

Aus der Medizinischen Klinik II
Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Evaluation von zirkulierenden Biomarkern bei der adjuvanten Therapie des
nodalpositiven Mammakarzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Steffi Siepmann

aus Berlin

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. D. Lüftner

2.: Prof. Dr. med. J. Sehouli

3.: Priv.-Doz. Dr. med. S. Kümmel

Datum der Promotion: 20.04.2009

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	- 1 -
1.1 AUSGEWÄHLTE BIOMARKER	- 3 -
1.2 ZIELSETZUNG.....	- 7 -
2 MATERIAL UND METHODEN.....	- 9 -
2.1 „ASG-STUDIE 1-3 LK+“	- 9 -
2.1.1 Design	- 9 -
2.1.2 Ziele	- 11 -
2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien	- 12 -
2.2 WISSENSCHAFTLICHES BEGLEITPROGRAMM	- 12 -
2.2.1 Bestimmung der biochemischen Marker im Plasma	- 14 -
2.3 STATISTIK.....	- 18 -
3 ERGEBNISSE.....	- 21 -
3.1 KLINISCH-DEMOGRAPHISCHE ANGABEN	- 21 -
3.2 ERGEBNISSE DER CA 15-3-MESSUNGEN IM PLASMA.....	- 23 -
3.2.1 CA 15-3-Konzentrationen zum Therapiebeginn im Gesamtkollektiv	- 24 -
3.2.2 Verläufe der CA 15-3-Spiegel in den Therapiearmen A und B	- 25 -
3.3 ERGEBNISSE DER HER-2/NEU-MESSUNGEN IM PLASMA	- 27 -
3.3.1 HER-2/neu-Konzentrationen zum Therapiebeginn im Gesamtkollektiv.....	- 27 -
3.3.2 Verläufe der HER-2/neu-Spiegel in den Therapiearmen A und B.....	- 28 -
3.4 ERGEBNISSE DER EGFR-MESSUNGEN IM PLASMA	- 30 -
3.4.1 EGFR-Konzentrationen zum Therapiebeginn im Gesamtkollektiv	- 30 -
3.4.2 Verläufe der EGFR-Spiegel in den Therapiearmen A und B.....	- 31 -
3.5 ERGEBNISSE DER VEGF ₁₆₅ -MESSUNGEN IM PLASMA	- 33 -
3.5.1 VEGF ₁₆₅ -Konzentrationen zum Therapiebeginn im Gesamtkollektiv	- 33 -
3.5.2 Verläufe der VEGF ₁₆₅ -Spiegel in den Therapiearmen A und B.....	- 34 -
3.6 EINFLUSS DER GEWÄHLTEN PROGNOSERELEVANTEN MERKMALE AUF DIE BASELINEKONZENTRATIONEN UND BIOMARKERVERLÄUFE	- 36 -

4 DISKUSSION	- 49 -
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	- 72 -
6 ANHANG	- 73 -
6.1 LITERATURVERZEICHNIS	- 74 -
6.2 ABKÜRZUNGEN	- 83 -
6.3 LEBENSLAUF	- 84 -
6.4 PUBLIKATIONSLISTE	- 85 -
6.5 DANKSAGUNG	- 90 -
6.6 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	- 91 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Studiendesign der „ASG-Studie 1-3 LK+“	- 10 -
Abbildung 2:	Abnahme von EDTA-Plasma im Studienablauf der „ASG-Studie 1-3 LK+“ zum Zeitpunkt der ersten (1. Probe) und letzten (2. Probe) Chemotherapiegabe.	- 13 -
Abbildung 3:	Altersverteilung in den beiden Therapiearmen A und B	- 23 -
Abbildung 4:	Verteilungskurve nach Gauß der CA 15-3-Werte im Plasma vor Therapiebeginn im Gesamtkollektiv.....	- 24 -
Abbildung 5:	Boxplots zum Anstieg der CA 15-3-Werte von Therapiebeginn zum -ende, getrennt betrachtet für Therapiearm A ($p=0,0103*10^{-8}$) und Therapiearm B ($p<0,01*10^{-14}$), dargestellt in Boxplots mit den 25/50/75%-Perzentilen.	- 26 -
Abbildung 6:	Verteilungskurve nach Gauß der HER-2/neu-Werte im Plasma vor Therapiebeginn im Gesamtkollektiv.....	- 27 -
Abbildung 7:	Anstieg der HER-2/neu-Werte von Therapiebeginn zum Therapieende, getrennt betrachtet für Therapiearm A ($p=0,0176*10^{-8}$) und Therapiearm B ($p=0,01*10^{-7}$), dargestellt in Boxplots mit den 25/50/75%-Perzentilen.....	- 29 -
Abbildung 8:	Verteilungskurve nach Gauß der EGFR-Werte im Plasma vor Therapiebeginn im Gesamtkollektiv.....	- 30 -
Abbildung 9:	Boxplots zum Verlauf der EGFR-Werte von Therapiebeginn zum Therapieende, getrennt betrachtet für Therapiearm A ($p=0,984$) und Therapiearm B ($p=0,0242*10^{-4}$), dargestellt in Boxplots mit den 25/50/75%-Perzentilen.....	- 32 -
Abbildung 10:	Verteilungskurve nach Gauß der VEGF ₁₆₅ -Werte im Plasma vor Therapiebeginn im Gesamtkollektiv.....	- 33 -
Abbildung 11:	Boxplots zum Verlauf der VEGF ₁₆₅ -Werte von Therapiebeginn zum Therapieende, getrennt betrachtet für Therapiearm A ($p=0,871$) und Therapiearm B ($p=0,002$), dargestellt in Boxplots mit den 25/50/75%-Perzentilen..	- 35 -
Abbildung 12:	Boxplots zum Anstieg der HER-2/neu-Werte im Therapiearm A und B in Abhängigkeit vom Menopausenstatus, Einfluss des Menopausenstatus auf den Markerverlauf im Therapiearm A: $p=0,8570$ und Arm B: $p=0,0026$	- 37 -
Abbildung 13:	Boxplots zum Verlauf der VEGF ₁₆₅ -Konzentrationen post- und prämenopausaler Patientinnen im Therapiearm A und B.	- 38 -
Abbildung 14:	Boxplots zur Verteilung der HER-2/neu- und VEGF ₁₆₅ -Baselinekonzentrationen in Abhängigkeit vom histologischen Grading.....	- 43 -
Abbildung 15:	HER-2/neu-Konzentrationen zum Therapiebeginn und -ende bei einem signifikanten Anstieg ($p=0,02$) mit zunehmendem Grading (Differenzierungsgrad) in beiden Therapiearmen.....	- 43 -

Abbildung 16:	Boxplots zu den Baselinekonzentrationen der Biomarker HER-2/neu und EGFR in Abhängigkeit vom Menopausen- und Hormonrezeptorstatus.	- 46 -
Abbildung 18:	Gegenüberstellung der Anteile pathologischer und nicht pathologischer Biomarkerkonzentrationen, prätherapeutisch.	- 50 -
Abbildung 19:	Schematische Darstellung der Abhängigkeiten (orange) der gewählten Biomarker von den prognoserelevanten Merkmalen sowie der Änderungen der Biomarkerkonzentrationen im Verlauf des jeweiligen Therapiearms.....	- 51 -
Abbildung 20:	Signalkaskaden eines EGF-Rezeptors. SRC-1 bindet ligandenunabhängig an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors.	- 61 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kriterien für den Patienteneinschluss in die „ASG-Studie 1-3 LK+“.....	- 12 -
Tabelle 2:	Demographische und krankheitsbezogene Daten zu 221 Patientinnen aus der „ASG-Studie 1-3 LK+“.....	- 22 -
Tabelle 3:	CA 15-3 (U/ml): Verlauf in Therapiearm A und B.....	- 25 -
Tabelle 4:	HER-2/neu (ng/ml): Verlauf in Therapiearm A und B	- 28 -
Tabelle 5:	EGFR (ng/ml): Verlauf in Therapiearm A und B	- 31 -
Tabelle 6:	VEGF ₁₆₅ (pg/ml): Verlauf im Therapiearm A und B	- 34 -
Tabelle 7:	Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF ₁₆₅ vom Menopausenstatus.....	- 36 -
Tabelle 8:	Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF ₁₆₅ von der HER-2/neu-Expression im Gewebe (negativ/positiv).....	- 39 -
Tabelle 9:	HER-2/neu-Expression in den Gruppen prä- und postmenopausaler Patientinnen.....	- 40 -
Tabelle 10:	Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF ₁₆₅ von der Anzahl befallener Lymphknoten (1+/2+/3+).....	- 41 -
Tabelle 11:	Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF ₁₆₅ vom histologischen Grading (1/2/3).	- 42 -
Tabelle 12:	Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF ₁₆₅ vom Hormonrezeptorstatus (negativ/positiv).	- 44 -
Tabelle 13:	Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF ₁₆₅ vom Hormonrezeptorstatus (negativ/positiv), getrennt betrachtet für prä- und postmenopausale Patientinnen.....	- 45 -
Tabelle 14:	Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF ₁₆₅ von der Tumorgroße (<2cm/>=2cm).....	- 47 -
Tabelle 15:	Ergebnisse (p-Werte) der Varianzanalyse nach Brunner zur Bestimmung des Einflusses des Alters (Kovariate) der Patientinnen auf den Markerverlauf.....	- 47 -
Tabelle 16:	Anteil erhöhter CA 15-3-Konzentrationen für das adjuvante Mammakarzinom.	- 52 -
Tabelle 17:	EGFR-Baselinewerte in Patientinnengruppen mit einem metastasierten bzw. adjuvanten Mammakarzinom.....	- 54 -
Tabelle 18:	Streubreite (Range) und Mediane der postoperativen, prätherapeutischen Biomarkerkonzentrationen.....	- 55 -
Tabelle 19:	Mediane Konzentrationen der Biomarker im Therapieverlauf.	- 57 -
Tabelle 20:	HER-2/neu- und EGFR-Konzentrationen bezogen auf den Menopausen- oder Hormonrezeptorstatus.	- 67 -

Tabelle 21: HER-2/neu-Gewebestatus bei prä- und postmenopausalen Frauen mit einem primär invasivem Mammakarzinom. - 68 -

Tabelle 22: Vergleich der VEGF-Konzentrationen im Gewebe und im Plasma in Abhängigkeit vom HER-2/neu-Gewebestatus..... - 69 -

1 Einleitung

In der adjuvanten Situation des Mammakarzinoms sollte hinsichtlich der Häufigkeit von Fernmetastasen selbst bei kleineren Primärtumoren eine potentielle Mikrometastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung angenommen werden (1). Von der Arbeitsgruppe um Bonadonna wurde 1995 erstmals der Nutzen einer adjuvanten Polychemotherapie in einer großen randomisierten Studie mit 20-Jahres-Überlebensergebnissen belegt. Es zeigte sich eine Steigerung des Gesamtüberlebens nach 20 Jahren von 33% in der Kontrollgruppe gegenüber 42% in der Therapiegruppe. Der signifikant höhere Anteil überlebender Patientinnen ($p=0,027$) in der Therapiegruppe stützte die Hypothese, dass die Langzeiterfolge einer adjuvanten Therapie im Wesentlichen durch die Reduktion früher Krankheitsfälle bedingt wird und nicht nur Rückfallverzögerungen erzielt werden (1;2).

Die Arbeitsgruppe um Citron et al. untersuchte die adjuvante dosisdichte Chemotherapie, bestehend aus Doxorubicin, Paclitaxel und Cyclophosphamid, gefolgt von Paclitaxel bei adjuvanten nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen in einer randomisierten Studie und konnte ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben für die Gruppe der dosisdicht behandelten Patientinnen nachweisen (3). Gleichzeitig sprechen diese Ergebnisse für die Existenz von Mikrometastasen oder verbliebener lokaler Tumorzellen in der adjuvanten Situation, die mit einer adjuvanten Chemotherapie und möglicherweise in noch höherem Maße mit einer intensivierten Chemotherapie vernichtet werden können.

Einer der wichtigsten prognostischen Parameter für das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben ist das Ausmaß des axillären Lymphknotenbefalls. Die Effekte der adjuvanten Chemotherapie sind jedoch bei nodalpositiven und nodalnegativen Patientinnen vergleichbar, wenngleich sich die Überlebenszeiten aufgrund der unterschiedlichen Risikokonstellationen deutlich unterscheiden (1). In Deutschland ist nach wie vor eine Unterscheidung der nodalpositiven Frauen in die Subgruppen mit 1-3,

4-9 sowie 10 und mehr befallenen Lymphknoten gebräuchlich. Diese Einstufung basiert unter anderem auf den Erfahrungen der Arbeitsgruppe um Bonadonna, die als eine der ersten versuchte, die Therapie in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Lymphknotenbefalls zu intensivieren (1;4).

Zur Therapieselektion und –optimierung hat die Konsensuskonferenz in St. Gallen eine Einstufung der adjuvanten Mammakarzinompatientinnen in Risikogruppen vorgenommen, wobei im Jahr 2001 den nodalnegativen ein geringeres und den nodalpositiven ein höheres Risiko für einen Krankheitsrückfall zugesprochen wurde. Im Jahr 2003 folgten als prognostische Faktoren für das Mammakarzinom der Hormonrezeptorstatus und im Jahr 2007 die HER-2/neu-Überexpression im Gewebe sowie die peritumorale Gefäßinvasion. Die bis 2005 bestehenden 2 Risikogruppen wurden um eine dritte, die intermediäre, erweitert. Nach der aktuellen Risikostratifizierung der Konsensuskonferenzen in St. Gallen 2005/2007 sind z. B. die Mammakarzinompatientinnen mit 1-3 befallenen Lymphknoten ohne HER-2/neu-Überexpression im Gewebe der intermediären und die mit vorhandener HER-2/neu-Überexpression der Hoch-Risikogruppe zuzuordnen (5). Demnach sei ein Teil des in dieser Arbeit untersuchten Patientengutes in die intermediäre, der andere in die Hoch-Risikogruppe einzuordnen.

Entsprechend dieser Einstufungen wurde von der Adjuvans-Studiengruppe (ASG) im Januar 2000 eine multizentrische, prospektive, randomisierte Studie zur Lebensverlängerung von Mammakarzinompatientinnen mit 1-3 befallenen Lymphknoten gestartet. Daran angeknüpft wurde ein wissenschaftliches Begleitprogramm zur Untersuchung verschiedener biochemischer Marker im Plasma dieser Patientinnen. Auf dieser Grundlage war die vorliegende Arbeit zu den longitudinalen Verläufen von zirkulierenden Biomarkern unter der adjuvanten Therapie des nodalpositiven Mammakarzinoms möglich.

1.1 Ausgewählte Biomarker

In dieser Arbeit wurden von 221 Patientinnen mit 1-3 befallenen Lymphknoten im EDTA-Plasma der klassische Parameter CA 15-3, HER-2/neu als neuer prognostischer Faktor und experimentell die Wachstumsfaktoren EGFR und VEGF₁₆₅ im Verlauf einer adjuvanten Chemotherapie bestimmt. Mit einem Teil konnte diese Arbeit an Untersuchungen zur Serumkonzentration des HER-2/neu-Proteins bei prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen mit 1-9 befallenen Lymphknoten anknüpfen, die einen Anstieg von s-HER-2/neu unter ovarieller Ablation im Rahmen einer adjuvanten Therapiestudie mit Leuprorelin versus CMF (TABLE) zeigten (6).

CA 15-3

CA 15-3 ist ein Glykoprotein und der Familie der Muzine angehörig. Gleich wie CA 27.29 stellt CA 15-3 ein Produkt des Gens MUC-1 dar und beide sind etablierte Biomarker im Therapiemonitoring beim Mammakarzinom. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Inzidenz der pathologischen Konzentrationserhöhungen von CA 15-3 bzw. CA 27.29 mit dem Stadium der Erkrankung steigt (7). Die Unterschiede zwischen CA 15-3 und CA 27.29 leiten sich durch die angewandten Antikörper her, die in den Immunoassays zur Detektion verschiedener Epitope des MUC-1-Moleküls eingesetzt werden.

Neoplasien können zu einem vermehrten Shedding des MUC-1-Moleküls von der Zelloberfläche ins Blut führen, wo es mittels Immunoassays gemessen werden kann. Biochemisch weist MUC-1 ein hohes Molekulargewicht von 250 bis 1000 kDa auf und setzt sich aus einer zytoplasmatischen, transmembranären und extrazellulären Region zusammen. Letztere variiert zwischen einer Länge von 1000 bis 2000 Aminosäuren (8;9). Diese Heterogenität der extrazellulären Domäne, welche nach dem Shedding im Blut zirkuliert, erklärt die zuweilen diskordanten Ergebnisse der verschiedenen Immunoassays.

Die Nutzung von CA 27.29 als Biomarker für das Mammakarzinom verbreitete sich in den Vereinigten Staaten, während in Europa vorrangig CA15-3 angewandt wird (10). Vergleichende Arbeiten ergaben ähnliche Sensitivitäten der auf CA 27.29 oder CA 15-3 basierenden Assays (7;11). In dieser Arbeit wurde deshalb CA 15-3 als gängiger Tumormarker beim Mammakarzinom gewählt und synonym auch für CA 27.29 verwandt.

Schroeder et al. berichteten 2001 über eine mögliche Interaktion zwischen MUC-1 und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren. Die Arbeit zeigte, dass MUC-1 die Wachstumsfaktorrezeptoren aktivieren und darüber eine vermehrte Zellteilung auslösen kann (12).

HER-2/neu

Die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (epidermal growth factor receptor, EGFR) sind eine Familie mit den vier bekannten Vertretern: EGFR (ErbB1, HER-1), EGFR-2 (ErbB2, HER-2/neu), EGFR-3 (ErbB3, HER-3) und EGFR-4 (ErbB4, HER-4). Dieser Onkogenfamilie wird eine Bedeutung in der Entstehung, der Wachstumsregulation, der Differenzierung und der Ausbreitung maligner, solider Tumore zugesprochen (13;14). In dieser Arbeit wurden EGFR und HER-2/neu als zirkulierende Biomarker gemessen.

Das HER-2/neu-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert und kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 185 kDa (p185). Sein Proteinprodukt, ein transmembranäres Glykoprotein, besteht strukturell aus einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität, die durch Autophosphorylierung die Signaltransduktion initiiert, einer transmembranösen Domäne und einer extrazellulären Domäne (ECD). Letztere kann von der Zelloberfläche durch Metallomatrixproteasen abgespalten und in die Blutbahn freigesetzt werden. In Serum, Plasma und Überständen von Zellkulturen kann die ECD mit einem Molekulargewicht zwischen 97 und 115 kDa (p105) quantitativ bestimmt werden (15). HER-2/neu wird als epitheliales Protein in vielen Organen exprimiert, z. B. Mamma (16), Kolon (17), Pankreas (18) oder Ovar (19), und

ist damit weder organ- noch erkrankungsspezifisch. In geringen Konzentrationen kann daher HER-2/neu im Plasma und Serum gesunder Frauen und Männer nachgewiesen werden (20).

Das Tumorgewebe eines Mammakarzinoms weist in 20 bis 30% der Fälle eine erhöhte HER-2/neu-Expression auf. Für diese Patientinnen wurden eine schlechtere Prognose und ein aggressiverer Krankheitsverlauf nachgewiesen (16;21). Für den Nachweis der HER-2/neu-Expression am Gewebe stehen derzeit die Immunhistochemie (IHC) und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Verfügung. Der Nachteil dieser Verfahren ist in der Gewinnung von Probenmaterial zu sehen, was lediglich eine Bestimmung zum Zeitpunkt der Operation ermöglicht oder zusätzliche histologische Probeentnahmen erfordert. Diese eingrenzenden Möglichkeiten der Bestimmung des HER-2/neu-Status könnten in seltenen Fällen betroffenen Patientinnen in der Selektion für eine Antikörpertherapie zum Nachteil gereichen, da sowohl eine Fluktuation der HER-2/neu-Expression in Mammakarzinomzellen während des Menstruationszyklus gezeigt werden konnte als auch eine Konversion eines initial HER-2/neu-negativen Mammakarzinoms zu HER-2/neu-positiven Zellen in später auftretenden Metastasen beobachtet wurde (22).

EGFR

Der erste beschriebene epidermale Wachstumsfaktor war EGFR (HER-1, erB-1) (23-25), ein membrangebundenes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa. Die vier verschiedenen Mitglieder der EGFR-Familie weisen eine hohe strukturelle Homologie auf, und entsprechend bestehen sie alle aus einer intrazellulären, transmembranären und extrazellulären Domäne (26). An die letztere binden Liganden, wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der transforming growth factor α (TGF- α). Der Rezeptor existiert wie die anderen seiner Familie als inaktives Monomer an der Zelloberfläche unterschiedlicher Organe.

Die verschiedenen Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie vermögen untereinander Homo- oder Heterodimere zu bilden. Die Dimerisierung löst eine Aktivierung der Tyrosinkinase durch Autophosphorylierung aus und setzt verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden in Gang mit den Zielen der Regulation von Proliferation, Angiogenese, Invasion, Adhäsion und Überleben. Eine Dimerisierung und folgende Rezeptoraktivierung ist auch möglich, wenn bereits ein Partner seine extrazelluläre Domäne verloren hat (27;28). Zu welchen Anteilen die vier Mitglieder der EGFR-Familie vorliegen und wie die Dimere die Entstehung und Ausbreitung von Tumorzellen bedingen, ist noch nicht eindeutig geklärt. In dieser Untersuchung wurde die ECD des EGF-Rezeptors mit einem Molekulargewicht von 110 kDa im Plasma adjuvanter Mammakarzinompatientinnen gemessen.

VEGF₁₆₅

Als vierter Biomarker wurde in dieser Arbeit VEGF₁₆₅ bestimmt, ein Vertreter der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren. Aus dieser Familie sind die fünf Liganden VEGF-A, -B, -C, -D und -E bekannt. Das VEGF-A Gen ist auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert und weist 8 Exons, separiert durch 7 Introns, auf (29). Das Genprodukt erscheint in fünf verschiedenen Formen, die gelöst im Blutgefäß- und lymphatischen System zirkulieren. Nach der Anzahl ihrer Aminosäuren benannt, existieren die Isoformen 121, 145, 165, 189 und 206 (30;31). VEGF₁₆₅ ist die häufigste Isoform und ein an Heparin oder Heparinase gebundenes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (32).

VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind stark basisch und binden nach der Sekretion in der extrazellulären Matrix an Heparin mit einer hohen Affinität. VEGF₁₂₁, ein saures Polypeptid, weist zu Heparin eine sehr niedrige Affinität auf und ist ein frei diffusionsfähiges Protein. VEGF₁₆₅ zeigt intermediäre Eigenschaften. Wurde es von der Zelle sekretiert, ist eine freie Diffusion und Bindung an die Oberfläche endothelialer Zellen oder in der extrazellulären Matrix an Heparin oder Heparinase möglich. Auch die

Bindung an Plasmin wurde beschrieben, und es wird angenommen, dass hierdurch eine Plasminogen-Aktivierung ausgelöst werden kann (33);(34). Die resultierenden proteolytischen Eigenschaften wären wesentlich für den physiologischen und pathologischen Prozess der Angiogenese. Während VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ keine mitogene Aktivität zugesprochen wird, da sie sich in der ECM gebunden befinden, sind VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ als frei diffusionsfähige Moleküle für die Neovaskularisierung von Bedeutung (35).

