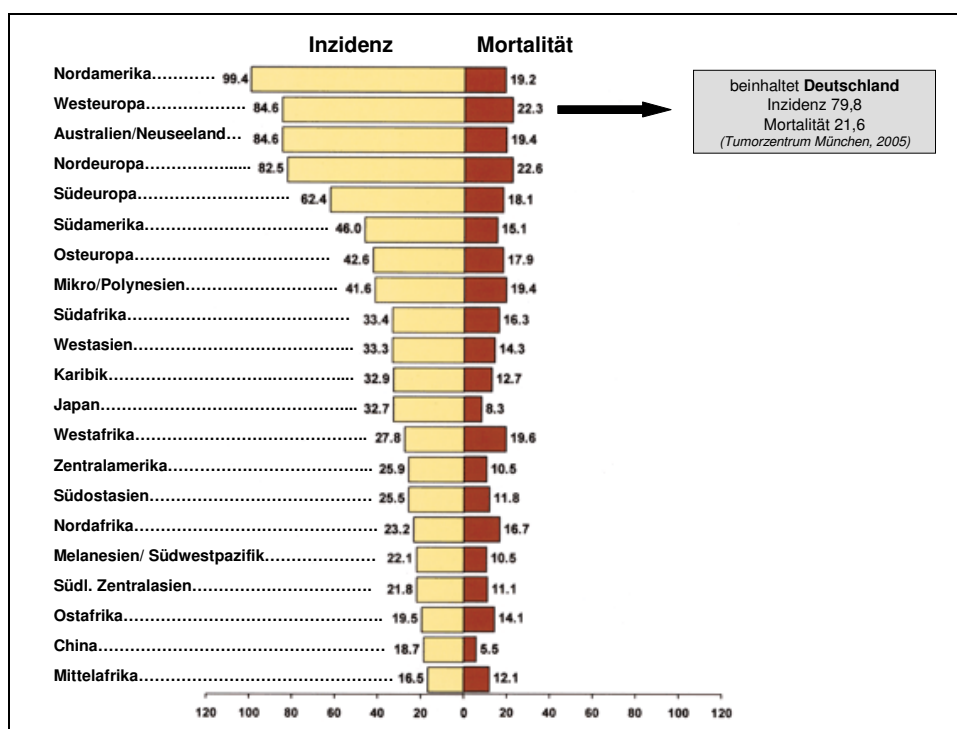
1.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Etwa **jede 8.-10. Frau** in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (*Bühling & Friedmann, 2003*). Es macht ein Viertel aller weiblichen Krebsneuerkrankungen aus und ist die **häufigste Krebstodesursache** unter Frauen (*Tumorzentrum München, 2005*). Weltweit ist Brustkrebs die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau und steht in Westeuropa zusammen mit den kolorektalen Karzinomen an der Spitze aller malignen Neoplasien der Gesamtbevölkerung (*Cancer Research UK, 2002*). Hinsichtlich Inzidenz und Mortalität bestehen erhebliche geographisch-kulturelle Unterschiede (**Abbildung 1**).

Auch Männer können Brustkrebs entwickeln, jedoch liegt die Anzahl der männlichen Neuerkrankungen bei etwa 1% der Inzidenz in der weiblichen Bevölkerung.

Abbildung 1:

Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms weltweit (je 100 000 Einwohner), Krebsstatistik 2002 (modifiziert nach *Parkin et al., 2005*)



Die Hälfte aller Brustkrebs Erkrankungen tritt in den **Industrielländern** auf. Mit Ausnahme von Japan ist die Inzidenz in diesen Ländern sehr hoch, was auch durch das Angebot von Screening-Programmen bedingt sein mag, welche die Detektionsrate dieser Malignome erhöhen. Hauptsächlich aber scheinen Umwelt- und Lifestyle-Faktoren für die Entstehung von Mammakarzinomen verantwortlich zu sein. Dazu gehören v. a. Übergewicht durch mangelnde Bewegung und inadäquate Ernährung, Alkoholmissbrauch, hormonelle Manipulation (orale Kontrazeption, HRT) (*Parkin et al., 2005*) sowie Fortpflanzungs- und Stillverhalten. Diese These wird durch Beobachtungen an Migrantenpopulationen unterstützt (*Dumitrescu & Cotarla, 2005*). Darüber hinaus sind etwa 5-10% der Mammakarzinome erblich bedingt (*Tumorzentrum München, 2005*).

Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Dies sind „*Bedingung(en), die in Bevölkerungsstudien bei der Untersuchung der Pathogenese bestimmter Erkrankungen als krankheitsfördernde Umstände statistisch gesichert wurde(n)...*“ (*Pschyrembel, 1998*). Sind ein oder mehrere Risikofaktoren vorhanden, erhöht sich also das relative Erkrankungsrisiko (RR) eines Individuums im Vergleich zu einer Bezugsgruppe ohne Risikofaktor (*Tumorzentrum München, 2005*).

Tabelle 1:

Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms (*Tumorzentrum München, 2005*; modifiziert nach *Armstrong et al., 2000*)

Risikofaktor	Relatives Risiko
Familiäre Belastung (Verwandtschaft ersten Grades)	1,4-13,6
Alter (≥50 vs. <50 Jahre)	6,5
Gutartige Brusterkrankung: atypische Hyperplasie	4,0-4,4
Alter bei erster Lebendgeburt (>30 vs. <20 Jahre)	1,3-2,2
Alter bei Menopause (≥55 vs. <55 Jahre)	1,5-2
Familiäre Belastung (Verwandtschaft zweiten Grades)	1,5-1,8
Gutartige Brusterkrankung: Biopsie (jeder histologische Befund)	1,5-1,8
Alter bei Menarche <12 vs. ≥12 Jahre	1,2-1,5
Hormonersatztherapie (HRT)	1,0-1,5

Nach entsprechender Diagnostik, einschließlich Staging, und **primärer systemischer oder** befundorientierter **operativer Therapie**, muss je nach OP-Methode u. U. eine adjuvante (postoperative) lokale **Bestrahlung** der Restbrust und/ oder der Achselhöhle erfolgen. Abhängig von der Einschätzung des zukünftigen Krankheitsverlaufes wird zudem eine **adjuvante Systemtherapie** in Form einer Chemotherapie und/ oder endokrinen Therapie durchgeführt (*Tumorzentrum München, 2005*).

Jeder therapeutische Schritt will wohl überlegt sein, da die Krankheit sehr unterschiedlich verlaufen kann: Einige Patientinnen sind nach primärer Therapie geheilt, andere erleiden nach unterschiedlichen Zeitintervallen einen Rückfall mit oft rascher Verschlechterung ihres Gesundheitszustandes und versterben nach kurzer Zeit an der Erkrankung. Variierende Tumorwachstumsraten, Invasions- und Metastasierungsfähigkeit sowie weitere, noch nicht vollständig erfasste Mechanismen, bedingen diese Unterschiede. Tumorbiologische Faktoren, welche diese Funktionen direkt oder indirekt bestimmen, könnten hier als Prognosefaktoren dienen (*Clark, 2000*).

1.3 Prognosefaktoren und therapierelevante Faktoren

1.3.1 Definition und Anforderungen an Prognosefaktoren

Prognosefaktoren sind Messgrößen, verfügbar zum Zeitpunkt der Diagnose oder Operation, die ohne Administration einer adjuvanten systemischen Therapie mit einem erhöhten **Risiko für Rezidivierung oder tumorassozierten Tod** einhergehen und so den natürlichen Verlauf der Tumorerkrankung vorhersagen können.

Parameter zur Einschätzung des **Ansprechens** oder Nichtansprechens einer bestimmten **Therapie** bezeichnet man als **prädiktive Faktoren**.

Diese prognostischen und prädiktiven Faktoren sind in mindestens drei klinischen Situationen bedeutend:

1. bei der Identifizierung von Patientinnen, deren *Prognose* nach lokaler Behandlung (Operation alleine oder Operation und Radiatio) so *gut* ist, dass *durch* eine *adjuvante systemische Therapie keine weiteren Vorteile* entstünden,
2. bei der Identifizierung von Patientinnen, deren *Prognose* bei Anwendung der üblichen Behandlung so *schlecht* ist, dass ggf. *aggressivere Therapieformen* indiziert sind und
3. bei der Bestimmung von Patientinnen, die von *spezifischen Therapieformen* wahrscheinlich profitieren werden oder nicht profitieren werden (nach *Clark, 2000*).

Sie zählen zur Gruppe der Tumormarker. Dies sind Substanzen, die in Gewebe oder Körperflüssigkeiten nachweisbar sind und zur Risikobeurteilung, Diagnose (Screeningmarker), Differenzialdiagnose, Vorhersage von Krankheitsverlauf oder Therapieerfolg, oder zur Überwachung der Krankheitsaktivität herangezogen werden können (*Hayes et al., 1996*).

Zur Beurteilung der klinischen Prognose einer Patientin mit Mammakarzinom wird in den verschiedenen internationalen Konsensus-Gremien übereinstimmend die routinemäßige Bestimmung von (Primär-)Tumorgröße, Nodalstatus, histologischem Tumortyp, Grading und Steroidhormonrezeptorstatus empfohlen. Immer noch gilt der Nodalstatus als stärkster prognostischer Faktor, wobei ein Zusammenhang zwischen der Größe des Primärtumors und dem Befall der axillären Lymphknoten besteht. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten wirkt sich direkt auf das Rezidiv- und Mortalitätsrisiko aus (*Tumorzentrum München, 2005*). Die aktuellen Richtlinien der deutschen

Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO, 2006) empfehlen die in **Tabelle 2** dargestellten etablierten Prognoseparameter.

Tabelle 2:

Etablierte und tumorbiologische Prognosefaktoren für das nodal-positive und nodal-negative Mammakarzinom (nach AGO, 2006)

LOE	Etablierte Prognosefaktoren	Empfehlungsgrad nach AGO		Tumorbiologische Faktoren	LOE
1a	Nodalstatus*	++	+	uPA/PAI-1 (ELISA) [§]	1a
1a	Tumorgroße (pT-Stadium)(2b; +)* [§]			Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark	1a
1a	Metastasen			HER-2-Status (IHC, FISH)*	2b
2a	Anzahl der befallenen Lymphknoten		+/-	Proliferationsmarker [§] (Thymidinlabeling Index TLI, S-Phase Ploidie Ki67)	2b
2a	Grading (2b; ++)* [§]				1b
2a	Östrogen-/ Progesteronrezeptorstatus*				2b
2a	Alter (2b; +) * [§]				2b
2c	Histologischer Tumortyp				
2b	Peritumorale Gefäßinfiltration* [#]	+	-	Nachweis von Gen- oder Proteinprofilen	2b-

- ++ Bestimmung uneingeschränkt empfehlenswert
- + Bestimmung kann durchgeführt werden
- +/- Bestimmung nicht allgemein empfohlen
- kann von Nachteil sein, Bestimmung nicht empfohlen
- von einer Bestimmung wird abgeraten

- * gemäß der 9. St. Gallen Konsensuskonferenz 2005 entscheidungsbildend für adjuvant-systemische Therapie
- § Prognosefaktoren speziell für das **nodal-negative** Mammakarzinom; falls abweichend, LOE / AGO-Empfehlungsgrad jeweils in Klammern
- # besonders Lymphgefäße

Bereits bei Diagnosestellung ist das Mammakarzinom als möglicherweise systemische Erkrankung anzusehen. Zum Zeitpunkt der Primärtherapie sind bei bis zu 40% der Patientinnen Mikrometastasen im Knochenmark zu finden (*Harbeck, 1998a*). Daher soll nach geltenden Richtlinien jede Patientin mit einer Rezidivwahrscheinlichkeit von mindestens 10% innerhalb der ersten 10 Jahre postoperativ routinemässig eine **adjuvante systemische Therapie** erhalten (*Goldhirsch et al., 1998*). Maßgebliches Auswahlkriterium für die angestrebte adjuvante Systemtherapie ist seit der 9. Konsensuskonferenz von St. Gallen 2005 die **Hormonempfindlichkeit** des einzelnen Tumors, da die Wirksamkeit oder Überlegenheit einzelner adjuvanter Therapieregimes vom Ansprechen auf eine endokrine Therapie abhängt.

Für Patientinnen mit **negativem Nodalstatus** (d. h. kein Befall der axillären Lymphknoten zum Zeitpunkt der Primärtherapie = nodal-negative Patientinnen) wird eine adjuvante systemische Therapie angeraten bei

- einer Tumorgröße >2cm und/ oder
- G >1 und/ oder
- peritumoraler Gefäßinvasion und/ oder
- positivem HER-2-Status und/ oder
- negativen Östrogen-/Progesteronrezeptoren (PR) und/ oder
- einem Alter <35 Jahre.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wird auch für Patientinnen mit niedrigem Rezidivrisiko bei gegebener oder fraglicher Hormonempfindlichkeit (v. a. immunhistochemisch <10% der Tumorzellen positiv für Steroidhormonrezeptoren oder negative PR) eine adjuvante endokrine Therapie empfohlen, sofern keine Kontraindikation vorliegt; bei Hormonunempfindlichkeit erfolgt generell die Indikationsstellung zur adjuvanten Chemotherapie. Positiver **HER-2/neu-Status** und **peritumorale Gefäßinvasion** resultieren jeweils in einer Einstufung in die **nächst höhere Risikogruppe** (*Goldhirsch et al., 2005*). Selbst unter Ausschluss dieser beiden Parameter müssten demnach mindestens 90% aller nodal-negativen Frauen eine adjuvant-systemische Therapie erhalten (*Harbeck et al., 2004*).

Dabei entwickeln ohne postoperative systemische Therapie nach historischen Daten nicht mehr als **ein Drittel** dieser Patientinnen zu einem späteren Zeitpunkt **Metastasen**, so dass 70-75% der nodal-negativen Patientinnen allein durch lokoregionale Therapie als geheilt betrachtet werden könnten. Für Patientinnen mit Befall der axillären Lymphknoten zum Zeitpunkt der Primärtherapie gilt dies hingegen nur zu 25-30% (*Allred et al., 1992; McGuire & Clark, 1992; Clark & McGuire, 1988*). Die relativ unflexible Einteilung in prognostische Gruppen anhand der klassischen Prognosefaktoren ist daher für eine so heterogene und unterschiedlich verlaufende Erkrankung unzureichend und gibt keinen Aufschluss darüber, welche der nodal-negativen Patientinnen letztendlich wirklich von der belastenden und toxischen adjuvanten Chemo- und/oder endokrinen Therapie profitieren (*Harbeck, 1998a; Powles, 1997*).

Um eine individuelle, **risikoadaptierte Therapie** zu ermöglichen, forscht man laufend nach weiteren Parametern, die den Krankheitsverlauf der einzelnen Patientin positiv oder negativ beeinflussen. Eine unübersichtliche Vielzahl potenzieller neuer Prognosefaktoren wird in der Literatur diskutiert (*Tumorzentrum München, 2005*). Um Verunsicherung unter Patientinnen und deren behandelnden Ärzten zu vermeiden, muss vor Übernahme eines

neuen Tumormarkers in die klinische Routine dessen Einfluss auf Krankheitsverlauf, Lebensqualität oder Behandlungskosten - und damit die **Bedeutsamkeit des Parameters für die Behandlungsstrategie** - eindeutig **nachgewiesen** werden. Die Bewertung neuer Prognosefaktoren beinhaltet mehrere Schritte (**Tabelle 3**).

Tabelle 3:

Kriterien zur Evaluierung prognostischer Marker (modifiziert aus *Tumorzentrum München, 2005*; modifiziert nach *McGuire, 1991*)

1. Biologische Hypothese
2. Einfache, standardisierte und reproduzierbare Nachweismethode mit Qualitätssicherung
3. Biostatistische Planung der Evaluierungsstudien
4. Überprüfung der Korrelation zu etablierten Faktoren
5. Optimierte Schwellenwerte zur Diskriminierung zwischen Hoch- und Niedrigrisikogruppen
6. Uni- und multivariate Analyse zur Bestimmung der Unabhängigkeit und Gewichtung der Faktoren
7. Unabhängige Validierung der Ergebnisse in einem anderen Patientenkollektiv/ durch eine andere Forschergruppe
8. Klinische Studie/ Therapiestudie, Metaanalyse
9. Überführung in die klinische Praxis

Zum Nachweis der Klinikauglichkeit wird das **TMUGS** (Tumor Marker Utility Grading System) der Amerikanischen Gesellschaft für Klinische Onkologie (ASCO) verwendet. Dieses Bewertungssystem bedient sich u. a. der Evaluierung wissenschaftlicher Studien gemäß ihrem Evidenzniveau (**LOE- Level of evidence, Tabelle 4**) (*Hayes et al., 1996*). Dabei hängt der Nutzen eines prognostischen Markers nicht allein von seiner statistischen Signifikanz ab, sondern auch von dessen prognostischer Stärke, also dem Ausmaß des relativen Risikos für einen ungünstigen Verlauf, welches die „faktorpositive“ Patientengruppe von den übrigen Patienten trennt (*Hayes, 2000*).

Tabelle 4:

Evidenzniveaus (Levels of evidence) zur Einstufung des klinischen Nutzens von Tumormarkern (modifiziert nach *Tumorzentrum München 2005*, nach *Hayes et al., 1996*)

Niveau	Voraussetzungen/ Vorhandene Evidenz
I	Einzelne prospektive Studie mit hoher statistischer Power, entworfen zur Testung des Nutzens eines spezifischen Markers (auch mit therapeutischer Implikation) oder Metaanalyse/ und Überblick über LOE II und III Studien
II	Prospektive Studie mit Tumormarkeranalyse als sekundärem Studienziel (z. B. Therapiestudie)
III	Große retrospektive Studien
IV	Kleine retrospektive Studien, Fallkontrollstudien etc.
V	Kleine Pilotstudien, Korrelationen zu anderen bekannten Faktoren

1.3.2 uPA und PAI-1

Die tumorbiologischen Faktoren **uPA** und **PAI-1** werden im Zusammenhang mit **verschiedenen Krebsarten** als Prognosefaktoren diskutiert. Neben dem Mammakarzinom gelten sie u. a. auch beim Ösophagus-, Magen- und Kolonkarzinom, bei Harnblasen-, Ovarial- und Endometriumkarzinomen sowie bei Gliomen und Sarkomen als Indikatoren für eine schlechte Prognose (*Duffy & Duggan, 2004*).

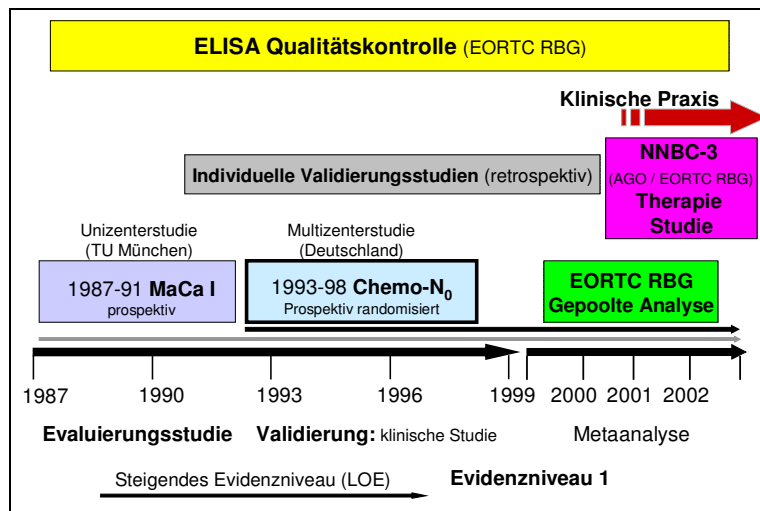
Erste Berichte über den negativen Einfluss einer vermehrten Enzymaktivität oder Expression der **Serinprotease uPA** (urokinase-Typ Plasminogenaktivator) auf das rezidivfreie Überleben von Mammakarzinom-Patientinnen wurden Ende der 80er Jahre veröffentlicht (*Duffy et al., 1988; Jänicke et al., 1989*). Wenig später wurde auch ein ungünstiger Einfluß ihres **Inhibitors PAI-1** (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) auf das krankheitsfreie Intervall beobachtet (*Duffy et al., 1990; Jänicke et al., 1991*). Seitdem haben uPA und PAI-1 alle Entwicklungsstufen zum Prognosefaktor (**Tabelle 3**) durchlaufen (**Abbildung 2**) (*Schrohl et al., 2003; Harbeck et al., 2004*):

1. Die **bedeutende Rolle** der beiden Faktoren bei Tumorinvasion und Metastasierung konnte **in zahlreichen Experimenten nachgewiesen** werden (*Andreasen et al., 1997*).
2. **Standardisierte, qualitätsgeprüfte ELISAs** quantifizieren uPA und PAI-1 in Primärtumor-Extrakten (*Sweep et al., 1998*).
3. - 6. Ein klinischer **Überlebensvorteil** von Patientinnen mit niedrigen Werten vs hohen Werten von uPA/PAI-1 wurde vielfach bestätigt (*Harbeck et al., 2002c*).
- 7., 8. Nachweis und Bestätigung der prognostischen Eigenschaft erfolgten in einer retrospektiven, **gepoolten Analyse** (*Look et al., 2002; Look et al. 2003*) und einer **prospektiv** durchgeführten **randomisierten Multicenter-Therapiestudie** (Chemo N₀) mit nodal-negativen Patientinnen (*Jänicke et al., 2001*).
9. Anders als Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1-Gehalt im Primärtumor und tumorfreien Lymphknoten, welche eine sehr gute Prognose haben, sind Patientinnen mit **hohen uPA/PAI-1-Werten** einem erheblichen **Rezidivrisiko** ausgesetzt, vergleichbar mit dem Befall von drei oder mehr axillären Lymphknoten, und profitieren besonders von einer adjuvanten Chemotherapie (*Jänicke et al., 2001; Harbeck et al., 2002a*). Zusätzlich zur Chemo N₀ Studie konnte in einer großen retrospektiven Studie für die durch uPA/PAI-1 charakterisierten Hochrisikopatientinnen ein **Vorteil durch adjuvante**

Chemotherapie aufgezeigt werden (*Harbeck et al., 2002b*). Jetzt gilt es, u. a. mit Hilfe der NNBC-3 Therapiestudie, die wirksamste Chemotherapie für diese Patientinnengruppe zu bestimmen (*Tumorzentrum München, 2005*). Zudem stellen uPA und PAI-1 vielversprechende Angriffsziele für eine **zielgerichtete Therapie** dar (*Schmitt et al., 2000; Alfano et al., 2005*).