Eine Hochregulierung der VEGF-mRNA konnte in einer Vielzahl humaner Tumore nachgewiesen werden, z. B. in Tumoren der Brust (36;37), der Lunge (38), des Gastrointestinaltraktes (39), der Niere oder Blase (40). VEGF kann dann übermäßig sekretiert werden und bindet als parakriner Mediator an die Oberflächenrezeptoren der endothelialen Zellen: VEGFR-1, -2 und -3. Ihre Wirkung vermitteln diese Wachstumsfaktorrezeptoren über Rezeptortyrosinkinasen nach intrazellulär. Die Aktivierung einer Signalkaskade löst die Proliferation endothelialer Zellen und die Neovaskularisation zur Versorgung der Tumorzellen aus (41). Einen regulativen Einfluss auf die VEGF-Expression besitzen verschiedene Faktoren wie die Hypoxie und verschiedene Zytokine (z. B. EGF, TGF- α oder TGF- β) (42).

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertationsschrift besteht darin, die zirkulierenden Bestandteile der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅, in der adjuvanten Situation des nodalpositiven Mammakarzinoms speziell bei Frauen mit 1-3 befallenen Lymphknoten im Hinblick auf die Unterschiede in ihren Baselinekonzentrationen und ihrer Veränderungen im longitudinalen Verlauf der adjuvanten Chemotherapie zu untersuchen.

Für eine weitere Differenzierung sollen die prognostisch relevanten Merkmale (Menopausenstatus, HER-2/neu-Gewebestatus, Lymphknotenstatus, histologisches Grading, Hormonrezeptorstatus, Tumorgröße und Alter) herangezogen und die

Biomarker in den jeweiligen Subgruppen betrachtet werden. Weiter gilt es zu testen, inwieweit diese Merkmale Einfluss auf die Biomarkerkonzentrationen nehmen.

Um jeden dieser Biomarker hinsichtlich seines Nutzens für ein therapeutisches Monitoring einzuschätzen, sollen Änderungen im longitudinalen Verlauf geprüft und diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 „ASG-Studie 1-3 LK+“

Die „ASG-Studie 1-3 LK+“ ist eine multizentrische prospektive Phase III-Studie. Mit dieser Therapieoptimierungsstudie der Adjuvans-Studiengruppe (ASG) der Nord-Ostdeutschen Gesellschaft für Gynäkologische Onkologie (NOGGO) sollte geprüft werden, ob eine sequentielle dosisdichte Therapie die Überlebensrate der Patientinnen mit 1 bis 3 befallenen Lymphknoten (LK) weiter verlängern kann. In dem Zeitraum vom Jahr 2000 bis 2004 wurden 1034 Patientinnen aus 83 nationalen Zentren in diese Studie eingebracht.

2.1.1 Design

Durchgeführt wurde die Studie als offene klinische Phase III-Studie mit zwei parallelen Gruppen A und B. Prä- und postmenopausale Patientinnen mit einem operierten, histologisch gesicherten Mammakarzinom wurden postoperativ innerhalb von 28 Tagen randomisiert in die Studie eingeschlossen.

Patientinnen der Gruppe A erhielten intravenös 4 Gaben Epirubicin 90 mg/m² und Cyclophosphamid 600 mg/m² und anschließend 4 Gaben Paclitaxel 175 mg/m² jeweils im Abstand von 3 Wochen, angelehnt an das Henderson-Schema (43). In der Gruppe B wurden intravenös 4 Gaben Epirubicin 120 mg/m² gefolgt von 4 Gaben Paclitaxel 175 mg/m² jeweils 14-tägig verabreicht. Am Tag 5 bis 10 eines jeden Zyklus sah das Protokoll des Therapiearms B eine Supportivtherapie mit Filgrastim 5µg/kg/d zur Prophylaxe der höhergradigen Neutropenie vor.

Entsprechend der dosisdichten Therapie im Arm B unterschied sich die Gesamtdauer der Chemotherapie in beiden Armen. Der Therapiearm A umfasste 21 Wochen, 14

Wochen der Therapiearm B. Das Studiendesign der „ASG-Studie 1-3 LK+“ ist in Abbildung 1 skizziert.

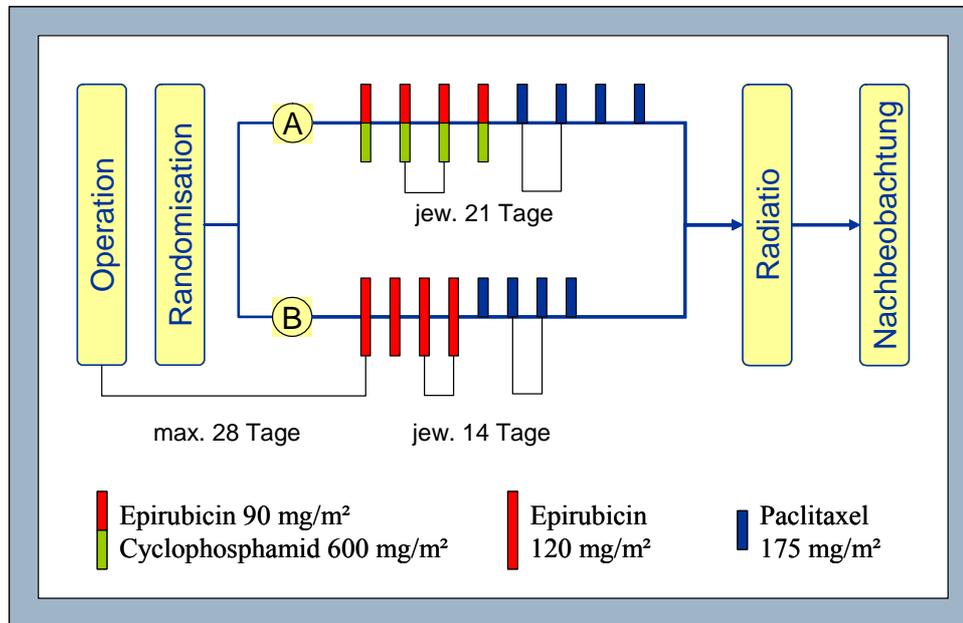


Abbildung 1: Studiendesign der „ASG-Studie 1-3 LK+“.

Nach Diagnosestellung des Mammakarzinoms wurden alle Patientinnen entweder brusterhaltend operiert oder mastektomiert. Es erfolgte die vollständige Tumorresektion plus Axilladissektion. Während der folgenden 28 postoperativen Tage sollte die Patientin in die Studie eingeschlossen und die Chemotherapie nach dem randomisierten Arm eingeleitet worden sein. Vor Studienbeginn wurden der HER-2/neu-Gewebestatus und der Hormonrezeptorstatus des Tumorgewebes bestimmt.

Bei brusterhaltender Operation war eine Strahlentherapie vorgeschrieben, die in beiden Armen in der Regel im 3. bis 6. postoperativen Monat an die Chemotherapie anschließend durchgeführt wurde. Fakultativ konnte im Arm A zwischen der Epirubicin/Cyclophosphamid- und der Paclitaxeltherapie die Radiatio des Tumorbettes erfolgen.

Die Dosismodifikation richtete sich nach dem Grad der hämatologischen, neurologischen, kardialen, hepatischen oder renalen Toxizität. Erhoben wurde das Toxizitätsprofil mittels folgender Untersuchungen: körperlicher Status, Blutbild, Serumchemie, Echokardiographie und Performance-Status. Die Lebensqualität wurde durch den Fragebogen EORTC-QLQ-C30 erfasst.

Für Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Primärtumor war eine der Chemotherapie folgende orale Tamoxifentherapie über 5 Jahre vorgesehen. Die Nachbeobachtung wurde für weitere 5 Jahre nach Beendigung der Chemotherapie festgesetzt, wobei eine Follow-up-Untersuchung in den ersten 2 Jahren alle 3 Monate, im 3. bis 5. Jahr alle 6 Monate erfolgen sollte.

Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt; der Prüfplan lag vor Studienbeginn allen zuständigen Ethikkomitees zur Beratung vor. Die Randomisierung für die Therapiegruppen erfolgte zentral durch das Studiensekretariat der Klinik für Frauenheilkunde des paritätischen Krankenhauses Lichtenberg, Berlin. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag bei Aufnahme in die Studie von allen teilnehmenden Patientinnen vor.

2.1.2 Ziele

Mittels dieser Studie sollte die Frage beantwortet werden, ob eine dosisdichte sequentielle Chemotherapie mit Epirubicin gefolgt von Paclitaxel (Arm B) einer dreiwöchentlichen Therapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid gefolgt von Paclitaxel (Arm A) hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens bei Mammakarzinompatientinnen mit 1 bis 3 positiven Lymphknoten überlegen sei. Als Beurteilungskriterium und primäres Studienziel galt die rezidivfreie Überlebenszeit. Sekundäre Studienziele waren das Gesamtüberleben und die Lebensqualität der Patientinnen in den beiden Therapiearmen, Standardtherapie versus intensivierte dosisdichte Therapie.

2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Randomisierung der Patientinnen erfolgte nach Prüfung der in Tabelle 1 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien.

Tabelle 1: Kriterien für den Patienteneinschluss in die „ASG-Studie 1-3 LK+“.

<u>Einschlusskriterien</u>	<u>Ausschlusskriterien</u>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ histologisch gesichertes Mammakarzinom nach Primäroperation (pT₁₋₃, pN₁, M₀, R₀) ▪ 1-3 befallene Lymphknoten von mindestens 10 axillär resezierten LK ▪ Alter: 18-75 Jahre ▪ ECOG-Performancestatus ≤ 1 ▪ unauffällige klinische und labormedizinische Untersuchung ▪ normale kardiale Funktion, gemessen an der LVEF ▪ Chemotherapiebeginn innerhalb von 28 Tagen nach Operation ▪ negativer Schwangerschaftstest der prämenopausalen Frauen und Einleitung einer suffizienten Kontrazeption ▪ Fähigkeit, Inhalt und Konzept der Studie zu verstehen ▪ schriftliches Einverständnis 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ bilaterales, metastasiertes oder inflammatorisches Mammakarzinom ▪ Zweitkarzinom der Mamma ▪ andere maligne Erkrankungen, ausgenommen ein kurativ behandeltes Basalzellkarzinom oder ein Zervixkarzinom in situ ▪ > 3 befallene Lymphknoten, positive Lymphknoten kontralateral, supra- oder infraklavikulär ▪ Vorliegen einer relevanten peripheren Neuropathie, ein Herzinfarkt in den letzten 6 Monaten, schwere kardiale oder kardiovaskuläre Schäden ▪ Vorbehandlung des Mammakarzinoms mit Radio-, Chemo-, Hormon- oder Immuntherapie

2.2 Wissenschaftliches Begleitprogramm

Von 83 Zentren, welche sich an der „ASG-Studie 1-3 LK+“ beteiligten, nahmen 40 Zentren an dem wissenschaftlichen Begleitprogramm teil, das die Rahmenbedingungen und Grundlagen für diese Promotion bildete. Für die Substudie wurde den teilnehmenden Zentren nach Einschluss einer Patientin Material für die Entnahme von EDTA-Plasma zu drei Zeitpunkten zur Verfügung gestellt. Voraussetzung war die

separate Einwilligung zur Teilnahme an diesem wissenschaftlichen Begleitprogramm und die Bereitschaft zu zusätzlichen Blutentnahmen.

Die Rekrutierung der Proben erfolgte jeweils zum ersten und letzten Chemotherapiezyklus. Geplant war für den Zeitraum der Nachbeobachtung eine Blutprobe zum Zeitpunkt eines eventuell auftretenden Rezidivs.

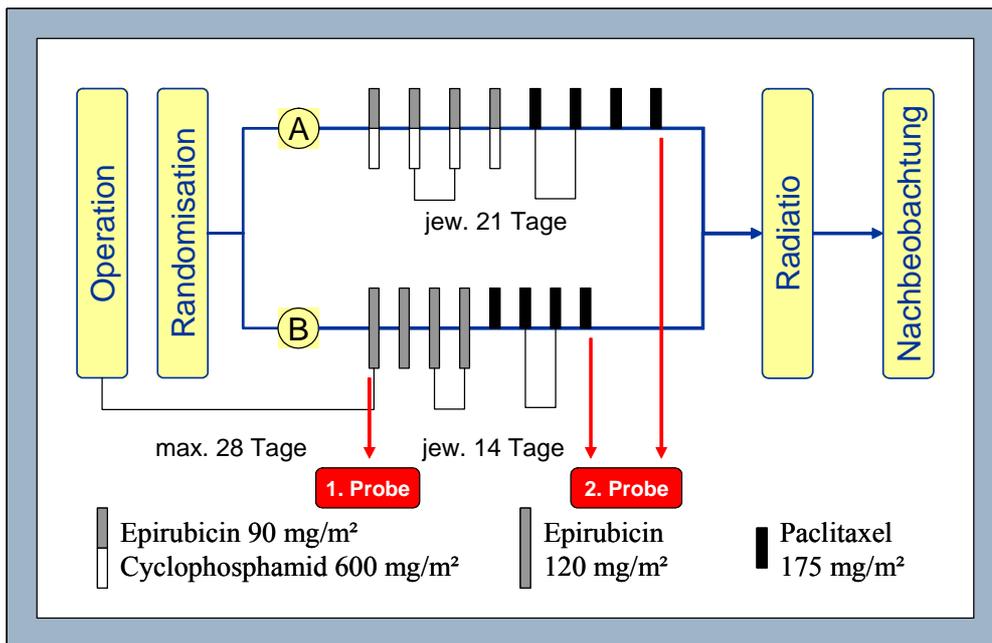


Abbildung 2: Abnahme von EDTA-Plasma im Studienablauf der „ASG-Studie 1-3 LK+“ zum Zeitpunkt der ersten (1. Probe) und letzten (2. Probe) Chemotherapiegabe.

Nach Entnahme von 10 ml venösem Blut im jeweiligen Studienzentrum wurde das Material in einem Versandbehälter auf dem Eilpostweg an unser Labor gesandt. Zur Trennung des EDTA-Plasma von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes wurden die Proben 10 Minuten mit 1000 x g zentrifugiert (Hettich Universal 30F[®]). Der pipettierte Überstand wurde in Aliquots (1,5 ml) bei -20°C asserviert.

2.2.1 Bestimmung der biochemischen Marker im Plasma

Den im Folgenden beschriebenen Messungen aller biochemischen Marker lagen die gesammelten EDTA-Plasmen der Substudie zugrunde. Um Fehler minimal halten zu können, erfolgten unabhängig von der Methode Doppelbestimmungen.

Zur Ermittlung der CA 15-3 Werte wandten wir einen automatisierten Immunoassay der Firma Bayer HealthCare[®] an. Für die Messungen der Biomarker HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ standen uns manuelle Immunoassays der Firma Oncogene Science Diagnostics[®] zur Verfügung. Dabei handelte es sich um Sandwich-Enzymimmuno-Assays (ELISA), deren Anwendung streng nach den in den Kits beigefügten Instruktionen und den laborinternen SOPs erfolgte.

In Vorbereitung auf die Messungen der Plasmakonzentrationen wurden die tiefgefrorenen Aliquots in den Eppendorfgefäßen langsam aufgetaut, auf einem Schüttler (Heidolph Reax Top[®]) gemischt und anschließend in einer Zentrifuge (Eppendorf 5415C[®]) noch vorhandene korpuskuläre Anteile vom Plasma getrennt.

2.2.1.1 Methodik der CA 15-3-Bestimmung

CA 15-3 wurde auf dem klinisch-chemischen Analysenapparat ACS:180[®] gemessen. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay auf Chemilumineszenzbasis. Im ersten Schritt wurden 25 µl unverdünntes EDTA-Plasma mit 22 µl eines Vorbereitungsreagenz (Natriumhydroxid) in einer Küvette gemischt und simultan mit 50 µl Lite-Reagenz und 250 µl „solide Phase“-Reagenz bei 37°C über 7,5 min inkubiert. Das Lite-Reagenz enthielt den CA 15-3-spezifischen, monoklonalen murinen Antikörper (B27.29), der mit Acridium markiert war. B27.29 bindet an ein Peptidepitop des MUC-1-Genprodukts. Das „solide Phase“-Reagenz entsprach der kovalenten Verbindung von gereinigtem CA 15-3 an paramagnetische Partikel. Nach einer Inkubation über 7,5 min bei 37°C erfolgte die magnetische Trennung der Partikel und das Waschen der Küvetten mit Aqua destillata. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde ausgelöst und die Menge des emittierten Lichts in so genannten „relative light

units“ (RLU) gemessen. Die CA 15-3-Plasmaspiegel wurden anhand einer Eichkurve, bestehend aus 7 Standards, berechnet und in U/ml angegeben. Für unverdünnte Proben erstreckte sich der analytische Messbereich von 3,5 bis 450 U/ml. Zur Qualitätskontrolle eines jeden Testdurchlaufs wurden 2-Punkt-Kalibrationen durchgeführt. Die Kalibratoren setzten sich zusammen aus niedrigen und hohen CA 15-3-Konzentrationen, gelöst in Pferdeserum mit 0,1 % Natriumazid.

2.2.1.2 Methodik der HER-2/neu-Bestimmung

Zur Bestimmung der HER-2/neu-Konzentrationen im Plasma wurde ein Sandwich Enzym-Immunoassay angewandt, welcher gegen die externen Epitope des HER-2/neu-Proteins gerichtete, monoklonale Antikörper verwendet und die extrazelluläre Domäne im Plasma quantifiziert.

Entsprechend der Sandwich-Methode kamen zwei differente monoklonale anti-HER-2/neu-Antikörper zur Anwendung, die murinen Antikörper NB-3 und TA-1. Beide binden spezifisch an die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu Proteins. Der Capture-Antikörper wurde dabei auf der Innenseite der Mikrotiterplattenmulden immobilisiert und bindet das humane HER-2/neu-Protein im Plasma in einer festen Phase. Der zweite, an Biotin gebundene Antikörper, fungierte als Detektor.

Für die Messung von HER-2/neu wurden 20 µl Plasma mit 980 µl gepuffertem „sample diluent“ gemischt und somit in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgte eine Inkubation über 180 min bei 37°C, in welcher der wandständige Capture-Antikörper das HER-2/neu-Protein in einer festen Phase band. Während dieser Inkubation wurde die Waschlösung präpariert, die einer Verdünnung von Aqua destillata und dem Waschkonzentrat („platewash concentrate“) in einem Verhältnis von 1:20 entsprach. In dem sich anschließenden Waschgang wurden die überschüssigen Plasmareste aus den wells entfernt. Nach diesem ersten Waschgang wurden 100 µl des an Biotin gebundenen Detektionsantikörpers in jedes Well gefügt und die Platte 60 min bei 37°C inkubiert. Der Antikörper wurde dabei in

einem Antigen-Antikörper-Komplex an die immobilisierte extrazelluläre Domäne von HER-2/neu auf der Mikrotiterplatte gebunden. In einem neuerlichen Waschgang wurden freie Moleküle entfernt, danach erfolgte die Zugabe von 100 µl des Konjugats, einer Streptavidin-Merrettichperoxidase. Diese band während der 30-minütigen lichtgeschützten Inkubationsphase bei Raumtemperatur (20-27°C) an Biotin und katalysierte den Farbumschlag des daraufhin zugegebenen chromogenen Substrates o-Phenylendiamin. Nach Zugabe von 100 µl Substrat inkubierte das Gemisch lichtgeschützt 45 min bei Raumtemperatur und die chemische Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl einer Stopplösung (2,5 NH₂SO₄) pro well unterbrochen. Der sichtbare Farbumschlag von hellgelb nach orange konnte spektrophotometrisch (Anthos htll[®]) bei 490 nm quantifiziert werden.

Zur Ermittlung und Verifizierung der Eichkurve in der Testauswertung wurden auf jeder Mikrotiterplatte 6 Standards mit rekombinantem HER-2/neu, ein Leerwell (blank) sowie 3 Kontrollen zur Verifizierung der Messergebnisse mitgeführt. Der Blank, dessen gemessener Wert von den restlichen subtrahiert wurde, entsprach der reinen „sample diluent“-Lösung. Weder der 2. Antikörper noch das Konjugat wurden im Testlauf den Leerwells zugegeben.

Aus den Wellenlängen des Farbumschlags ermittelte ein Software-Programm (Anthos labtec[®]) die endgültigen Messergebnisse, welche die Einheit ng/ml bei einem analytischen Range der unverdünnten Probe von 1,5 bis 35 ng/ml trugen.

2.2.1.3 Methodik der EGFR-Bestimmung

Das Prinzip des angewandten Immunoassays zur EGFR-Bestimmung entsprach im Wesentlichen dem der HER-2/neu-Bestimmung. Auf die Unterschiede sei im Folgenden näher eingegangen.

Als monoklonale Maus-Antikörper wurden ein Capture-Antikörper und ein an alkalische Phosphatase gebundene Detektor-Antikörper eingesetzt. Different zur HER-2/neu-Bestimmung waren die Inkubationszeiten mit 90 min bei 37°C nach Auftragen

der vorbereiteten Proben, 30 min bei Raumtemperatur nach Zugabe des Detektor-Antikörpers und 90 min nach Pipettieren des Substrates. Mit dem Substrat wurden der Katalysator und das Chromogen (BluePhos[®]) simultan aufgetragen, weshalb bei diesem Testablauf eine Inkubationszeit entfiel. Die Intensität des ausgelösten Farbumschlages von gelb nach blau verhielt sich proportional zur gebundenen Menge EGFR an den Capture-Antikörper und konnte bei einer Wellenlänge von 650 nm auf dem gleichen Spektrophotometer gemessen werden, welches zur Messung der HER-2/neu-Konzentrationen zur Verfügung stand. Die EGFR-Werte wurden anhand der mitgeführten Standardkurve in ng/ml bestimmt und mit einem analytischen Range der unverdünnten Probe von 0,25 ng/ml bis 300 ng/ml angegeben. Die Auswertung und Verifizierung der Ergebnisse erfolgte äquivalent der HER-2/neu-Bestimmung.

2.2.1.4 Methodik der VEGF₁₆₅-Bestimmung

Das Prinzip des angewandten Immunoassays zur VEGF₁₆₅-Bestimmung entsprach im Wesentlichen dem der HER-2/neu-Bestimmung. Im Folgenden sei auf die Unterschiede näher eingegangen.

Konform zu den oben beschriebenen Immunoassays fanden auch zur Bestimmung von VEGF₁₆₅ monoklonale Maus-Antikörper Anwendung. Der eingesetzte Capture-Antikörper erfüllte die Anforderungen, eine spezifische Proteindomäne des VEGF₁₆₅ zu erkennen und keine Kreuzreaktionen mit den anderen Isoformen einzugehen.

Ein Unterschied zum HER-2/neu-ELISA bestand in den Inkubationszeiten mit 90 min bei 37°C nach Auftragen der vorbereiteten Proben, 60 min bei 37°C nach Zugabe des an Biotin gebundenen Detektor-Antikörpers, 60 min bei Raumtemperatur nach Hinzufügen des Konjugats (Streptavidin-Alkalische Phosphatase) und 45 min bei Raumtemperatur nach Auftragen des Substrats (BluePhos[®]). Gemessen wurde der Farbumschlag von gelb nach blau bei einer Wellenlänge von 650 nm. Die ermittelten Ergebnisse wurden in pg/ml angegeben und in einem analytischen Bereich von 8 pg/ml bis 8000 pg/ml für die unverdünnte EDTA-Plasmaprobe analysiert.

Die Auswertung und Verifizierung der Ergebnisse für VEGF₁₆₅ erfolgte äquivalent der HER-2/neu-Bestimmung.

2.3 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie der Charité unter der Leitung von Prof. Dr. K.-D. Wernecke durchgeführt bzw. in der Richtigkeit ihrer Durchführung bestätigt.

Verwendet wurden SPSS für Windows in der Version 11 und 12, SAS in der Version 9.1 und Microsoft Office 2000 bzw. 2003.

Deskriptive Standardmethoden dienten der Ermittlung von Mittelwert, Median, Standardabweichung, Range und Perzentilen für die Plasmakonzentrationen der biochemischen Marker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR, VEGF₁₆₅ sowie zur Auswertung soziodemographischer Angaben.

Mit Hilfe statistischer Tests wie dem Student-t-Test, Wilcoxon-Test und nichtparametrischen Varianzanalysen untersuchten wir einerseits Beziehungen zwischen den Plasmakonzentrationen der biochemischen Marker vor und nach Chemotherapie und andererseits deren Verläufe hinsichtlich Gruppen- und Zeiteffekten sowie Wechselwirkungen zwischen Gruppen und Zeit. Mit dem Chi-Quadrat-Test prüften wir, ob zum Baselinewert in beiden Therapiearmen die Verteilung prognoserelevanter kategorialer Faktoren homogen war. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für alle Tests ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gewählt.

Die ermittelten Messergebnisse der jeweiligen Marker entsprachen abhängigen Stichproben, da von jeder Patientin die Werte aus dem EDTA-Plasma zu zwei Zeitpunkten, vor und nach Chemotherapie, vorlagen.

Nachdem graphisch (Histogramme, Q-Q-Plots) eine annähernde Normalverteilung der Differenzen gezeigt werden konnte, wurde der t-Test für verbundene Stichproben zum

Vergleich der abhängigen, normalverteilten Testvariablen der zu untersuchenden Gruppen angewandt. Unter Einbeziehung des Mittelwertes der Differenz der Messwerte, der Standardabweichung und der Fallzahl wurde der t-Wert der Teststatistik ermittelt. Die Anwendung dieses Testes erbrachte den direkten Vergleich der Baselinewerte mit den Folgemessungen nach Chemotherapie. Die Ergebnisse wurden mittels Fehlerbalken dargestellt.

Im Falle nicht gegebener Normalverteilung der Differenzen zusammengehöriger Messwertpaare verwendeten wir den Wilcoxon-Test für Paardifferenzen. Dieser Rangsummentest dient dem Vergleich zweier abhängiger Stichproben. Hierfür wurden den absoluten Paardifferenzen, separiert nach den beiden Therapiearmen, Rangplätze zugeteilt und die Prüfgröße T auf ihre Signifikanz kontrolliert. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots gewählt (44).

Die zweifaktoriellen, nichtparametrischen Varianzanalysen für Daten mit Messwiederholungen nach Brunner wurden verwendet, um für jeden Behandlungsarm separat Unterschiede in den Verläufen der biochemischen Marker bezüglich eines unabhängigen Faktors (Gruppeneffekt) und bezüglich der Zeit (Zeiteffekt) aufzudecken und Wechselwirkungen zwischen dem Faktor und der Zeit zu erkennen. Diese Faktoren waren: Anzahl der befallenen Lymphknoten (1/2/3), Menopausenstatus (prä-/postmenopausal), HER-2/neu-Status im Gewebe (negativ/positiv), Hormonrezeptorstatus (negativ/positiv) und Tumorgröße (<2cm/≥2cm). Zur graphischen Darstellung wurden die relativen Randeffekte herangezogen und in Liniendiagrammen visualisiert. Ein relativer Randeffekt ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Messwerte einer bestimmten Faktorstufe zu einem bestimmten Zeitpunkt größer sind als alle Messwerte des Versuchs. Möglich sind Werte zwischen 0 und 1, wobei ein relativer Effekt von annähernd 0,5 keinen Unterschied zu allen Werten des Versuchs kennzeichnet, während ein relativer Randeffekt <0,5 bedeutet, dass die Messergebnisse in dieser Stufe zu diesem Zeitpunkt zu kleineren Werten tendieren als alle Messwerte des Versuches. Analog charakterisiert ein relativer Randeffekt >0,5, dass die Messergebnisse in dieser Stufe zu diesem Zeitpunkt zu größeren Werten tendieren als alle Messwerte des Versuchs (45).

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes wird die Nullhypothese [„die Verteilung der Ausprägungen eines kategorialen Merkmals (oder prognoserelevanten Faktors) ist in beiden Therapiearmen homogen“] gegen die Alternativhypothese („die Verteilung der Ausprägungen dieses kategorialen Merkmals ist in beiden Therapiearmen nicht homogen“) geprüft.

3 Ergebnisse

In die Untersuchung zur Bedeutung biochemischer Marker in der adjuvanten Situation beim nodalpositiven Mammakarzinom konnten 221 Patientinnen aus der „ASG-Studie 1-3 LK+“ eingebracht werden. Für die Auswertung standen EDTA-Plasmen aus dem wissenschaftlichen Begleitprogramm und die im Rahmen der „ASG-Studie 1-3 LK+“ zusammengetragenen klinischen Daten zur Verfügung.

3.1 Klinisch-demographische Angaben

Der Auswahl und gegebenenfalls Kategorisierung der in dieser Arbeit ausgesuchten prognoserelevanten Merkmale wurde die Risikostratifizierung des Mammakarzinoms nach St. Gallen 2007 zugrunde gelegt (5;46). Die Angaben beziehen sich auf die Merkmale: Menopausenstatus, HER-2/neu-Gewebestatus, Anzahl der befallenen Lymphknoten, histologisches Grading, Hormonrezeptorstatus, Größe des Tumors und Alter der Patientin. Die konventionelle Therapie des Armes A erhielten von den 221 Patientinnen 106 und die dosisdichtere Therapie B insgesamt 115 Patientinnen.

Zur Auswertung der Verläufe der biologischen Marker im Plasma wurden die Ausgangsdaten der 221 Patientinnen des wissenschaftlichen Begleitprogramms hinsichtlich ihres Therapiearms getrennt betrachtet und verglichen. Die ausgewählten klinischen Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst und waren in beiden Patientinnengruppen ausgeglichen.

Tabelle 2: Demographische und krankheitsbezogene Daten zu 221 Patientinnen aus der „ASG-Studie 1-3 LK+“.

Parameter	Gesamtkollektiv n = 221		Therapiearm A n = 106		Therapiearm B n = 115	
		in %		in %		in %
Alter bei Therapie						
Range	25 - 73		31 - 72		25 - 73	
Mittelwert	52		52		52	
Median	52		52		52	
Operation						
Mastektomie	67	30,3	34	32,1	33	28,7
brusterhaltend	150	67,9	71	67	79	68,7
unbekannt	4	1,8	1	0,9	3	2,6
Histologie						
invasiv duktal	161	72,9	78	73,6	83	72,2
invasiv lobulär	45	20,4	21	19,8	24	20,9
sonstiges	15	6,8	7	6,6	8	7
Tumorgröße						
</= 2 cm	100	45,2	56	52,8	44	38,3
> 2 - 5 cm	109	49,3	47	44,3	62	53,9
> 5 cm	12	5,4	3	2,8	9	7,8
Anzahl befallener Lymphknoten						
1	96	43,4	50	47,2	46	40
2	77	34,8	33	31,1	44	38,3
3	48	21,7	23	21,7	25	21,7
Pathologisches Grading						
1	21	9,5	6	5,7	15	13
2	118	53,4	59	55,7	59	51,3
3	80	36,2	41	38,7	39	33,9
unbekannt	2	0,9	0	0	2	0,9
Menopausenstatus						
prämenopausal	102	46,2	46	43,4	56	48,7
postmenopausal	119	53,8	60	56,6	59	51,3
Hormonrezeptorstatus						
ER und PR negativ	55	24,9	27	25,5	28	24,3
ER oder PR positiv	165	74,7	79	74,5	86	74,8
unbekannt	1	0,5	0	0	1	0,9
HER-2/neu Gewebestatus						
negativ	138	62,4	63	59,4	75	65,2
positiv	62	28,1	29	27,4	33	28,7
unbekannt	21	9,5	14	13,2	7	6,1

Die Altersverteilung in den beiden Therapiearmen wies mit gleichen Mittelwerten von 52 Jahren bei einer Streuung von 31 – 72 Jahren im Therapiearm A und 25 – 73 Jahren im Therapiearm B keine wesentlichen Unterschiede auf. Die Verteilungen sind für den jeweiligen Therapiearm mittels Gauß-Kurven in Abbildung 3 dargestellt.

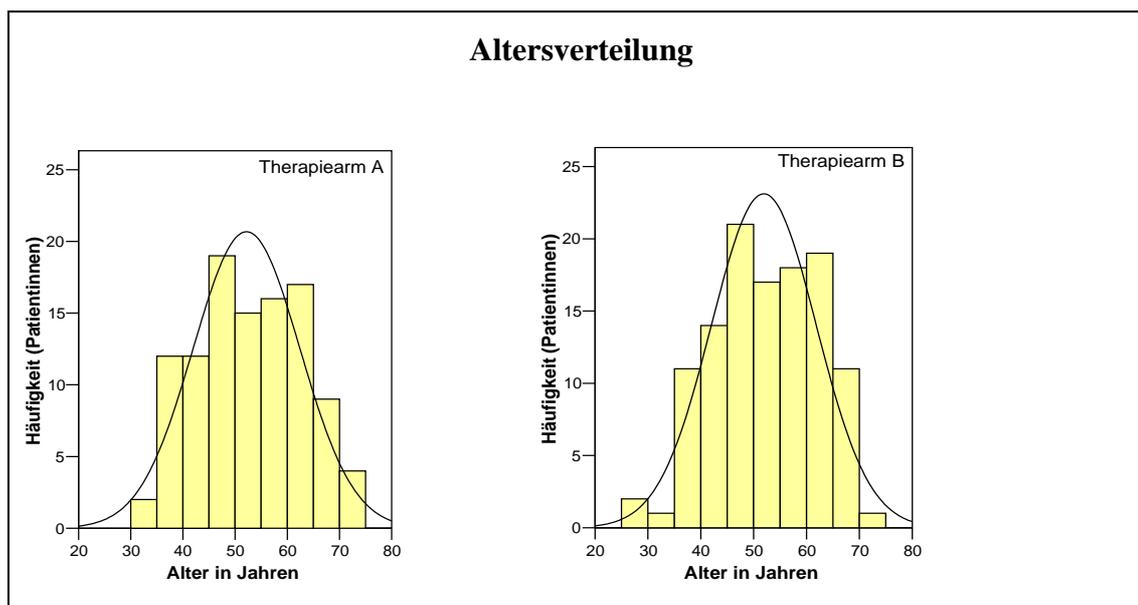


Abbildung 3: Altersverteilung in den beiden Therapiearmen A und B.

Nach den Richtlinien zur Risikostratifizierung der Konsensuskonferenz in St. Gallen 2007 weisen Frauen unter 35 Jahren ein höheres Rezidivrisiko auf als die älteren (5;46). In der Population dieser Arbeit waren lediglich fünf Patientinnen (2,3%) jünger als 35 Jahre, weshalb diese Subgruppe nicht näher ausgewertet wurde.

3.2 Ergebnisse der CA 15-3-Messungen im Plasma

Die Plasmawerte von CA 15-3 wurden mit Hilfe eines klinisch-chemischen Analysenapparates auf Chemilumineszenzbasis und nicht manuell gemessen. Der obere Cut-off-Wert lag mit dieser Messmethode bei 30 U/ml gemäß der Testanleitung des

Herstellers für den ACS:180. Im Folgenden seien die Ergebnisse zu den Baselinespiegeln der CA 15-3-Konzentrationen im Gesamtkollektiv betrachtet und daran anschließend die longitudinalen Verläufe über die Therapie dargestellt.

3.2.1 CA 15-3-Konzentrationen zum Therapiebeginn im Gesamtkollektiv

Die CA 15-3-Konzentrationen lagen im Gesamtkollektiv vor Therapiebeginn in einem Bereich von 6,5 bis 54,6 U/ml (Mittelwert: 20,0 U/ml; Median: 18,5 U/ml). Damit wiesen 24 von 221 Patientinnen (10,9%) in der adjuvanten Situation postoperativ und vor Therapiebeginn einen pathologischen CA 15-3-Wert auf. Die Verteilung aller gemessenen CA 15-3-Konzentrationen vor Therapiebeginn entsprach einer Normalverteilung nach Gauß (siehe Abbildung 4).

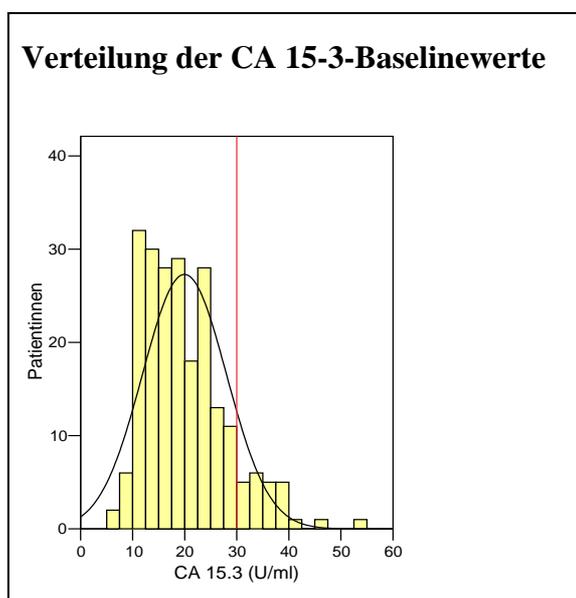


Abbildung 4: Verteilungskurve nach Gauß der CA 15-3-Werte im Plasma vor Therapiebeginn im Gesamtkollektiv; der obere Cut-off lag bei 30 U/ml (rote Linie).

3.2.2 Verläufe der CA 15-3-Spiegel in den Therapiearmen A und B

Die mittleren Baselinewerte für CA 15-3 waren in beiden Therapiearmen annähernd gleich mit 19,3 U/ml (Median: 17,0 U/ml) im Arm A und 20,5 U/ml (Median: 19,8 U/ml) im Arm B (siehe Tabelle 3). Unter beiden Therapien stiegen die mittleren CA 15-3-Konzentrationen im Plasma signifikant an ($p < 0,001$). Im Therapiearm A war ein Anstieg der Mittelwerte von CA 15-3 von 19,3 U/ml auf 24,3 U/ml innerhalb von 22 Wochen und im Therapiearm B von 20,5 U/ml auf 37,4 U/ml in einem Zeitraum von 15 Wochen zu verzeichnen. Damit war ein prozentualer Anstieg der mittleren CA 15-3-Konzentrationen im Therapiearm A um 26% und Therapiearm B um 82% zu beobachten.

Tabelle 3: CA 15-3 (U/ml): Verlauf in Therapiearm A und B.

CA 15-3 (U/ml)	Therapiearm A		Therapiearm B	
	baseline	Woche 22	baseline	Woche 15
n =	106	106	115	115
Mittelwert	19,3	24,3	20,5	37,4
Median	17,0	21,6	19,8	36,5
Minimum	7,3	7,0	6,5	15,7
Maximum	40,0	54,8	54,6	72,9
SD	8,3	10,2	7,8	13,5

Der longitudinale Verlauf der CA 15-3-Konzentrationen gestaltete sich in den beiden Therapiearmen unterschiedlich. Die Boxplots in Abbildung 5 veranschaulichen sowohl die Ranges als auch die 25-, 50- und 75%-Perzentilen des CA 15-3-Verlaufs getrennt nach den Therapiearmen. Median und 75%-Perzentile lagen im Arm A unter dem oberen Cut-off-Wert von 30 U/ml, während im dosisdichten und intensiveren Arm B diese Werte deutlich in den pathologischen Bereich stiegen.

Obwohl die ansteigenden Verläufe der CA 15-3-Konzentrationen in beiden Therapiearmen eine hohe Signifikanz aufwiesen, war der hohe Anteil pathologischer CA 15-3-Werte im Therapiearm B markant, weshalb diese Patientinnengruppe im Folgenden näher analysiert wird.

Vor Therapiebeginn lagen 11 (9,6%) von den insgesamt 115 Patientinnen des Therapiearms B mit ihren CA 15-3-Konzentrationen über dem oberen Cut-off-Wert. Von diesen stiegen 10 Patientinnen im Verlauf weiter von einem initialen Mittelwert von 36,5 U/ml auf 47,6 U/ml an (Range: von 34,4 U/ml bis 71,1 U/ml), während eine Patientin in den Normbereich zurückfiel. Zum Therapieende wiesen im Therapiearm B insgesamt 79 Patientinnen einen erhöhten CA 15-3-Wert auf. Demnach stiegen die CA 15-3-Konzentrationen im Therapiearm B von 69 Patientinnen (60%) während der Therapie aus dem Normbereich (Mittelwert 20,2 U/ml) über die Normgrenze von 30 U/ml auf einen Mittelwert von 43,5 U/ml (Range: von 30,6 U/ml bis 72,9 U/ml). Hingegen konnte im Therapiearm A ein Anstieg aus dem Normbereich zu pathologischen Werten bei 12,3% der Patientinnen festgestellt werden.

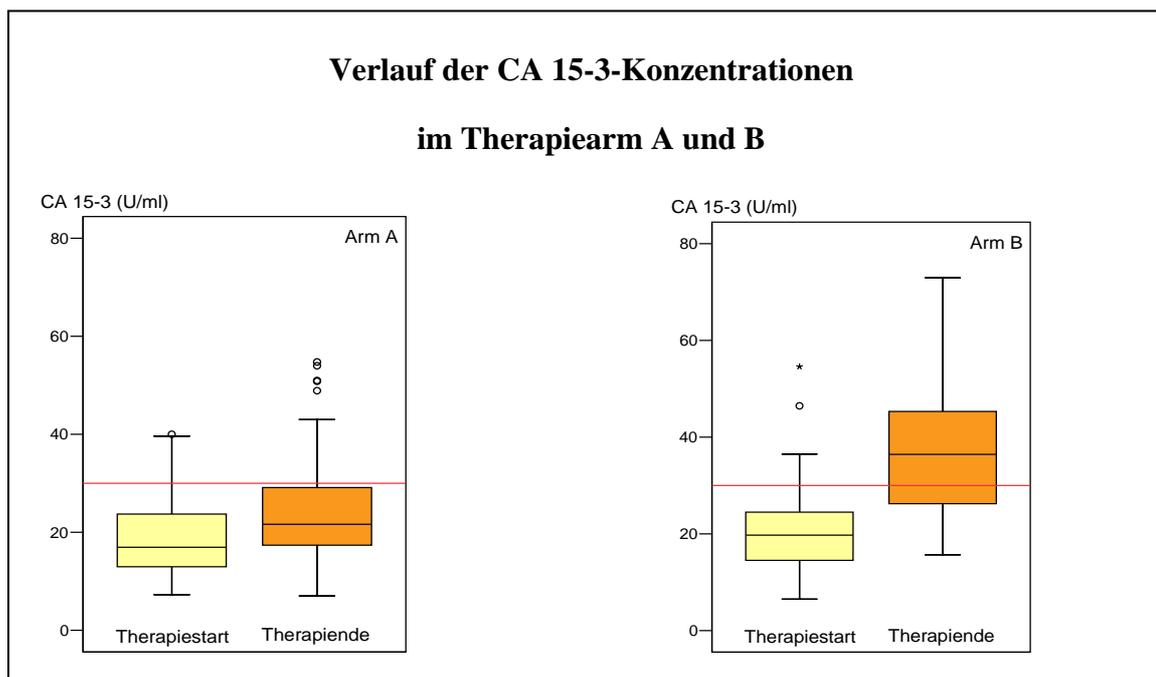


Abbildung 5: Boxplots zum Anstieg der CA 15-3-Werte von Therapiebeginn zum -ende, getrennt betrachtet für Therapiearm A ($p=0,0103 \cdot 10^{-8}$) und Therapiearm B ($p < 0,01 \cdot 10^{-14}$), dargestellt in Boxplots mit den 25/50/75%-Perzentilen.

Die longitudinalen Verläufe der CA 15-3-Konzentrationen wurden durch keines der definierten prognoserelevanten Merkmale signifikant beeinflusst.

3.3 Ergebnisse der HER-2/neu-Messungen im Plasma

Die Plasmawerte von HER-2/neu wurden mit einem manuellen ELISA gemessen, dessen oberer Cut-off-Wert mit 15 ng/ml vom Hersteller für den Test angegeben war. Im Folgenden seien die Ergebnisse zu den Baselinespiegeln der HER-2/neu-Konzentrationen im Gesamtkollektiv betrachtet und daran anschließend die longitudinalen Verläufe über die Therapie dargestellt.

3.3.1 HER-2/neu-Konzentrationen zum Therapiebeginn im Gesamtkollektiv

Die HER-2/neu-Spiegel lagen im Gesamtkollektiv vor Therapiebeginn normalverteilt in einem Bereich von 5,4 bis 14,2 ng/ml (siehe Abbildung 6). Der Mittelwert unterschied sich mit 9,3 ng/ml nicht wesentlich vom Median mit 9,1 ng/ml. Gegenüber den CA 15-3-Konzentrationen lagen die HER-2/neu-Werte allesamt im Normbereich und damit unterhalb der oberen Normgrenze von 15 ng/ml.

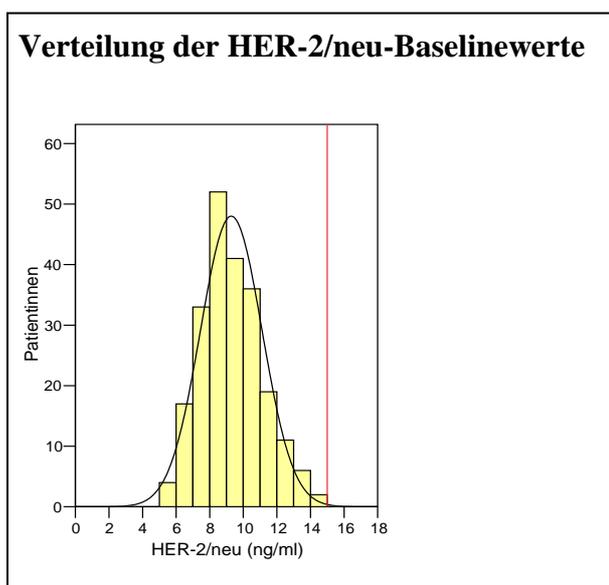


Abbildung 6: Verteilungskurve nach Gauß der HER-2/neu-Werte im Plasma vor Therapiebeginn im Gesamtkollektiv; der obere Cut-off-Wert lag bei 15 ng/ml (rote Linie).