Abbildung 2:

Nachweisprozess des klinisch-prognostischen Nutzens von uPA und PAI-1 (modifiziert nach *Harbeck et al., 2004*)



Im Laufe der **Tumorprogression** können sich Krebszellen verschiedene Eigenschaften aneignen, die ihre Malignität bedingen. Dazu gehört die Fähigkeit, unabhängig von exogenen Faktoren die Tumorzell-Proliferation anzuregen. Die Beeinflussbarkeit der Tumorzellen durch körpereigene Wachstumshemmer und Immunabwehrstoffe nimmt ab und natürliche Apoptosevorgänge werden umgangen. Außerdem beginnt eine kontinuierliche, tumorzellinduzierte Angiogenese, wodurch eine ausreichende Nährstoffzufuhr für das Karzinomwachstum gewährleistet wird (*Hanahan & Weinberg, 2000*).

Proteolyse, abwechselnd **gerichtete Adhäsion** und Loslösung maligner Zellen von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM), sowie Veränderungen des extrazellulären Milieus und **Abbau der EZM** ermöglichen die **Migration** der Karzinomzellen durch das Gewebe (*Dellas & Loskutoff, 2005; Danø et al., 2005*). Diese Vorgänge begünstigen die Invasion von Blut- und Lymphgefäßen und ermöglichen die **Metastasierung**: Nach Anheftung an das Gefäßendothel entfernt von der Primärlokalisation, kann eine Extravasation einzelner Tumorzellen und deren Proliferation zu einer metastatischen Läsion erfolgen (*van Roy & Mareel, 1992*).

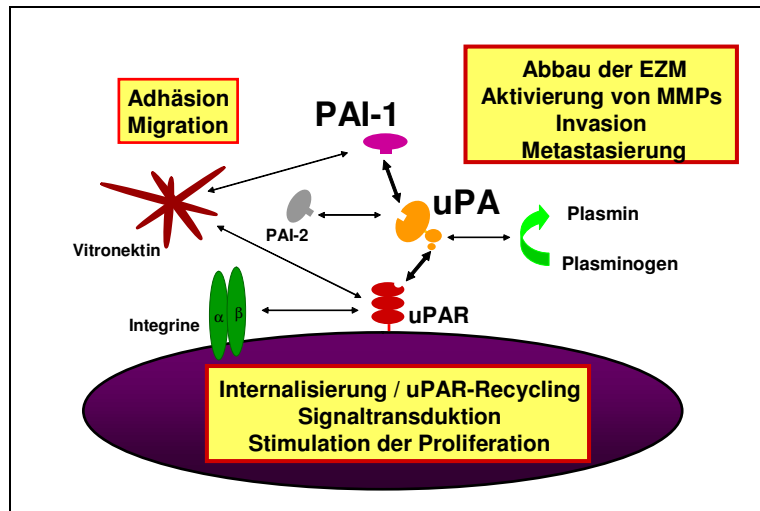
uPA, dessen Rezeptor **uPAR** (Urokinase-Plasminogenaktivator-Rezeptor, CD87) und dessen Inhibitor **PAI-1** werden von benignen Körperzellen gebildet (*Schmitt et al., 1997*) und sind in physiologische Prozesse wie Wundheilung und Immunabwehr involviert (*Blasi, 1999; Alfano et al., 2005*). In malignen Geweben allerdings, können diese Faktoren häufig in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden und in einem optimalen **kritischen Gleichgewicht** Proteolyse, Migration, Adhäsion, Neoangiogenese und damit Gewebsinvasion und Metastasierung entscheidend vorantreiben (*Andreasen et al., 1997; Chazaud et al., 2002; Gutierrez et al., 2000; Liu et al., 1995*). Hierbei stehen fokale Proteolyse und Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM) sowie die Beweglichkeit (Motilität) der Zellen im Vordergrund. Allerdings werden die einzelnen Komponenten des uPA-Systems nicht zwangsläufig von den malignen Zellen selbst, sondern beispielsweise von Stromazellen exprimiert, nachdem eine Induktion durch die Krebszellen stattgefunden hat (*Dellas & Loskutoff, 2005; Danø et al., 2005*).

Nach Spaltung des rezeptorgebundenen, inaktiven Zymogens pro-uPA z.B. durch Plasmin, Kathepsine oder Kallikrein, kann der so **aktivierte uPA** nun seine **proteolytische Funktion** aufnehmen; Hauptsubstrat ist dabei Plasminogen, durch dessen Spaltung **Plasmin** entsteht. Jedoch werden auch verschiedene **Wachstumsfaktoren** aktiviert oder beim proteolytischen **Abbau der EZM** freigesetzt, darunter der Hepatozyten-Wachstumsfaktor/Scatterfaktor HGF/SF, VEGF, Insuline-like GF-1, FGF2 und TGFβ (*Rifkin, 1997; Andreasen et al., 1997; Alfano et al., 2005*). Durch Plasminaktivierung werden nicht nur die **Matrixproteine** Fibrin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Proteoglykane proteolytisch abgebaut, sondern auch **Matrixmetalloproteasen** (MMPs) aktiviert, was darüber hinaus zum Abbau von Kollagen führt.

Die Bindung von **uPA** an **uPAR** regt zudem über unterschiedliche Mechanismen Zellproliferation (*Webb et al., 2001*), Chemotaxis (*Degryse et al., 2001*), Zellmotilität und Adhäsion an (*Schmitt et al., 2000; Kjølner, 2002*) und scheint auch in die Hemmung der Apoptose involviert zu sein (*Ma et al., 2001; Alfano et al., 2005*). **Abbildung 3** veranschaulicht die multifunktionelle Rolle der Systemkomponenten.

Abbildung 3:

Schematische Darstellung der Mechanismen ausgelöst durch uPA- und PAI-1-induzierte Vorgänge. Neben direkt stattfindenden perizellulären Interaktionen wird durch das uPA-System über intrazelluläre Signaltransduktion u. a. auch die Zellproliferation stimuliert (modifiziert nach Harbeck et al. 2004).



Zunächst scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen **PAI-1**, dem Inhibitor des proteolytischen uPA, und einer Verschlechterung der Prognose paradox. Tatsächlich jedoch **wirkt** PAI-1 eher bedarfsgerecht **modulierend**, als insgesamt hemmend auf Proteolyse und Zellmigration (*Durand et al., 2004*). Zudem **modifiziert** PAI-1 die **Signaltransduktion** des uPAR und weiterer Rezeptoren sowie daran gekoppelte Effekte, etwa Mitose und Zellmotilität. Dies geschieht durch die Bindung von PAI-1 an uPAR-gebundenen uPA und die nachfolgende **Internalisierung** (Endozytose) des resultierenden Komplexes [PAI-1-uPA-uPAR] (s. u.). Die Signale des uPAR und anderer an der Endozytose beteiligten Rezeptoren werden so beeinflusst (*Webb et al., 2001*).

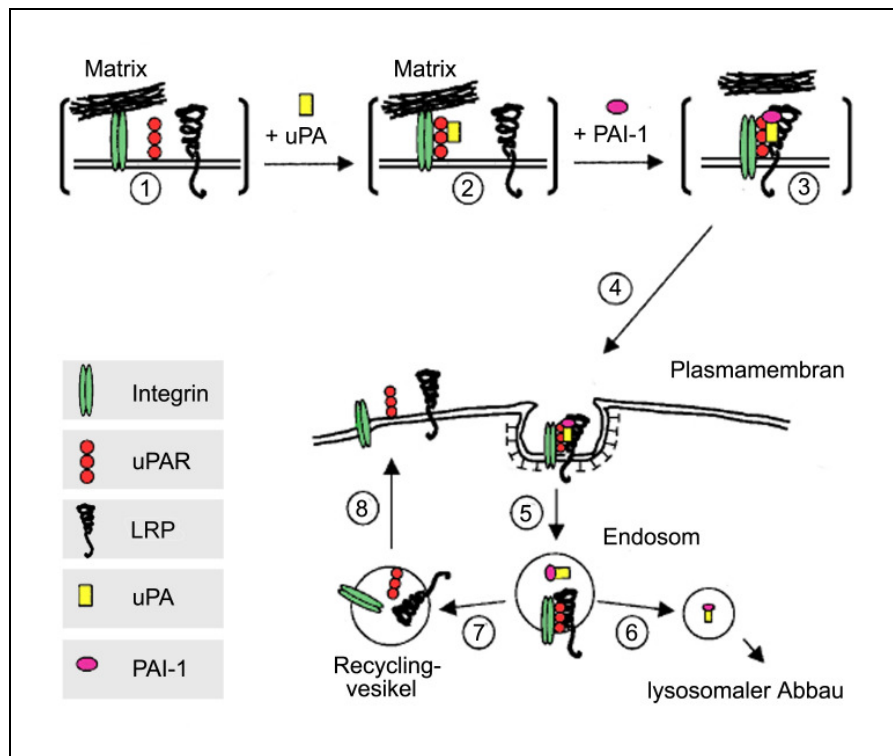
Eine **Adhäsion** von Zellen an das Matrixprotein **Vitronektin** (VN) ist über das Oberflächenprotein uPAR möglich und/ oder auch über andere Adhäsionsrezeptoren, die Integrine. PAI-1 vermag die Bindung von uPAR und $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen an VN unabhängig von seiner inhibitorischen Wirkung auf uPA kompetitiv zu hemmen (*Deng et al., 2001; Andreasen et al., 1997*). Zudem kann PAI-1 *in vitro* durch Bindung an uPA im [PAI-1-uPA-uPAR-Integrin]-Komplex eine **Loslösung** dieses Komplexes von VN bewirken. Die Interaktion zwischen Komplex-gebundenem Integrin ([PAI-1-uPA-uPAR-Integrin]) und VN kann weiterhin durch PAI-1-vermittelte Deaktivierung der Integrine aufgehoben werden. Es findet eine Ablösung der Tumorzelle von Vitronektin und, in geringerem Ausmaß, auch von Fibronektin (FN) und Typ1-Kollagenfasern statt. Weiterhin regt PAI-1 die LRP-(LDL-Rezeptorassoziertes Lipoprotein)-vermittelte **Endozytose** der im Komplex befindlichen Oberflächenproteine an (**Abbildung 4** mit Legende). Diese

stehen dadurch bis zum Rücktransport (Recycling) an die Zelloberfläche für weitere Bindungen mit Bestandteilen der EZM vorübergehend nicht zu Verfügung. uPA und PAI-1 werden in Lysosomen abgebaut (Czekay *et al.*, 2003).

Durch Bindung an aktiven freien oder rezeptorgebundenen uPA reguliert PAI-1 den Abbau der EZM und verhindert möglicherweise durch seine hohe Affinität für Vitronektin (VN) auch dessen Abbau, wodurch eine VN-reiche Stroma als optimales Gerüst für die **Zellmigration** entsteht. Außerdem gibt es Hinweise, dass PAI-1 die **Angiogenese** fördert (Bajou *et al.*, 1998; Bajou *et al.*, 2001; Isogai *et al.*, 2001). Ein weiterer Plasminogenaktivator, der (Gewebetyp-) tPA, ist primär thrombolytisch aktiv und vermag intravasale Emboli aufzulösen. Da PAI-1 auch tPA inhibiert, ist bei hoher PAI-1-Expression ferner eine Beschleunigung der Metastasierung denkbar: Durch reduzierten Abbau von **Tumorzellmikroemboli** in Gefäßkapillaren können so „konservierte“ maligne Zellen zu Tochtergeschwülsten proliferieren (Tsuchiya *et al.*, 1997).

Abbildung 4:

Mechanismen der PAI-1-vermittelten Zellablösung von Matrixproteinen (modifiziert nach Czekay *et al.*, 2003)



1. Integrin, gebunden an Matrixprotein (z.B. VN), uPAR und LDL-Rezeptor-assoziiertes Lipoprotein (LRP) jeweils freistehend an der Zelloberfläche. 2. Aus Zellen freigesetzter uPA bindet an uPAR und initiiert die Komplexbildung aus uPA, uPAR und Integrin [uPA-uPAR-Integrin]. uPAR bindet ebenfalls an VN und verstärkt die Adhäsion. 3. Die Bindung von PAI-1 an den Komplex bewirkt die Loslösung der Zelle von VN und außerdem die Bindung des Komplexes an LRP. 4. LRP-vermittelte Endozytose, 5. Ablösung von [uPA-PAI-1] vom Gesamtkomplex und 6. Transport zum lysosomalen Abbau. 7. Dissoziation von uPAR, Integrin, LRP und 8. Rücktransport an die Zelloberfläche.

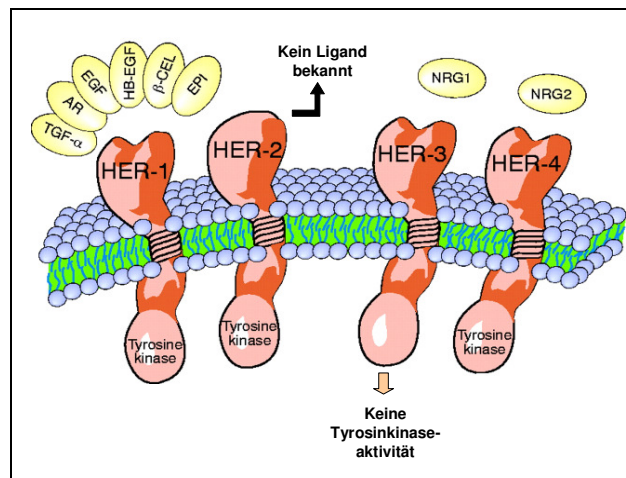
1.3.3 HER-2

Ein weiterer Indikator für den Krankheitsverlauf bzw. Therapieerfolg beim Mammakarzinom, welcher zunehmend an Bedeutung gewinnt, ist das **Proto-Onkogen HER-2**, auch HER-2/*neu* genannt, und dessen Genprodukt, der **HER-2-Rezeptor**.

Als Erste berichteten *Slamon und Kollegen 1987* von einer vergleichsweise **schlechten Prognose** für Patientinnen, deren Tumoren eine **Amplifikation des HER-2/*neu*-Gens** aufwiesen. Dieses Gen, in der Literatur auch *neu* oder *c-erbB-2* genannt, ist auf Chromosom 17, Bande q21.1 lokalisiert und eng verwandt mit dem EGFR-Gen auf Chromosom 7, Bande p12.3-12.1 (*NCBI, 2006 a und b*); das Suffix *-neu* leitet sich vom Neuroglioblastom der Ratte ab. Das HER-2/*neu*-Gen kodiert für das **HER-2/*neu*-Onkoprotein**, den **transmembranären Rezeptor HER-2** mit **Tyrosinkinase-Aktivität**. Er hat ein Molekulargewicht von 185 kDa (*Slamon et al., 1987*) und ist deshalb auch unter dem Namen p185^{HER2} bekannt (*Yarden, 2001*).

Abbildung 5:

Die HER-Rezeptorfamilie (modifiziert nach *Ross et al., 2003*)



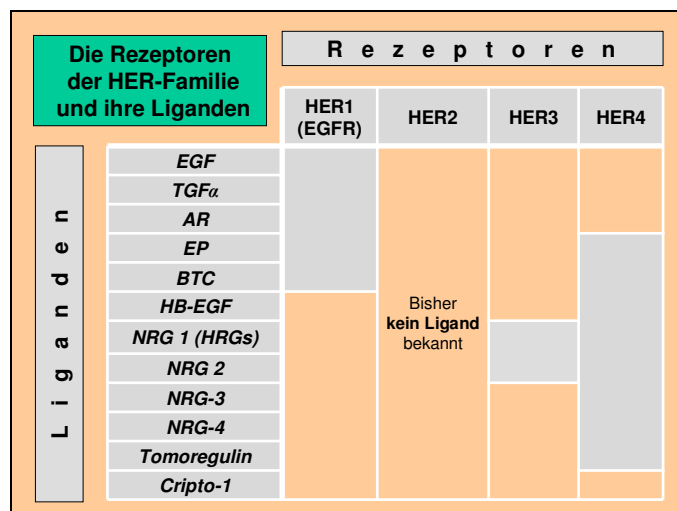
HER-2 (HER-2/*neu* / ErbB2/ p185^{HER2}) gehört zur **ErbB (HER)-Familie (Human Epidermal Growth Factor Receptor)**, einer Gruppe von signalgebenden **Wachstumsfaktorrezeptoren**, bestehend aus den 4 homologen transmembranären Rezeptoren vom Tyrosinkinase-Typ, *HER-1* (c-erbB1=EGFR), ***HER-2*** (c-erbB2), *HER-3* (c-erbB3) und *HER-4* (c-erbB4) (**Abbildung 5**). Physiologischerweise ist die HER-Familie an der **embryonalen Entwicklung** der meisten Körpergewebe beteiligt und trägt in Adoleszenz und Erwachsenenalter zur Differenzierung der Brustdrüse bei (*Albanell & Ross, 2005*).

Die Rezeptoren formen ein komplexes, interaktives intrazelluläres **Signalnetzwerk**, welches sich über unterschiedliche Signalfade, wie z.B. Ras-Raf-MAPK, PI3K-Akt, PLC- γ 1-PKC, Src und STAT, auf Apoptose, Migration, Zellwachstum, Adhäsion, Zelldifferenzierung und Angiogenese auswirkt (Yarden & Sliwkowski, 2001; Albanell & Ross, 2005). Daher sind **Fehlregulationen** innerhalb dieses komplizierten Systems in malignen oder prämaligen Zellverbänden mitverantwortlich für erhöhte Transkriptions- und Proliferationsraten, Invasionsfähigkeit, Zytoskelettveränderungen, Neoangiogenese und Hemmung der Apoptose (Yarden & Sliwkowski, 2001; Konecny et al., 2004a; Ignatoski et al., 2000).

Die intrazelluläre Signaltransduktion wird mit der **Ligandenbindung** an einen der HER-Tyrosinkinase-Rezeptoren eingeleitet. Dieser bildet sodann ein Homo- oder Heterodimer mit einem Rezeptor aus derselben oder einer anderen HER-Gruppe. Das **Rezeptordimer phosphoryliert**, jeweils abhängig von Ligand und Dimerisationspartner, spezifische eigene, intrazellulär gelegene **Tyrosinreste** (Autophosphorylierung), wodurch eine entsprechende **Signaltransduktionskette** aktiviert wird. Der Prozess der Signalgebung wird durch ligandenvermittelte Endozytose des Rezeptordimers beendet (Yarden & Sliwkowski, 2001).

Abbildung 6:

Die Mitglieder der HER-Familie und ihre Liganden (jeweils grau unterlegt; modifiziert nach Albanell & Ross, 2005)



Für den **HER-2** Rezeptor wurde bisher noch **kein** eigener **Ligand** ausfindig gemacht (Abbildung 6). Dennoch ist er der **bevorzugte Dimerisationspartner** innerhalb der HER-Rezeptorfamilie und nimmt als Ko-Rezeptor an der Signaltransduktion teil. Verglichen mit

anderen HER-Dimeren sind HER-2-Heterodimere stabiler und die ausgelösten Signale stärker und nachhaltiger (*Tzahar et al., 1996; Ross et al., 2003*), da die Geschwindigkeit der Liganden-Dissoziation und die ligandeninduzierte Rezeptor-Endozytose vermindert wird. Gleichzeitig ist der Rücktransport (Recycling) der funktionsfähigen Dimerisationspartner (Rezeptoren) an die Zelloberfläche begünstigt, so dass diese sich erneut am Signalnetzwerk beteiligen können. Letzteres gilt besonders für HER-1 (EGFR), dessen Homodimere nach der Endozytose zumeist dem lysosomalen Abbau zugeführt werden (*Lenferink et al., 1998; Yarden & Sliwkowski, 2001*). Diese Eigenschaften tragen maßgeblich zum erhöhten malignen Potenzial HER-2 überexprimierender Zellen bei.

Außer einer Verschiebung der Dimerbildung zugunsten der potenteren HER-2-Heterodimere, kann eine HER-2-Rezeptorüberexpression auch eine spontane, **ligandenunabhängige HER-2-Homodimerisierung** und Phosphorylierung der Tyrosinreste des Dimers mit nachfolgender Signaltransduktion auslösen (*Yarden & Sliwkowski, 2001; Thor et al., 2000*). Dies wird beim duktalem in-situ Karzinom (DCIS) häufiger beobachtet als bei invasiven Karzinomen (*Cardoso et al., 2005*).

Der Anteil der **Mammakarzinome**, welcher eine **HER-2-Genamplifikation** und/ oder **-Proteinüberexpression** aufweist, wird mit **10-34%** angegeben (*Cardoso et al., 2005*). Allerdings wird erstere in unterschiedlichen Studien in bis zu 55% der Mammakarzinome dokumentiert, eine HER-2-Überexpression in bis zu 50% (*Révillion et al., 1998*). Letztere kann durch die Amplifikation des HER-2-Gens oder eine erhöhte Transkriptionsrate bedingt sein (*Yarden, 2001*). Je nach histologischem Tumortyp treten beide zu sehr unterschiedlichen Anteilen auf. Sie sind in extensiven duktalem in-situ Karzinomen (DCIS) am häufigsten, in rein invasiv-lobulären Läsionen hingegen am seltensten (*Dickson & Lippman, 2000; Hanby, 2005*). Eine schwache HER-2-Proteinexpression wird außerdem in benignem Brustgewebe, aber z. B. auch im Myokard nachgewiesen (*Yarden, 2001; Özcelik et al., 2002*). Angesichts einer möglichen Schädigung der Herzmuskelzellen durch Antikörper, die gegen HER-2-Rezeptoren gerichtet sind, wird die beobachtete Potenzierung der Kardiotoxizität bestimmter Chemotherapieregimes durch Addition des HER-2-spezifischen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin[®]) (*Keefe, 2002*) nachvollziehbar.