Eine signifikante Abhängigkeit der Baseline-HER-2/neu-Spiegel im Plasma bestand von den prognoserelevanten Merkmalen Menopausenstatus und histologisches Grading. Auf deren Einfluss auf den Biomarker HER-2/neu wird im Kapitel 3.6 näher eingegangen.

3.3.2 Verläufe der HER-2/neu-Spiegel in den Therapiearmen A und B

Die Normalverteilung der HER-2/neu-Baselinewerte fand sich auch in den Subgruppen der Therapiearme A und B wieder. Die mittleren Baselinewerte für HER-2/neu waren in beiden Therapiearmen annähernd gleich mit 9,4 ng/ml (Median: 9,3 ng/ml) im Arm A und 9,2 ng/ml (Median: 8,8 ng/ml) im Arm B. Unter der Therapie stiegen die mittleren HER-2/neu-Spiegel im Plasma unabhängig vom Therapieschema signifikant an ($p < 0,001$), die Patientinnen des Therapiearms A im Mittel von 9,4 ng/ml auf 11,0 ng/ml innerhalb von 22 Wochen und des Therapiearms B im Mittel von 9,2 ng/ml auf 10,6 ng/ml in einem Zeitraum von 15 Wochen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: HER-2/neu (ng/ml): Verlauf in Therapiearm A und B.

Her-2/neu (ng/ml)	Therapiearm A		Therapiearm B	
	baseline	Woche 22	baseline	Woche 15
n =	106	106	115	115
Mittelwert	9,4	11,0	9,2	10,6
Median	9,3	10,6	8,8	10,1
Minimum	5,4	7,3	5,4	7,3
Maximum	13,7	17,8	14,2	17,8
SD	1,8	2,1	1,9	2,2

Damit steigerte sich die gemessene mittlere HER-2/neu-Konzentration im Therapiearm A um 17% und Therapiearm B um 15%. Da die mittleren Konzentrationen den Cut-off von 15 ng/ml nicht überschritten, sei zu beachten, dass es sich um einen Anstieg innerhalb des Normbereichs bei mutmaßlich tumorfreien Patientinnen handelte. Die Boxplots in Abbildung 7 visualisieren den HER-2/neu-Verlauf getrennt nach den Therapiearmen.

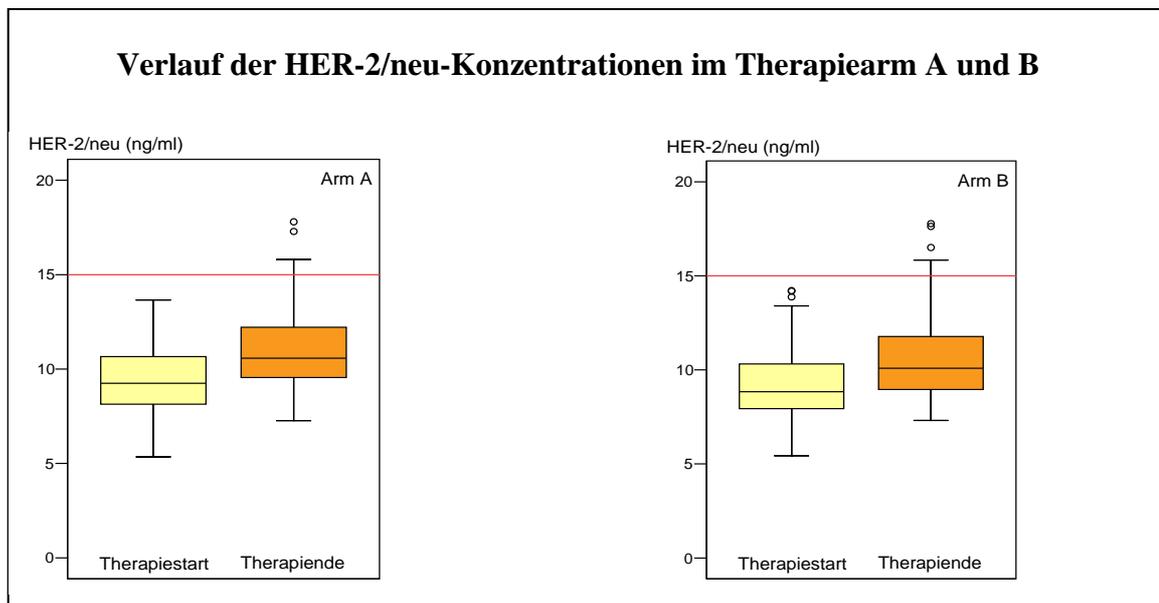


Abbildung 7: Anstieg der HER-2/neu-Werte von Therapiebeginn zum Therapieende, getrennt betrachtet für Therapiearm A ($p=0,0176 \cdot 10^{-8}$) und Therapiearm B ($p=0,01 \cdot 10^{-7}$), dargestellt in Boxplots mit den 25/50/75%-Perzentilen.

Oberhalb des Normbereichs lagen zum Zeitpunkt des Therapieendes im Arm A insgesamt 5 von 106 Patientinnen (4,7%), von denen keine eine Erhöhung der CA 15-3-Konzentration zeigte. Im Arm B stiegen 5 von 115 Patientinnen (4,3%) über die obere Normgrenze, wobei 3 Patientinnen zeitgleich eine erhöhte CA 15-3-Konzentration nachzuweisen war. Die maximal erreichte HER-2/neu-Konzentration lag in beiden Therapiearmen bei 17,8 ng/ml.

Ein signifikanter Einfluss auf die HER-2/neu-Konzentrationen konnte für den Menopausen- und Hormonrezeptorstatus gezeigt werden (siehe Kap. 3.6).

3.4 Ergebnisse der EGFR-Messungen im Plasma

Die EGFR-Messungen im Plasma wurden mit einem manuellen ELISA vorgenommen. Der untere Cut-off-Wert lag bei diesem Test bei 52 ng/ml und der obere bei 75 ng/ml. Konzentrationen gemäß den Angaben des Herstellers. Werte sowohl unter als auch über den Normgrenzen müssen als pathologisch angesehen werden. Im Folgenden seien die Ergebnisse zu den Baselinespiegeln der EGFR-Konzentrationen im Gesamtkollektiv betrachtet und daran anschließend die longitudinalen Verläufe über die Therapie dargestellt.

3.4.1 EGFR-Konzentrationen zum Therapiebeginn im Gesamtkollektiv

Die EGFR-Spiegel lagen im Gesamtkollektiv vor Therapiebeginn normalverteilt in einem Bereich von 29,6 bis 98,1 U/ml bei einem Mittelwert von 59,4 ng/ml und einem Median von 58,8 ng/ml (siehe Abbildung 8).

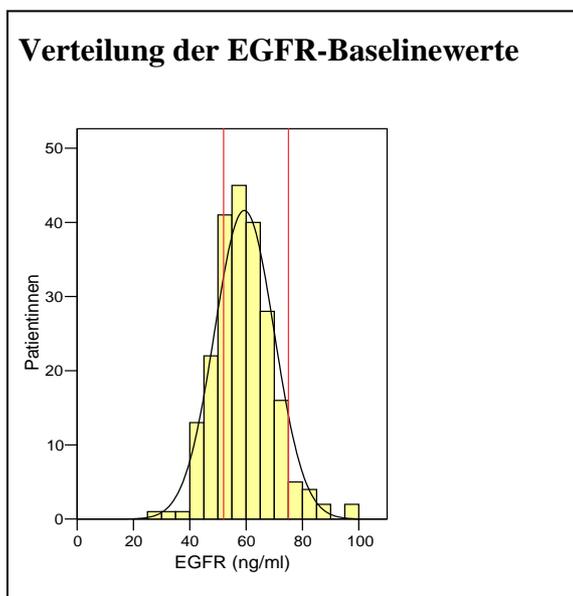


Abbildung 8: Verteilungskurve nach Gauß der EGFR-Werte im Plasma vor Therapiebeginn im Gesamtkollektiv; der untere Cut-off lag bei 52 ng/ml, der obere bei 75 ng/ml (rote Linien).

Die EGFR-Werte von 151 der 221 Patientinnen (68,3%) befanden sich vor Therapiebeginn innerhalb der Cut-off-Grenzen von 52 ng/ml und 75 ng/ml, während die EGFR-Konzentrationen von 57 Patientinnen (25,8%) unterhalb und 13 (5,9%) oberhalb des Normbereichs lagen.

Die Baseline-EGFR-Konzentrationen im Plasma wiesen keine signifikante Abhängigkeit von den prognoserelevanten Merkmalen auf.

3.4.2 Verläufe der EGFR-Spiegel in den Therapiearmen A und B

Die mittleren Konzentrationen der EGFR-Baselinewerte waren in beiden Therapiearmen mit 58,4 ng/ml (Median: 58,0 ng/ml) im Arm A und 60,2 ng/ml (Median: 59,4 ng/ml) im Arm B annähernd gleich (siehe Tabelle 5). Während im Zeitverlauf die Patientinnen der Gruppe B einen signifikanten Abfall ($p < 0,001$) im Mittel von 60,2 ng/ml auf 55,2 ng/ml aufwiesen, blieben die mittleren Konzentrationen von EGFR im Therapiearm A konstant.

Tabelle 5: EGFR (ng/ml): Verlauf in Therapiearm A und B.

EGFR (ng/ml)	Therapiearm A		Therapiearm B	
	baseline	Woche 22	baseline	Woche 15
n =	106	106	115	115
Mittelwert	58,4	58,1	60,2	55,2
Median	58,0	56,3	59,4	54,1
Minimum	29,6	38,9	42,2	33,3
Maximum	89,6	80,8	98,1	92,0
SD	10,6	9,2	10,6	9,5

Im Arm B lagen zum Therapieende 46 von 115 Patientinnen (40%) unter dem unteren Cut-off von 52 ng/ml, hingegen im Arm A nur 30 von 106 Patientinnen (28,3%). Die Anzahl der Patientinnen mit initial erniedrigten EGFR-Plasmakonzentrationen war mit 28 (26,4%, Arm A) und 29 (25,2%, Arm B) in beiden Therapiearmen gleich. EGFR-

Plasmakonzentrationen über dem oberen Cut-off von 75 ng/ml wiesen initial 6 (5,7%, Arm A) und 7 (6,1%, Arm B) Patientinnen auf sowie 3 (2,8%, Arm A) und 4 (3,5%, Arm B) Patientinnen zum Therapieende auf. Damit war der Anteil pathologischer EGFR-Konzentrationen zum Therapieende im Arm B (43,5%) deutlich höher als im Arm A (31,1%). Der signifikante Abfall der EGFR-Konzentrationen im Therapiearm B gegenüber dem Therapiearm A ist mittels Boxplots in der Abbildung 9 dargestellt.

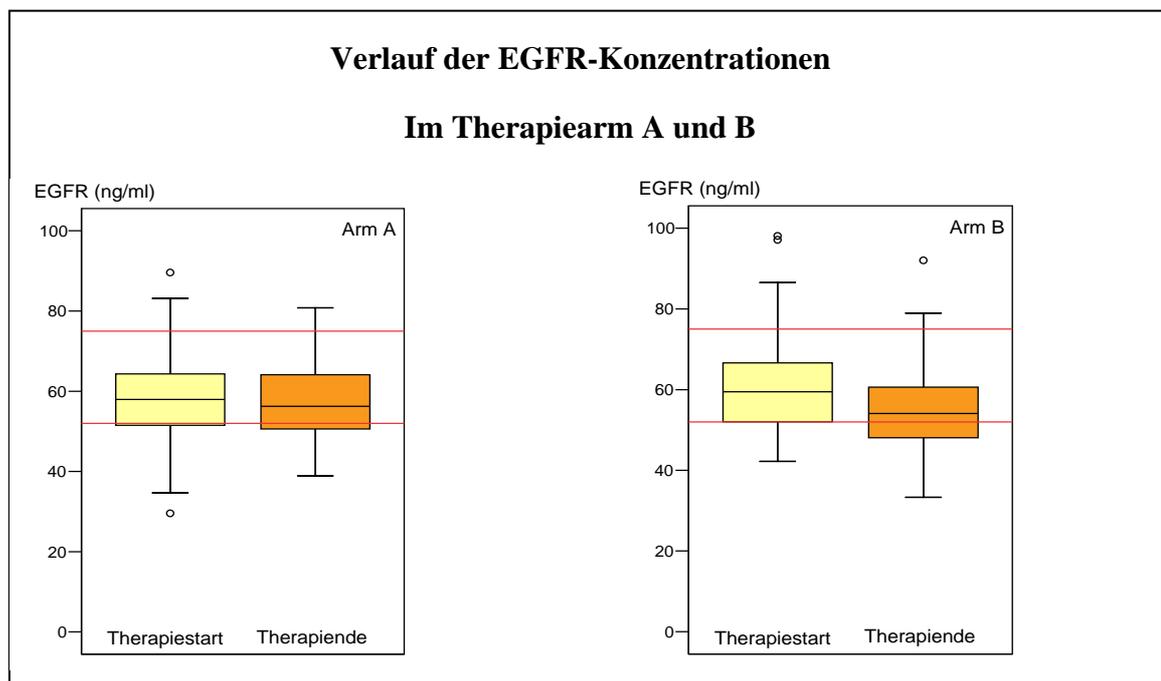


Abbildung 9: Boxplots zum Verlauf der EGFR-Werte von Therapiebeginn zum Therapieende, getrennt betrachtet für Therapiearm A ($p=0,984$) und Therapiearm B ($p=0,0242 \cdot 10^{-4}$), dargestellt in Boxplots mit den 25/50/75%-Perzentilen.

Ein signifikanter Einfluss auf die EGFR-Konzentrationen konnte für den Hormonrezeptorstatus gezeigt werden (siehe Kap. 3.6).

3.5 Ergebnisse der VEGF₁₆₅-Messungen im Plasma

Die Plasmakonzentrationen von VEGF₁₆₅ wurden mit einem manuellen ELISA gemessen, dessen oberer Cut-off-Wert bei 60 pg/ml vom Hersteller des Tests angegeben war. Im Folgenden seien die Ergebnisse zu den Baselinespiegeln der VEGF₁₆₅-Konzentrationen im Gesamtkollektiv betrachtet und daran anschließend die longitudinalen Verläufe über die Therapie dargestellt.

3.5.1 VEGF₁₆₅-Konzentrationen zum Therapiebeginn im Gesamtkollektiv

Die VEGF₁₆₅-Spiegel lagen im Gesamtkollektiv vor Therapiebeginn in einem Bereich von 2,4 bis 825,1 U/ml (Mittelwert: 121,1 pg/ml; Median: 78,6 pg/ml). Die Verteilung war rechtsschief und entsprach gegenüber den anderen Biomarkern nicht der Normalverteilung nach Gauß (siehe Abbildung 10).

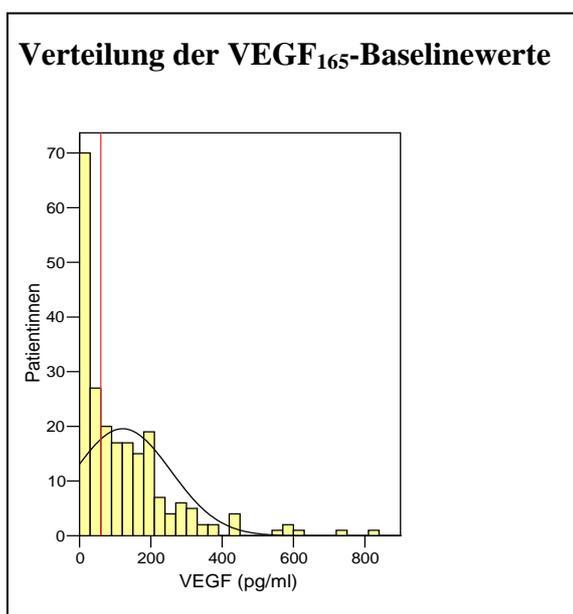


Abbildung 10: Verteilungskurve nach Gauß der VEGF₁₆₅-Werte im Plasma vor Therapiebeginn im Gesamtkollektiv; der obere Cut-off lag bei 60 pg/ml (rote Linie).

Der obere Cut-off-Wert lag bei 60 pg/ml, damit müssen die VEGF₁₆₅-Konzentrationen von 124 Patientinnen (56,1%) vor Therapiebeginn als pathologisch angesehen werden.

Ein signifikanter Einfluss auf die Baselinekonzentrationen des VEGF₁₆₅ bestand für das histologische Grading (siehe Kapitel 3.6), nicht aber für die anderen prognoserelevanten Merkmale.

3.5.2 Verläufe der VEGF₁₆₅-Spiegel in den Therapiearmen A und B

Obwohl die Patientinnen randomisiert waren, differierten die mittleren Konzentrationen und Mediane der VEGF₁₆₅-Baselinewerte in den jeweiligen Therapiearmen A (Mittelwert: 138,7 pg/ml; Median: 100,6 pg/ml) und B (Mittelwert: 104,8 pg/ml; Median: 59,1 pg/ml), dargestellt in Tabelle 6.

Tabelle 6: VEGF₁₆₅ (pg/ml): Verlauf im Therapiearm A und B.

VEGF ₁₆₅ (pg/ml)	Therapiearm A		Therapiearm B	
	baseline	Woche 22	baseline	Woche 15
n =	106	106	115	115
Mittelwert	138,7	130,4	104,8	136,3
Median	100,6	67,7	59,1	94,3
Minimum	4,8	8,0	2,4	8,0
Maximum	825,1	672,6	621,1	733,1
SD	155,6	138,7	111,4	144,0

Für den Vergleich der Konzentrationsverläufe zwischen den beiden Therapiearmen in der Abbildung 11 sei auf diese unterschiedlichen Ausgangswerte hingewiesen. Während im Zeitverlauf in der Gruppe B ein signifikanter Anstieg ($p=0,002$) im Mittel von 104,8 pg/ml auf 136,3 pg/ml beobachtet werden konnte, war der fallende Trend der VEGF₁₆₅-Konzentrationen im Arm A ohne Signifikanz. Da die Ausgangskonzentrationen für VEGF₁₆₅ sehr voneinander abwichen, sind die Verläufe beider Therapiearme kaum bewertbar.

Verlauf der VEGF₁₆₅-Konzentrationen

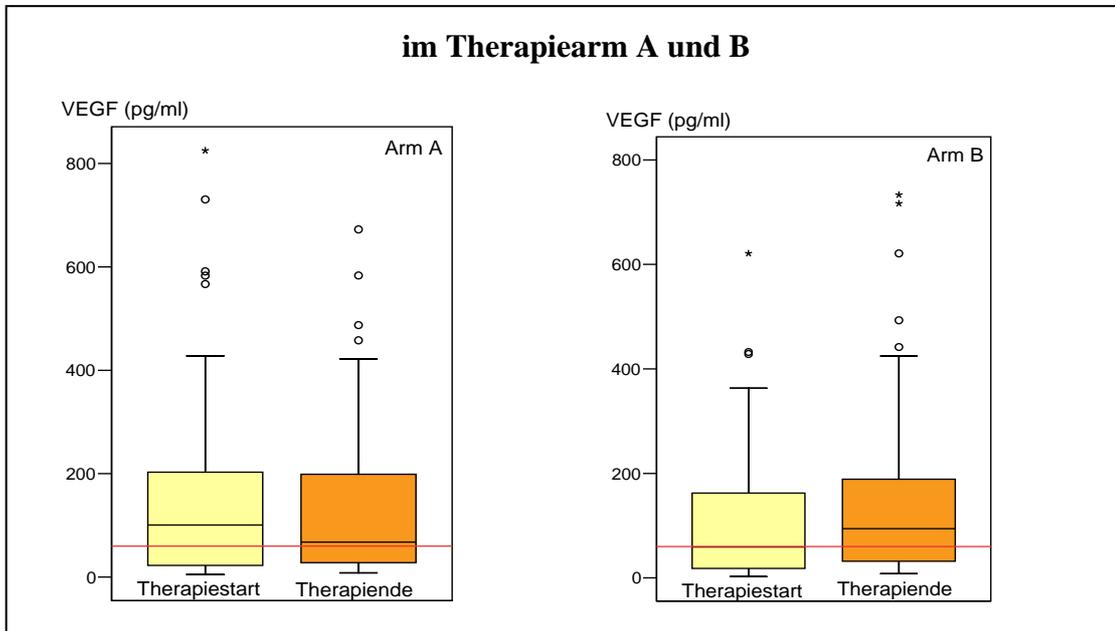


Abbildung 11: Boxplots zum Verlauf der VEGF₁₆₅-Werte von Therapiebeginn zum Therapieende, getrennt betrachtet für Therapiearm A ($p=0,871$) und Therapiearm B ($p=0,002$), dargestellt in Boxplots mit den 25/50/75%-Perzentilen.

Der Anteil der Patientinnen, deren VEGF₁₆₅-Konzentrationen im Normbereich lagen betrug im Arm A zu Therapiebeginn 35,8% und zum Therapieende 45,3%, im Arm B 51,3% und 34,8%.

Ein signifikanter Einfluss auf die VEGF₁₆₅-Konzentrationen konnte für den Menopausenstatus und das histologische Grading gezeigt werden (siehe Kapitel 3.6).

3.6 Einfluss der gewählten prognoserelevanten Merkmale auf die Baselinekonzentrationen und Biomarkerverläufe

Einfluss des Menopausenstatus

Von den 221 untersuchten Patientinnen befanden sich 102 (46,2%) in der Prämenopause und 119 (53,8%) in der Postmenopause. Der Menopausenstatus beeinflusste von den vier getesteten Biomarkern die HER-2/neu-Baselinekonzentrationen sowie die longitudinalen Verläufe der VEGF₁₆₅-Konzentrationen.

Die postmenopausalen Patientinnen wiesen vor Therapiebeginn eine signifikant höhere HER-2/neu-Konzentration gegenüber den prämenopausalen ($p=0,02$) auf, während die anderen Marker in ihren Baselinewerten nicht wesentlich differierten (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: *Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ vom Menopausenstatus (prä- /postmenopausal).*

Menopausen-status	CA 15-3 (U/ml)		HER-2/neu (ng/ml)		EGFR (ng/ml)		VEGF ₁₆₅ (pg/ml)	
	prä	post	prä	post	prä	post	prä	post
Mittelwert	20,3	19,7	9,0	9,5	60,0	58,9	106,5	133,6
Median	19,3	18,1	8,7	9,4	59,0	58,3	66,5	101,8
Signifikanz (p)	0,42		0,02		0,56		0,24	

Die HER-2/neu-Konzentrationen zeigten für die prämenopausalen Patientinnen einen Mittelwert von 9,0 ng/ml und einen Median von 8,7 ng/ml und waren im Normbereich niedriger als die HER-2/neu-Konzentrationen der postmenopausalen Patientinnen (Mittelwert: 9,5 ng/ml; Median: 9,4 ng/ml).