Neben Malignomen der Brustdrüse sind u. a. auch Ovarial- und orale Karzinome, sowie Lungen-, Pancreas- und Magenkarzinome häufig mit einer HER-2-Genamplifikation oder -Proteinüberexpression assoziiert (*Yarden, 2001; Dickson & Lipman, 2000*).

HER-2-Genamplifikation und HER-2-Proteinüberexpression treten beim Mammakarzinom in Verbindung mit einer Vielzahl prognostisch relevanter Merkmale auf. Dazu gehören **große Tumoren**, ein **schlechter** histologischer **Differenzierungsgrad** (Grading), **negative Hormonrezeptoren**, **Infiltration von venösen Gefäßen** und Lymphgefäßen, **Lymphknotenmetastasen**, **DNA Aneuploidie**, hohe **Zellproliferationsrate**, **p53 Mutation**, **TOP2A Aberration** und vermehrte Expression von **VEGF**. Zudem beeinflussen sie in unterschiedlicher Weise molekulare Biomarker für Proteolyse, Zellmotilität, Tumorinvasion und Metastasierung (*Ménard et al., 2002; Cardoso et al., 2005; Eccles, 2001; Yarden, 2001; Konecny et al., 2004a*).

Darüber hinaus können HER-2-Heterodimere über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase ERK1,2 MAPK den Östrogenrezeptor-Ko-Aktivator AIB1 (SRC-3) und, ligandenunabhängig, Östrogenrezeptoren (ER) selbst aktivieren. In Zelllinien, die gleichzeitig HER-2 als auch AIB1 überexprimieren und damit vermehrt AIB1 und ER aktivieren, rekrutiert Tamoxifen, gebunden an ER, Östrogenrezeptor-Ko-Aktivatoren anstatt wie beabsichtigt Ko-Repressoren. Damit hat Tamoxifen unter diesen Bedingungen im Drüsengewebe der Brust östrogenagonistische Wirkung. Östrogen und Tamoxifen wiederum aktivieren in einem circulus vitiosus EGFR, HER-2 und die ERK1,2 MAPK. Diese Mechanismen sind für die sogenannte **Tamoxifenresistenz** HER-2-positiver Tumore mitverantwortlich und konnten durch Hemmung der HER-Rezeptoren aufgehoben werden (*Shou et al., 2004; Eccles, 2002*).

Während eine prognostische Bedeutung von HER-2 für Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom noch umstritten ist, gilt HER-2 als Indikator für ein gutes Ansprechen auf bzw. die Resistenz gegen bestimmte Formen der adjuvanten Systemtherapie und der Therapie in der metastasierten Situation (*Kapitel 5.2 dieser Arbeit; Ellis, 2004*). Deshalb, und aufgrund der Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]), wird HER-2-positiven Mammakarzinomen sogar der Status einer „eigenen Tumorgattung“ eingeräumt (*Piccart-Gebhart, 2005a*). Der rekombinante, humanisierte monoklonale Antikörper ist gegen die extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptors gerichtet und wirkt u. a. über die beschleunigte Internalisierung mit anschließendem Abbau der Rezeptoren. Die Dimerbildung und nachfolgende Signaltransduktion werden behindert, Zellzyklus, Proliferation und Angiogenese gehemmt. Zudem werden der Angriff der HER-2-überexprimierenden Tumorzellen durch das Immunsystem und, indirekt, die Apoptose angeregt (*Nahta & Esteva, 2003*).

Seit einigen Jahren gehört Trastuzumab bereits zum Behandlungsspektrum des metastasierten Mammakarzinoms (*Slamon et al., 2001*) und wurde angesichts der Erfolge in prospektiven Studien (*Piccart-Gebhard et al., 2005b; Romond et al., 2005*) kürzlich auch für die adjuvante Therapie des invasiven Mammakarzinoms zugelassen und empfohlen (*AGO, 2006; European Medicines Agency, 2006; Nachrichten Medizin, 2006*).

Daher ist eine möglichst akkurate Erfassung des HER-2 Status als Selektionskriterium für eine Trastuzumab-Therapie unabdingbar. Im Laufe der Zeit sind unterschiedliche Methoden der HER-2-Bestimmung entwickelt worden (**Tabelle 5**). Nach derzeitigen Empfehlungen sollen Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) zur Festlegung des HER-2-Status verwendet werden (*Ross et al., 2003*; s. auch Kapitel **5.1.2** dieser Arbeit). Inzwischen ist auch die Chromogen-In-situ-Hybridisierung für die Bestimmung der HER-2-Genamplifikation zugelassen (*Tumorzentrum München, 2005*).

Tabelle 5:

Überblick über verschiedene Bestimmungsmethoden des HER-2-Status im Tumorgewebe (zusammengefasst aus Ross & Fletcher, 1998; Ross et al., 2003)

Methode u. Messgröße	Vorteile	Nachteile	1.Sens. 2.Spez.	Bemerkungen
IHC EXP	<ul style="list-style-type: none"> • Leicht verfügbare Testmethode • Frisch- oder Paraffinschnitte • niedrige Kosten • einfache Aufbewahrung der gefärbten Schnitte • einfaches Lichtmikroskop ausreichend • Möglichkeit der wiederholten Auswertung 	<ul style="list-style-type: none"> • mannigfaltige präanalytische Fehlerquellen[§] • Verwendung diverser Antikörper (monoklonal/ polyklonal) unterschiedlicher Herstellung • Beeinträchtigung des Antigengehaltes* • hohe Subjektivität bei der Auswertung 	<p>1. gut 2. gut</p>	Die Variabilität bei der Beurteilung durch verschiedene Untersucher kann durch quantitative Bildanalyse reduziert werden
FISH AMP	<ul style="list-style-type: none"> • kann automatisiert werden • länger gelagerte Paraffinschnitte verwendbar • geeignet für Feinnadelbiopsien • direkte Gendarstellung • interne Kontrolle[#] • ► objektivere Auswertung • zeitgleiche Beurteilung der Histopathologie und der Tumormorphologie möglich • standardisiertes Verfahren. 	<ul style="list-style-type: none"> • wiederholte Beurteilung nach Aufbewahrung nicht möglich • Fluoreszenzmikroskop benötigt • höhere Kosten • manuelles Scoring zeitaufwendig • Ergebnis kann durch manche Fixationsreagenzien uninterpretierbar werden • gelegentlich Identifizierung invasiver Tumorzellen erschwert • Chromosomenaneuploidie und Genamplifikation schwer zu unterscheiden 	<p>1. hoch 2. hoch</p>	[#] da in Zellen ohne HER-2/ <i>neu</i> -Amplifikation normalerweise nur jeweils zwei bzw. vier Genkopien vorhanden sind (s. Kap. 3.2.1)
CISH AMP/EXP	<ul style="list-style-type: none"> • vereint Vorteile von IHC und FISH • kombinierbar mit IHC • Paraffinschnitte ausreichend • geringere Kosten • schnelle Resultate • Lichtmikroskop ausreichend • Färbung bleibt stabil (wie IHC) • objektiveres Scoring-System • robustes DNA-Target 	<ul style="list-style-type: none"> • geringere Sensitivität als FISH • mangelnde Erfahrung mit der Methode • Genaue Zählung der Genkopien nicht immer möglich/ keine intrinsische Kontrolle für Anzahl des Chromosom 17 	<p>1. gut 2. hoch</p>	(Tanner et al., 2000)
ELISA EXP	<ul style="list-style-type: none"> • Antigenschäden vermieden durch sofortiges Verarbeiten des Materials • generell gute Korrelation von Antigenbestand und Patienten-Outcome 	<ul style="list-style-type: none"> • Gewisse Menge an frischem Tumorgewebe zur Zytisolherstellung benötigt[§] • Anfällig für Verdünnungseffekte 	<p>1. hoch 2. hoch</p>	[§] bei kleineren Karzinomen möglicherweise problematisch
(RT-)PCR mRNA	<ul style="list-style-type: none"> • schnelle, halbautomatische Methode • genauere Schätzung der Proteinkonzentration • braucht sehr wenig Gewebe 	<ul style="list-style-type: none"> • Verdünnungseffekte möglich • Verwendung nicht weit verbreitet 	keine Angaben	(Bièche et al., 1999) Zur Bestimmung in Blut, Knochenmark und Tumorgewebe
WESTERN BLOT EXP	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendung von frischem Tumorzytosol oder Paraffinschnitten 	<ul style="list-style-type: none"> • mühsame Anwendung, unpraktisch für routinemäßigen Gebrauch 	keine Angaben	
SOUTHERN-/ SLOTT BLOT AMP	<ul style="list-style-type: none"> • erste auf Gendarstellung basierende Bestimmungsmethode 	<ul style="list-style-type: none"> • teurer und zeitaufwendig • relativ viel frisches bzw. gefrorenes Tumorgewebe benötigt • Verdünnungseffekte möglich • Geringere Sensitivität als FISH 	<p>1. gut 1. hoch</p>	Verdünnungs-Artefakte möglich durch DNA aus entzündlichem und benignem Gewebe

[§] durch Art und Zeitraum der Fixierung und des Einbettens, Methode und Temperatur der Gewebeverarbeitung, Intensität der Antigenausbeute, Art der Systemkontroll-Schnitte

* durch Lagerungszeit vor Färbung, Fixierung

2 Zielsetzung

Prognostische Faktoren sind entscheidend für eine individualisierte, **risikoadaptierte Therapie** des Mammakarzinoms. Dies gilt besonders für **nodal-negative Mammakarzinom-Patientinnen**, einer aufgrund der heutzutage tendenziell früheren Diagnosestellung klinisch immer bedeutsamer werdenden Gruppe. Trotz der gemäß historischen Daten **niedrigen Rezidiv- und Metastasierungsrate** erhält der Großteil dieser Patientinnen eine adjuvante Systemtherapie. Da nodal-negative **Patientinnen mit hohem** bzw. besonders niedrigem **Rezidivrisiko** anhand der traditionellen Prognosefaktoren nur **unzureichend identifiziert** werden können, bedarf es zur Risikogruppeneinteilung beim nodal-negativen Mammakarzinom neuer tumorbiologischer Faktoren, wie **uPA/PAI-1** und **HER-2**.

Eine vorangegangene Studie der Frauenklinik rechts der Isar der TU München beschrieb die prognostische Relevanz von uPA/PAI-1, sowie eine prognostische und prädiktive Bedeutung der HER-2-Genamplifikation an einem Kollektiv nodal-negativer Patientinnen (*Harbeck et al., 1999a; Yurdseven, 2001*). Jedoch war ein Teil dieser Patientinnen adjuvant-systemisch behandelt worden, was die Beurteilung der rein prognostischen Aussagekraft der untersuchten Faktoren beeinträchtigt. Die mediane Nachbeobachtungszeit dieser Arbeit betrug 7 Jahre. *Konecny und Kollegen* fanden 2001 eine HER-2-Proteinüberexpression, nachgewiesen mittels ELISA, und erhöhte uPA/PAI-1-Werte als prognostisch signifikant für das krankheitsfreie Überleben. Bei den Berechnungen wurden allerdings nodal-negative Patientinnen nicht gesondert berücksichtigt; das mediane Follow-up lag bei maximal 32 Monaten und gestattete keine Beurteilung des Gesamtüberlebens.

Vor diesem Hintergrund ergibt sich die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:

1. Ein Kollektiv von 118 nodal-negativen Patientinnen mit primärem Mammakarzinom soll unter dem Aspekt der **Risikogruppeneinteilung anhand** der Invasionsfaktoren **uPA/PAI-1**, der **HER-2-Genamplifikation** und -Proteinüberexpression untersucht werden. uPA/PAI-1 wurden mittels ELISA quantifiziert, die HER-2-Genamplifikation durch FISH nachgewiesen und die HER-2-Proteinüberexpression immunhistochemisch dargestellt.
2. Erstmals soll die Bedeutung von uPA/PAI-1 und HER-2 im gleichen Patientenkollektiv über einen langen medianen Nachbeobachtungszeitraum von 10,5 Jahren hinweg untersucht und die einzelnen **Prognose-Parameter** auf die

Beständigkeit ihrer prognostischen Stärke über die Zeit hinweg geprüft werden. Anstatt der einzelnen Faktoren uPA und PAI-1 wird in allen Berechnungen die kombinierte Variable uPA/PAI-1 verwendet, weil diese Kombination die stärkste prognostische Aussagekraft besitzt.

3. Da ein langes Follow-up auch angesichts der naturgemäß relativ guten Prognose nodal-negativer Patientinnen genaue Aussagen über den Krankheitsverlauf ermöglicht und **keine** der Patientinnen in diesem Kollektiv eine **adjuvant-systemische Therapie** erhalten hat, soll zudem der **Einfluss der einzelnen Prognosefaktoren auf den Krankheitsverlauf** und damit auf die Tumoraggressivität beurteilt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patientinnenkollektiv

Im Primärtumorgewebe von **118 nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen** wurden die tumorbiologischen Faktoren uPA/PAI-1, HER-2-Genamplifikation, und HER-2-Proteinüberexpression sowie die etablierten histomorphologischen Prognosefaktoren (Tumorgröße, Steroidhormonrezeptorstatus, histologisches Grading, Menopausenstatus) untersucht (**Tabelle 6**). Die etablierten Faktoren wurden wie andernorts beschrieben erhoben (*Harbeck et al, 2002a*). Alle Patientinnen waren zwischen 1987 und 1993 in der Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar wegen eines primären Mammakarzinoms behandelt worden und hatten sich entweder einer modifiziert radikalen Mastektomie (n=74) oder einer brusterhaltenden Operation mit nachfolgender Bestrahlung des Restdrüsenkörpers unterzogen (n=44). Nach den zu dieser Zeit in Deutschland geltenden Behandlungsrichtlinien, erhielt **keine** der Patientinnen eine **adjuvant-systemische Therapie**. Der oben genannte Zeitraum wurde gewählt, da Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus an unserer Klinik anschließend an einer klinischen Studie mit Stratifizierung nach uPA/PAI-Gehalt im Primärtumor teilnehmen konnten (*Jänicke et al., 2001*) und dann auch vermehrt bei nodal-negativen Patientinnen eine adjuvant-systemische Therapie (Chemo- und / oder endokrin) eingesetzt wurde (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005*).

Das mediane Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung und Primärtherapie betrug 55 Jahre (36-82 Jahre). Bei keiner der Patientinnen waren zu diesem Zeitpunkt klinisch oder radiologisch Fernmetastasen nachweisbar gewesen. Nachbeobachtungsdaten wurden in regelmäßigen Abständen erhoben (*Harbeck et al., 1999b*). Die mediane Nachbeobachtungszeit der Patientinnen, die zum Zeitpunkt dieser Analyse noch lebten, betrug 126 Monate (22-176 Monate). Innerhalb des Beobachtungszeitraumes erlitten 33 Patientinnen (28%) ein Rezidiv und 30 Patientinnen (25%) verstarben.

Tabelle 6:

Verteilung der histomorphologischen, klinischen und tumorbiologischen Faktoren bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom ohne adjuvante systemische Therapie (n=118; einige Faktoren konnten nicht bei allen Patientinnen bestimmt werden)

Prognosefaktoren	n	(%)	Verteilung im Kollektiv
pT-Stadium	118		
pT 1	55	(46,6)	<p>A pie chart showing the distribution of pT stages. pT1 is 47% (yellow), pT2 is 52% (orange), pT3 is a very small sliver (red), and pT4 is another very small sliver (green).</p>
pT 2	61	(51,7)	
pT 3	1	(0,8)	
pT 4	1	(0,8)	
Steroidhormonrezeptorstatus	118		
positiv	95	(80,5)	<p>A pie chart showing the distribution of hormone receptor status. HR positiv is 81% (yellow) and HR negativ is 19% (orange).</p>
negativ	23	(19,5)	
Histologisches Grading	117		
G 1	7	(5,9)	<p>A pie chart showing the distribution of histological grading. G 1 is 6% (yellow), G 2 is 67% (orange), and G 3 is 27% (red).</p>
G 2	78	(66,7)	
G 3	32	(27,4)	
Menopausenstatus	118		
prä- / perimenopausal	47	(39,8)	<p>A pie chart showing the distribution of menopausal status. prä-/perimenop. is 40% (yellow) and postmenop. is 60% (orange).</p>
postmenopausal	71	(60,2)	
HER-2-Genamplifikation (FISH)	81		
nicht amplifiziert	54	(66,7)	<p>A pie chart showing the distribution of HER-2 amplification. nicht amplifiziert is 66,7% (yellow) and amplifiziert is 33% (orange).</p>
amplifiziert	27	(33,3)	
HER-2-Proteinüberexpression (IHC)	113		
negativ	63	(55,8)	<p>A pie chart showing the distribution of HER-2 protein overexpression. EXP negativ is 56% (yellow) and EXP positiv is 44% (orange).</p>
positiv	50	(44,2)	
HER-2-Status (IHC und/ oder FISH positiv)	117		
negativ	49	(41,8)	<p>A pie chart showing the distribution of HER-2 status. HER-2 negativ is 42% (yellow) and HER-2 positiv is 58% (orange).</p>
positiv	68	(58,1)	
uPA/PAI-1	115		
niedrig (uPA UND PAI ≤ cutoff-Wert)	65	(56,5)	<p>A pie chart showing the distribution of uPA/PAI-1 status. uPA/PAI niedrig is 57% (yellow) and uPA/PAI-1 hoch is 43% (orange).</p>
hoch (uPA und / oder PAI-1 > cutoff-Wert)	50	(43,5)	

3.2 Bestimmungsmethoden

3.2.1 Biochemische Bestimmung von uPA und PAI-1 mit Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)

Zur Bestimmung von uPA und PAI-1 wurde ein 200-500 mg schweres repräsentatives Stück Tumorgewebe unmittelbar nach Entnahme aus der Brust in flüssigem Stickstoff schockgefroren und daraus ein Detergensextrakt hergestellt (*Jänicke et al., 1994*):

Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden einzeln mit dem *Mikro-Dismembrator* (Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland) für 30 Sekunden auf höchster Stufe pulverisiert, das entstandene Pulver umgehend in 1,8 ml TBS gelöst und die Lösung in 0,9 ml Aliquots aufgeteilt. Ein Teil erhielt weitere 0,1 ml TBS, dem anderen wurde 0,1 ml 10% (w/v) nicht-ionisches Detergens Triton X-100 in TBS (Sigma, München, Deutschland) zugesetzt. Beide Suspensionen wurden über 12 Stunden hinweg bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend bei gleicher Temperatur bei 100 000 g 45 Minuten lang ultrazentrifugiert, um Zellmembranen, Zellkerne und andere Zellbestandteile voneinander zu trennen. Die uPA und PAI-1 enthaltenden Überstände wurden in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

uPA und PAI-1 Assays wurden prospektiv in wöchentlichen Blöcken mit kommerziell erhältlichen ELISA-Tests (uPA: Imubind #894; PAI-1: Imubind #821; jeweils American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) quantitativ bestimmt und in Nanogramm Antigen pro Milligramm Gewebeprotein angegeben.

Wie in Kap. 3.3 beschrieben, wurden die Schwellenwerte für uPA bei 3 ng/mg Protein und für PAI-1 bei 14 ng/mg Protein festgelegt und die Patientinnen anhand der Kombination von uPA und PAI-1 (uPA/PAI-1) in zwei Gruppen eingeteilt.

3.2.2 Bestimmung der HER-2-Genamplifikation durch Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

Durchführung und Auswertung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung erfolgten retrospektiv durch J.S. Ross, MD, am Department of Pathology and Laboratory Medicine, Albany Medical College, Albany, NY, USA.

Die ungefärbten 4 µm dicken formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebsschnitte wurden auf Plus Objektträger (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) aufgezogen und unter Verwendung des Ventana Chromosomen-In-situ-Hybridisierungskits (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) in dem automatischen in-situ-Hybridisierungsgerät *Ventana Gen^{II}* (Ventana Medical Systems) bearbeitet:

Nach Entparaffinieren mit Xylol, zweifachem Dehydrieren mit 100% Ethanol und Spülen mit destilliertem Wasser, wurden die Objektträger in das *Ventana Gen^{II}* Hybridisierungsgerät eingesetzt. Die Objektträger wurden zunächst für 30 Minuten in 30%iger Vorbehandlungslösung (Ventana) bei 45°C inkubiert und anschließend über 45 Minuten hinweg bei 45°C mit Proteinverdauungslösung behandelt (Ventana). Die *Ventana Unique Sequence Digoxigenin-markierte HER2/neu-DNA-Sonde* wurde 5 Minuten lang bei 37°C vorgewärmt und dann aufgetragen. Die Menge des erforderlichen Hybridisierungsgemisches wurde auf die Zielfläche bezogen errechnet (10 µl Testlösung pro 22 x 22 mm Gewebstück). Nach 5-minütiger Denaturierung bei 69°C, wurden die Gewebsschnitte über Nacht bei 37°C mit der Hybridisierungslösung inkubiert.

Anschließend wurden die Präparate dreimal gewaschen und das Fluoreszein-markierte Anti-Digoxigenin-Detektionsreagens für 28 Minuten bei 37°C aufgetragen. Nach Entnahme der Schnitte aus dem Instrument wurde jeder einzelne Schnitt mit 18 µl Propidiumjodid (1:2) gegengefärbt und mit einem Deckglas bedeckt.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte anhand der Anzahl der HER-2-Genkopien bei 100facher Vergrößerung mit dem Zeiss Axioskop 50 Fluoreszenz Mikroskop (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). Die Amplifikation wurde wie folgt bewertet: Für jede HER-2-Genkopie zeigt die Sonde einen einzelnen fluoreszierenden Punkt an. In einer normalen oder nicht HER-2-amplifizierten Tumorzelle erwartet man zwei Genkopien bzw. vier Kopien bei sich teilenden Zellen. Je Tumorschnitt wurden mindestens 100 Tumorzellen ausgewertet. Tumoren wurden als HER-2-genamplifiziert betrachtet,

wenn darin mindestens 20 Zellen jeweils fünf oder mehr fluoreszierende Punkte aufwiesen (*Press et al., 1997*).

3.2.3 Immunhistochemische Bestimmung der HER-2-Proteinüberexpression

Die immunhistochemischen Färbungen wurden am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München durch Prof. W. Nathrath und Dr. P. Dettmar durchgeführt. Zur Immunfärbung für das HER-2-Protein (c-erbB-2) wurde die zu dieser Zeit routinemäßig durchgeführte Methode angewandt:

Parallel zu den für die FISH verwendeten Schnitten wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf mit Aminosilan beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 37°C über Nacht getrocknet. Nach Rehydrierung und zweifachem Waschen mit Phosphat-gepufferter Salinelösung (PBS/Trispuffer), wurden die Gewebstücke mit 0,005% Saponin (Sigma, St. Louis, MO, USA) in destilliertem Wasser 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) vorbehandelt und danach erneut mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation (4°C, über Nacht) mit dem monoklonalen Mausantikörper Ab-3 (0,125µg/ml; Oncogene Science, MA, USA) in PBS, angereichert mit 1% Rinderserumalbumin (BSA, Sigma, München, Deutschland). Nach behutsamem Spülen wurden die Schnitte mit Kaninchen-IgG-anti-Maus-IgG (20µg/ml, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) in Trispuffer mit 20% Humanserum-Gehalt abermals inkubiert (30 min, RT) und anschließend gewaschen. Eine letzte Inkubation erfolgte mit dem APAAP-Komplex (Alkaline Phosphatase-antialkaline Phosphatase Komplex, Dianova), 1:50 verdünnt in Trispuffer (30 min, RT). Danach wurden die Schnitte nochmals gewaschen. Die Präparate wurden schließlich dem Reagens Texas Fast Red (Sigma) als chromogenes Substrat für die Alkalische Phosphatase ausgesetzt, kurz in Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend mit Deckgläsern versehen.

Als Negativkontrolle wurde selbige Färbeprozedur ohne den Maus-Antikörper Ab-3 durchgeführt.

Die Bewertung der HER-2 Immunreaktivität erfolgte semiquantitativ durch zwei unabhängige Untersucher (Prof. W. Nathrath und Dr. P. Dettmar): Pro Schnitt und Untersucher wurden mindestens 500 zufällig ausgewählte Tumorzellen in Hotspot-Bereichen begutachtet. Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter dem Lichtmikroskop,

abhängig von histologischem Tumortyp und Tumorzellverteilung bei 100- bis 400-facher Vergrößerung.

Die Beurteilung einer positiven Färbereaktion der Tumoren beschränkte sich jeweils auf Areale mit membrantypischem Färbemuster. Wie früher veröffentlicht, wurde die HER-2 Färbung (HER-2 EXP) als positiv ($>2,5\%$ der Tumorzellen positiv) oder negativ ($\leq 2,5\%$ der Tumorzellen positiv) eingestuft (*Harbeck et al., 1998b; Harbeck et al., 1999a*).

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch Prof. Dr. med. N. Harbeck und R. E. Kates, PhD, wie schon an anderer Stelle beschrieben (*Harbeck et al., 2002a*):

Die fortlaufenden Variablen **uPA** und **PAI-1** wurden zunächst als binäre Variablen kodiert. Dabei wurden zur Unterscheidung zwischen hohen und niedrigen Antigenkonzentrationen im analysierten Material die mittels log-rank Statistik optimierten Schwellenwerte für uPA (3 ng/mg Protein) und PAI-1 (14 ng/mg Protein) verwendet (*Jänicke et al., 1994; Harbeck et al., 1999b*).

Als neue binäre Variable **uPA/PAI-1** wurde die Kombination aus den beiden Faktoren uPA und PAI-1 festgelegt, mit der Eigenschaft *beide* Faktoren *niedrig* im Gegensatz zu *einer oder beide* Faktoren *hoch* (*Harbeck et al., 2002a*). Diese Vorgehensweise hatte sich bereits früher bewährt (*Jänicke et al., 1993*). Etablierte Prognosefaktoren wurden dichotomisiert wie andernorts beschrieben (*Harbeck et al., 1999c*). Die univariate Analyse der rezidivfreien Überlebenszeit und der Gesamtüberlebenszeit wurde nach Kaplan-Meier (*Kaplan & Meier, 1958*) durchgeführt und mittels log-rank Statistik verglichen. Die multivariate Analyse erfolgte „forward stepwise“ nach dem „Cox Proportional Hazards Model“ (*Cox, 1972*), mit Hilfe des SPSS Software Pakets (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Alle Tests wurden auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und mit einem Konfidenzintervall (KI) von 95% durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Verteilung traditioneller und tumorbiologischer Faktoren

In einem Kollektiv **118 nodal-negativer Patientinnen** mit Mammakarzinom, welche allesamt **keine** postoperative **adjuvante systemische Therapie** erhalten hatten, wurden die etablierten histomorphologischen und klinischen Prognosefaktoren (**Tumorgröße** = pT-Stadium, **Grading**, **Steroidhormonrezeptor-** und **Menopausenstatus**) bestimmt. Zudem wurden die Tumorinvasionsfaktoren **uPA/PAI-1** und die Amplifikation des HER-2-Gens sowie die HER-2-Proteinüberexpression im Tumorgewebe ermittelt (**Tabelle 6**) und auf den Krankheitsverlauf bezogen.

Für die Bestimmung von **uPA/PAI-1** war in 115 der 118 der Fälle genügend frisches Tumorgewebe vorhanden. Bei 50 Patientinnen (**43,5%**) waren entweder uPA, PAI-1, oder beide Faktoren erhöht.

Bei 81 der 118 Patientinnen war die gewonnene Menge an Tumorgewebe ausreichend für die Bestimmung der **HER-2-Genamplifikation (HER-2 AMP)** durch FISH, in 113 Fällen konnte die immunhistochemische Bestimmung der **HER-2-Proteinüberexpression (HER-2 EXP)** erfolgen. In 27 der untersuchten Mammakarzinome (bei **33%** der Patientinnen in unserem Kollektiv) wurde eine **Amplifikation des HER-2-Gens** festgestellt (Median 3 Genkopien; 2-10,2), 50 der Tumoren (**44%**) wiesen eine **HER-2-Proteinüberexpression** auf (Median 0%; 0-90%).

Korrelation und Verhältnis zwischen etablierten und tumorbiologischen Faktoren, sowie zwischen den tumorbiologischen Faktoren untereinander, wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten dargestellt (*Harbeck et al., 1998b; Harbeck et al., 1999a; Harbeck et al., 1999b*).

4.2 Prognostische Aussagekraft der tumorbiologischen Faktoren anhand des rezidivfreien Überlebens (DFS)

Nach einem **medianen Nachbeobachtungszeitraum von 126 Monaten** war in der **univariaten und multivariaten Analyse** nur **uPA/PAI-1** signifikant mit dem rezidivfreien Überleben (**DFS**) assoziiert ($p < 0,001$; RR 8,3; 95% KI 3,4-20,4 bzw. $p = 0,001$; RR 5,4; 95% KI 1,9-14,8) (**Abbildung 7A**).

Keiner der etablierten Prognosefaktoren, wie Tumorgröße (pT-Stadium), Steroidhormonrezeptorstatus, Menopausenstatus, histologisches Grading, ebenso wenig wie HER-2 AMP ($p = 0,139$; RR 1,9; 95% KI 0,8-4,3) oder HER-2 EXP ($p = 0,74$; RR 1,1; 95% KI 0,6-2,3) hatten **signifikante prognostische Aussagekraft** für das rezidivfreie Überleben in diesem Kollektiv nodal-negativer Patientinnen ohne adjuvante systemische Therapie (**Tabelle 7; Abbildung 7B-F**). Selbst bei Anwendung strengerer Schwellenwerte für die immunhistochemische Bewertung, entsprechend einem Anteil von 24,8% und 17,7% HER-2-überexprimierenden Tumoren, war eine signifikante Auswirkung der HER-2 EXP auf das DFS nicht nachweisbar ($p = 0,566$ bzw. $p = 0,236$).

Aufgrund der begrenzten Anzahl von Ergebnissen aus der HER-2 AMP-Bestimmung wurde die multivariate Analyse zunächst an der Gruppe der 73 Patientinnen durchgeführt, für welche alle benötigten Daten zur Verfügung standen. Um auf eine mögliche Auswahlverzerrung hin zu prüfen, wurde die zusammengesetzte Variable **HER-2 STATUS** eingeführt, welche Patientinnen mit negativer HER2-Amplifikation *und* fehlender Überexpression von den übrigen (HER-2 AMP oder HER-2 EXP positiv, oder beide positiv) unterscheidet. So konnte die multivariate Analyse anhand der Daten von **110 Patientinnen** durchgeführt werden, wobei 49 Patientinnen (42%) einen negativen und 68 Patientinnen (58%) einen positiven HER-2 Status aufwiesen. Das Ergebnis der **multivariaten Analyse** für das DFS unterschied sich bei Berechnung mit der kombinierten Variablen HER-2 STATUS anstelle der einzelnen Variablen HER-2 AMP und HER-2 EXP nicht wesentlich vom ursprünglichen Resultat, s. **Tabelle 7**. Somit blieb **uPA/PAI-1** der **einzige signifikante Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben** ($p < 0,001$; RR 7,9; 95% KI 3,2-19,5) in diesem Patientinnenkollektiv.

Tabelle 7:

Univariate and multivariate Analyse für die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) von Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom ohne adjuvante systemische Therapie (n=118, medianer Nachbeobachtungszeitraum 126 Monate). Zeitvariierende Auswirkungen wurden für pT-Stadium, Grading, Steroidhormonrezeptorstatus und HER-2-Genamplifikation (HER-2 AMP) festgestellt.

Prognosefaktoren	Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS)					
	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	Kollektiv mit vollständigen Daten für alle untersuchten Prognosefaktoren [§] n=73				Gesamtkollektiv nach Einführung des HER-2 Status n=110	
	p-Wert	RR (95% KI*)	p-Wert	RR (95% KI*)	p-Wert	RR (95% KI*)
uPA/PAI-1	<0,001	8,3 (3,4 – 20,4)	0,001	5,4 (1,9 – 14,8)	<0,001	7,9 (3,2 - 19,5)
HER-2 AMP	n.s. [§]	----	n.s.	----	n.a. [#]	n.a.
HER-2 EXP	n.s.	----	n.s.	----	n.a.	n.a.
HER-2 Status	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.s.	----
pT-Stadium	n.s.	----	n.s.	----	n.s.	----
Grading	n.s.	----	n.s.	----	n.s.	----
Steroidhormonrezeptorstatus	n.s.	----	n.s.	----	n.s.	----
Menopausenstatus	n.s.	----	n.s.	----	n.s.	----

[§] Multivariate Analyse mit HER-2 AMP und HER-2 EXP als separate Variablen; Berechnung basierend auf den Daten der 73 Patientinnen, für die alle erforderlichen Informationen verfügbar waren

* Relatives Risiko, Konfidenz-Intervall

[§] n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

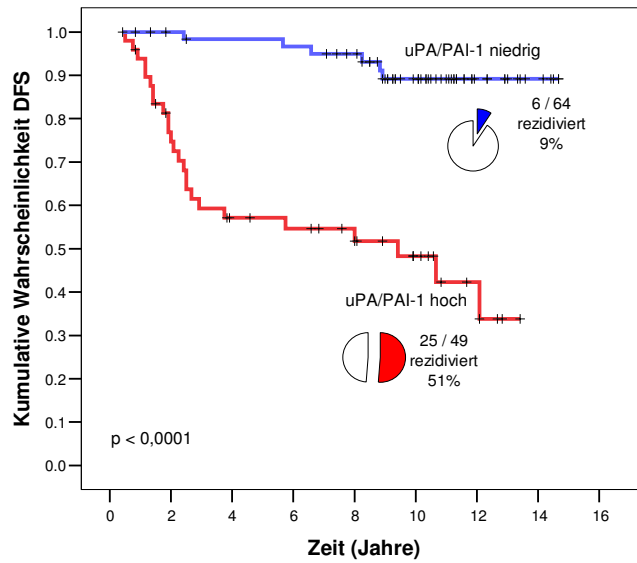
[#] n.a. nicht anwendbar

Der lange Nachbeobachtungszeitraum macht die Berücksichtigung möglicher Abweichungen vom Proportional-Hazards-Modell interessant: In einem univariaten, zeitvariierenden Cox-Modell der Funktion $F(T) = 1/\{1+EXP[(T-30)/6]\}$ (EXP hier: Exponent; T=Zeit in Monaten) waren die Faktoren histologisches Grading (p=0,029; RR 3,8; 95% KI 1,1-12,7), pT-Stadium (p=0,047; RR 4,2; 95% KI 1,02-16,7) und Steroidhormonrezeptorstatus (p=0,011; RR 4,6; 95% KI 1,4-14,9), nicht aber der Menopausenstatus signifikant für das DFS. Das Modell erlaubt einen starken Einfluss der Prognosefaktoren in den ersten 2,5 Jahren postoperativ, welcher mit zunehmender Dauer des Nachbeobachtungszeitraumes rasch gegen Null geht. Diese Zeitvariation spiegelt sich in **Abbildung 7 D-F** wider.

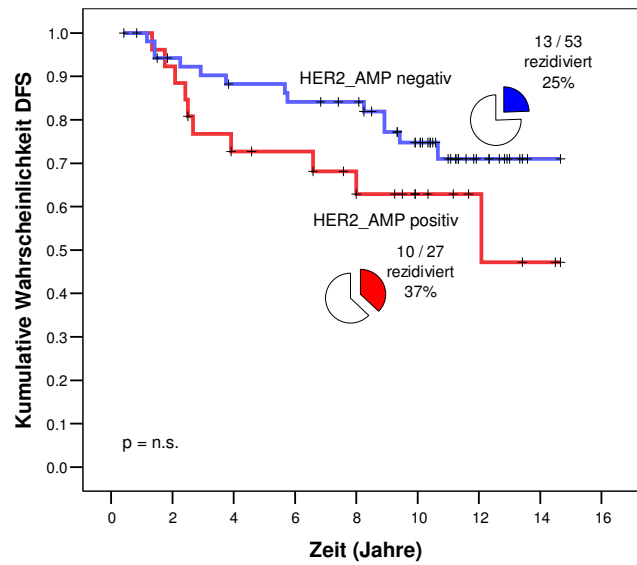
Abbildung 7:

7 A-F: Einfluss der Prognosefaktoren auf die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) bei nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen ohne adjuvante Therapie

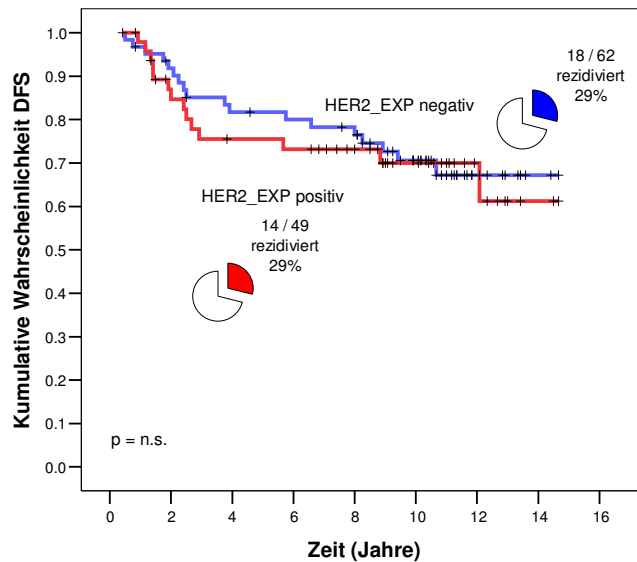
7 A: uPA/PAI-1



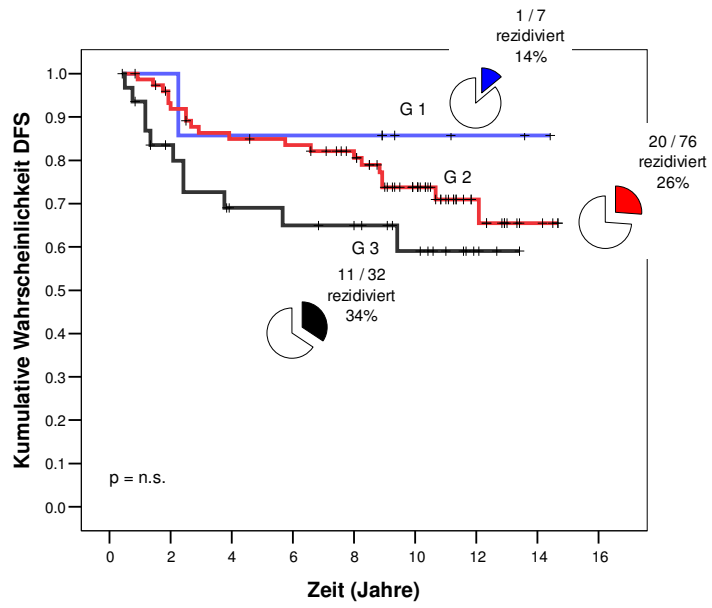
7 B: HER-2 AMP



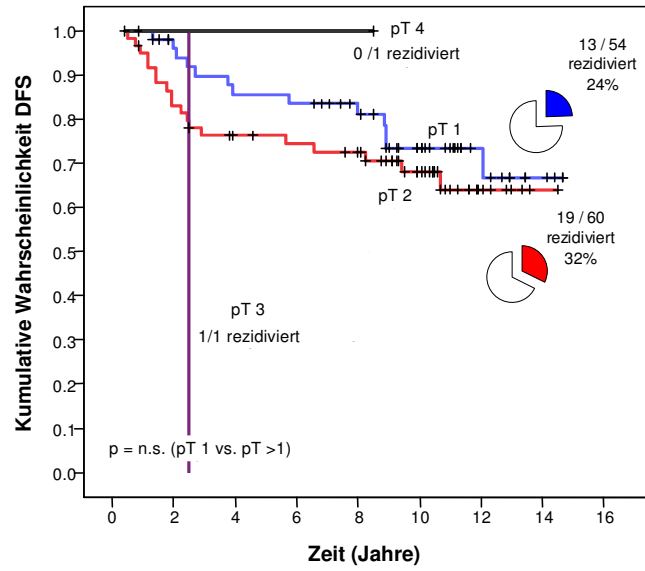
7 C: HER-2 EXP



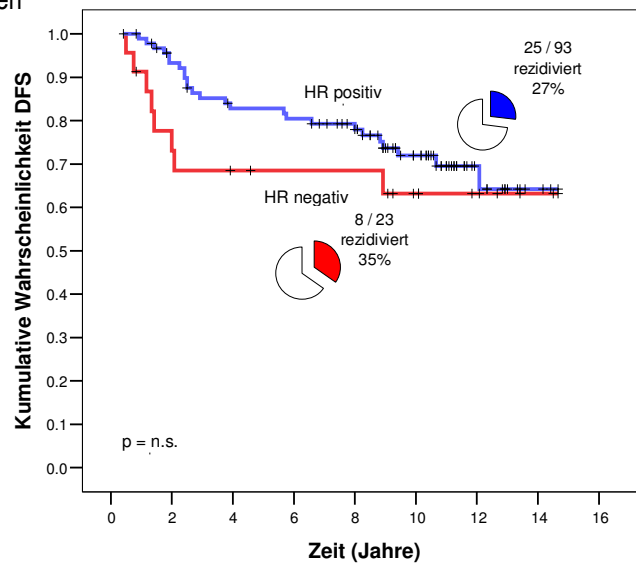
7 D: Grading



7 E: pT-Stadium



7 F: Steroidhormonrezeptoren



4.3 Einfluss der tumorbiologischen Faktoren auf das Gesamtüberleben (OS)

4.3.1 Univariate Analyse

Für das Gesamtüberleben (OS) wurde in der univariaten Analyse ein signifikanter Effekt von **uPA/PAI-1**, **HER-2-Genamplifikation** (HER-2 AMP) und **HER-2-Proteinüberexpression** (HER-2 EXP) nachgewiesen (**Abbildung 8 A-C**). Unter den etablierten Prognosefaktoren war nur das Tumor-**Grading** für das OS **signifikant**: Zum Zeitpunkt der Analyse war keine Patientin mit Tumor Differenzierungsgrad G1 verstorben (OS=100%), jedoch hatten die Patientinnen mit G2- und G3-Tumoren eine 10-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 80% bzw. 53% (p=0,0048) (**Abbildung 8 D**).

Der Menopausenstatus zeigte sich grenzwertig signifikant für das OS (p=0,083; RR 2,0; 95% KI 0,9-4,6), pT-Stadium und Steroidhormonrezeptorstatus hingegen erreichten keine Signifikanz (**Tabelle 8**).

4.3.2 Multivariate Analyse

Bei der multivariaten Analyse unter Berücksichtigung von HER-2 AMP und HER-2 EXP als *separate* Variablen konnten wiederum nur jene Patientinnen berücksichtigt werden, bei denen alle eingehenden Variablen bestimmt worden waren (n=71). Dabei erwiesen sich lediglich die **HER-2-Genamplifikation** und **HER-2-Proteinüberexpression** als **statistisch signifikant** (p=0,004; RR 3,7; 95% KI 1,5-9,2 bzw. p=0,009, RR 3,4; 95% KI 1,4-8,7), uPA/PAI-1 und die erfassten etablierten Prognosefaktoren jedoch nicht (**Tabelle 9**).

Zur Überprüfung einer möglichen Auswahlverzerrung wurde, wie für das DFS, die multivariate Analyse des OS wiederholt und HER-2 AMP und HER-2 EXP (n=71) durch die zusammengesetzte Variable **HER-2 STATUS** ersetzt (n=111). Die dabei erzielten Ergebnisse unterschieden sich geringfügig von der zuvor durchgeführten Analyse. HER-2 blieb signifikant für das OS (p=0,006; RR 3,9; 95% KI 1,5-10,3) und bemerkenswerterweise zeigte sich nun die Signifikanz von **uPA/PAI-1** (p=0,052; RR 2,3; 95% KI 0,99-5,2) und histologischem **Grading** (p=0,054; RR 2,1; 95% KI 0,99-4,8) (**Tabelle 8**).

Tabelle 8:

Univariate und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben von nodal-negativen Patientinnen ohne adjuvante systemische Therapie (n=118, medianer Nachbeobachtungszeitraum 126 Monate).