Betrachtet man die HER-2/neu-Konzentrationen über den Zeitraum der Therapie hinweg, so bestand für Therapiearm A kein signifikanter Einfluss des Menopausenstatus auf den zeitlichen Verlauf, während im dosisdichten Therapiearm B ein signifikanter

Unterschied im Anstieg der HER-2/neu-Werte abhängig vom Menopausenstatus zu erkennen war (vergleiche Abbildung 12).

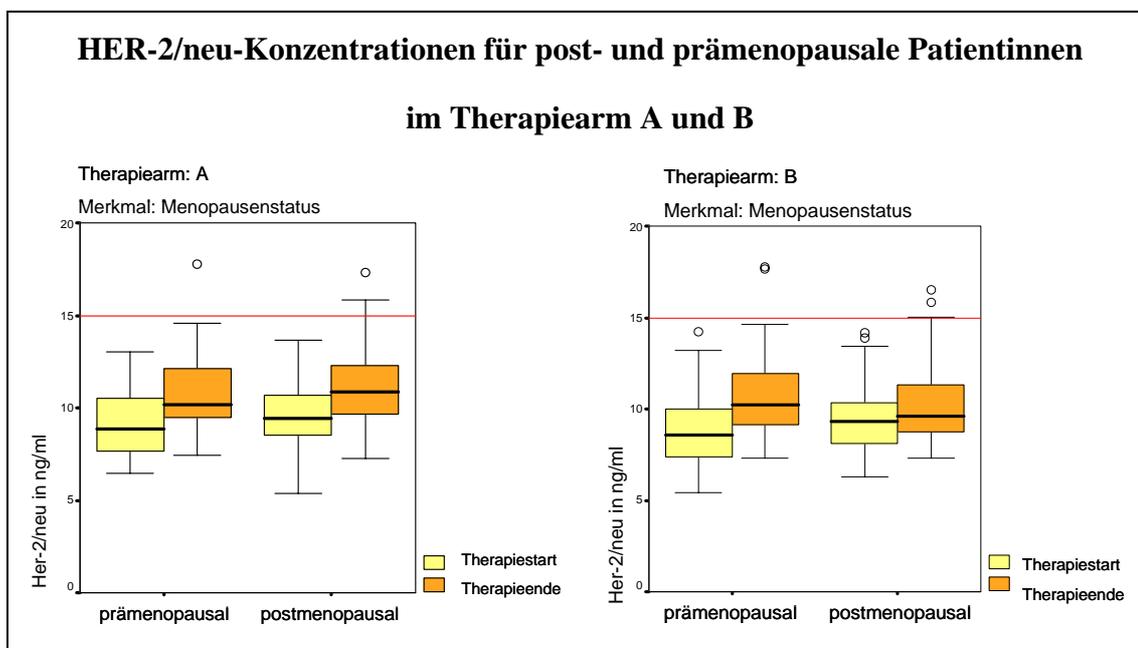


Abbildung 12: *Boxplots zum Anstieg der HER-2/neu-Werte im Therapiearm A und B in Abhängigkeit vom Menopausenstatus, Einfluss des Menopausenstatus auf den Markerverlauf im Therapiearm A: $p=0,8570$ und Arm B: $p=0,0026$.*

Die geringer östrogen-gesteuerten postmenopausalen Patientinnen wiesen höhere HER-2/neu-Konzentrationen auf, daher konnte bei der schnelleren chemischen Kastration der prämenopausalen Patientinnen im Therapiearm B der Anstieg größer sein.

Pathologische HER-2/neu-Werte fanden sich unabhängig vom Therapiearm häufiger in der Gruppe der postmenopausalen Patientinnen (7/119; 5,9%) als der prämenopausalen (3/102; 2,9%), passend zu dem bekannten supprimierenden Einfluss von Östrogen auf HER-2/neu.

Bemerkenswert ließen sich höhere VEGF₁₆₅-Konzentrationen der postmenopausalen Patientinnen zum Therapieende feststellen als der prämenopausalen Frauen (siehe Abbildung 13).

Der Anstieg der VEGF₁₆₅-Konzentrationen der postmenopausalen Patientinnen ($p=0,04$) des Therapiearms B war gegenüber den prämenopausalen ($p=0,09$) signifikant. In der Gruppe des Therapiearms A waren die VEGF₁₆₅-Konzentrationen der postmenopausalen gleich bleibend, während die prämenopausalen Patientinnen einen abfallenden Trend ohne Signifikanz zeigten.

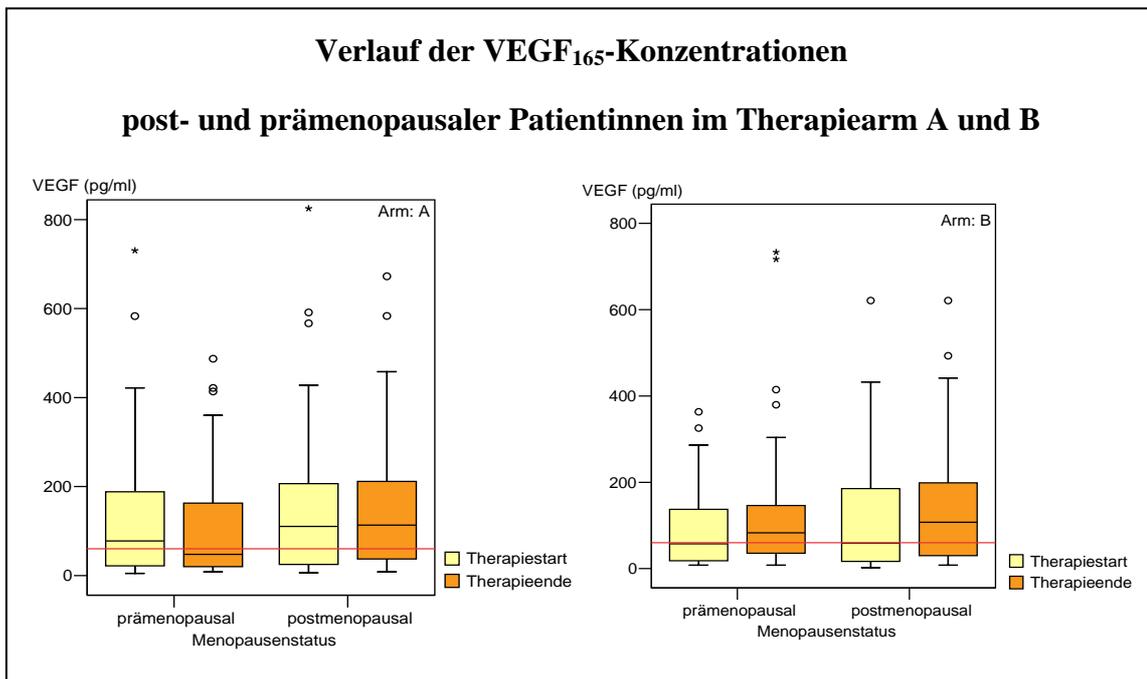


Abbildung 13: Boxplots zum Verlauf der VEGF₁₆₅-Konzentrationen post- und prämenopausaler Patientinnen im Therapiearm A und B.

Arm A: nicht signifikanter Anstieg für die postmenopausalen Patientinnen ($p=0,88$) gegenüber den prämenopausalen ($p=0,46$).

Arm B: signifikanter Anstieg für die postmenopausalen Patientinnen ($p=0,04$) gegenüber den prämenopausalen ($p=0,09$).

Da die Ausgangswerte der VEGF₁₆₅-Konzentrationen beider Therapiearme nicht übereinstimmten, soll von einer weiteren Wertung der Verläufe abgesehen werden.

Einfluss des HER-2/neu-Gewebestatus

Der HER-2/neu Gewebestatus der Patientinnen in der „ASG 1-3 LK+“-Studie wurde vom jeweiligen Zentrum mittels Immunhistochemie (IHC) bestimmt. Eine weitergehende Untersuchung der Präparate mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) war nicht obligat gemäß den Empfehlungen zum Zeitpunkt der Studieninitiierung im Jahr 2000. Dokumentiert wurden die Ergebnisse gemäß des standardisierten Scoring-Systems für die immunhistochemische HER-2/neu-Färbung des Präparats: keine Färbung oder eine Membranfärbung bei weniger als 10% der Zellen (0) und vorhandene Membranfärbung bei über 10% der Zellen in geringer (+1), mäßiger (+2) oder starker (+3) Ausprägung. Für die weiteren Auswertungen wurden diese möglichen Ergebnisse zusammengefasst. Die Bewertungen 0 und +1 bildeten die Gruppe der nicht vorhandenen Überexpression von HER-2/neu-Rezeptoren und die Scores +2 und +3 wurden als Überexpression gewertet, entsprechend einem negativen oder positiven HER-2/neu-Gewebestatus.

Der HER-2/neu-Gewebestatus wurde bei 200 von den 221 Patientinnen des wissenschaftlichen Begleitprogramms angegeben. Von diesen wiesen im histologischen Präparat 138 (69,0%) keine Überexpression auf, während in 62 Fällen (31%) eine Überexpression bei mäßiger oder starker Ausprägung der Membranfärbung vorlag. Eine Abhängigkeit der untersuchten Biomarker von der Überexpression von HER-2/neu im Tumorgewebe lag in dem Patientenkollektiv dieser Arbeit nicht vor (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ von der HER-2/neu-Expression im Gewebe (negativ/positiv).

HER-2/neu- Gewebestatus	CA 15-3 (U/ml)		HER-2/neu (ng/ml)		EGFR (ng/ml)		VEGF ₁₆₅ (pg/ml)	
	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv
Mittelwert	20,5	19,1	9,4	9,2	59,2	59,1	114,4	132,3
Median	19,5	17,8	9,1	9,1	58,8	57,0	77,2	86,4
Signifikanz (p)	0,45		0,75		0,90		0,41	

Insbesondere für die Baseline-HER-2/neu-Konzentrationen im Plasma zeigte sich kein Unterschied zwischen den Patientinnen mit einem negativen oder positiven HER-2/neu-

Gewebestatus. Dieses Faktum unterstützte den adjuvanten Ansatz dieser Arbeit und damit die Annahme, dass keine Tumorlast vorhanden war und somit vorhandene regulative Prozesse, welche die Biomarkerkonzentrationen beeinflussen, unwahrscheinlich waren.

Die Betrachtung der HER-2/neu-Gewebeexpression in der Gruppe der prä- bzw. postmenopausalen Patientinnen erbrachte einen positiven Status von 33,3% bzw. 29,1%. In Tabelle 9 wurden die beiden Gruppen gegenübergestellt. Im Vergleich der prä- und postmenopausalen Patientinnen bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der HER-2/neu-Gewebeexpression.

Tabelle 9: HER-2/neu-Expression in den Gruppen prä- und postmenopausaler Patientinnen. Der Anteil HER-2/neu-gewebepositiver Frauen war in beiden Gruppen ausgewogen.

HER-2/neu-Gewebestatus = 200	n	Prämenopausale		Postmenopausale		p
		n = 90	in %	n = 110	in %	
negativ		60	66,7	78	70,9	> 0,5
positiv		30	33,3	32	29,1	> 0,5

Einfluss des Lymphknotenstatus

Die Adjuvans-Studiengruppe selektierte mit der „ASG-Studie 1-3 LK+“ Patientinnen mit ein bis drei befallenen Lymphknoten. Ein befallener Lymphknoten konnte am postoperativen Präparat in 96 Fällen (43,5%), zwei bei 77 (34,8%) und drei bei 48 (21,7%) von den 221 Patientinnen des wissenschaftlichen Begleitprogramms nachgewiesen werden.

Die Baselinekonzentrationen der untersuchten vier Biomarker unterlagen keiner signifikanten Abhängigkeit hinsichtlich der Anzahl der befallenen Lymphknoten (siehe Tabelle 10). Eine weitere Tatsache, welche für die freie Tumorlast aller Patientinnen sprach.

Tabelle 10: Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ von der Anzahl befallener Lymphknoten (1+/2+/3+).

LK-Status	CA 15-3 (U/ml)			HER-2/neu (ng/ml)		
	1+	2+	3+	1+	2+	3+
Mittelwert	20,2	20,3	18,9	9,0	9,5	9,5
Median	18,4	19,5	17,7	8,9	9,2	9,4
Signifikanz (p)	0,55			0,39		
LK-Status	EGFR (ng/ml)			VEGF (pg/ml)		
	1+	2+	3+	1+	2+	3+
Mittelwert	59,7	58,4	60,3	111,9	135,4	116,5
Median	58,9	57,5	58,8	50,9	98,2	80,8
Signifikanz (p)	0,77			0,28		

Ebenfalls bestand kein Einfluss durch die Anzahl der befallenen Lymphknoten auf die longitudinalen Verläufe der vier Biomarker in den beiden Therapiearmen A und B.

Einfluss des histologischen Gradings

Nach der Histologie des Mammakarzinoms wurde das Gesamtkollektiv in 3 Gruppen eingeteilt. Gruppe I umfasste die Patientinnen mit einem histologischen Grading von 1, Gruppe II diese mit einem Grading von 2 und der dritten Gruppe waren die Patientinnen mit einem Grading von 3 zugeteilt. Die Anzahl der Patientinnen mit einem histologischen Grading von 1 war mit 23 (10,4%) erwartungsgemäß gering, der Gruppe II konnten 118 (54,4%) und der Gruppe III 80 (36,2%) Patientinnen zugeteilt werden.

Signifikant abhängig vom histologischen Differenzierungsgrad waren sowohl die Plasmakonzentrationen von HER-2/neu als auch VEGF₁₆₅. Die HER-2/neu-Konzentrationen stiegen mit abnehmender Differenzierung der Tumorzellen signifikant an ($p=0,02$), entsprechend niedrig waren sie für die Patientinnen mit einem Grading von 1 (Mittelwert: 8,7 ng/ml; Median: 8,4 ng/ml) und erhöhten sich bei einem Grading von 2 (Mittelwert: 9,1 ng/ml; Median: 8,8 ng/ml) und 3 (Mittelwert: 9,7 ng/ml; Median: 9,4 ng/ml). Für die Baselinekonzentrationen von VEGF₁₆₅ waren die deutlich niedrigeren Werte bei einem Grading von 1 gegenüber denen bei einem Grading von 2 auffällig mit einer Signifikanz von $p=0,04$ (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: *Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ vom histologischen Grading (1/2/3).*

Grading	CA 15-3 (U/ml)			HER-2/neu (ng/ml)		
	1	2	3	1	2	3
Mittelwert	21,2	19,8	20,0	8,7	9,1	9,7
Median	19,4	17,8	19,7	8,4	8,8	9,4
Signifikanz (p)	0,62			0,02		
Grading	EGFR (ng/ml)			VEGF (pg/ml)		
	1	2	3	1	2	3
Mittelwert	57,8	58,8	60,7	106,6	130,7	113,6
Median	56,2	58,4	60,9	35,7	102,6	67,2
Signifikanz (p)	0,21			0,04		

In der Abbildung 14 sind die Baselinekonzentrationen von HER-2/neu und VEGF₁₆₅ mittels Boxplots dargestellt. Ersichtlich wird der stetige Anstieg von HER-2/neu im Normbereich und die signifikante Divergenz der VEGF₁₆₅-Konzentrationen bei einem Grading von 1 zu 2 (p=0,04). Während die mittleren VEGF₁₆₅-Konzentrationen zum Therapiebeginn, dargestellt durch die 50%-Perzentile, der Patientinnen mit einem histologischen Grading von 1 unter der oberen Normgrenze von 60 pg/ml gelegen waren, steigt die 50%-Perzentile bei einem histologischen Grading von 2 und 3 über die obere Normgrenze.

Die Abbildung 15 stellt die longitudinalen Verläufe der Plasmakonzentrationen von HER-2/neu im Therapiearm A und B dar. Patientinnen, deren HER-2/neu-Konzentrationen zum Therapieende über der oberen Normgrenze lagen, wiesen ein histologisches Grading des Mammakarzinoms von 2 oder 3 auf. Patientinnen mit einem Grading von 1 waren unabhängig vom Therapiearm innerhalb des Normbereichs angestiegen und überschritten den oberen Normwert von 15 ng/ml nicht.

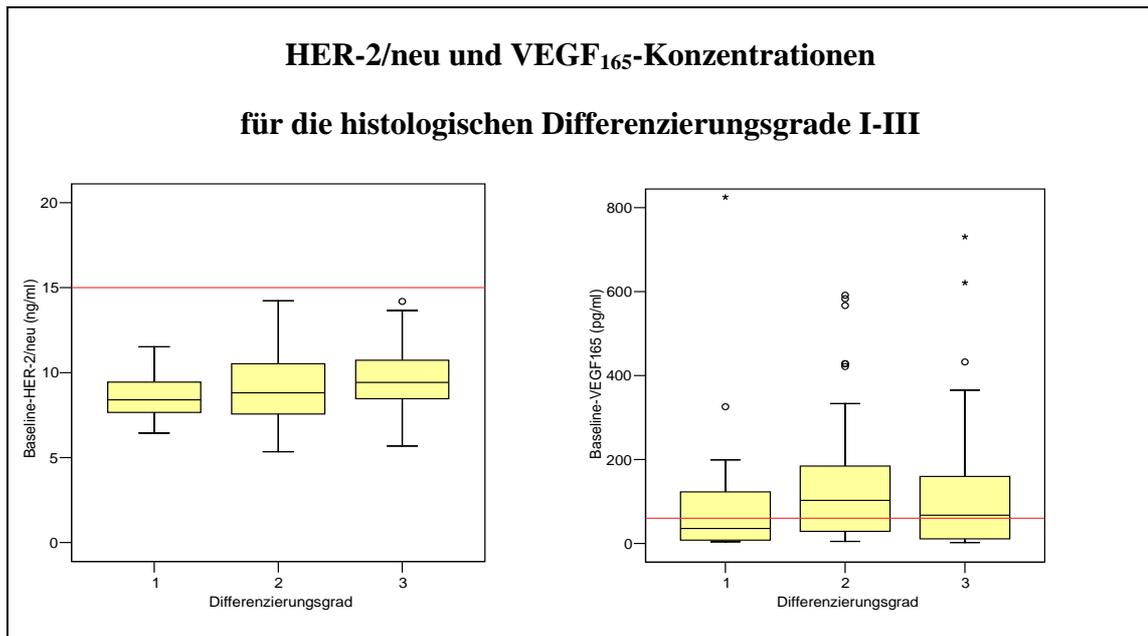


Abbildung 14: Boxplots zur Verteilung der HER-2/neu- und VEGF₁₆₅-Baselinekonzentrationen in Abhängigkeit vom histologischen Grading; HER-2/neu steigt signifikant ($p=0,02$) mit zunehmendem Differenzierungsgrad an. Die Baselinekonzentrationen von VEGF₁₆₅ sind bei einem Grading von 1 signifikant niedriger als bei einem Grading von 2 ($p=0,04$).

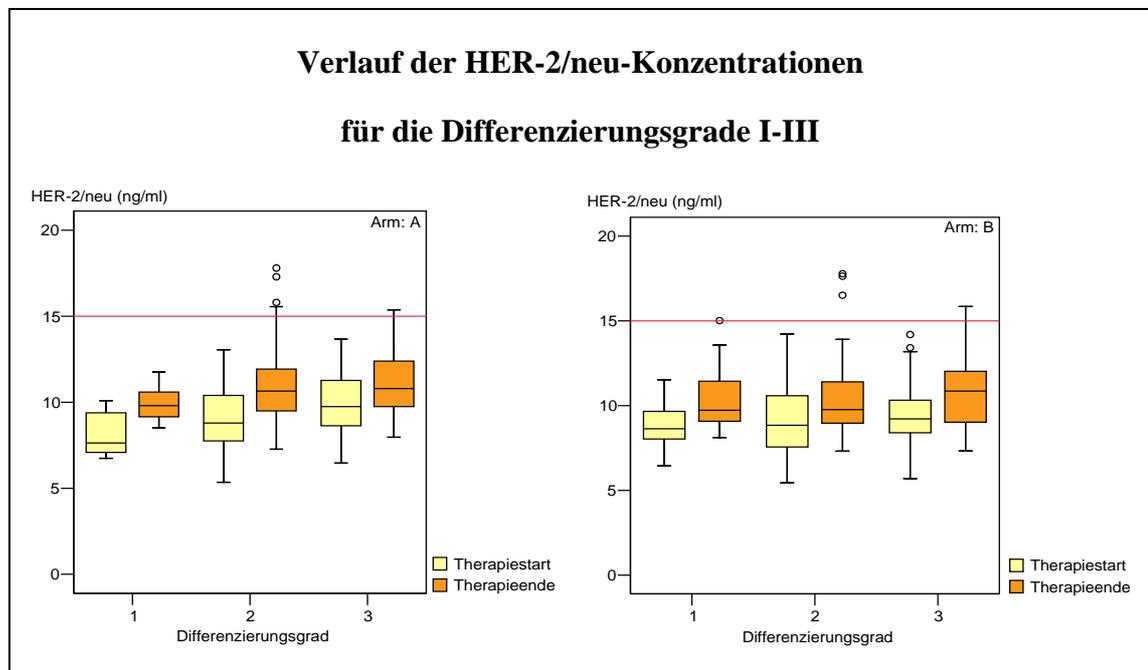


Abbildung 15: HER-2/neu-Konzentrationen zum Therapiebeginn und -ende bei einem signifikanten Anstieg ($p=0,02$) mit zunehmendem Grading (Differenzierungsgrad) in beiden Therapiearmen.

Einfluss des Hormonrezeptorstatus

Ein positiver Hormonrezeptorstatus lag vor, wenn der Östrogen- oder Progesteronrezeptor biochemisch oder im immunreaktiven histologischen Score (IRS) positiv war.

Von den 221 Patientinnen hatten 56 (25,3%) Patientinnen einen negativen und 165 (74,6%) einen positiven Hormonrezeptorstatus. Im Gesamtkollektiv fanden sich keine signifikanten Abhängigkeiten der Baselinespiegel der vier untersuchten Biomarker vom Hormonrezeptorstatus. HER-2/neu, für dessen Expression ein östrogenabhängiger Mechanismus bekannt ist, war im Plasma hormonrezeptornegativer Patientinnen (Mittelwert: 9,6 ng/ml; Median: 9,4 ng/ml) tendenziell höher als im Plasma hormonrezeptorpositiver (Mittelwert: 9,2 ng/ml; Median: 8,8 ng/ml). Diese Divergenz unterlag keiner Signifikanz (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: *Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ vom Hormonrezeptorstatus (negativ/positiv).*

HR-Status	CA 15-3 (U/ml)		HER-2/neu (ng/ml)		EGFR (ng/ml)		VEGF (pg/ml)	
	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv
Mittelwert	19,7	20,1	9,6	9,2	61,3	58,7	133,1	117,3
Median	21,3	18,1	9,4	8,8	60,1	57,8	72,6	80,0
Signifikanz (p)	0,81		0,13		0,07		0,92	

Weitergehend wurde der Einfluss des Hormonrezeptorstatus in den Subgruppen der prä- und postmenopausalen Patientinnen betrachtet. Auffällig wurden dabei die postmenopausalen Patientinnen. Bei ihnen fanden sich signifikant höhere HER-2/neu- (Mittelwert: 10,1 vs. 9,3 ng/ml; Median: 9,9 vs. 9,1 ng/ml; $p=0,02$) und EGFR-Konzentrationen (Mittelwert: 63,4 vs. 57,0 ng/ml; Median: 61,7 vs. 57,0 ng/ml; $p=0,002$), wenn ihr Hormonrezeptorstatus negativ war (siehe Tabelle 14). Anzunehmen waren ähnliche regulative Prozesse, da beide Biomarker der gleichen Rezeptorfamilie entstammen.