Prognosefaktoren	Gesamtüberleben (OS)					
	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	Kollektiv mit vollständigen Daten für alle untersuchten Prognosefaktoren § n=71				Gesamtkollektiv nach Einführung des HER-2 Status (n=111)	
	p-Wert	RR (95% KI)	p-Wert	RR (95% KI)	p-Wert	RR (95% KI)
uPA/PAI-1	0,002	3,3 (1,5 – 7,0)	n.s.§	----	0,052	2,3 (0,99 – 5,2)
HER-2 AMP	0,009	3,2 (1,3 – 7,5)	0,004	3,7 (1,5-9,2)	n.a.#	----
HER-2 EXP	0,013	2,6 (1,2 – 5,4)	0,009	3,4 (1,4-8,7)	n.a.	----
HER-2 STATUS	n.a.	----	n.a.	----	0,006	3,9 (1,5-10,3)
pT-Stadium	n.s.	----	n.s.	----	n.s.	----
Grading	0,003	3,0 (1,4 – 6,2)	n.s.	----	0,054	2,1 (0,99 – 4,8)
Steroidhormon-rezeptorstatus	n.s.	----	n.s.	----	n.s.	----
Menopausenstatus	0,083	2,0 (0,9-4,6)	n.s.	----	n.s.	----

§ Multivariate Analyse mit HER-2 AMP und HER-2 EXP als separate Variablen berechnet anhand der 71 Patientinnen, für die alle erforderlichen Informationen verfügbar waren

* Konfidenz-Intervall

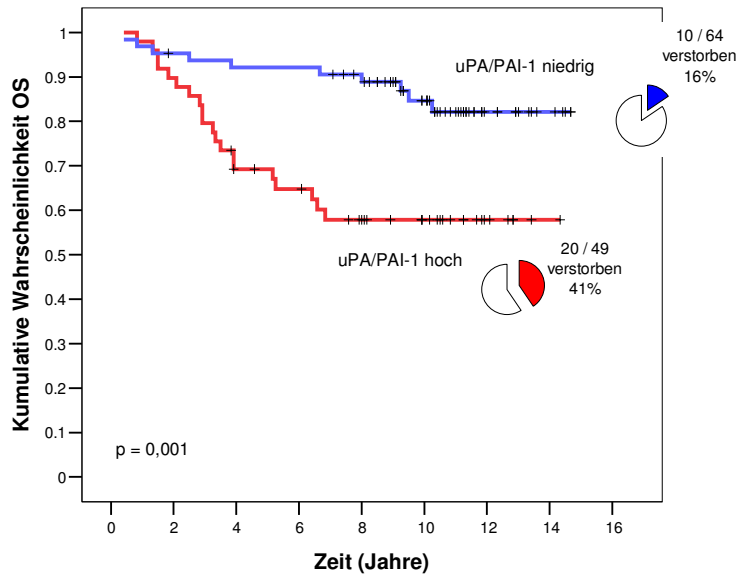
§ n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

n.a. = nicht zutreffend

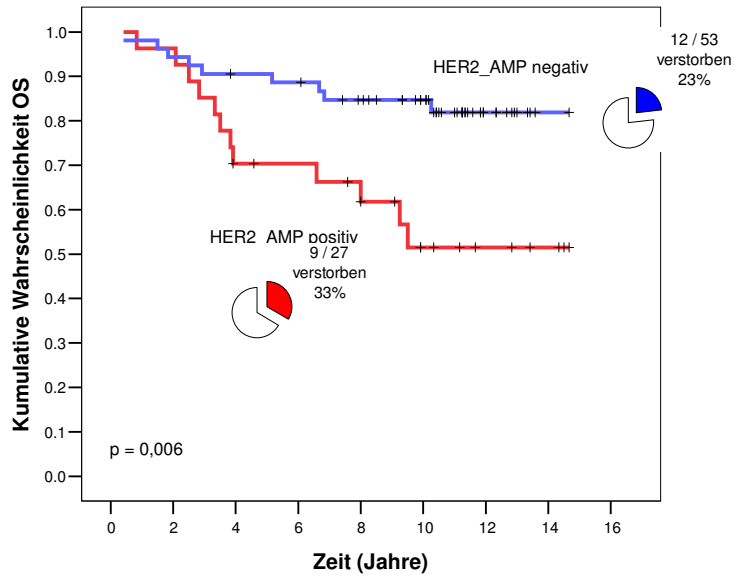
Abbildung 8:

Abbildung 8 A-F: Einfluss der Prognosefaktoren auf das Gesamtüberleben (OS) bei nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen ohne adjuvante Therapie

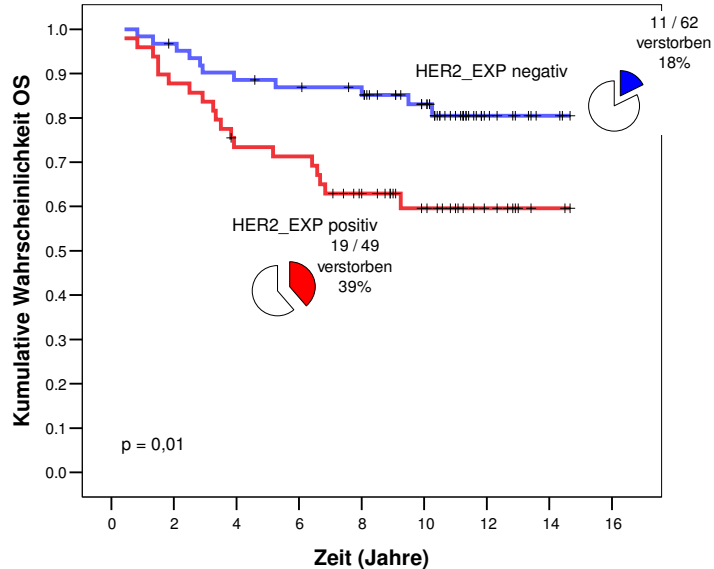
8 A: uPA/PAI-1



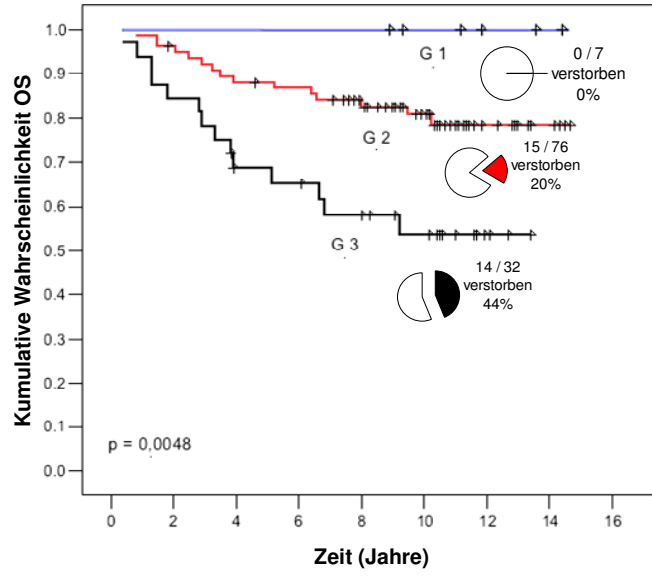
8 B: HER-2 AMP



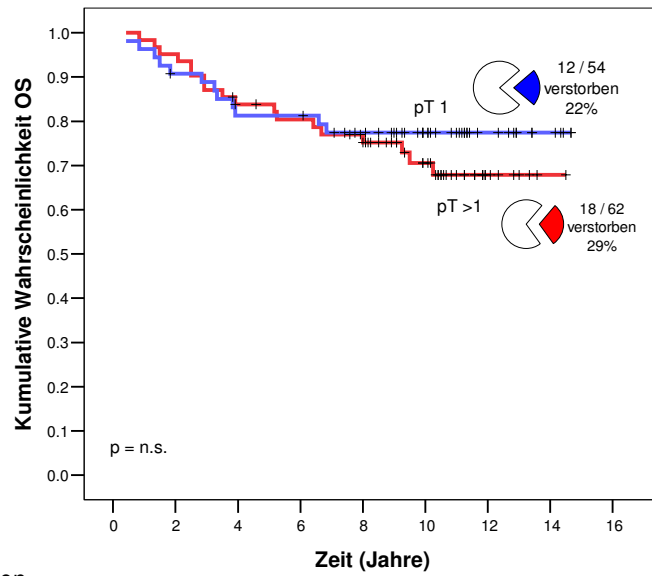
8 C: HER-2 EXP



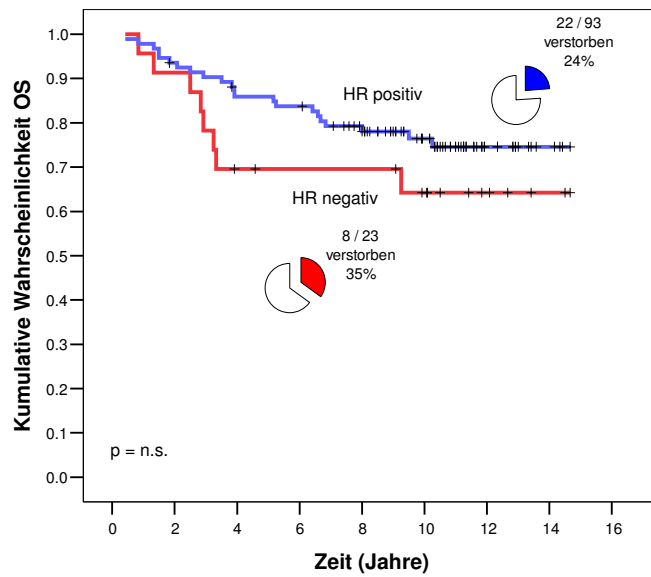
8 D: Grading



8 E: pT-Stadium



8 F: Steroidhormonrezeptoren



4.4 Risikogruppeneinschätzung durch uPA/PAI-1 und HER-2

4.4.1 uPA/PAI-1 und HER-2-Genamplifikation

Ausreichende Information über **uPA/PAI-1** und **HER-2-Genamplifikation** war von **78 Patientinnen** verfügbar. In dieser Gruppe wiesen die Tumoren von 36 Patientinnen hohe uPA/PAI-1-Werte auf, von denen 14 (39%) außerdem eine Amplifikation des HER-2-Gens (HER-2 AMP) zeigten. Unter den 42 Patientinnen mit niedrigen uPA/PAI-1-Werten im Primärtumor war HER-2 in 12 Fällen (29%) amplifiziert.

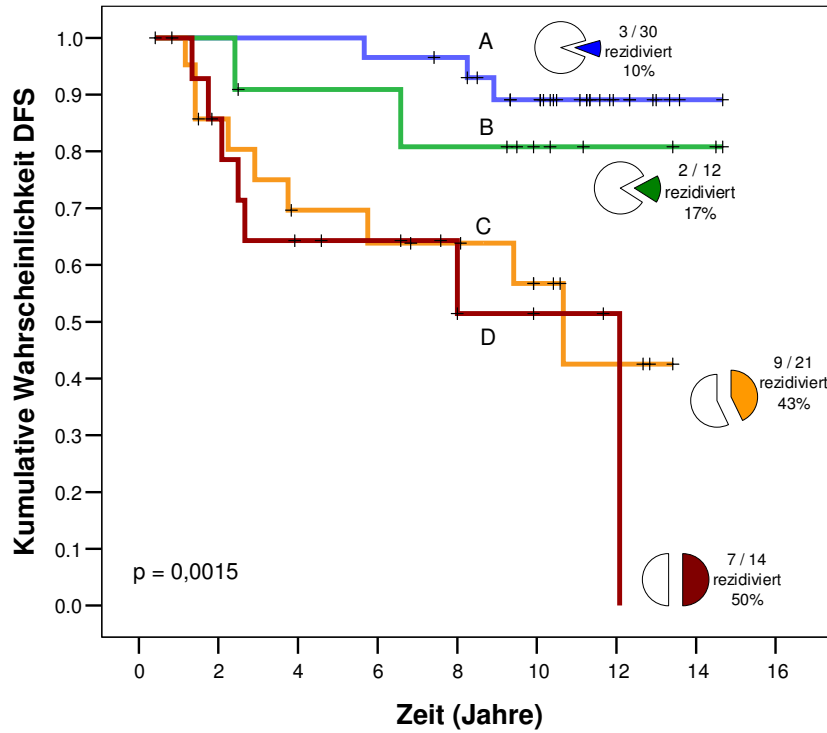
Jedoch hatte die HER-2-Genamplifikation bei der Subgruppeneinteilung nach uPA/PAI-1 keinen signifikanten prognostischen Effekt auf das **rezidivfreie Überleben** (DFS) (**Abbildung 9 A**).

Eine **Signifikanz für** das **Gesamtüberleben** (OS) ergab sich nur **für** die **Niedrigrisikogruppe gemäß uPA/PAI-1** ($p=0,012$; RR 6,0; 95% KI 1,5-24,0): Patientinnen mit *niedrigem* uPA/PAI-1 *ohne* HER-2-Genamplifikation hatten ein signifikant besseres OS als die übrigen Gruppen ($p=0,021$) (**Abbildung 9 B**). Die 10-Jahres-Überlebensrate dieser Patientinnen lag bei 93%, verglichen mit 55%, wenn im Tumor uPA/PAI-1 *erhöht und* das HER-2-Gen *amplifiziert* war.

Abbildung 9:

9 A und B: Kombinierte Auswirkung von HER-2-Genamplifikation (HER-2 AMP) und uPA/PAI-1 auf das rezidivfreie Überleben (DFS, 9 A) und das Gesamtüberleben (OS, 9 B)

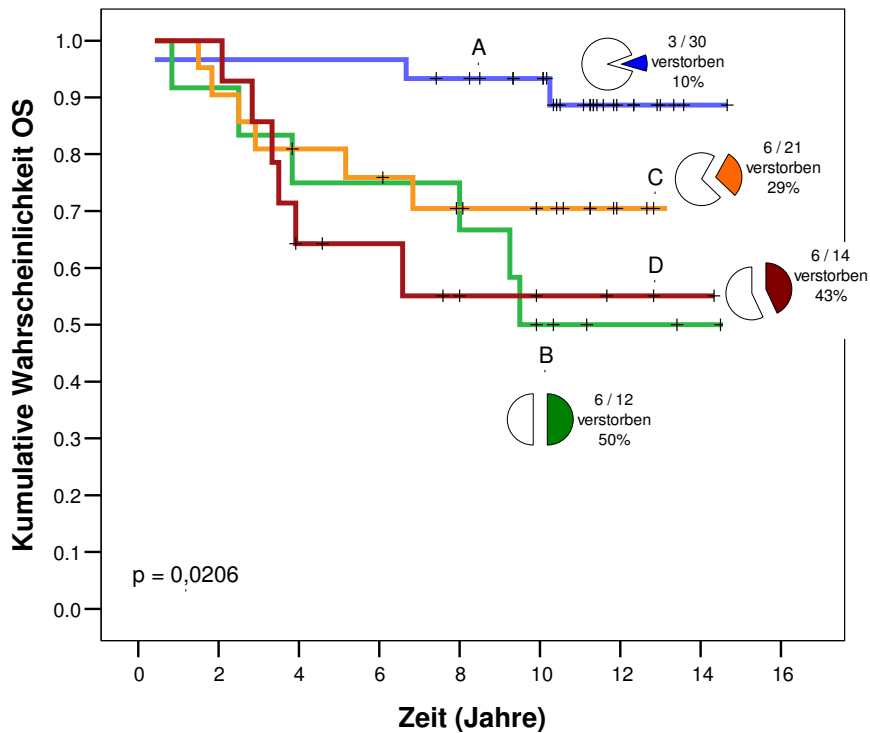
9 A: DFS



Gemeinsame Legende

- A: uPA/PAI-1 niedrig, HER-2 AMP negativ —
- B: uPA/PAI-1 niedrig, HER-2 AMP positiv —
- C: uPA/PAI-1 hoch, HER-2 AMP negativ —
- D: uPA/PAI-1 hoch, HER-2 AMP positiv —

9 B: OS



4.4.2 uPA/PAI-1 und HER-2-Proteinüberexpression

Bei der Analyse der HER-2-Proteinüberexpression in Verbindung mit uPA/PAI-1 wurden vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich rezidivfreiem und Gesamtüberleben (DFS und OS) erzielt (**Abbildung 10 A**). Für die Auswertung standen für **111 Patientinnen** Daten zu uPA/PAI-1 und HER-2-Proteinüberexpression (HER-2 EXP) zur Verfügung. Die Tumoren von 49 Patientinnen wiesen hohe **uPA/PAI-1**-Werte auf, davon 24 zusätzlich eine **HER-2-Proteinüberexpression** (49%). Von den 62 Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1 wurde HER-2 EXP in 26 Fällen nachgewiesen (42%).

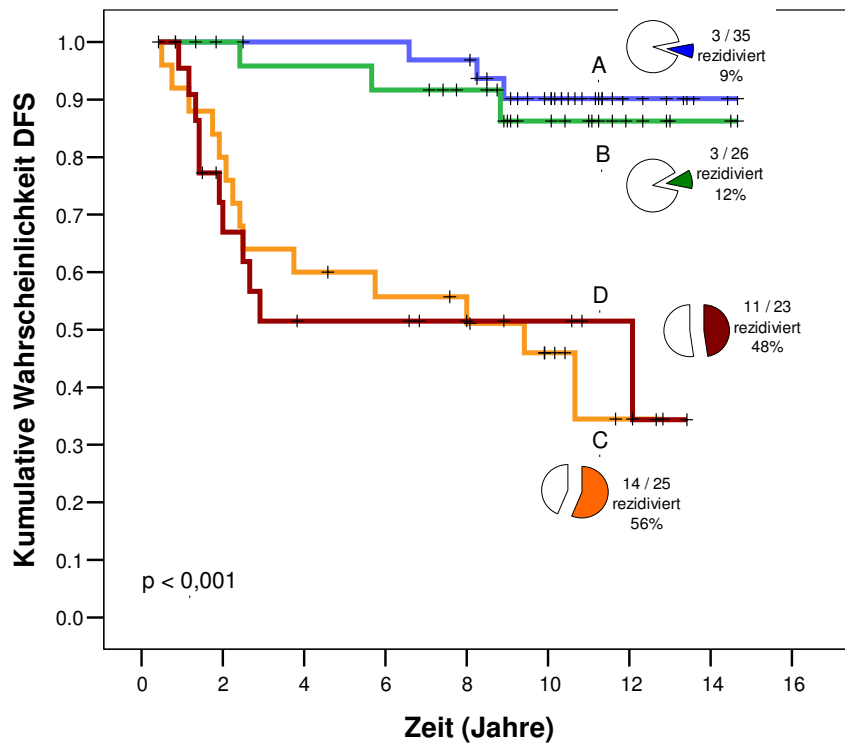
Auf das **rezidivfreie Überleben** hatte HER-2 EXP in keiner der nach uPA/PAI-1 eingeteilten Gruppen (uPA/PAI-1 hoch vs niedrig) einen signifikanten prognostischen Effekt.

Für das **Gesamtüberleben** war HER-2 EXP nur für **Hochrisiko**-Patientinnen (d. h. uPA/PAI-1 hoch) **signifikant** ($p=0,018$; RR 3,2; 95% KI 1,2-8,3) (**Abbildung 10 B**).

Abbildung 10:

10 A und B: Kombinierte Auswirkung von HER-2-Proteinüberexpression (HER-2 EXP) und uPA/PAI-1 auf das rezidivfreie Überleben (DFS, 10 A) und das Gesamtüberleben (OS, 10 B)

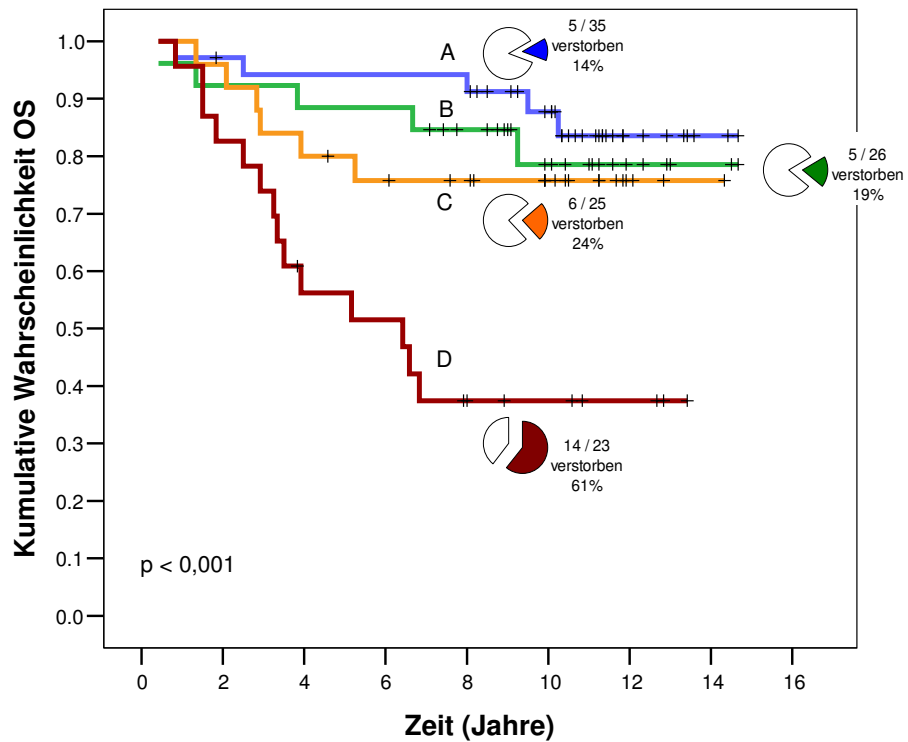
10 A: DFS



Gemeinsame Legende

- A: uPA/PAI-1 niedrig, HER-2 EXP negativ —
- B: uPA/PAI-1 niedrig, HER-2 EXP positiv —
- C: uPA/PAI-1 hoch, HER-2 EXP negativ —
- D: uPA/PAI-1 hoch, HER-2 EXP positiv —

10 B: OS



5 Diskussion

5.1 Bestimmungsmethoden der tumorbiologischen Faktoren

5.1.1 ELISA zur Quantifizierung von uPA und PAI-1 aus Frischgewebe

Der quantitative Nachweis von uPA und PAI-1 mit **ELISA**-Immunoassays (*Benraad et al., 1996*), die nach EORTC RGB-Richtlinien geprüft wurden (*Sweep et al., 1998; Sweep et al., 2003*), gilt heute als **Goldstandard** (*Hayes, 2003*). Die kommerziell erhältlichen, standardisierten ELISAs sind robust genug für die Anwendung in der Klinik. Eine Bestimmung von uPA und PAI-1 kann bereits aus 100µg **frischem Tumorgewebe** erfolgen und ist aus Tumor-Gefrierschnitten und sogar aus Stanzbiopsien durchführbar (*Harbeck et al., 2005, Abraha et al., 2003*). Die meisten ELISAs weisen freie und komplexgebundene uPA und PAI-1 nach. Durch Detergenzien (z.B. Triton X-100) kann die Antigenausbeute von uPA etwa verdoppelt werden, jedoch nicht die von PAI-1 (*Jänicke et al., 1994; Benraad et al., 1996; Harbeck et al., 2002c*).

Leider bedeutet diese Art der Bestimmung den Verlust von Information über die morphologische Verteilung der Analytate im Gewebe. Die Auswahl eines geeigneten Stücks Tumorgewebe (z.B. keine nekrotischen Areale) zur Zytosolgewinnung ist entscheidend für die Bestimmung des korrekten Antigengehaltes (*Hansen et al., 2003*). Zudem kann bei Verwendung bestimmter monoklonaler PAI-1-Antikörper die Epitoperkennung durch Bindung von uPA an PAI-1 oder durch die Aktivierung von PAI-1 erheblich beeinträchtigt werden (*Pedersen et al., 2003*). Die Notwendigkeit von **Frischgewebe** für die adäquate Bestimmung von uPA und PAI-1 scheint der **Hauptgrund** dafür zu sein, dass uPA und PAI-1 trotz erfolgter Validierung und vielfacher Bestätigung als prognostische Marker auch 2005 wieder **nicht** in die Liste der **international** zur Bestimmung **empfohlenen** Faktoren aufgenommen wurde (*Goldhirsch et al., 2005*).

In der ersten Studie zur klinischen Relevanz von uPA bestimmten Duffy und Kollegen dessen Enzymaktivität (*Duffy et al., 1988*). **Aktivitätsassays** sind v. a. bei Gewebegewinnung und -verarbeitung problematisch und weisen z. B. pro-uPA nicht nach (*Jänicke et al., 1989*). Enzyminhibitoren wie PAI-1 und andere, beim Extraktionsvorgang freigesetzte Proteasen, können die enzymatische Aktivität beeinflussen

(Harbeck et al., 2002c). Die Bestimmung von uPA und PAI-1 mittels **IHC** brachte keine prognostischen Informationen (Hayes, 2003).

5.1.2 IHC und FISH sind die bewährten Bestimmungsmethoden von HER-2-Proteinüberexpression und HER-2-Genamplifikation im Tumorgewebe

Auf die zunehmende Bedeutung des HER-2-Status beim Mammakarzinom und die Relevanz der korrekten Erfassung desselben wurde bereits eingangs hingewiesen. Der adjuvante und palliative Einsatz des Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) wird sich sicherlich auf die Verteilung des Gesundheitsbudgets auswirken (Neyt et al., 2005; Nachrichten Medizin, 2006). Ein falsch-positiver HER-2-Status ist nicht nur mit hohen Behandlungskosten verbunden ohne der betroffenen Patientin zu nutzen, sondern aus ärztlicher Sicht besonders unter dem Aspekt möglicher Nebenwirkungen zu vermeiden; zu diesen zählt v. a. die potenzierte Kardiotoxizität von Trastuzumab in Kombination mit einigen Chemotherapeutika (Slamon et al., 2001; Keefe, 2002; Tuma, 2006). Andererseits kann ein falsch-negatives Ergebnis die betreffende Patientin um die Chance auf eine potenziell lebensverlängernde Therapie bringen (Dowsett, 2002). Ein möglichst spezifischer und sensitiver und spezifischer Nachweis von HER-2 ist also gefordert, um tatsächlich HER-2-positive Patientinnen als solche zu identifizieren und ihnen eine entsprechende Therapie anbieten zu können.

Der Nachweis von HER-2 erfolgt standardgemäß mit **IHC** (EXP) und **FISH** (AMP): Bei mäßiger Überexpression im semiquantitativen immunhistochemischen Nachweis (IHC 2+), wird zur **Bestätigung** der HER2-Positivität eine **FISH** durchgeführt, da HER-2-Proteinüberexpression und -Genamplifikation im Tumor aus verschiedenen Gründen nicht immer korrelieren (Lebeau et al, 2001; Schnitt & Jacobs, 2001; Tubbs et al., 2001). Aufgrund der potenzierten kardialen Toxizität von Trastuzumab in Verbindung mit anthrazyclin- oder taxanhaltigen Chemotherapien wird vereinzelt auch bei starker Überexpression (IHC 3+) eine Bestätigung der HER-2-Positivität durch FISH gefordert (Hammock et al., 2003).

Vor- und Nachteile der beiden Methoden wurden bereits in **Tabelle 5 (Kap. 1.3.3)** erörtert. Das größte **Problem** der IHC hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Färbungs- und Studienergebnisse ist die **fehlende Standardisierung**: Die unterschiedlichen Detektionsraten der verwendeten Antikörper (Lebeau et al., 2001), Testmethode und -durchführung, sowie die Auswertung der Gewebsschnitte unterscheiden sich oft erheblich

voneinander (*Schnitt & Jacobs, 2001; Ross & Harbeck, 2005*). Dies führt zu HER-2-Überexpressionsraten zwischen 14 und 50% (*Révellion et al., 1998*), deren Spannweite sich jedoch nicht immer durch mangelnde Standardisierung bei Präparation und Auswertung begründen läßt.

Für die IHC als Selektionskriterium zur Herceptin[®]-Therapie werden heute einzig Hercep Test[®] (DaKo) und Pathway[®] (Ventana) empfohlen, in der EU wurde mittlerweile neben IHC und FISH (Inform[®], Ventana; PathVysion[®], Abbot-Vysis) auch die Chromogen-In-situ-Hybridisierung CISH (SPoT-Light HER2 CISH[®] Kit, Zymed) zur Bestimmung des HER-2-Status zugelassen (*Tumorzentrum München, 2005*).

5.2 Die klinisch unterschiedliche Bedeutung von uPA/PAI-1 und HER-2-Status für den Krankheitsverlauf sowie Auswirkung des Beobachtungszeitraumes auf den Einfluss der Prognosefaktoren

5.2.1 Informationen aus uPA/PAI-1 und HER-2-Status ergänzen sich

Genau prognostische und prädiktive Informationen über den Tumor zum Zeitpunkt der Primärtherapie sind Voraussetzung für die Erstellung **individueller Therapiekonzepte**, zugeschnitten auf die einzelne Patientin mit primärem Mammakarzinom. Die **tumorbiologischen Faktoren uPA/PAI-1 und HER-2** gewinnen für die Behandlung dieser Erkrankung zunehmend an klinischer Bedeutung, da es mit ihrer Hilfe möglich wird, Patientinnen mit einem erhöhten Rezidivrisiko herauszufiltern und die Chancen für ein Ansprechen oder Versagen bestimmter adjuvanter Therapieschemata abzuschätzen. Zudem stellen diese Faktoren jeweils Angriffsziele für neue Behandlungsansätze dar (*Schmitt et al., 2000*) oder haben, in Form des gegen HER-2 gerichteten Antikörpers Herceptin[®], bereits klinische Anwendung in der Therapie des metastasierten (*Ross et al., 2003*) und jetzt auch des primären Mammakarzinoms gefunden (*European Medicines Agency, 2006*).

Die Ergebnisse dieser Studie betonen den klinischen Nutzen, welcher sich aus der Bestimmung des uPA/PAI-1-Antigenbestandes und des HER-2-Status bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom ergibt: Erstmals kann gezeigt werden, dass sowohl uPA/PAI-1 als auch HER-2 wertvolle klinische Informationen liefern, aber

unterschiedliche Bedeutung für den Krankheitsverlauf und damit für die weitere Behandlungsstrategie haben (s. unten).

Keine der Patientinnen in dem hier untersuchten Kollektiv hat eine adjuvante systemische Therapie erhalten; deshalb spiegelt das Intervall bis zum ersten Wiederauftreten der Erkrankung, also das DFS, vollständig den Einfluss der untersuchten Parameter auf die **Tumoraggressivität** und damit den „natürlichen“ Krankheitsverlauf wider und folglich deren **prognostische Aussagekraft**.

Nach dem ersten Rezidiv wurde eine palliative systemische Therapie durchgeführt. Diese ist gewöhnlich auf die Symptome der Patienten und das Ansprechen des Tumors auf die Therapie zugeschnitten und setzt sich meist aus mehreren Behandlungsschienen zusammen (*Ellis et al., 2000*). Daher reflektiert die Wirkung der tumorbiologischen Faktoren auf das Gesamtüberleben - zusätzlich zur Aggressivität des Tumors - auch deren Einfluss auf Therapieerfolg oder -resistenz, also deren **prädiktiven Wert**.

In der vorliegenden Studie unterscheiden sich uPA/PAI-1 und HER-2-Status erheblich in ihrer Wirkung auf das rezidivfreie Überleben (DFS) und das Gesamtüberleben (OS): Während uPA/PAI-1 einen signifikanten Faktor sowohl für DFS als auch für OS darstellt, ist der HER-2-Status lediglich mit dem OS assoziiert. Somit besitzen **uPA/PAI-1 prognostische und prädiktive Aussagekraft**, während der **HER-2-Status allein Informationen prädiktiver Art** liefert. Dabei stellten wir bei unserer Langzeit-Nachbeobachtung keinen qualitativen Unterschied zwischen HER-2-Genamplifikation (HER-2 AMP) und HER-2-Proteinüberexpression (HER-2 EXP) fest. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, welche teilweise unterschiedliche Antikörper verwendeten (*Lebeau et al., 2001*), zeigten geringere Prozentsätze immunhistochemischer HER-2 Proteinüberexpression (*Allred et al., 1992*); in dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass **auch bei der Anwendung strengerer Schwellenwerte** eine signifikante prognostische Aussagekraft der HER-2-Proteinüberexpression für das DFS fehlt (siehe Kapitel 4.2).

Die Beobachtung, dass uPA/PAI-1 und HER-2 unterschiedliche Risikogruppen kennzeichnen, deckt sich mit den Ergebnissen von Konecny und seiner Arbeitsgruppe, die beschrieben, dass der mit HER-2 assoziierte invasive Phänotyp nicht in erster Linie kausal mit einer Hochregulierung von uPA/PAI-1 zusammenhängt (*Konecny et al., 2001*).

Die Stellung von uPA/PAI-1 als Prognosekriterium ist einzigartig unter den tumorbiologischen Faktoren: Forscher aus Europa, den USA und Japan berichteten trotz

unterschiedlicher demographischer Gegebenheiten einstimmig über einen starken prognostischen Effekt von uPA und PAI-1, sofern diese mit biochemischen Assays aus Tumorgewebsextrakten bestimmt worden waren (**Tabelle 9**). uPA/PAI-1 sind prognostisch wesentlich aussagekräftiger als andere tumorbiologische Marker (*Harbeck et al., 1999c; Harbeck et al., 2001*). In Kombination (uPA/PAI-1) sind sie beim Mammakarzinom nach dem Lymphknotenstatus zweitstärkster prognostischer Faktor (*Jänicke et al., 1993; Look et al., 2002*) und stellen in der nodal-negativen Patientinnengruppe ohne adjuvante systemische Therapie den stärksten Prognosefaktor dar (*Harbeck et al., 2002a*). Dabei besteht nur eine schwache Korrelation mit den traditionellen prognostischen Kriterien (*Harbeck et al., 1999b*).

Tabelle 9:

Schlüsselstudien zum prognostischen Einfluss von uPA und PAI-1 beim primären Mammakarzinom (modifiziert nach *Harbeck et al., 2005*)

Autor		Land	Bestimmungsmethode	n Patientinnen/Patientinnen N0		FU
<i>Duffy et al., *</i>	1988	Irland	Aktivitätsmessung (Zyt)	52	25 (48%)	17
<i>Jänicke et al.,</i>	1991	Deutschland	ELISA (TX)	115	53 (46%)	25
<i>Jänicke et al.,</i>	1993	Deutschland	ELISA (TX)	247	101 (41%)	30
<i>Foekens et al.,</i>	1994	Niederlande	ELISA (Zyt)	657	273 (42%)	48
<i>Grøndahl-Hansen et al.,</i>	1995	Dänemark	ELISA (Zyt)	505	193 (38%)	54
<i>Fernö et al., *</i>	1996	Schweden	LIA (Zyt)	688	265 (39%)	42
<i>Eppenberger et al.,</i>	1998	Schweiz	ELISA (Zyt)	305	159 (52%)	37
<i>Kim et al.,</i>	1998	Japan	ELISA (Zyt)	130	130 (100%)	53
<i>Kute et al.,</i>	1998	USA	ELISA (Zyt)	168	168 (100%)	58
<i>Knoop et al.,</i>	1998	Dänemark	ELISA (TX)	429	178 (41%)	61
<i>Bouchet et al.,</i>	1999	Frankreich	ELISA (Zyt)	499	233 (47%)	72
<i>Foekens et al.,</i>	2000	Niederlande	ELISA (Zyt)	2780	1405 (51%)	88
<i>Jänicke et al.,</i>	2001	Deutschland	ELISA (TX)	556	556 (100%)	32
<i>Konecny et al.,</i>	2001	USA/ Deutschland	ELISA (TX)	587	283 (48%)	26
<i>Harbeck et al.,</i>	2002a	Deutschland	ELISA (TX)	761	269 (35%)	60
<i>Cufer et al.,</i>	2003	Slowenien	ELISA (TX)	460	214 (47%)	33
<i>Hansen et al.,</i>	2003	Dänemark	ELISA (TX)	228	101 (44%)	150

* nur uPA

FU Follow-up in Monaten (Median)
TX Triton X-100-(Detergens-)Extrakt
n/N0 Gesamtzahl / nodal-negativ

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay
LIA Luminometric immunosorbent assay
Zyt Tumorzytosol

Bevor neue prognostische Marker in die Liste der routinemäßig bestimmten Parameter aufgenommen werden können, müssen v. a. zwei wichtige Kriterien erfüllt werden: die

Assay-Validierung, einschließlich einer Bewertung durch externe Qualitätssicherung (Benraad et al., 1996; Sweep et al., 1998) und die **klinische Validierung** auf höchstem Evidenzniveau (LOE 1). Beides ist für uPA und PAI-1 geschehen (Duffy, 2002). Mit der Chemo N0 Studie (Jänicke et al., 2001) und der retrospektiven gepoolten Analyse mit 8377 Patientinnen aus 18 teilnehmenden Instituten (Look et al., 2002) wurde der **klinisch-prognostische Nutzen von uPA/PAI-1** bei primären und besonders bei nodal-negativen Mammakarzinomen auf dem **höchsten Evidenzniveau** (Hayes et al., 1996; Hayes, 2000) bestätigt (**Abbildung 4**).

In der vorliegenden Studie mit dem beachtlichen Nachbeobachtungszeitraum von 10 Jahren konnte der Einfluss von uPA/PAI-1 auf **DFS und OS** in einem homogenen Kollektiv nodal-negativer Patientinnen **ohne adjuvante systemische Therapie** bestätigt werden. Patientinnen ohne Lymphknotenbefall zum Zeitpunkt der Primärtherapie mit **niedrigen uPA/PAI-1** haben eine **sehr gute Prognose**, unabhängig von etablierten Prognosefaktoren. Damit könnten ihnen die Nebenwirkungen und Spätfolgen der adjuvanten Chemotherapie erspart werden, welche oft die Lebensqualität erheblich einschränken. Andererseits ist bei Patientinnen mit **hohen uPA/PAI-1** im Tumor trotz ihres negativen Nodalstatus das **Rezidivrisiko** erhöht, **vergleichbar mit dem Befall von mindestens drei Lymphknoten** (Jänicke et al., 2001, Harbeck et al., 2002a). Diese brauchen deshalb definitiv eine adjuvante Systemtherapie, vorzugsweise einschließlich Chemotherapie. Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass Patientinnen mit hohen uPA/PAI-1 Werten auf eine adjuvant-systemische Therapie (Jänicke et al., 2001; Harbeck et al., 2002a; Harbeck et al., 2001; Manders et al., 2004), vor allem auf Chemotherapie, besonders gut ansprechen (Harbeck et al., 2002b), aber weniger gut auf eine palliative endokrine Therapie reagieren (Meijer-van Gelder et al., 2004). Somit haben uPA und PAI-1 auch **prädiktiven** Charakter. Zur Bestimmung der optimalen Chemotherapie für Patientinnen mit hohen uPA/PAI-1-Werten laufen derzeit zwei prospektiv randomisierte Multicenterstudien (Harbeck et al., 2005), die NNBC-3-Studie für nodal-negative Patientinnen und die ADEBAR-Studie für Patientinnen mit mehr als drei befallenen axillären Lymphknoten (Tumorzentrum München, 2005).

Anders jedoch als für die Einteilung nach uPA/PAI-1, deren Niedrigrisikogruppe fast die Hälfte unserer Patientinnen ausmacht und eine ausgezeichnete Prognose hat (**Abbildung 7 A**), weist die HER-2-negative Gruppe in der vorliegenden Studie nur einen sehr geringen Überlebensvorteil auf, der alleine betrachtet sicherlich den Verzicht auf eine

konventionelle adjuvante Therapie, insbesondere auf die Chemotherapie **nicht** rechtfertigt (**Abbildung 7 B** und **C**).

Generell herrscht immer noch Uneinigkeit über die rein prognostische Bedeutung von HER-2, insbesondere beim nodal-negativen Mammakarzinom (*Schmidt et al., 2005*). *Ross und seine Arbeitsgruppe (2003)* haben in einer kürzlich veröffentlichten Synopsis über 80 Studien zu diesem Thema zusammengetragen. Dabei waren, im Gegensatz zu FISH verwendenden Studien, v. a. die auf IHC basierenden Arbeiten zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen. Wie schon von *Yamauchi und Kollegen (2001)* beschrieben, erschwert jedoch die variierende Gestaltung der einzelnen Studien einen direkten Vergleich der Studienergebnisse und damit die Formulierung eindeutiger Empfehlungen. Es bestehen teils erhebliche Unterschiede hinsichtlich HER-2-Bestimmung (Kap. 5.1.2), Patientenkollektiv, Therapiemodalität und Nachbeobachtungszeit. Eine Vorstellung davon vermitteln die Publikationen in **Tabelle 10**.

Die Frage einer rein prognostischen Bedeutung von HER-2 beim nodal-negativen Mammakarzinom könnte durch eine entsprechend statistisch versierte gepoolte Analyse retrospektiver Studien beantwortet werden, die möglichst vielen Unterschieden hinsichtlich Methodik, Patientenkollektiv und adjuvanten Behandlungsmodus Rechnung trägt und sich auf Patientinnen ohne adjuvante systemische Therapie konzentriert. Eine idealerweise prospektive Studie unter dieser Voraussetzung ist mit dem heutigen Wissensstand weder durchführbar noch vertretbar.

In einer großen retrospektiven Analyse mit mehr als 1900 Patientinnen, operiert vor mehr als 35 bzw. 25 Jahren, in der die 44% nodal-negativen Patientinnen ebenfalls keine adjuvante systemische Therapie erhalten hatten, fand man allerdings keinen prognostischen Einfluss der HER-2-Proteinüberexpression auf diese Patientengruppe (*Ménard et al., 2002*).