Für die Biomarker-Konzentrationen der prämenopausalen Patientinnen bestand hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus kein signifikanter Unterschied. Die HER-2/neu-Konzentrationen der prämenopausalen Patientinnen verhielten sich invers zu den der postmenopausalen. Mittelwert und Median waren hier für die Hormonrezeptorpositiven (Mittelwert: 9,1 ng/ml; Median: 8,7 ng/ml) höher als für die Hormonrezeptornegativen (Mittelwert: 8,6 ng/ml; Median: 8,4 ng/ml), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: *Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ vom Hormonrezeptorstatus (negativ/positiv), getrennt betrachtet für prä- und postmenopausale Patientinnen.*

prämenopausal HR-Status	CA 15-3 (U/ml)		HER-2/neu (ng/ml)		EGFR (ng/ml)		VEGF (pg/ml)	
	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv
Mittelwert	20,6	20,3	8,6	9,1	57,6	60,5	124,3	102,4
Median	21,9	18,9	8,4	8,7	57,9	59,1	53,4	67,1
Signifikanz (p)	0,70		0,37		0,50		0,86	
postmenopausal HR-Status	CA 15-3 (U/ml)		HER-2/neu (ng/ml)		EGFR (ng/ml)		VEGF (pg/ml)	
	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv
Mittelwert	19,3	19,8	10,1	9,3	63,4	57,0	138,1	131,7
Median	20,9	17,3	9,9	9,1	61,7	57,0	100,2	102,9
Signifikanz (p)	0,97		0,02		0,002		0,88	

Die signifikant höheren Biomarkerkonzentrationen für HER-2/neu und EGFR der postmenopausalen Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus ist in der Abbildung 16 graphisch dargestellt.

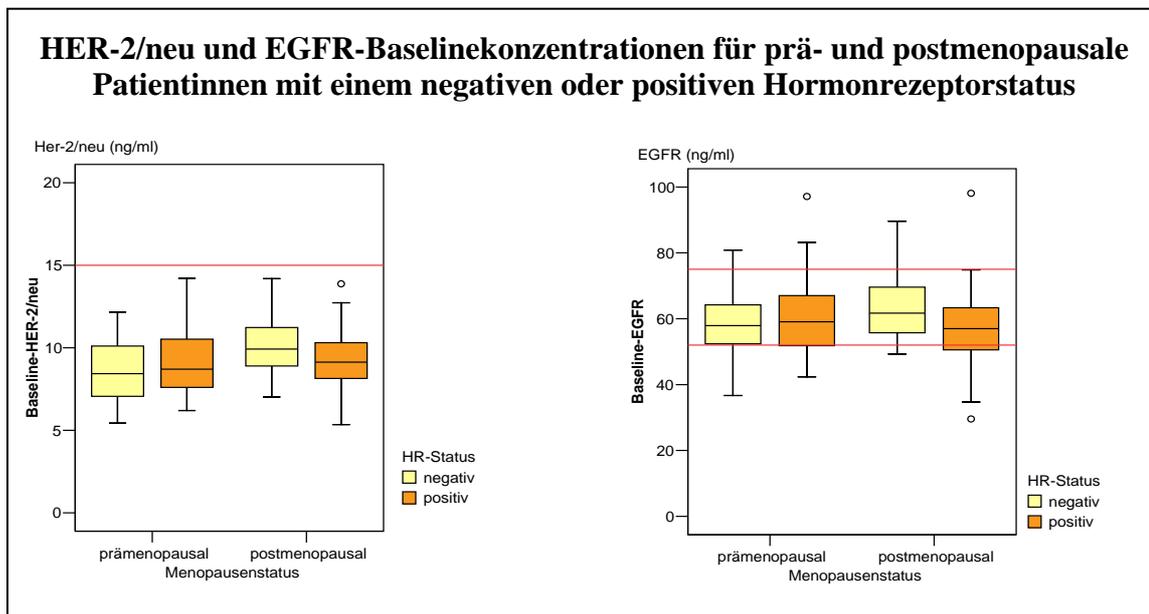


Abbildung 16: Boxplots zu den Baselinekonzentrationen der Biomarker HER-2/neu und EGFR in Abhängigkeit vom Menopausen- und Hormonrezeptorstatus. In Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus waren die Baselinekonzentrationen der postmenopausalen Patientinnen für HER-2/neu ($p=0,02$) und EGFR ($p=0,002$) signifikant höher.

Einfluss der TumorgroÙe

Die Zuordnung der Patientinnen hinsichtlich der TumorgroÙe erfolgte nach den Richtlinien der Konsensuskonferenz in St. Gallen 2007 in die Gruppe mit Tumoren kleiner als 2 cm und die Gruppe der Tumoren größer bzw. gleich 2 cm. Ein Mammakarzinom kleiner als 2 cm hatten 90 Patientinnen (40,7%), ein größeres 131 Patientinnen (59,3%).

Eine signifikante Abhängigkeit von der TumorgroÙe konnte in dem vorliegenden Patientinnenkollektiv für keinen der betrachteten Biomarker nachgewiesen werden, wobei darauf hingewiesen sei, dass es sich um postoperative Blutentnahmen handelte. (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14 *Abhängigkeit der Baselinekonzentrationen der vier Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ von der Tumorgröße (<2cm/>=2cm).*

Tumorgröße	CA 15-3 (U/ml)		HER-2/neu (ng/ml)		EGFR (ng/ml)		VEGF (pg/ml)	
	< 2 cm	>= 2 cm	< 2 cm	>= 2 cm	< 2 cm	>= 2 cm	< 2 cm	>= 2 cm
Mittelwert	20,6	19,5	9,3	9,3	59,3	59,4	112,6	126,9
Median	19,1	18,2	9,1	9,1	59,1	58,3	81,2	77,5
Signifikanz (p)	0,29		0,98		0,97		0,91	

Ebenfalls bestand kein Einfluss der Tumorgröße auf die longitudinalen Verläufe der vier Biomarker in den beiden Therapiearmen A und B.

Einfluss des Alters

Um den Einfluss des Alters auf die Konzentrationen der vier Biomarker im Plasma zu betrachten, wurde das Alter als Kovariate in der Varianzanalyse nach Brunner geführt. Die Ergebnisse erbrachten einen signifikanten Einfluss des Alters auf die EGFR-Konzentrationen und ihren Verlauf im Therapiearm B. Für den EGFR-Verlauf im Therapiearm A war allenfalls ein Trend zu erkennen, eine Signifikanz für den Einfluss des Alters bestand nicht. Die Konzentrationen der anderen Biomarker, CA 15-3, HER-2/neu und VEGF₁₆₅, waren wie in Tabelle 15 zu ersehen altersunabhängig.

Tabelle 15: *Ergebnisse (p-Werte) der Varianzanalyse nach Brunner zur Bestimmung des Einflusses des Alters (Kovariate) der Patientinnen auf den Markerverlauf.*

Therapiearm	CA 15-3 (U/ml)	HER-2/neu (ng/ml)	EGFR (ng/ml)	VEGF ₁₆₅ (pg/ml)
A	0,343	0,358	0,073	0,258
B	0,686	0,771	0,026	0,399

Der signifikante Einfluss des Alters auf die EGFR-Konzentrationen, bevorzugt im Therapiearm B, bedeutete, dass mit steigendem Alter der Patientinnen auch die EGFR-Level steigen.

Da ein signifikanter Unterschied zwischen prä- und postmenopausalen Patientinnen nur für HER-2/neu im Plasma gezeigt werden konnte, wie in Tabelle 7 bereits dargestellt, war nun die Frage interessant, ob sich der Einfluss des Menopausenstatus ändert, wenn man den altersbedingten EGFR-Anstieg der Postmenopausalen adjustiert. Die Varianzanalyse ergab nach der Adjustierung des Alters einen signifikant tieferen Abfall der EGFR-Konzentrationen der postmenopausalen Patientinnen gegenüber den prämenopausalen im Therapiearm B. Die folgende Abbildung stellt die EGFR-Verläufe für beide Analysen, erstens mit Einfluss des Alters und zweitens ohne Einfluss des Alters, gegenüber.

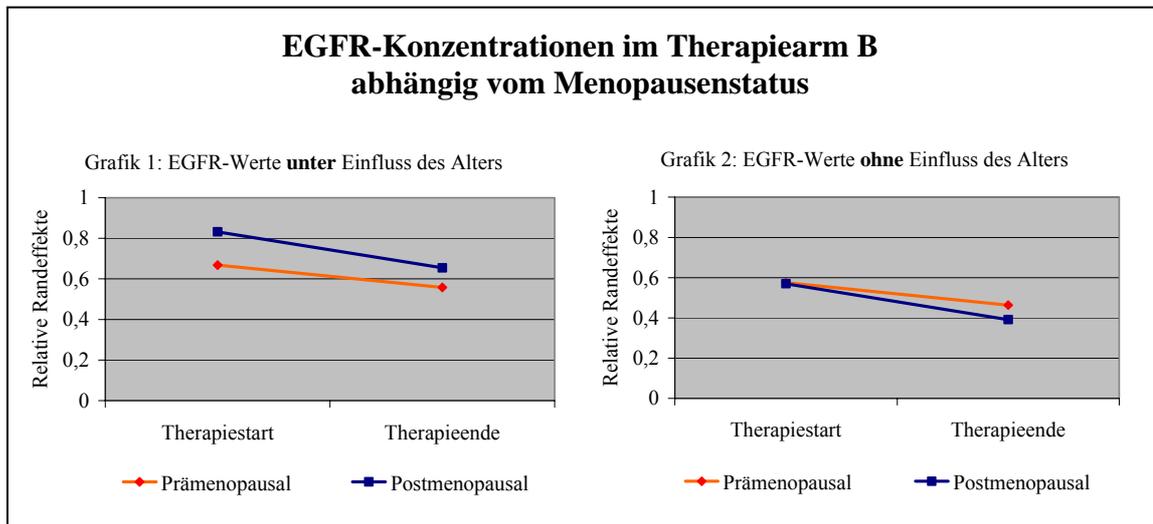


Abbildung 17: Verläufe der EGFR-Konzentrationen im Therapiearm B, dargestellt in Abhängigkeit vom Menopausenstatus; der Abfall der EGFR-Konzentrationen ist signifikant für prämenopausale gegenüber postmenopausale Patientinnen ($p=0,0081$), nachdem der Einfluss des Alters adjustiert wurde (Grafik 2).

Der Abfall der postmenopausalen Patientinnen von ihren höheren Ausgangswerten spricht ebenfalls gegen einen Einfluss möglicher verbliebener Tumorzellen auf den Biomarker.

4 Diskussion

Der Weg in der Onkologie führt hin zur optimierten Therapie. Diese sei angepasst sowohl an die Charakteristika des Karzinoms als auch den individuellen Patient, geprägt durch sein biologisches Alter, Begleiterkrankungen und seine Compliance. Allein die Tumoreigenschaften differenzieren die Therapieoptionen in viele Facetten. So richtet sich die Wahl der Behandlung des Mammakarzinoms nicht allein nach dem operativen Erfolg, sondern auch nach prognoserelevanten Merkmalen wie Hormonrezeptorstatus, HER-2/neu-Status und Nodalstatus.

Eine adjuvante Chemotherapie ist eine in kurativer Absicht vorgenommene zytostatische Behandlung nach kompletter operativer Tumorresektion. Das Ziel dieser systemischen Therapie ist es, eine angenommene, nicht nachzuweisende Mikrometastasierung kurativ zu behandeln.

Die nationale, prospektiv randomisierte ASG-Studie bildete die Grundlage für die Plasmabestimmungen der biologischen Marker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ an einem selektierten, homogenen Kollektiv mit 221 Patientinnen. Die adjuvanten Patientinnen dieser Arbeit waren durchschnittlich 52 Jahre alt und zu 46 % prä- und 54% postmenopausal.

Postoperative, prätherapeutische Biomarkerkonzentrationen

Innerhalb der ersten 28 postoperativen Tage wurde bei den 221 ausgewerteten Patientinnen die adjuvante Chemotherapie im Rahmen der ASG-Studie eingeleitet. Somit lag die Abnahme aller Baselinekonzentrationen in den ersten 4 postoperativen Wochen.

Unter den vier untersuchten Biomarkern lagen lediglich die HER-2/neu-Konzentrationen aller Patientinnen ausnahmslos im Normbereich. Jede zehnte Frau

wies erhöhte CA 15-3-Konzentrationen auf, circa jede dritte Frau pathologische EGFR-Werte (sowohl unter als auch oberhalb des Normbereichs). Mehr als die Hälfte der Patientinnen zeigte über die Norm erhöhte VEGF₁₆₅-Konzentrationen vor Therapiebeginn (siehe Abbildung 18). Die hohe Variabilität der VEGF₁₆₅-Konzentrationen ließ eine nur eingeschränkte Interpretation der Ergebnisse zu.

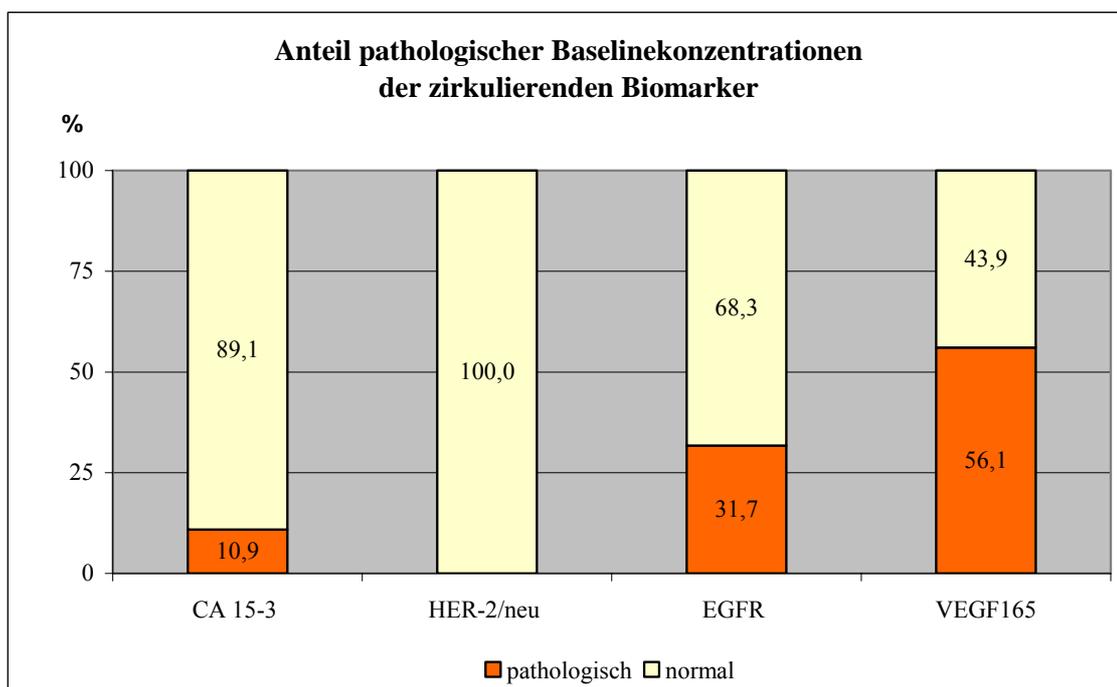


Abbildung 18: Gegenüberstellung der Anteile pathologischer und nicht pathologischer Biomarkerkonzentrationen prätherapeutisch; Normbereiche für CA 15-3: <30 U/ml, HER-2/neu: <15 ng/ml, EGFR: 52-75 ng/ml, VEGF₁₆₅: <60 pg/ml.

Gegenüber CA 15-3 bestanden für die Konzentrationen von HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ signifikante Abhängigkeiten von mehreren der betrachteten prognoserelevanten Merkmale (siehe Abbildung 19).

Abhängigkeiten der Baselinekonzentrationen von den prognoserelevanten Merkmalen und signifikante Änderungen der Biomarker im Verlauf

Biomarker	CA 15-3	HER-2/neu	EGFR	VEGF ₁₆₅
Menopausenstatus				
HER-2/neu Expression				
Histologisches Grading				
Hormonrezeptorstatus				
Nodalstatus				
Alter				

Biomarker	CA 15-3	HER-2/neu	EGFR	VEGF ₁₆₅
Therapiearm A				
im Normbereich	↑	↑	=	
über den Normbereich				=
Therapiearm B				
im Normbereich		↑		
über den Normbereich	↑		↓	↑

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Abhängigkeiten (orange) der gewählten Biomarker von den prognoserelevanten Merkmalen sowie der Änderungen (↑ signifikanter Anstieg, ↓ signifikanter Abfall, = keine signifikante Änderung) der Biomarkerkonzentrationen im Verlauf des jeweiligen Therapiearms.

Die jeweilige Regulation eines Markers abhängig von dem betrachteten Merkmal wird im Folgenden zu jedem Marker separat diskutiert.

CA 15-3

Der in dieser Arbeit ermittelte Anteil von 10,9% pathologisch erhöhter CA 15-3-Baselinekonzentrationen entsprach den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen mit ähnlicher oder höherer Fallzahl, wenngleich die verwendeten cut-off-Werte differierten und zwischen 20 und 40 U/ml lagen (47-49). In Anbetracht der Etablierung laborinterner Grenzwerte sollte dieser Aspekt zu vernachlässigen sein und einen Vergleich zulassen. Zudem wurden Arbeiten publiziert, die in der adjuvanten Situation keine Erhöhung der CA 15-3-Konzentrationen nachweisen konnten (50;51). Bekannt war eine Assoziation erhöhter CA 15-3-Konzentrationen mit anderen Erkrankungen, wie chronische Hepatitis, Leberzirrhose, Sarkoidose, Tuberkulose und systemischer Lupus Erythematoses (47), weshalb für fehlende erhöhte CA 15-3-Konzentrationen in einer adjuvanten Patientengruppe am ehesten strenge Auswahlkriterien, z. B. ein negativer Nodalstatus, oder eine geringe Fallzahlen als Ursache in Betracht kamen. Die

dem Vergleich herangezogenen Arbeiten, zusammengestellt in nachfolgender Tabelle, betrachteten alle kurativ operierten Mammakarzinompatientinnen vor der Einleitung einer Chemotherapie.

Tabelle 16: Anteil erhöhter CA 15-3-Konzentrationen für das adjuvante Mammakarzinom.

CA 15-3	n	cut-off (U/ml)	Fallzahl erhöhter CA 15-3-Level	Anteil in %
Kallioniemi et al. 1988	177	38	16	9
Colomer et al. 1989	350	40	25	7
Okamoto et al. 1995	134	20	13	10
Briasoulis et al. 1998	57	30	0	0
Pentheroudakis et al. 2004	22	31	0	0
<i>eigene Daten</i>	<i>221</i>	<i>30</i>	<i>24</i>	<i>11</i>

Den präoperativen CA 15-3-Serumkonzentrationen wurde ein prognostischer Wert für den Verlauf des Mammakarzinoms zugesprochen (52). Weiter konnte eine Abhängigkeit der präoperativen CA 15-3-Konzentrationen von der Tumorgroße und dem Nodalstatus gezeigt werden. In verschiedenen Studien zum primären Mammakarzinom der Stadien I-III wurden präoperativ erhöhte CA 15-3-Level mit einem Anteil von 16 bis 31% evaluiert (52-54), wobei auch hier die oberen Normgrenzen stark variierten.

Die betrachteten prognoserelevanten Merkmale nahmen auf die CA 15-3-Konzentrationen dieser Arbeit keinen signifikanten Einfluss, weder auf die Baselinekonzentrationen noch auf die Werte im Therapieverlauf. Hingegen war der Einfluss des Therapiearms auf den Biomarkerverlauf signifikant.

HER-2/neu

In dieser Arbeit streuten die prätherapeutischen HER-2/neu Werte im Plasma von 5,4 bis 14,2 ng/ml und lagen alle unter 15 ng/ml, dem oberen Grenzwert für den Normbereich. Damit unterschied sich dieser Biomarker entscheidend von den anderen - CA 15-3, EGFR und VEGF₁₆₅, deren Konzentrationen vor Therapiebeginn teils pathologische Werte aufwiesen. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen an ein Onkogen, welches in einem Patientenkollektiv ohne bekannte Tumorlast nicht zu unspezifischen Erhöhungen führen sollte, wie sie bei anderen Massentumormarkern auftreten könnten.

Vorliegende Daten zum zirkulierenden HER-2/neu-Protein adjuvanter nodalpositiver Patientinnen vor Einleitung einer Chemotherapie konnten bestätigt werden. So lagen auch in der Arbeit von Lüftner et al. alle HER-2/neu Konzentrationen unter 15 ng/ml (55).

Das Ergebnis entsprach ebenfalls den Daten zu den Stadien I-III eines Mammakarzinoms, für welche eine geringe Sensitivität des s-HER-2/neu im Gegensatz zur metastasierten Situation durch Schwartz et al. nachgewiesen werden konnte (56).

Unseren Erwartungen entsprechend stellte sich heraus, dass die HER-2/neu-Baselinewerte unabhängig von der HER-2/neu-Expression im Tumorgewebe waren.

EGFR

Ein Viertel der Patientinnen wies in dieser Arbeit postoperativ zu geringe EGFR-Level auf, 2/3 zeigten EGFR-Level im Normbereich und bei ca. 6% waren die Werte erhöht. Aufgrund mangelnder Daten zu zirkulierendem EGFR in der adjuvanten Situation soll die Diskussion auf die metastasierte Situation ausgeweitet werden. Darüber hinaus wurde die EGFR-Expression im Tumorgewebe insbesondere im Kontext der neuen biologischen Therapien mit monoklonalen Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren an verschiedenen Entitäten untersucht und soll einem Vergleich dienen.

Die Tabelle 17 zeigt Patientengruppen mit einem metastasierten Mammakarzinom und ähnlicher oder höherer Fallzahl. Pathologisch niedrige EGFR-Konzentrationen im Serum zeigten sich bei 10 - 20% der Patientinnen (57-60).