Tabelle 10: Vergleich wichtiger Publikationen zu HER-2 als prognostischer Marker beim nodal-negativen Mammakarzinom

Autor	Methode/ Präparat	Patienten gesamt (NO in %)	Medianes Follow-up (Monate)	NO mit adj. T _x in %	HER-2 positiv in %	NO, HER-2 pos %	Bemerkung	Prognostische Bedeutung	
								DFS	OS
<i>Allred et al., 1992</i>	IHC Paraffin	613 (100)	59	25	14	14	EXP korreliert mit Outcome in Niedrigrisikogruppe ¹ ohne ISC HER-2-überexprimierende Patientinnen profitieren nicht von CMF	U	U
<i>Gusterson et al., 1992</i>	IHC Paraffin	1506 (50)	72	66	17 / 16	16	Assoziation von EXP mit DFS nur bei <i>nodal-positiven</i> Patientinnen - nach <i>adjuv. Therapie</i> für <i>beide</i> nodale Gruppen <i>ausgeprägter</i>	M	M
<i>Carlomagno et al., 1996</i>	IHC Paraffin	145 (100)	144	49	30	30	EXP hat <i>keine</i> Assoziation mit DFS kein Vorteil durch Tamoxifen adjuvant für Patientinnen mit EXP	nein	nein
<i>Press et al., 1997</i>	FISH Paraffin	324 (100)	69-76 ²	0	18	18	Assoziation von AMP mit DFS und OS	U/M	U/M
<i>Andrulis et al., 1998</i>	PCR. Southern-/ Slot Blot (Frisch)	580 (100)	36	51	20	20	AMP hat ↑ prognostische Bedeutung <i>nach systemisch adjuvanter Therapie</i>	U/M	n.e.
<i>Harbeck et al., 1999a</i>	IHC, FISH Paraffin	112 (100)	84	22	41 / 31	41 / 31	AMP ist mit DFS+OS assoziiert, EXP ist mit OS assoziiert (nur in U)	U/M	U/M
<i>Reed et al., 2000</i>	IHC Paraffin, Antigenretrieval	613 (100)	186/ 307	100 ³	10	10	EXP ist <i>nicht</i> mit DFS assoziiert EXP ist assoziiert mit neg. Hormonrezeptoren und hohem Grading	U nein/ M n.e.	U nein/ M n.e.
<i>Konecny et al., 2001</i>	ELISA	587 (48)	26 / 32 ⁴	n.e.	18	13	EXP: starker Einfluss auf DFS, grenzwertiger Einfluss auf MFS Assoziation von EXP mit DFS bei uPA/PAI-1-neg. Patientinnen	U/M	n.e.
<i>Ménard et al., 2002</i>	IHC Paraffin	1928 (44)	n.e. >120	0	23	22	EXP: starker Einfluss auf Outcome allein bei <i>nodal-positiven</i> Patientinnen	n.e. ⁵	n.e. ⁵
Zemzoum et al., 2003⁶	IHC, FISH Paraffin	118 (100)	126	0	44 / 33	44 / 33	AMP und EXP sind jeweils nur mit OS assoziiert	nein	U/M
<i>Joensuu et al., 2003</i>	IHC, CISH Paraffin Micro-array	852 (100)	114	5	12	12	HER-2 ist assoziiert mit DDFS, besonders in <i>kleinen</i> Tumoren HER-2-neg.: gute Prognose für T1-Tumoren mit höherem Grading	U/M	n.e.
<i>Volpi et al., 2003</i>	IHC Paraffin	529 (100)	79	0	29	29	EXP hat <i>keine</i> Assoziation mit DFS, Assoziation mit DFS bei ↑ Proliferationsrate	nein	n.e.
<i>Schmidt et al., 2005</i>	IHC Paraffin, FISH (frisch)	101 (100)	131	0	22 / 17	22 / 17	AMP ist assoziiert mit OS und DFS EXP ist mit OS assoziiert (nur in U)	U/M	U/M

NO
adj. T_x (%)

Nodal-negaitve Patientinnen
Prozentsatz systemisch-adjuvant
behandelter Patientinnen

U in Univarianzanalyse signifikant
M in Multivarianzanalyse signifikant

ISC in-situ Komponente
n.e. Nicht erwähnt/ bestimmt

DFS rezidivfreie Überlebenszeit
OS Gesamtüberlebenszeit

MFS Mestastasis free survival – nur Fernmetastasen
DDFS Distant disease free survival- nur Fernmetastasen

¹ Niedrigrisikogruppe: Tumor < 3cm, hormonrezeptorpositiv
² für Rezidiv- und Survivalgruppe unterschiedliche FU-Länge,
ebenso für amplifiziert/ nicht amplifiziert

³ 1 Zyklus adj Chemotherapie bzw. ovarielle Radiatio ± lokale Radiatio

⁴ für DSF bzw MSF

⁵ HER-2 wird in Berechnungen nicht als Variable verwendet, sondern U + M jeweils für die HER-2-positiv
und -negative Gruppe durchgeführt; der Nodalstatus tritt in diesen Gruppen als Variable auf

⁶ Grundlage der vorliegenden Arbeit

5.2.2 Zeitabhängige Varianz der prognostischen Aussagekraft

Der durchgängig starke prognostische Effekt von uPA/PAI-1 (**Abbildung 7A**) sowie die beobachtete **zeitabhängig variierende Signifikanz der klassischen Prognosefaktoren** pT-Stadium, Differenzierungsgrad und Steroidhormonrezeptorstatus (**Abbildung 7 D-F**) unterstreichen **die Bedeutung der Langzeit-Nachbeobachtung** für das Verständnis von Prognosefaktoren und deren klinische Konsequenz.

Hinsichtlich des Krankheitsverlaufes scheint das untersuchte Patientinnenkollektiv bei einer Rezidivrate von 28% über eine mediane Nachbeobachtungszeit von 10,5 Jahren mit historischen Kontrolldaten vergleichbar zu sein (*McGuire & Clark, 1992*). Nach diesem beachtlichen Follow-up-Zeitraum stellen wir in der gewöhnlichen Cox Analyse keinen signifikanten Effekt von HER-2 auf das DFS mehr fest; zumindest für die HER-2-Genamplifikation (HER-2 AMP) war ein solcher zuvor beobachtet worden (*Harbeck et al., 1999a*). Allerdings hatte jene Studie ein kürzeres Follow-up und beinhaltete mit 22% einen beträchtlichen Anteil adjuvant behandelter Patientinnen. Das Konfidenzintervall des univariaten Proportional Hazard Modells der HER-2 AMP für das rezidivfreie Überleben stimmt mit der früheren Bewertung überein. Bei Berücksichtigung der Variation durch die Zeit, jedoch auf einem Maßstab von 96 Monaten, finden wir einen grenzwertig signifikanten Einfluss der HER-2-Genamplifikation auf das DFS, obwohl Patientinnen mit adjuvanter Therapie in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt wurden ($p=0,09$; RR 2,3; 95% KI 0,86-6,0). Daher sind diese Ergebnisse konsistent mit der älteren Bewertung und dem visuellen Eindruck der Kaplan Meier Kurve für HER-2 AMP (**Abbildung 7 B**).

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung stellten *Révillion und Kollegen (1998)* in ihrem Übersichtsartikel zur klinischen Signifikanz von HER-2 fest, dass HER-2 in der multivariaten Analyse überwiegend in Studien mit kürzerem Follow-up als unabhängiger prognostischer Faktor befunden wurde, während dies besonders auf Arbeiten mit längerer **Nachbeobachtungszeit** und einem nodal-negativen Patientinnenkollektiv seltener zutrif.

Außerdem ermöglichte uns das lange Follow-up die Beobachtung eines **starken Effektes der HER-2-Genamplifikation und -Proteinüberexpression auf das Gesamtüberleben**, der sich noch ausgeprägter darstellt als in der vorangegangenen Arbeit (*Harbeck et al., 1999a*). Dies stützt die These, dass HER-2 eher ein prädiktiver als ein prognostischer Marker ist. In retrospektiven Analysen wurden HER-2-positive Tumoren

mit Tamoxifenresistenz (Carlomagno et al., 1996; Ellis, 2004) und schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie nach dem CMF Schema in Verbindung gebracht (Allred et al., 1992; Gusterson et al., 1992). Besonders gut sprachen diese Karzinome auf eine anthrazyklin- und taxanhaltige Chemotherapie (Muss et al., 1994; Paik et al., 2000; Moliterni et al., 2003; Konecny et al., 2004b) sowie auf die endokrine Therapie mit Aromatasehemmern (Ellis et al., 2001) an. Tatsächlich wurde der prognostische Effekt von HER-2 bei nodal-positiven Patientinnen teilweise seiner potenziellen Rolle als Prädiktor für Therapieerfolg oder -versagen zugeschrieben (Gusterson et al., 1992; Révillon et al., 1998; Clark, 2000), da diese Patientinnen alle eine adjuvante systemische Therapie erhalten. Diese Vermutung mag auch für Studien gelten, welche sich, bei gesonderter Betrachtung nodal-negativer Mammakarzinome, in ihrer Patientenauswahl nicht auf Patientinnen ohne adjuvante systemische Therapie beschränken (Andrulis et al., 1998).

5.3 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend formuliert, weist ein **hoher uPA/PAI-1** Gehalt im Primärtumorgewebe unabhängig von HER-2 auch nach langer Nachbeobachtungszeit zuverlässig und nachdrücklich auf einen **aggressiven Krankheitsverlauf** beim nodal-negativen Mammakarzinom hin. Die spezielle prognostische Stärke von **HER-2** im Hinblick auf das Gesamtüberleben könnte Ausdruck eines Nichtansprechens auf die verabreichte palliative Therapie sein, und somit die voraussichtliche **Wirksamkeit** einer bestimmten systemischen Therapie **oder** die **Resistenz** der Tumorzellen dagegen anzeigen.

Damit indizieren die vorgestellten Daten, dass die Bestimmung von uPA/PAI-1 und HER-2 beim nodal-negativen Mammakarzinom ergänzende Informationen liefern. Einerseits gibt uPA/PAI-1 Aufschluss über das Rezidivrisiko einer Patientin, andererseits kann dieser Marker den potenziellen Nutzen einer adjuvanten Systemtherapie widerspiegeln. Zielgerichtete Therapieansätze gegen das uPA-System werden für verschiedene Krebsarten erforscht oder bereits klinisch erprobt (Schmitt et al., 2000; Alfano et al., 2005; Pressemitteilungen, 2004a und b; Setyono-Han et al., 2005).

Auch wenn sich uPA und PAI-1 bisher auf internationaler Ebene nicht allgemein als Prognosefaktoren für das primäre Mammakarzinom durchsetzen konnten (Goldhirsch et al., 2005), ist ihre Verwendung als Prognosekriterium in Europa bereits anerkannt (AGO, 2006; Molina et al., 2005).

HER-2 hingegen, kann hilfreiche zusätzliche Informationen zur Wahl einer adäquaten systemischen Therapie geben und hat prädiktive Bedeutung, v. a. im Hinblick auf den voraussichtlichen individuellen Nutzen einer zielgerichteten Therapie mit dem HER-2-spezifischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). Seit einigen Jahren schon werden Patientinnen mit metastasiertem, HER-2-positivem Mammakarzinom mit Trastuzumab behandelt (*Slamon et al., 2001*). Aufgrund eines signifikanten Prognosevorteils durch Addition von Trastuzumab zur konventionellen adjuvant-systemischen Therapie, den neuere prospektive Studien für Patientinnen mit HER-2-positiven Tumoren dokumentieren (*Piccart-Gebhart et al., 2005b; Romond et al., 2005*), wurde Trastuzumab in Europa kürzlich für die adjuvante Therapie des invasiven, HER-2-positiven Mammakarzinoms zugelassen (*European Medicines Agency, 2006*). Dies betrifft auch nodal-negative Patientinnen mit positivem HER-2-Status.

Um die zielgerichtete Therapie zu optimieren, befinden sich weitere gegen HER-2 gerichtete Therapieansätze in der Entwicklung, zumal Resistenzen auch gegen Trastuzumab auftreten können (*Nahta et al. 2006*).

Genauere Aussagen zur individuellen, also risikoadaptierten systemischen Therapie HER-2-positiver und/ oder uPA/PAI-1-erhöhter, (nodal-negativer) Mammakarzinom-Patientinnen bedürfen weiterer prospektiver Studien.

6 Zusammenfassung

In einem Kollektiv **118 nodal-negativer** Mammakarzinompatientinnen **ohne adjuvante systemische Therapie** wurde, nach einer **Nachbeobachtungszeit** von über 10 Jahren (medianes Follow-up **126 Monate**), die klinische Relevanz der Invasionsfaktoren **uPA/PAI-1** (Urokinase-Plasminogenaktivator uPA, kombiniert mit dessen Inhibitor PAI-1) und des **HER-2-Status** untersucht.

Die Quantifizierung von **uPA** und **PAI-1** erfolgte prospektiv durch die enzymgebundene Immunnachweismethode **ELISA** an Extrakten aus frischem Primärtumorgewebe. **HER-2-Genamplifikation** (HER-2 AMP) und **HER-2-Proteinüberexpression** (HER-2 EXP) wurden durch Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (**FISH**, HER-2 AMP), bzw. durch Immunohistochemie (**IHC**, HER-2 EXP) an parallel angefertigten, formalinfixierten Paraffinschnitten nachgewiesen.

Erhöhte uPA/PAI-1-Werte (einer oder beide Faktoren über dem Schwellenwert) wurden in **44%** der Tumoren gemessen. FISH zeigte eine **Amplifikation** des **HER-2-Gens** in **33%** der untersuchten Schnitte, eine **HER-2-Proteinüberexpression** wurde in **44%** der Fälle immunhistochemisch nachgewiesen. Bei Uni- und Multivarianzanalyse der etablierten und tumorbiologischen Prognosefaktoren war **uPA/PAI-1 einziger unabhängiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben (DFS)** ($p < 0,001$; RR 8,3; 95 %KI 3,4-20,4). Trotz des fehlenden Einflusses auf das DFS waren **HER-2 AMP und HER-2 EXP** in der Uni- und Multivarianzanalyse **signifikant für das Gesamtüberleben (OS)** (HER-2 AMP: $p = 0,004$; RR 3,7; 95% KI 1,5–9,2; HER-2 EXP: $p = 0,009$; RR 3,4; 95% KI 1,4–8,7).

Nach einer **Langzeitnachbeobachtung** bezeichnen **uPA/PAI-1** demnach beim nodal-negativen Mammakarzinom zuverlässig und nachdrücklich einen **aggressiven Krankheitsverlauf**, und zwar unabhängig vom HER-2-Status. Die prognostische Wirkung des **HER-2-Status** (HER-2 AMP und HER-2 EXP) auf das Gesamtüberleben spiegelt möglicherweise seine Fähigkeit wider, ein **Nichtansprechen** auf bestimmte **systemische Therapieformen** vorherzusagen.

7 Literaturverzeichnis

Abraha RS, Thomssen C, Harbeck N, Mueller V, Baak K, Schmitt M, Jänicke F: *Micromethod for determination of uPA and PAI-1 from preoperative core-needle biopsies in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat 82(suppl 1):144, 2003

AGO - Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie: *Leitlinie der Kommission „Mamma“*. www.ago-online.org, 5. Version 2006

Albanell J, Ross JS: *Epidermal growth factor receptor and other growth factors and receptors*. In: Molecular Oncology of Breast Cancer, Jeffrey S Ross, Gabriel N. Hortobagay (Hrsg.). Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, p.256-275, 2005

Alfano D, Franco P, Vocca I, Gambi N, Pisa V, Mancini A, Caputi M, Carriero MV, Iaccarino I, Stoppelli MP: *The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis*. Thromb Haemost 93(2):205-11, 2005

Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, Gilchrist KW, Mansour EG, Abeloff M, Eudey L, McGuire WM: *Her-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in-situ carcinoma*. J Clin Oncol 10(4):599-605, 1992

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

Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KP, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R, Qizilbash A, Ambus U, Lipa M, Weizel H, Katz A, Baida M, Mariz S, Stoik G, Dacamara P, Strongitharm D, Geddie W, McCready D: *Neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer*. Toronto Breast Cancer Study Group. J Clin Oncol 16(4):1340-1349, 1998

Armstrong K, Eisen A, Weber B: *Assessing the risk of breast cancer*. N Engl J Med 342(8):564-571, 2000

Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brünner N, Danø K, Fusening NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A: *The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies*. J Cell Biol 152(4):777-84, 2001

Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brünner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM: *Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization*. Nat Med 4(8):923-928, 1998

Benraad TJ, Geurts-Moespot J, Grøndahl-Hansen J, Schmitt M, Heuvel JJ, de Witte JH, Foekens JA, Leake RE, Brünner N, Sweep CG: *Immunoassays (ELISA) of urokinase-type plasminogen activator (uPA): Report of an EORTC/BIOMED-1 workshop*. Eur J Cancer 32A(8):1371-1381, 1996

- Bièche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M: *Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications*. *Clinical Chemistry* 45(8):1148–1156, 1999
- Blasi F: *Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the uPA-u-PAR-PAI-1 system*. *Thrombosis Haemost* 82(2):298-304, 1999
- Bouchet C, Hacene K, Martin PM, Becette V, Tubiana-Hulin M, Lasry S, Oglobine J, Spyrtos F: *Dissemination risk index based on plasminogen activator system components in primary breast cancer*. *J Clin Oncol* 17(10):3048-3057, 1999
- Bühling, KJ (Hrsg.), Friedmann W (Hrsg.): *Tumorartige Läsionen und Tumoren der Brustdrüse- Mammakarzinom*. In: Intensivkurs Gynäkologie, Urban & Fischer, p.435-453, 2003
- Cancer Research UK: *Cancer Incidence Worldwide*. info.cancerresearchuk.org/cancerstats, http://info.cancerresearchuk.org/images/pdfs_cs_world_map/pdf-, 2002, Zugriff am 13.04.2005
- Cardoso F, Durbecq V, Sotiriou C, Ross JS: *HER-2/neu gene and protein in breast cancer*. In: *Molecular Oncology of Breast Cancer*, Jeffrey S Ross, Gabriel N.Hortobagy (Hrsg.). Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, p.232-255, 2005
- Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S: *c-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases*. *J Clin Oncol* 14(10):2702-2708, 1996
- Chazaud B, Ricoux R, Christov C, Plonquet A, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G: *Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations*. *Am J Pathol* 160(1):237-246, 2002
- Clark G: *Prognostic and predictive factors*. In: *Diseases of the breast*. Harris JR, Lippmann ME, Morrow M, Osborne CK (eds). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 489-514, 2000
- Clark GM, McGuire WL: *Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer*. *Semin Oncol* 15(2, suppl1): 20-25, 1988
- Cox DR: *Regression models and life-tables*. *J R Statist Soc (B)* 34:187-200, 1972
- 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(2):106-115, 2003
- Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ: *Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins*. *J Cell Biol* 160(5):781-791, 2003
- Danø K, Behrendt N, Høyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, Rømer J: *Plasminogen activation and cancer*. *Thromb Haemost* 93(4): 676-681, 2005

- Degryse B, Sier CF, Resnati M, Conese M, Blasi F: *PAI-1 inhibits urokinase-induced chemotaxis by internalizing the urokinase-receptor*. FEBS Lett 505(2):249-254, 2001
- Dellas C, Loskutoff DJ: *Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease*. Thromb Haemost 93(4):631-640, 2005
- Deng G, Curriden SA, Hu G, Czekay RP, Loskutoff DJ: *Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin*. J Cell Physiol 189(1):23-33, 2001
- Dickson RB, Lippman ME: *Oncogenes, suppressor genes, and signal transduction*. In: Diseases of the breast. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (eds). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 281-297, 2000
- Dowsett M: *Current issues: Quality control and validation, Abstract*. HER Targeting-Advancing Cancer Treatment, 2nd State of the Art Conference, Montreux 2002
- Duffy MJ, Duggan C: *The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumor markers for the individualised management of patients with cancer*. Clin Biochem 37(7):541-548, 2004
- Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ: *Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report*. Cancer 62(3):531-533, 1988
- Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fenelly JJ, Andreassen P: *Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer*. Cancer Res 50(21):6827-6829, 1990
- Duffy MJ: *Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies*. Clin Chem 48(8):1194-1197, 2002
- Dumitrescu RG, Cotarla I: *Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?* J Cell Mol Med 9(1):208-221, 2005
- Durand MK, Bodker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, Kjelgaard S, Mathiasen L, Pedersen KE, Skeldal S, Wind T, Andreassen PA: *Plasminogen activator inhibitor-1 and tumour growth, invasion, and metastasis*. Thromb Haemost 91(3):438-449, 2004
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG): *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of randomised trials*. Lancet 365(9472):1687-1717, 2005
- Eccles SA: *The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia 6(4):393-406, 2001
- Ellis M: *Overcoming endocrine therapy resistance by signal transduction inhibition*. The Oncologist 9(suppl3):20-26, 2004

Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Jänicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M: *Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for Erb-B1- and/ or Erb-B2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial.* J Clin Oncol 19(18):3808-3816, 2001

Ellis MJ, Hayes DF, Lippman ME: *Treatment of metastatic breast cancer.* In: Diseases of the breast. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (eds). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 749-797, 2000

Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi, 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(9):3129-3136, 1998

European Medicines Agency- Press Office: *Press Release European Medicines Agency: Committee for Medicinal Products for Human Use 24-27 April 2006.* <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/press/pr/15260806en.pdf>, Zugriff am 10.07.2006

Fernö M, Bendahl PO, Borg Å, Brundell J, Hirschberg 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.* Eur J Cancer 32A(5):793-801, 1996

Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brüner N, Jänicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL, Klijn JG: *The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients.* Cancer Res 60(3):636-643, 2000

Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Kramer MD, Jänicke F, Klijn JG: *Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer.* J Clin Oncol 12(8):1648-58, 1994

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members: *Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005.* Ann Oncol 16(10):1569-1583, 2005

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ: *Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer.* J Natl Cancer Inst 90(21):1601-1608, 1998

Grøndahl-Hansen J, Peters HA, van Putten WL, Look MP, Pappot H, Rønne E, Danø K, Klijn JG, Brüner N, Foekens JA: *Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group.* Clin Cancer Res 1(10):1079-1087, 1995

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Säve-Söderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, Martinez-Tello F, Tiltman A, Torhorst J, Grigolato P, Bettelheim R, Neville AM, Bürki K, Castiglione M, Collins J, Lindtner J, Senn HJ: *Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer.* J Clin Oncol 10(7):1049-1056, 1992

- Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ: *Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1*. *Cancer Res* 60(20):5839-5847, 2000
- Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C: *Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridisation*. *Hum Pathol* 34(10): 1043-1047, 2003
- Hanahan D, Weinberg RA: *Hallmarks of cancer*. *Cell* 100(1):57-70, 2000
- Hanby AM: *Aspects of molecular phenotype and its correlations with breast cancer behaviour and taxonomy*. Review. *Br J Cancer* 92(4):613-617, 2005
- Hansen S, Overgaard J, Rose J, Knoop A, Lænkholm AV, Andersen J, Sørensen FB, Andersen PA: *Independent prognostic value of angiogenesis and the level of plasminogen activator inhibitor type 1 in breast cancer patients*. *Br J Cancer* 88(1):102-08, 2003
- Harbeck N, Alt U, Berger U, Krüger A, Thomssen C, Jänicke F, Höfler H, Kates RE, Schmitt M: *Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, cathepsins B, D and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy*. *Clin Cancer Res* 7(9):2757-2764, 2001
- Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt M: *Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up*. *Br J Cancer* 80(3-4):419-426, 1999c
- 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(3C): 2187-2197, 1998b
- Harbeck N, Kates R, Schmitt M: *Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination*. *J Clin Oncol* 20(4): 1000-1007, 2002a
- Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M: *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer*. *Thromb Haemost* 91(3):450-456, 2004
- Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA: *Enhanced benefit from adjuvant systemic chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) (n=3,424)*. *Cancer Res* 62(16): 4617-4622, 2002b.
- Harbeck N, Magdolen V, Diamandis E, Ross JS, Kates RE, Schmitt M: *Tumor-associated proteolytic factors: Markers for tumor invasion and metastasis*. In: *Molecular Oncology of Breast Cancer*, Jeffrey S Ross, Gabriel N.Hortobagay (Hrsg.). Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, p.276 ff/ p.284 f, 2005

Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, Dettmar P, Pölcher M, Kuhn W, Ulm K, Graeff H, Schmitt M: *HER-2/neu gene amplification by in-situ hybridization allows risk group assessment in node-negative breast cancer*. Int J Oncol 14(4):663-671, 1999a

Harbeck N, Schmitt M, Kates RE, Kiechle M, Zenzoum I, Jänicke F, Thomssen C: *Clinical utility of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts*. Clin Breast Cancer 3(3):196-200, 2002c