Tabelle 17: *EGFR-Baselinewerte in Patientinnengruppen mit einem metastasierten bzw. adjuvanten Mammakarzinom.*

EGFR		n	cut-off (ng/ml)	Anteil erniedrigter EGFR-Level in %
metast.	Marx et al.	265	-	20
	Muller et al.	101	45	15
	Sandri et al.	113	45	17
	Souder et al.	907	44,1	10
adj.	eigene Daten	221	52	26
adj. - adjuvant; metast. - metastasiert				

Müller und Sandri et al. stellten für das metastasierte Mammakarzinom einen Zusammenhang zwischen geminderten EGFR-Serumspiegeln und reduzierten Überlebenszeiten her und bewerten EGFR im Serum als einen prädiktiven und prognostischen Marker (58;59). Souder et al. zeigte in einer Gruppe von 535 Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom ebenso eine signifikant verkürzte Überlebenszeit bei erniedrigten EGFR-Konzentrationen im Serum. Weitergehend untersuchten sie eine Subgruppe von Patientinnen mit normalen Werten des s-HER-2/neu. Dabei fand sich für die Patientinnen mit erniedrigten s-EGFR-Konzentrationen bei normalen s-HER-2/neu eine signifikant kürzere Überlebenszeit im Vergleich zu den Patientinnen, die sowohl normale s-EGFR als auch s-HER-2/neu-Werte aufwiesen (60). Damit konnte EGFR als ein von den s-HER-2/neu-Konzentrationen unabhängiger prädiktiver Wert herausgearbeitet werden und die Messung von EGFR im Blut erlangte insbesondere für die HER-2/neu negativen Patientinnen prognostisch an Bedeutung.

Auffällig ist ein deutlich höherer cut-off unserer EGFR-Messungen. In dieser Arbeit wurde der vom Hersteller des angewandten ELISA vorgegebene cut-off genutzt,

während die anderen Autoren eigene Vergleichskollektive gesunder Probanden für die Festlegung eines Normbereichs heranzogen. Aus diesem Unterschied heraus resultiert wahrscheinlich der höhere Anteil erniedrigter EGFR-Level dieser Arbeit.

VEGF₁₆₅

Unter den vier betrachteten biochemischen Markern nimmt VEGF₁₆₅ eine Sonderstellung als Angiogenesefaktor ein. Auffällig war die Verteilung der Baselinekonzentrationen gegenüber CA15-3, HER-2/neu und EGFR. Über die Hälfte aller Patientinnen (56,1%) hatten vor Therapiebeginn pathologische VEGF₁₆₅-Konzentrationen. Anhand der Streubreiten und Mediane (vergleiche Tabelle 18) wird deutlich, dass VEGF₁₆₅ vor Therapiebeginn nicht nur moderat, sondern auf ein Vielfaches des oberen Normwerts von 60 pg/ml erhöht war. Beachtenswert lag der Median über dem oberen Normwert.

Tabelle 18: Streubreite (Range) und Mediane der postoperativen, prätherapeutischen Biomarkerkonzentrationen.

Baseline-Konzentrationen	CA 15-3 (U/ml)	HER-2/neu (ng/ml)	EGFR (ng/ml)	VEGF ₁₆₅ (pg/ml)
Range	6,5 - 54,6	5,4 - 14,2	29,6 - 98,1	2,4 - 825,1
Median	18,5	9,1	58,8	78,6
cut-off	30	15	52 - 75	60

Zwei Arbeiten zu perioperativen s-VEGF₁₆₅-Konzentrationen beim Kolon- und Mammakarzinom zeigten postoperative Markeranstiege. Zum einen ergaben die perioperativen s-VEGF₁₆₅-Konzentrationen von 68 kurativ resezierten Kolonkarzinompatienten bis zum 30. postoperativen Tag signifikant erhöhte Level verglichen mit den Werten Gesunder (61). Zum anderen beschreibt eine perioperative Untersuchung der s-VEGF-Level von 82 Mammakarzinompatientinnen einen initialen Anstieg bis zum 2. postoperativen Tag, einen darauf folgenden Abfall und einen erneuten Anstieg zum 5. postoperativen Tag, abhängig vom Ausmaß der

Tumorresektion (62). Diskutiert wurde eine Stimulation residueller Tumorzellen durch den operativen Eingriff oder die anschließenden Wundheilungsprozesse.

Die Bindung von VEGF₁₆₅ an VEGFR-1 oder VEGFR-2 kann über die Aktivierung einer Signalkaskade die Neovaskularisation, einen physiologischen Prozess, auslösen (42). Erhöhte Konzentrationen und damit verbundene Aktivitäten wurden während des Tumorwachstums beschrieben. Da die untersuchte Patientengruppe vermeintlich tumorfrei war, schien ein kausaler Zusammenhang zwischen den erhöhten VEGF₁₆₅-Werten und einer physiologischen, gesteigerten Angiogenese im Rahmen des postoperativen Wundheilungsprozesses wahrscheinlicher.

Zu VEGF-Konzentrationen in Serum oder Plasma existiert eine vergleichende Arbeit, die zeigte, dass im Plasma von Mammakarzinompatientinnen die VEGF-Konzentrationen signifikant niedriger waren als im Serum dieser (63). Für die Daten der vorliegenden Arbeit bedeutet dieser Aspekt, dass in Serumuntersuchungen ein noch höherer Anteil pathologischer Werte zu erwarten wäre.

Peritherapeutische Biomarkerkonzentrationen und deren biologische Bedeutung

Im Verlauf der Therapie veränderten sich die medianen Konzentrationen der Biomarker abhängig vom Therapiearm. Im konventionellen Therapiearm A stiegen CA 15-3 und HER-2/neu signifikant an, hingegen veränderte sich VEGF₁₆₅ nicht wesentlich. Die EGFR-Konzentrationen waren tendenziell fallend, allerdings ohne Signifikanz im Arm A.

Bemerkenswert war die signifikante Änderung aller vier Biomarker für die Patientinnen im dosisdichten, intensiveren Therapiearm B. Die medianen Werte von CA 15-3, HER-2/neu und VEGF₁₆₅ stiegen an und EGFR fiel alterabhängig signifikant ab.

Auch war ein bedeutend höherer Anstieg der CA 15-3-Konzentrationen im Therapiearm B gegenüber Arm A zu verzeichnen, wohingegen der Anstieg der HER-2/neu-Konzentrationen in beiden Armen ausgewogen war (siehe Tabelle 19). Dieser

Gegensatz spricht gegen eine Regulation durch residuelle Tumorzellen und verlangt weitere Erklärungen.

Tabelle 19: *Mediane Konzentrationen der Biomarker im Therapieverlauf.*

	Therapiearm A			Therapiearm B		
	Start	Ende	<i>P</i> value	Start	Ende	<i>P</i> value
CA 15-3 (U/ml)	17,0	21,6	$0,103 \cdot 10^{-9}$	19,8	36,5	$< 0,1 \cdot 10^{-15}$
HER-2/neu (ng/ml)	9,3	10,6	$0,176 \cdot 10^{-9}$	8,8	10,1	$0,100 \cdot 10^{-8}$
EGFR (ng/ml)	58,0	56,3	0,984	59,4	54,1	$0,242 \cdot 10^{-5}$
VEGF ₁₆₅ (pg/ml)	100,6	67,7	0,871	59,1	94,3	0,002

Da mit einer adjuvanten Therapie (im Vergleich zu keiner Therapie) für das nodalpositive Mammakarzinom bessere Überlebenszeiten erzielt wurden (2;64), ist zu hinterfragen, warum die Markerwerte in der Therapie entgegen den Erwartungen für ein Patientenkollektiv ohne nachweisbare Tumorlast anstiegen.

Für den Anstieg der Biomarker während einer adjuvanten Chemotherapie und die bemerkenswerten Unterschiede zwischen dem konventionellen und dem intensiveren Arm sollen im Folgenden mögliche Ursachen, wie

- Mikrometastasierung in der adjuvanten Situation,
- Regulative Prozesse der Markerexpression und
- G-CSF-Modulation, diskutiert werden.

Mikrometastasierung in der adjuvanten Situation

Ein akzeptiertes Modell der Fernmetastasierung beschreibt das Loslösen von einzelnen Zellen vom Tumorverband, so genannten Mikrometastasen. Diese zirkulieren entweder durch das Blutgefäßsystem oder über das lymphatische System in andere Organe. In den letzten Jahren war es gelungen, diese anfängliche These durch immunhistochemische Detektion solcher Zellen, z. B. im Knochenmark oder in Lymphknoten adjuvanter nodalnegativer Mammakarzinompatientinnen, zu sichern (65;66).

Unabhängig von der Anzahl der befallenen Lymphknoten wurde für das nodalpositive Mammakarzinom von allen führenden Gesellschaften die Indikation zu einer systemischen Chemotherapie gestellt, da bereits eine Metastasierung vorliegt und okkulte Tumorzellen nach einer R0-Resektion angenommen werden müssen. Die zytostatische Therapie hat den Zelltod verbliebener Tumorzellen zum Ziel, weshalb anzunehmen war, dass unter der Therapie Zellbestandteile, unter anderem auch Oberflächenrezeptoren, in die Blutbahn frei gesetzt werden und im Plasma in erhöhter Konzentration nachzuweisen wären.

Allerdings ist es fragwürdig, ob allein dadurch ein signifikanter Markeranstieg zu begründen und darüber hinaus auch der Unterschied der Ergebnisse beider Therapieregime zu erklären ist, wenngleich eine radikalere Zerstörung mikroskopischer Tumormassen unter einer intensiveren Therapie denkbar wäre.

Gegen die Mikrometastasierung als alleinige Ursache für die Markeranstiege unter Therapie sprach der hohe Anteil der Patientinnen mit auffälligen Biomarkerkonzentrationen. Die Werte für CA 15-3 stiegen bei 12,3% (Arm A) und 60% (Arm B) der Patientinnen über die Normgrenze an, wohingegen die Rezidivrate für das adjuvante Mammakarzinom innerhalb 15 Jahren postoperativ etwa 20% beträgt. Somit sind die gemessenen ansteigenden Konzentrationen durch eine Mikrometastasierung nicht plausibel erklärbar.

Die HER-2/neu-Konzentrationen hingegen waren in 4,7% (Arm A) und 4,3% (Arm B) der Fälle über die obere Normgrenze gestiegen.

Einen gemeinsamen Anstieg beider Marker zeigten lediglich 3 von 221 (1,4%) untersuchten Patientinnen. Läge dem Markeranstieg im intensiveren Behandlungsarm ein Zerfall der Mikrometastasen zu Grunde, wäre häufiger ein gleichzeitiger Anstieg der Oberflächenmarker, CA 15-3, HER-2/neu und EGFR, zu erwarten. Auffällig ist der homogene Verlauf von HER-2/neu unter der intensiveren Therapie, während EGFR als struktureller Verwandter scheinbar stärker beeinflusst wurde. In folgender Abbildung sind die Patienten dargestellt, deren gemessenen Konzentrationen unter der Chemotherapie in den pathologischen Bereich angestiegen (CA 15-3, HER-2/neu) bzw. abgefallen (EGFR) sind.

Nur wenige Patientinnen wiesen bei erhöhten CA 15-3-Konzentrationen auch einen pathologischen Wert der HER-2/neu- oder EGFR-Konzentration auf, ein Sachverhalt, der vermuten ließ, dass eher regulative Prozesse eines jeden einzelnen Markers unter der jeweiligen Chemotherapie zu diesen Ergebnissen führten.

Der deutlich hohe Anteil steigender CA 15-3-Konzentrationen im dosisdichten/intensiveren Arm B sollte keinesfalls prognostisch gedeutet werden, zumal andere prognostische Faktoren, wie die HER-2/neu-Expression oder das Grading, in beiden Therapiearmen ausgeglichen waren.

Die Kombination von Anthrazyklinen und Taxanen in dosisdichten Therapieschemata, wie eines auch für die Patientinnen dieser Arbeit angewandt wurde, erbrachte einen Überlebensvorteil verglichen mit konventionellen Regimen der adjuvanten Therapie des nodalpositiven Mammakarzinoms (3;67;68). Die größte der drei Studien erbrachte innerhalb von 5 Jahren einen Vorteil im krankheitsfreien Überleben für die dosisdichte Therapiegruppe (82% versus 75%) (3). Das sei ebenfalls ein Argument für andere regulative Prozesse, die zu pathologischen Markerkonzentrationen unter der adjuvanten Chemotherapie führten.

*Regulative Prozesse der Markerexpression**HER-2/neu*

Erhöhte s-HER-2/neu-Spiegel vor und nach einer adjuvanten Chemotherapie sind als prognostisch ungünstig erwiesen (69-71). Deshalb kann HER2-/neu als Surrogatmarker für eine Mikrometastasierung angesehen werden. Die Baselinekonzentrationen aller hier untersuchten Patientinnen lagen im Normbereich und nur 10 [Arm A: 5 (4,7 %); Arm B: 5 (4,3%)] stiegen im Verlauf der Chemotherapie moderat über die Normgrenze (17,8 ng/ml) an. Weitere prognostisch ungünstige Faktoren, wie gleichzeitig erhöhte CA 15-3-Konzentrationen oder einen positiven HER-2/neu-Status im Gewebe wiesen nur 3 bzw. 2 Patientinnen auf. Unabhängig von der Anzahl der befallenen Lymphknoten stiegen die HER-2/neu-Konzentrationen im Normbereich signifikant (Arm A: $p=0,176 \cdot 10^{-9}$ / Arm B: $p=0,100 \cdot 10^{-8}$) an.

Bei der geringen Anzahl positiver Lymphknoten von 1 bis 3 und den überwiegend normalen CA 15-3-Konzentrationen ergab sich kein Anhalt, dass dieser Anstieg aus okkulten Tumorzellen stammte. Vielmehr ist ein vermehrtes Abshedden der Oberflächenrezeptoren von epithelialen, gesunden Gewebes wahrscheinlich, da HER-2/neu auch von epithelialen Zellen gesunder Organe exprimiert wird (16-19). Vorstellbar wäre eine stärkere Induktion dieses Vorgangs unter Einfluss der Chemotherapie.

Eine regulatorische Interaktion zwischen Östrogenrezeptoren und HER-2/neu wurde bereits 1995 von Grunt et al. an Mammakarzinomzelllinien gezeigt. Dabei führten steigende Östrogenspiegel zu einer Hemmung der HER-2/neu-Expression und umgekehrt (72). Der Effekt der chemischen Kastration, sinkende Östrogenspiegel unter systemischer Chemotherapie (Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil), ist an nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen von Lüftner et al. beschrieben worden. Resultierend kam es zu einem signifikanten Anstieg der Serum-HER-2/neu-Konzentrationen (55). Der Nachweis der östrogenabhängigen HER-2/neu-Expression gelang bereits 1990 bis 1994 an den verschiedenen Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, T47-D, ZR75-1). Die Zugabe von Östradiol induzierte eine Verminderung der HER-

2/neu-Expression und die Hemmung des Rezeptors durch Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptor Modulator, führte zu einem Anstieg der Expression (73-76). Die inverse Korrelation von Östrogenkonzentration und HER-2/neu-Expression erfolgt nach Newmann et al. über eine Modulation der Transkriptionsaktivität des HER-2/neu-Gens durch Kofaktoren des Östrogenrezeptors, z. B. SRC-1. Ihre vorrangige Bindung an Östrogenrezeptoren potenziert deren Transkriptionsaktivität. Sinkt die Östrogenrezeptorkonzentration, steigt der Anteil an freiem SRC-1 und es folgt eine Potenzierung der HER-2/neu-Transkriptionsaktivität (77). In der Abbildung 20 sei der Signalweg eines EGF-Rezeptor in seiner Komplexizität dargestellt.

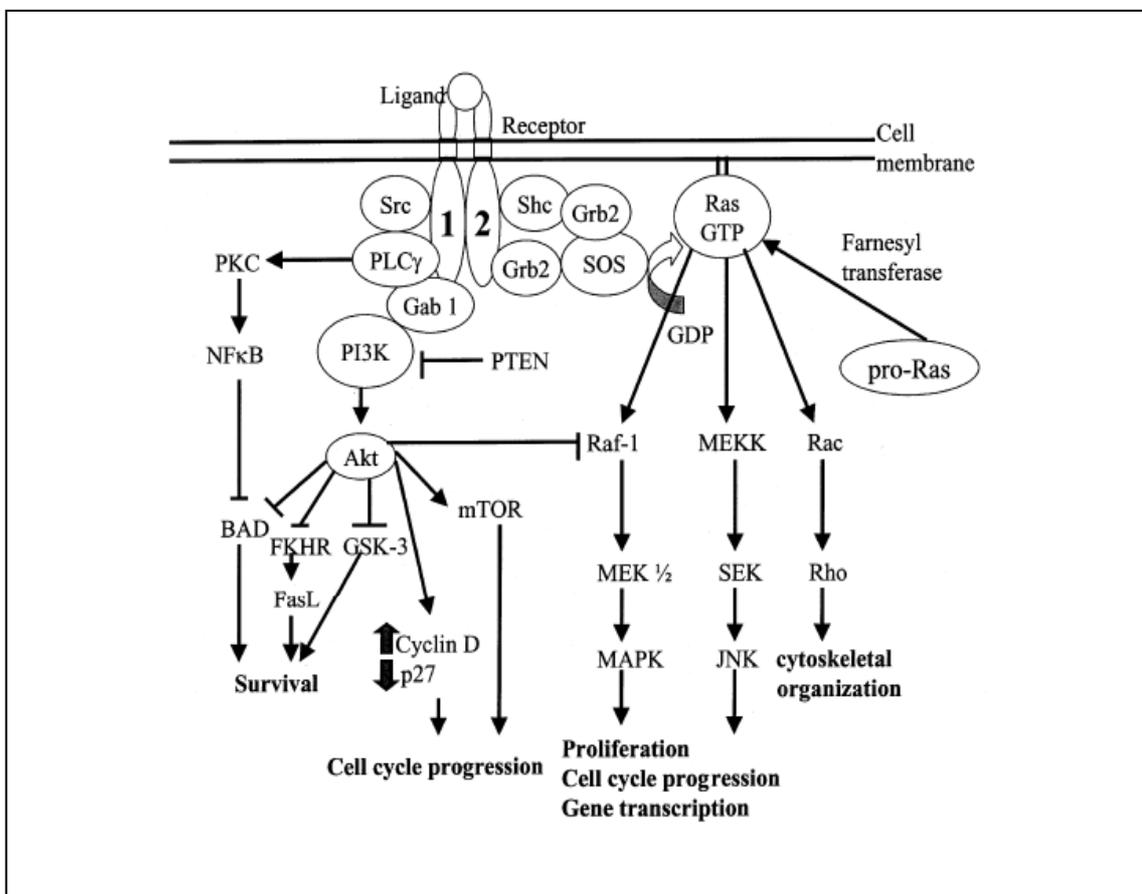


Abbildung 20: Signalkaskade des EGF-Rezeptors. SRC-1 bindet ligandenunabhängig an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors.

Der Anstieg der HER-2/neu-Konzentrationen im Therapieverlauf durch eine chemische Kastration unter Epirubicin, Cyclophosphamid und Paclitaxel kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Dafür spräche der adäquate Anstieg des Markers in beiden Therapiearmen, da die Wirkung der chemischen Kastration in beiden Therapiearmen anzunehmen ist. Eine prognostische Bedeutsamkeit würde man in dem Anstieg der HER-2/neu-Konzentrationen in dieser Arbeit nicht sehen.

EGFR

Im Therapieverlauf ergab sich ein signifikanter Abfall ($p=0,242 \cdot 10^{-5}$) der EGFR-Konzentrationen im dosisdichten, intensiveren Arm B gegenüber einem nicht signifikanten Abfall ($p=0,984$) im Arm A. Zum Therapieende wiesen in der Gruppe B 40 % der Patientinnen erniedrigte, pathologische EGFR-Konzentrationen auf gegenüber 25,2 % prätherapeutisch.

Die Erkenntnis, dass erniedrigte EGFR-Konzentrationen prädiktiv für ein kürzeres Überleben sind (59;60), ließe für den dosisdichten, intensiven Therapiearm dieser Studie Erklärungen offen, zumal gerade für diesen aggressiveren Therapiearm günstigere Markerkonstellationen erwartet wurden.

In der Literatur fanden sich derzeit keine Daten, welche eine geminderte EGFR-Expression oder absinkende Konzentrationen der gelösten EGFR-Domäne unter Chemotherapie aufzeigten. Aus klinischen Erfahrungen ist die verstärkte Apoptose epidermaler Zellen unter Chemotherapie bekannt und an Symptomen, wie Alopezia, Mukositis, Hand-und-Fuß-Syndrom sichtbar. Neben der beschleunigten Apoptose wäre auch die Hemmung der Transkription der epidermalen Wachstumsfaktoren annehmbar. In der adjuvanten Situation wurden Konzentrationen gelöster EGF-Rezeptoren adäquat zu denen gesunder Frauen erwartet, da diese von gesundem epitheliales Gewebe und nicht von Tumorzellen entstammten. Dafür spräche der stärkere Abfall im dosisdichten Therapiearm mit der stärkeren Toxizität, wenn man einen Einfluss des eingesetzten hämatopoetischen Wachstumsfaktors auf EGFR ausschließt.

VEGF₁₆₅

Gemeinsam war den Verläufen von VEGF₁₆₅ und CA 15-3 ein signifikanter Anstieg der Level im dosisdichten, intensiven Therapiearm in den pathologischen Bereich, während im konventionellen Arm die VEGF₁₆₅-Werte sogar abfielen. Als Ursache für die unterschiedlichen VEGF₁₆₅-Markerverläufe kann zum einen die Wirkung einer intensiven Therapie auf das postoperative Wundgebiet zum anderen der Einfluss von G-CSF diskutiert werden.

Ein postoperativer VEGF₁₆₅-Anstieg abhängig vom Resektionsausmaß wurde von de Vita et al. für das Kolonkarzinom beschrieben und als reaktiver Prozess während der Wundheilung interpretiert (78). Bereits 1992 wurde eine ansteigende Expression der VEGF-mRNA in der Phase der Wundheilung an Ratten, Meerschweinchen und Mäusen nachgewiesen. Gezeigt wurde eine vermehrte Expression von VEGF-mRNA durch Keratozyten (79).

Der Einfluss einer adjuvanten Chemotherapie auf VEGF₁₆₅ wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal betrachtet. Überraschend lagen die Baseline-Werte zu 56 % im pathologischen Bereich. Unter der Therapie fiel die mittlere Konzentration im Arm A nicht signifikant ab. Im Arm B zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($p=0,002$) bei unterschiedlichen Baselinekonzentrationen. Vorstellbar ist eine durch Zytostatika herbeigeführte Verzögerung der Wundheilung und damit anhaltende Stimulierung der Proliferation von Endothelzellen über die VEGF-Expression. Denkbar ist die Vermittlung auch durch mononukleäre Zellen oder Zytokine. Für den dosisdichten Arm kann eine zusätzliche Störung der Wundheilung durch die intensivere Chemotherapie vorliegen, weshalb eine reaktive Hochregulation von VEGF₁₆₅ möglich wäre.