Harbeck N, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates RE, 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 Treat 54(2):147-157, 1999b

Harbeck N: *Klinische Bedeutung von Proliferations- und Invasionsfaktoren beim Mammakarzinom*. Habilitationsschrift an der TU München, 1998a

Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche HJ, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ: *Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers*. J Natl Cancer Inst 88(20):1456-1466, 1996

Hayes DF: *Do we need better prognostic factors in node-negative breast cancer? Arbitr*. Eur J Cancer 36(3):302-306, 2000

Hayes DF: *Markers of increased risk for failure of adjuvant therapies. Review*. Breast 12(6):543-549, 2003

Ignatoski KM, Maehama T, Markwart SM, Dixon JE, Livant DL, Ethier SP: *ERBB-2 overexpression confers PI 3'Kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells*. Br J Cancer 82(3):666-674, 2000

Isogai C, Laug WE, Shimada H, Declerck PJ, Stins MF, Durden DL, Erdreich-Epstein A, DeClerck YA: *Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin*. Cancer Res 61(14):5587-5594, 2001

Jänicke F, Pache L, Schmitt M, Ulm K, Thomssen C, Prechtel A, Graeff H: *Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1*. Cancer Res 54(10):2527-2530, 1994

Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep GC, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M; German N0 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

Jänicke F, Schmitt M, Graeff H: *Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type I inhibitor in breast cancer*. Semin Thromb Haemost 17(3):303-312, 1991

- Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H: *Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong independent prognostic factors in node-negative breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat* 24(3):195-208, 1993
- Jänicke F, Schmitt M, Ulm K, Gössner G, Graeff H: *Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer*. *Lancet* 2(8670):1049, 1989
- Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkänen L, Turpeenniemi-Hujanen T, von Smitten K, Lundin J: *Amplification of erbB2 and erbB2 overexpression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study*. *Clin Cancer Res* 9(3):923-930, 2003
- Kaplan EL, Meier P: *Non-parametric estimation from incomplete observations*. *J Am Statist Assoc* 53:457-481, 1958
- Keefe DL: *Trastuzumab-associated cardiotoxicity*. *Cancer* 95(7):1592-1600, 2002
- Kim SJ, Shiba E, Kobayashi T, Yayoi E, Furukawa J, Takatsuka Y, Shin E, Koyama H, Inaji 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
- Kjøller L: *The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility*. *Biol Chem* 383(1):5-19, 2002
- Knoop A, Andreasen PA, Andersen JA, Hansen S, Lænkholm AV, Simonsen 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(6):932-940, 1998
- Konecny G, Untch M, Arboleda J, Wilson C, Kahlert S, Boettcher B, Felber M, Beryt M, Lude S, Hepp H, Slamon D, Pegram M: *HER-2/neu and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer*. *Clin Cancer Res* 7(8):2448-2457, 2001
- Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang HJ, Bauernfeind I, Epstein M, Stieber P, Vernes JM, Gutierrez J, Hong K, Beryt M, Hepp H, Slamon DJ, Pegram MD: *Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients*. *Clin Cancer Res* 10(5):1706-1716, 2004a
- Konecny GE, Thomssen C, Lück HJ, Untch M, Wang HJ, Kuhn W, Eidtman H, du Bois A, Olbricht S, Steinfeld D, Möbus V, von Minckwitz G, Dandekar S, Ramos L, Pauletti G, Pegram MD, Jänicke F, Slamon DJ. *Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer*. *J Natl Cancer Inst* 96(15):1141-1151, 2004b
- Kute TE, Grøndahl-Hansen J, Shao SM, Long R, Russell G, Brüner N: *Low cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols defines a group of node negative breast cancer patients with low risk of recurrence*. *Breast Cancer Res Treat* 47(1):9-16, 1998

Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Lohrs U: *HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization*. J Clin Oncol 19(2):354-363, 2001

Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y: *Differential endocytic routing of homo- and heterodimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers*. EMBO J 17(12):3385–3397, 1998

Liu G, Shuman MA, Cohen RL: *Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells*. Int J Cancer 60(4):501-506, 1995

Look M, van Putten W, Duffy M, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Fred Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder M, Manders P, Edward Fiets W, Blankenstein M, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex L, Klijn J, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens J: *Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in breast cancer patients*. Thromb Haemost 90(3):538-548, 2003

Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA: *Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst 94(2):116-128, 2002

Ma Z, Webb DJ, Jo M, Gonias SL: *Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells*. J Cell Sci 114(18):3387-3396, 2001

Manders P, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Grebenchtchikov N, Foekens JA, Beex LV, Sweep CG: *Predictive impact of urokinase-type plasminogen activator : plasminogen activator inhibitor type-1 complex on the efficacy of adjuvant systemic therapy in primary breast cancer*. Cancer Res 64(2):659-664, 2004

McGuire W, Clark GM: *Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer*. N Engl J Med 326(26):1756-1761, 1992

McGuire WL: *Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines*. J Natl Cancer Inst 83(3): 154-155, 1991

Meijer-van Gelder ME, Look MP, Peters HA, Schmitt M, Brünner N, Harbeck N, Klijn JG, Foekens JA: *Urokinase-type plasminogen activator system in breast cancer: association with tamoxifen therapy in recurrent disease*. Cancer Res 64(13):4563-4568, 2004

- Ménard S, Balsari A, Casalini P, Tagliabue E, Campiglio M, Bufalino R, Cascinelli N: *HER-2-positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors.* Clin Cancer Res 8(2):520-525, 2002
- Molina R, Barak V, van Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, Goike H, Lamerz R, Nap M, Sölétormos G, Stieber P: *Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations.* Tumor Biol 26(6):281-293, 2005
- Moliterni A, Ménard S, Valagussa P, Biganzoli E, Boracchi P, Balzari A, Casalini P, Tomasic G, Marubini E, Pilotti S, Bonadonna G: *HER2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer.* J Clin Oncol 21(3):458-462, 2003
- Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M, Henderson IC: *c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer.* New Engl J Med 330(18):1260-1266, 1994
- Nachrichten Medizin: *EMEA: Zulassung von Herceptin® beim frühen Mammakarzinom. Mitteilung vom 28.04.2006.* <http://www.aerzteblatt.de/v4/news/news.asp?id=24014>, Zugriff am 10.07.2006
- Nahta R, Esteva FJ: *HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions.* Clin Cancer Res 9(14):5078-5084, 2003
- Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ: *Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer.* Nat Clin Pract Oncol 3(5):269-280, 2006
- NCBI, National Center for Biotechnology Information – OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man: *EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR; EGFR.* www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=131550, Zugriff am 26.02.2006b
- NCBI, National Center for Biotechnology Information – OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man: *V-ERB-B2 AVIAN ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 2; ERBB2.* www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=164870, Zugriff am 26.02.2006a
- Neyt M, Albrecht J, Cocquyt V: *An economic evaluation of Herceptin® in adjuvant setting: the Breast Cancer International Research Group 006 trial.* Ann Oncol 17(3):381-390, 2006, Epub Nov 30:1-10, 2005
- Özcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hübner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN: *Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy.* Proc Natl Acad Sci U S A 99(13):8880-8885, 2002
- Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, Wolmark N: *HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15.* J Natl Cancer Inst 92(24):1991-1998, 2000
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: *Global Cancer Statistics, 2002.* CA Cancer J Clin 55(2):74-108, 2005

Pedersen AN, Mouridsen HT, Tenney DY, Brüner N: *Immunoassays of urokinase (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) in detergent extracts of breast cancer tissue*. Eur J Cancer 39(7): 899-908, 2003

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff M, Sütö T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD - Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study: *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer*. New Engl J Med 353(16):1659-1672, 2005b

Piccart-Gebhart MJ: *Moving away from the "one shoe fits all" strategy: the key to future progress in chemotherapy*. J Clin Oncol 23(8):1611-1613, 2005a

Powles TJ: *Adjuvant therapy for early breast cancer: a time to refine*. J Natl Cancer Inst 89(22):1652-1654, 1997

Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ: *HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas*. J Clin Oncol 15(8):2894-2904, 1997

Pressemitteilung vom 20.09.2004: *Wilex starts clinical trial with new anti-cancer compound WX-671*. http://www.wilex.de/german%20frames/News_fs/Presse_fs.htm, 2004b, Zugriff am 18.06.2005

Pressemitteilung vom 25.05.2004: *Wilex and Fox Chase Cancer Center Begin Clinical Trial in the U.S. with Novel Compound WX-UK1 Targeting Tumor Cell Invasion and Metastasis* http://www.wilex.de/german%20frames/News_fs/Presse_fs.htm, 2004a, Zugriff am 18.06.2005

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch: bearbeitet von der Wörterbuch-Redaktion des Verlages unter der Leitung von Helmuth Hildebrandt. 258., neu bearbeitete Auflage-Berlin: de Gruyter, 1998

Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Marthin J: *The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years*. Cancer 88(4):804-13, 2000

Révillon F, Bonnetterre J, Peyrat JP: *ERBB2 Oncogene in human breast cancer and its clinical significance*. Eur J Cancer 34(6):791-808, 1998

Rifkin DB: *Cross-talk among proteases and matrix in the control of growth factor action*. Fibrinolysis 11(1):3-9, 1997

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N: *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. New Engl J Med 353(16): 1673-1684, 2005

Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ: *The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy*. The Oncologist 8(4):307-325, 2003

Ross JS, Fletcher JA: *The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor and Target for Therapy*. The Oncologist 3(4):237-252, 1998

Ross JS, Harbeck N: *Prognostic and predictive factors overview*. In: Molecular Oncology of Breast Cancer, Jeffrey S Ross, Gabriel N. Hortobagay (Hrsg.). Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA. p.135, 2005

Schmidt M, Lewark B, Kohlschmidt N, Glawatz C, Steiner E, Tanner B, Pilch H, Weikel W, Kölbl H, Lehr HA: *Long-term prognostic significance of HER-2/neu in untreated node-negative breast cancer depends on the method of testing*. Breast Cancer Res 7(2):R256-R266, 2005

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reunig 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*. Thromb Haemost. 78(1):285-296, 1997

Schmitt M, Wilhelm OG, Reuning U, Krüger A, Harbeck N, Lengyel E, Graeff, Gänsbacher B, Kessler H, Bürgle M, Stürzebacher J, Sperl S, Magdolen V: *The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumor therapy*. Fibrinolysis Proteol 14(2-3):114-132, 2000

Schnitt SJ, Jacobs TW: *Current status of HER2 Testing: caught between a rock and a hard place*. Am J Clin Pathol 116(6):806-810, 2001

Schrohl AS, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J, Brüner N: *Tumor markers: from laboratory to clinical utility*. Mol Cell Proteomics 2003 2(6):378-387, 2003

Setyono-Han B, Stürzebecher J, Schmalix WA, Muehlenweg B, Sieuwerts AM, Timmermans M, Magdolen V, Schmitt M, Klijn JG, Foekens JA: *Suppression of rat breast cancer metastasis and reduction of primary tumor growth by the small synthetic urokinase inhibitor WX-UK-1*. Thromb Haemost 93(4):779-776, 2005

Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R: *Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer*. J Natl Cancer Inst 96(12):926-935, 2004

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science 235(4785):177-182, 1987

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med 344(11): 783-792, 2001

- Sweep CG, Geurts-Moespot J, Grebenschikov N, de Witte JH, Heuvel JJ Schmitt M, Duffy MJ, Jänicke F, Kramer MD, Foekens JA, Brünner N, Brugal G, Pedersen AN, Benraad TJ: *External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts.* Br J Cancer 78(11):1434-1441, 1998
- Sweep FC, Fritsche HA, Gion M, Klee GG, Schmitt M; EORTC-NCI Working Group: *Considerations on development, validation, application, and quality control of immuno(metric) biomarker assays in clinical cancer research: an EORTC-NCI working group report.* Int J Oncol 23(6):1715-26, 2003
- Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J: *Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples.* Am J Pathol 157(5):1467-1472, 2000
- Thor AD, Liu S, Edgerton S, Moore D 2nd, Kasowitz KM, Benz CC, Stern DF, DiGiovanna MP: *Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer.* J Clin Oncol 18(18): 3230-3239, 2000
- Tsuchiya H, Sunayama C, Okada G, Matsuda E, Tomita K, Binder BR: *Plasminogen activator inhibitor-1 accelerates lung metastasis formation of human fibrosarcoma cells.* Anticancer Res 17(1A):313-316, 1997
- Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM: *Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message.* J Clin Oncol 19(10):2714-2712, 2001
- Tuma RS: *Trastuzumab faces trials, clinical and otherwise.* J Natl Cancer Inst 98(5):296-298, 2006
- Tumorzentrum München (Sauer H., ed.) *Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge - Mammakarzinome.* Herausgeber: Tumorzentrum München, 10. Auflage, 2005
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karungaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y: *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor.* Mol and Cell Biol. 16(10):5276-5287, 1996
- Van Roy F, Mareel M: *Tumor invasion: effects of cell adhesion and motility.* Trends Cell Biol 2(6): 163-169, 1992
- Volpi A, Nanni O, De Paola F, Granato AM, Mangia A, Monti F, Schittulli F, De Lena M, Scarpi E, Rosetti P, Monti M, Gianni L, Amadori D, Paradiso A: *HER-2 expression and cell proliferation: prognostic markers in patients with node-negative breast cancer.* J Clin Oncol 21(14):2708-2712, 2003

Webb DJ, Thomas KS, Gonias SL: *Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth.* J Cell Biol 152(4):741-752, 2001

Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF: *When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer.* J Clin Oncol 19(8):2334-2356, 2001

Yarden Y, Sliwkowski MX: *Untangling the ErbB signalling network.* Nat Rev Mol Cell Biol 2(2):127-137, 2001

Yarden Y: *Biology of HER2 and its importance in breast cancer.* Oncology 61(suppl 2):1-13, 2001

Yurdseven S: *Prognostische Bedeutung von HER-2/neu Gen-Amplifikation mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung und HER-2/neu Protein-Überexpression mittels Immunhistochemie sowie uPA und PAI-1 beim nodal-negativen Mammakarzinom.* Dissertationsschrift zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin, 2001

Zenzoum I, Kates RE, Ross JS, Dettmar P, Dutta M, Henrichs C, Yurdseven S, Höfler H, Kiechle M, Schmitt M, Harbeck N: *Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer.* J Clin Oncol 21(6):1022-1028, 2003

8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms weltweit (je 100 000 Einwohner), Krebsstatistik 2002 (modifiziert nach <i>Parkin et al., 2005</i>)	5
Abb. 2	Nachweisprozess des klinisch-prognostischen Nutzens von uPA und PAI-1 (modifiziert nach <i>Harbeck et al., 2004</i>)	12
Abb. 3	Schematische Darstellung der Mechanismen ausgelöst durch uPA- und PAI-1-induzierte Vorgänge. Neben direkt stattfindenden perizellulären Interaktionen wird durch das uPA-System über intrazelluläre Signaltransduktion u. a. auch die Zellproliferation stimuliert (modifiziert nach <i>Harbeck et al. 2004</i>).	14
Abb. 4	Mechanismen der PAI-1-vermittelten Zellablösung von Matrixproteinen (modifiziert nach <i>Czekay et al., 2003</i>)	15
Abb. 5	Die HER-Rezeptorfamilie (modifiziert nach <i>Ross et al., 2003</i>)	16
Abb. 6	Die Mitglieder der HER-Familie und ihre Liganden (jeweils grau unterlegt; modifiziert nach <i>Albanell & Ross, 2005</i>)	17
Abb. 7 A-F	Einfluss der Prognosefaktoren auf die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) bei nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen ohne adjuvante Therapie	33/34
Abb. 7 A	uPA/PAI-1	33
Abb. 7 B	HER-2 AMP	33
Abb. 7 C	HER-2 EXP	33
Abb. 7 D	Grading	34
Abb. 7 E	pT-Stadium	34
Abb. 7 F	Steroidhormonrezeptoren	34
Abb. 8 A-F	Einfluss der Prognosefaktoren auf das Gesamtüberleben (OS) bei nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen ohne adjuvante Therapie	37/38
Abb. 8 A	uPA/PAI-1	37
Abb. 8 B	HER-2 AMP	37
Abb. 8 C	HER-2 EXP	37

Abb. 8 D	Grading	38
Abb. 8 E	pT-Stadium	38
Abb. 8 F	Steroidhormonrezeptoren	38
Abb. 9	9 A und B: Kombinierte Auswirkung von HER-2-Genamplifikation (HER-2 AMP) und uPA/PAI-1 auf das rezidivfreie Überleben (DFS, 9 A) und das Gesamtüberleben (OS, 9 B)	40
Abb. 9 A	DFS	40
Abb. 9 B	OS	40
Abb. 10	10 A und B: Kombinierte Auswirkung von HER-2-Proteinüberexpression (HER-2 EXP) und uPA/PAI-1 auf das rezidivfreie Überleben (DFS, 10 A) und das Gesamtüberleben (OS, 10 B)	42
Abb. 10	DFS	42
Abb. 10	OS	42

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms (<i>Tumorzentrum München, 2005; modifiziert nach Armstrong et al., 2000</i>)	6
Tab. 2	Etablierte und tumorbiologische Prognosefaktoren für das nodal-positive und nodal-negative Mammakarzinom (nach <i>AGO, 2006</i>)	8
Tab. 3	Kriterien zur Evaluierung prognostischer Marker (modifiziert aus <i>Tumorzentrum München, 2005; modifiziert nach McGuire, 1991</i>)	10
Tab. 4	Evidenzniveaus (Levels of evidence) zur Einstufung des klinischen Nutzens von Tumormarkern (modifiziert nach <i>Tumorzentrum München 2005, nach Hayes et al., 1996</i>)	10
Tab. 5	Überblick über verschiedene Bestimmungsmethoden des HER-2-Status im Tumorgewebe (zusammengefasst aus <i>Ross & Fletcher, 1998; Ross et al., 2003</i>)	21
Tab. 6	Verteilung der histomorphologischen, klinischen und tumorbiologischen Faktoren bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom ohne adjuvante systemische Therapie (n=118; einige Faktoren konnten nicht bei allen Patientinnen bestimmt werden)	25
Tab. 7	Univariate and multivariate Analyse für die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) von Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom ohne adjuvante systemische Therapie (n=118, medianer Nachbeobachtungszeitraum 126 Monate). Zeitvariierende Auswirkungen wurden für pT-Stadium, Grading, Steroidhormonerezeptorstatus und HER-2-Genamplifikation (HER-2 AMP) festgestellt.	32
Tab. 8	Univariate und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben von nodal-negativen Patientinnen ohne adjuvante systemische Therapie (n=118, medianer Nachbeobachtungszeitraum 126 Monate)	36
Tab. 9	Schlüsselstudien zum prognostischen Einfluss von uPA und PAI-1 beim primären Mammakarzinom (modifiziert nach <i>Harbeck et al., 2005</i>)	47
Tab. 10	Vergleich wichtiger Publikationen zu HER-2 als prognostischer Marker beim nodal-negativen Mammakarzinom	50

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Frau **Prof. Dr. med. M. B. Kiechle** für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an ihrer Klinik durchzuführen.

Meiner Doktormutter, Frau **Prof. Dr. med. Nadia Harbeck** für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit und deren statistische Auswertung sowie für ihre fortwährend engagierte Betreuung und stete Informationsbereitschaft bei anfallenden Fragestellungen, die Verfügbarmachung schwer zu beschaffender Quellen und besonders für die zahlreichen Verbesserungsvorschläge des Manuskriptes. Besonders möchte ich ihr für die gute Zusammenarbeit danken und dafür, dass sie den Glauben an die Fertigstellung dieser Arbeit trotz diverser Widrigkeiten nicht gänzlich verloren hat.

Herrn **Dr. Ronald Kates, PhD** für die statistische Auswertung der Arbeit.

Frau **Dr. med. Katja Annecke** für die präzise Beantwortung von Fragen zu aktuellen Änderungen in der klinischen Praxis.

Herzlichen Dank an Frau **Dr. med. Dorothee Watz**, Frau **Silvia Riemer** und Frau **Cristina Bergfeld** für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Mann **Dr. Shitanshu Uppal (MBBS)** bedanken für seine vielfältigen Versuche, mein Gehirn für die Mathematik zu gewinnen und seine unerschöpfliche, liebevolle Unterstützung.

Zum Schluss ein riesiges Dankeschön an meine Eltern, **Elisabeth** und **Samaresh Dutta**, die mir das Studium ermöglicht haben und dabei mindestens genauso viel Durchhaltevermögen brauchten wie ich selbst. Meiner Mutter danke ich nochmals im Besonderen für die umfangreiche Hilfestellung in Fragen der Formatierung.

Ihnen und meinen Schwestern **Bidisha** Dutta und **Kavita** Sharma, sowie meinem Mann danke ich für ihr Verständnis, ihre stetige multimodale Unterstützung und die Geduld beim Ertragen meiner einen oder anderen Laune.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:	Moushumi Dutta Geboren am 11.06.1975 in München	
Schulbildung:	1981-1985 1985-1994 01.07.1994	Grundschule Pullach im Isartal Gymnasium Pullach im Isartal Allgemeine Hochschulreife
Studium:	1995-1998 1998-2002 13.11.2002	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München, präklinischer Studienabschnitt Klinischer Abschnitt des Studiums an der Technischen Universität München III. Staatsexamen
Praktisches Jahr:	2001-2002	Gynäkologie und Geburtshilfe/ Frauenklinik Klinikum rechts der Isar, München; All India Institute of Medical Sciences, Neu Delhi, Indien Innere Medizin/ All India Institute of Medical Sciences; Erste Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München Chirurgie/Städtisches Krankenhaus Bogenhausen
ÄiP/ Weiterbildung:	Feb-Okt 2003 Feb-Aug 2004 Aug 2004-Feb 2005 Feb-Aug 2005 Aug-Dez 2005 März 2007	ÄiP Chirurgie, Krankenhaus Martha Maria München ÄiP/ PRHO Innere Medizin, Monklands Hospital Airdrie, Schottland ÄiP/ PRHO Chirurgie, Leeds General Infirmary, Leeds, England Bearbeitung der Dissertation Herz-Thoraxchirurgie, Leeds General Infirmary, Trust-Doctor SHO-Grade USMLE Step1 (US-Amerikanisches Medizinisches Staatsexamen, Erster Abschnitt)