Der Einfluss von G-CSF

Im Unterschied zu den Patientinnen der konventionellen Therapiegruppe A erhielten diejenigen der dosisintensivierten Gruppe B Filgrastim, ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor zur Stimulation der Granulopoese und Vermeidung oder Milderung der therapieinduzierten Neutropenie.

Der granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) aktiviert und kontrolliert die Proliferation und Differenzierung neutrophiler Granulozyten. Physiologisch verhält sich der G-CSF-Serumspiegel invers zur Neutrophilenzahl im Blut (80).

Zwei griechische Arbeiten aus den Jahren 2000 und 2004 beschrieben den Einfluss von G-CSF auf zirkulierendes CA 15-3 für Mammakarzinompatientinnen unter einer adjuvanten Therapie. Sie fanden gleich den Ergebnissen dieser Arbeit signifikante Anstiege der CA 15-3-Konzentrationen für die Gruppe, welche eine G-CSF-Prophylaxe erhielt, gegenüber denen ohne G-CSF-Gabe (50;51). Die Arbeit von Briasoulis et al. fand für 57 Patientinnen mit einer Epirubicin-haltigen adjuvanten Therapie heraus, dass die CA 15-3-Konzentrationen abhängig von der G-CSF-Gabe anstiegen und nach Behandlungsende wieder auf ihr Ausgangsniveau sanken. Pentheroudakis et al. untersuchten weitergehend den Einfluss der G-CSF-Dosis auf den CA 15-3-Anstieg und fanden einen direkten Zusammenhang für 22 untersuchte Patientenverläufe. Mit der Gabe von 5 µg/kg Körpergewicht stieg der Biomarker moderat und unter 10 µg/kg Körpergewicht um ein Vielfaches an. Ein Abfall der CA 15-3-Konzentrationen in den Normbereich mit Beendigung der Behandlung war auch bei diesen Verläufen zu verzeichnen. Weiter konnten sie unter der G-CSF Applikation mit dem Anstieg der neutrophilen Granulozyten eine Induktion der MUC-1-Expression der Neutrophilen im peripheren Blut nachweisen. Die Fähigkeit hämatopoetischen Gewebes zur Expression des Gens MUC-1 wurde bereits 1999 von Dent et al. (81) beschrieben und durch die Arbeit von Briasoulis et al. belegt.

Der signifikante Anstieg der CA 15-3-Konzentrationen der 115 Patientinnen des dosisintensivierten Therapiearmes, welchen G-CSF appliziert wurde, gegenüber den 106 Patientinnen des konventionellen Arms in dieser Arbeit, stützt die Erkenntnisse um

den Einfluss von G-CSF auf die CA 15-3-Konzentrationen im Blut. Der Anstieg von CA 15-3 unter einer adjuvanten dosisintensivierten Chemotherapie mit G-CSF-Applikationen (5 µg/kg KG d₅₋₁₀) konnte mit dieser Arbeit erstmals an einem größeren Patientenkollektiv gezeigt werden.

Unabhängig vom Therapiearm stiegen die HER-2/neu-Spiegel signifikant ($p < 0,001$) innerhalb des Normbereichs an. Somit lässt sich vermuten, dass die Gabe von G-CSF auf die Expression von HER-2/neu keinen wesentlichen Einfluss hatte.

G-CSF-Rezeptoren sind nicht ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen zu finden. Ihre Präsenz wurde für verschiedene humane, nicht-hämatopoetische Zellen beschrieben: das Plazentagewebe, Trophoblasten (82), vaskuläre Endothelzellen (83) und Zelllinien des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (84). In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass G-CSF sowohl die Migration als auch die Proliferation humaner vaskulärer Endothelzellen stimulierte und über Rezeptoren auf Endothelzellen eine Wirkung vermittelte (85). Somit wäre es denkbar, dass G-CSF direkt über die Endothelzellen wirken kann und in der verabreichten Dosis zu einer gesteigerten Expression von VEGF₁₆₅ in dem dosisintensivierten Arm mit G-CSF-Applikation führte.

Nach diesen Ergebnissen sollten unter einer intensiven, adjuvanten, mit G-CSF-support geführten Chemotherapie gemessene CA 15-3 bzw. VEGF₁₆₅ Konzentrationen mit Vorsicht ausgewertet werden und keinesfalls allein zu weiteren bildgebenden, kostenintensiven Untersuchungen außerhalb des Monitoringplans führen.

Einfluss des Menopausen- und Hormonrezeptorstatus auf die HER-2/neu- und EGFR-Konzentrationen

Bekannt ist eine inverse Abhängigkeit der HER-2/neu Konzentrationen von der Östradiol-Konzentration (55) und dem Östrogenrezeptor (86;87). In der vorliegenden Arbeit war der Anteil prä- und postmenopausaler Frauen ausgewogen (46% versus 54%). Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus wurden bei Positivität als Hormonrezeptoren zusammen betrachtet und es ergab sich kein signifikanter Unterschied der HER-2/neu-Konzentrationen bezüglich des Hormonrezeptorstatus ($p=0,13$). Hingegen zeigten die postmenopausalen Patientinnen signifikant höhere HER-2/neu-Konzentrationen ($p=0,02$) als prämenopausale, wenngleich alle Werte im Normbereich lagen.

Sainsbury et al. beschrieben eine inverse Korrelation der Präsenz von Östrogen- und EGF-Rezeptoren in Primärtumoren eines Mammakarzinoms (88). Auch für die adjuvanten Patientinnen mit 1-3 positiven Lymphknoten wurden tendenziell höhere EGFR-Level im Plasma gemessen ($p=0,07$), wenn jene negative Hormonrezeptorstatus aufwiesen. Ein signifikanter Unterschied der EGFR-Konzentrationen zwischen prä- und postmenopausalen Patientinnen bestand nicht.

Die Ergebnisse über den Einfluss des Menopausenstatus und damit der Östradiolspiegel auf die HER-2/neu-Konzentrationen im Serum und Plasma belegen Studien von Bagli et al. und Lüftner et al. (55;89). Letztere untersuchten die Veränderungen der s-HER-2/neu-Spiegel von Mammakarzinompatientinnen mit 1-9 befallenen Lymphknoten in der adjuvanten Situation unter Östradiol-suppression mittels Leuprorelin, was hormonell einer künstlichen Herbeiführung der Menopause entspricht.

Über den Zeitraum der Therapie betrachtet bestand kein signifikanter Einfluss des Hormonrezeptor- oder Menopausenstatus auf den zeitlichen Verlauf der Biomarkerkonzentrationen von HER-2/neu und EGFR. Unabhängig vom Therapiearm fanden sich zum Therapieende häufiger pathologische HER-2/neu-Konzentrationen bei den postmenopausalen (5,9%), als den prämenopausalen Frauen (2,9 %).

Eine Subgruppenanalyse in der vorliegenden prospektiven Arbeit ergab signifikant höhere HER-2/neu- und EGFR-Konzentrationen für die postmenopausalen Patientinnen, wenn gleichzeitig der Hormonrezeptor negativ war ($p=0,02$ und $0,002$). In der Prämenopause bestand dieser signifikante Einfluss des Hormonrezeptorstatus nicht wie Tabelle 20 zeigt.

Tabelle 20: HER-2/neu- und EGFR-Konzentrationen bezogen auf den Menopausen- oder Hormonrezeptorstatus.

Menopausenstatus	HER-2/neu (ng/ml)		EGFR (ng/ml)	
	prä	post	prä	post
Median	8,7	9,4	59,0	58,3
Signifikanz (p)	0,02		0,56	
Hormonrezeptorstatus	negativ	positiv	negativ	positiv
<i>Prämenopausale</i>				
Median	9,4	8,8	60,1	57,8
Signifikanz (p)	0,13		0,07	
<i>Postmenopausale</i>				
Median	9,9	9,1	61,7	57,0
Signifikanz (p)	0,02		0,002	

Einfluss der HER-2/neu-Gewebeexpression auf die HER-2/neu- und VEGF₁₆₅-Konzentrationen

Ein Vergleich der HER-2/neu-Gewebeexpression abhängig vom Menopausenstatus erbrachte eine Überexpression bei 33,3% der prä- und 29,1% der postmenopausalen Frauen ($p>0,05$). Dieses ausgewogene Verhältnis HER-2/neu-gewebepositiver unter den prä- und postmenopausalen Frauen konnte bereits in früheren Arbeiten von Tsakountakis et al. und Zheng et al. gezeigt werden. Sie stellten ebenfalls eine Gegenüberstellung des HER-2/neu-Gewebestatus bei prä- und postmenopausalen Patientinnen mit einem primären invasiven Mammakarzinom auf (89-91). Eine HER-2/neu-Überexpression wurde von Tsakountakis et al. für 40% der prämenopausalen und 38% der postmenopausalen Frauen beschrieben. In der Patientinnengruppe von Zheng

et al. zeigten eine HER-2/neu-Überexpression 27,4% der prämenopausalen und 24,8% der postmenopausalen Patientinnen (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: HER-2/neu-Gewebestatus bei prä- und postmenopausalen Frauen mit einem primär invasivem Mammakarzinom. Das Signifikanzniveau prämenopausal vs. postmenopausal lag in allen Gruppen über 0,5.

	HER-2/neu-Gewebestatus	Prämenopausal	Postmenopausal
Tsakountakis et al.		n=132	n=246
	positiv	52 (40%)	93 (38%)
	negativ	80 (60%)	153 (62%)
Zheng et al.		n=318	n=230
	positiv	87 (27,4%)	57 (24,8%)
	negativ	231 (72,6%)	173 (75,2%)
eigene Daten		n=90	n=110
	positiv	30 (33,3%)	32 (29,1%)
	negativ	60 (66,7%)	78 (70,9%)

Die auffallend divergierenden Anteile HER-2/neu-gewebepositiver Patientinnen von 27,4 bis 40% der Prämenopausalen und 24,8 bis 38% der Postmenopausalen läßt sich zum einen mit der Heterogenität der drei Patientengruppen erklären. Gemeinsam ist ihnen die Diagnose des primär invasiven Mammakarzinoms, jedoch bestehen Unterschiede im Grading, Staging und Nodalstatus. Da die prä- und postmenopausalen Patientinnen einer jeden Studiengruppe keine signifikanten Unterschiede in diesen Merkmalen aufwiesen, ist ein Vergleich dennoch zulässig. Zum anderen können divergierende Ergebnisse der HER-2/neu-Expression im Gewebe aus den unterschiedlich angewandten Nachweismethoden, FISH oder IHC, resultieren. Auch der Zeitpunkt der Bestimmung der HER-2/neu-Expression innerhalb des Menstruationszyklus einer prämenopausalen Frau kann entscheidend sein (22).

Bekannt ist eine positive Assoziation zwischen der HER-2/neu- und VEGF-Expression für das Mammakarzinom. Speziell für VEGF₁₆₅ konnten von Konecny et al. retrospektiv signifikant höhere Konzentrationen für 114 HER-2/neu-positive Frauen mit einem adjuvanten Mammakarzinom, verglichen mit HER-2/neu-negativen, gezeigt werden

(92). Die prospektiven Messungen dieser Arbeit ergaben keinen signifikanten Unterschied der VEGF₁₆₅-Konzentrationen für HER-2/neu-negative oder –positive Patientinnen, wengleich ein Trend zu höheren Konzentrationen bei positivem HER-2/neu-Status vorhanden war.

Tabelle 22: *Vergleich der VEGF-Konzentrationen im Gewebe und im Plasma in Abhängigkeit vom HER-2/neu-Gewebestatus.*

	HER-2/neu-Gewebestatus		Signifikanz p
	negativ	positiv	
Konecny et al.	n= 497	n=114	
VEGF ₁₆₅ -Gewebeexpression, positiv	353	100	<0,001
%	71,0	87,7	
eigene Daten	n=138	n=62	
VEGF ₁₆₅ -Plasmakonzentration, Median (pg/ml)	77,2	86,4	0,41

Einfluss des histologischen Gradings auf die HER-2/neu und VEGF₁₆₅-Konzentrationen

Patientinnen mit einem histologischen Grading von 1 wiesen signifikant niedrigere VEGF₁₆₅-Konzentrationen auf als jene mit einem histologischen Grading von 2 und 3. Ein weiterer Anstieg der VEGF₁₆₅-Konzentrationen mit der Entdifferenzierung des Tumorgewebes war nicht vorhanden. Im Gegenteil, die Patientinnen mit einem histologischen Grading von 3 wiesen tendenziell geringere VEGF₁₆₅-Konzentrationen auf als jene mit einem histologischen Grading von 2, allerdings ohne Signifikanz.

Zusammenfassend zeigte sich der Trend, dass adjuvante Mammakarzinompatientinnen mit differenzierteren Karzinomen geringere VEGF₁₆₅-Konzentrationen aufwiesen, als diese mit zunehmend entdifferenzierten. Diese Abhängigkeit des biologischen Markers von der Differenzierung des Tumors zeigte sich ebenfalls für HER-2/neu. Ein

signifikanter Anstieg ($p=0,02$) der Plasmakonzentrationen mit abnehmender Differenzierung des Mammakarzinoms konnte auch hier gezeigt werden.

Altersabhängige EGFR-Konzentrationen

Die Untersuchungen bezüglich eines Einflusses des Alters der Patientinnen auf die Konzentrationen der Biomarker ergaben steigende EGFR-Werte mit zunehmendem Alter. Diese Abhängigkeit konnte allerdings nur in einem der beiden Therapiearme beobachtet werden und wird deshalb als Phänomen betrachtet. Um die Fragestellung nach einem Einfluss des Alters auf die EGFR-Konzentrationen im Blut adjuvanter Mammakarzinompatientinnen zu beantworten, wären Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven sinnvoll.

Einfluss des Lymphknotenstatus und der Tumorgröße

Die Baseline-Konzentrationen und Verläufe der Biomarker waren weder durch die variierende Anzahl der Lymphknoten von 1 bis 3 noch durch die Tumorgröße beeinflusst worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, wie sich die Konzentrationen der Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ unter einer adjuvanten Chemotherapie im Plasma verhielten und welchen Einflüssen diese unterlagen. HER-2/neu stellte sich dabei als ein stabiler Marker heraus und erscheint als Verlaufsparemeter in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms als geeignet.

CA 15-3- und VEGF₁₆₅-Konzentrationen sollten nach den vorliegenden Ergebnissen während einer intensiven, adjuvanten, mit G-CSF-support geführten Chemotherapie mit Vorsicht ausgewertet werden und keinesfalls allein zu weiteren bildgebenden, kostenintensiven Untersuchungen außerhalb des Monitoringplans führen. Weitere biochemische Untersuchungen über den Einfluss hämatopoetischer Wachstumsfaktoren auf epitheliale Onkoproteine sind nötig, um die Verwertbarkeit der einzelnen Biomarker unter dosiseskalierten oder -dichten Therapieregimen eingehender beurteilen zu können.

Die vorliegenden Ergebnisse ließen vermuten, dass VEGF₁₆₅ zum Beginn der Chemotherapie noch durch den postoperativen Wundheilungsprozess hoch reguliert war. Eine intensive Chemotherapie beeinflusst die Regulation von VEGF₁₆₅ vermutlich in wesentlich höherem Maße als eine Chemotherapie mit geringerer Toxizität.

Der Abfall der EGFR-Werte unter der angewandten Chemotherapie bei signifikant ansteigenden HER-2/neu-Konzentrationen lässt für die beiden Biomarker aus der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren verschiedene regulative Mechanismen vermuten und unterstreicht die Bedeutung beider Marker im Therapiemonitoring. Aus klinischer Sicht ergab sich die Frage, inwieweit HER-2/neu-negative Patientinnen von einem zusätzlichen EGFR-Monitoring profitieren. Dies sollte ein interessanter Ansatz für weitere Begleitprogramme zu klinischen Studien sein und erweitert werden durch die Prüfung der Indikationen für Anti-EGFR-Therapien beim HER-2/neu-negativen Mammakarzinom.

Für die prognostische Bedeutung dieser Marker in der frühen, adjuvanten Situation sind die weiteren Auswertungen des laufenden Follow-up erforderlich. Aufgrund der Biologie des Mammakarzinoms und seinen späten Rezidiven sind erste Auswertungen zu dieser Fragestellung frühestens in 5-10 Jahren zu erwarten.

Zusammenfassung

Diese Arbeit untersuchte die longitudinalen Verläufe der Biomarker CA 15-3, HER-2/neu, EGFR und VEGF₁₆₅ während einer adjuvanten Chemotherapie des nodalpositiven Mammakarzinoms. Die Grundlage hierfür bildete eine nationale prospektiv randomisierte Therapieoptimierungsstudie der Adjuvans-Studiengruppe. Die eingeschlossenen Patientinnen mit 1-3 befallenen Lymphknoten wurden postoperativ mit Cyclophosphamid, Epirubicin gefolgt von Paclitaxel in Intervallen von 21 Tagen oder mit der intensivierten Gabe von Epirubicin gefolgt von Paclitaxel unter G-CSF-Support in Intervallen von 14 Tagen behandelt. Der ASG-Studie war ein wissenschaftliches Begleitprogramm angehängt, welches zur Aufgabe hatte, von den jeweiligen Patientinnen Blutproben vor und zum Ende der Chemotherapie sowie zum Zeitpunkt eines eintretenden Rezidivs zusammenzustellen, um die genannten Biomarker im longitudinalen Verlauf zu bestimmen. Die Ergebnisse dieses wissenschaftlichen Begleitprogramms bilden den Inhalt dieser Dissertationsschrift.

Im Plasma von 221 Patientinnen (A: n=106 und B: n=115) lagen postoperativ und vor Einleitung der adjuvanten Chemotherapie die HER-2/neu-Konzentrationen ausschließlich im Normbereich, während nicht pathologische Konzentrationen für CA 15-3 bei 89,1%, für EGFR bei 68,3% und für VEGF₁₆₅ bei 43,9% der Patientinnen zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen wurden. Signifikant änderten sich zum Therapieende im konventionellen Therapiearm A lediglich die Konzentrationen der Biomarker CA 15-3 und HER-2/neu, dagegen im intensivierten Therapiearm B die Konzentrationen aller Biomarker. Die Schwankungen der HER-2/neu-Konzentrationen wurden bis auf wenige Ausnahmen im Normbereich beobachtet. Damit erwies sich dieser Marker als sehr stabil und von regulatorischen Prozessen nur wenig beeinflusst.

Anhand der Veränderungen der Biomarker konnte gezeigt werden, dass eine intensivere Chemotherapie sowie ein G-CSF-Support einen wesentlichen Einfluss auf die weiteren gewählten Biomarker in ihren Konzentrationen im Blut nehmen kann und die Nutzung dieser für ein Therapiemonitoring bereits in der adjuvanten Chemotherapie nur

eingeschränkt zu empfehlen ist. Sie sollten allein betrachtet nicht zu weiteren bildgebenden, kostenintensiven Untersuchungen außerhalb des Monitoringplans führen.

Unter der Chemotherapie mit G-CSF-Support erwies sich der etablierte Biomarker CA 15-3 als nicht aussagekräftig für ein Therapiemonitoring, weshalb von Messungen der CA 15-3-Konzentrationen bei gleichzeitigen G-CSF-Gaben abgeraten wird. Nach unserer Kenntnis konnte ein Anstieg der CA 15-3-Konzentrationen unter G-CSF erstmals an einem größeren Patientinnenkollektiv gezeigt und bereits existierende Daten zur Regulation von CA 15-3 durch G-CSF mit dieser Arbeit bestätigt werden.

Deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen für circa die Hälfte der Patientinnen zeigte der Biomarker VEGF₁₆₅. Interessant wären weitere Studien mit einem bereits präoperativ liegenden Verlaufsbeginn. Damit ließe sich die Frage einer noch durch die Wundheilung getriggerten Hochregulation der VEGFR₁₆₅-Expression zum Zeitpunkt der Einleitung einer adjuvanten Chemotherapie beantworten. Der Verlauf des Biomarkers unter einer adjuvanten Chemotherapie des Mammakarzinoms konnte in dieser Arbeit nur mit Vorsicht betrachtet werden, da keine Gleichverteilung der Baselinewerte in beiden Therapiearmen vorlag.

In der adjuvanten Situation des Mammakarzinoms erschienen die EGFR-Plasmakonzentrationen vorerst nicht geeignet. Die Interpretation war erschwert durch die sowohl pathologisch erhöhten als auch erniedrigten Werte und den fragwürdigen Einfluss des Alters. Zu welchen Anteilen der signifikante Abfall der EGFR-Konzentrationen unter der dosisdichten Therapie prognostische Aussagekraft besitzt oder durch die intensivere Chemotherapie bzw. den G-CSF-Support hervorgerufen wurde, werden zukünftige Auswertungen der Rezidivpatientinnen zeigen.

Für die prognostische Bedeutung dieser Marker in der frühen, adjuvanten Situation sind die weiteren Auswertungen des laufenden Follow-up erforderlich. Aufgrund der Biologie des Mammakarzinoms und seinen späten Rezidiven sind erste Auswertungen zu dieser Fragestellung frühestens in 5-10 Jahren zu erwarten.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

1. Schmoll K, Höffken R, Possinger K. Kompendium Internistische Onkologie. 2006. Springer Verlag, Heidelberg, 2006.
2. Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med* 1995 April 6; 332(14):901-6.
3. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, Hudis C, Winer EP, Gradishar WJ et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003 April 15; 21(8):1431-9.
4. Bonadonna G, Zambetti M, Valagussa P. Sequential or alternating doxorubicin and CMF regimens in breast cancer with more than three positive nodes. Ten-year results. *JAMA* 1995 February 15; 273(7):542-7.
5. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005 October;16(10):1569-83.
6. Luftner D, Jung A, Schmid P, Geppert R, Kienle E, Wernecke KD et al. Upregulation of HER-2/neu by ovarian ablation: results of a randomized trial comparing leuprorelin to CMF as adjuvant therapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003 August; 80(3):245-55.
7. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001 March 15; 19(6):1865-78.
8. Quin RJ, McGuckin MA. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion. *Int J Cancer* 2000 August 15; 87(4):499-506.

9. Hudson MJ, Stamp GW, Chaudhary KS, Hewitt R, Stubbs AP, Abel PD et al. Human MUC1 mucin: a potent glandular morphogen. *J Pathol* 2001 July; 194(3):373-83.
10. Molina R, Barak V, van DA, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M et al. Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol* 2005 November; 26(6):281-93.
11. Gion M, Mione R, Leon AE, Dittadi R. Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer. *Clin Chem* 1999 May; 45(5):630-7.
12. Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem* 2001 April 20; 276(16):13057-64.
13. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 1986 June 6; 45(5):649-57.
14. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell* 1982 April; 28(4):865-71.
15. Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ, Carney W. The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J Biol Chem* 1991 January 25; 266(3):1716-20.
16. 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* 1987 January 9; 235(4785):177-82.
17. Osako T, Miyahara M, Uchino S, Inomata M, Kitano S, Kobayashi M. Immunohistochemical study of c-erbB-2 protein in colorectal cancer and the correlation with patient survival. *Oncology* 1998 November; 55(6):548-55.
18. Day JD, Digiuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN et al. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 1996 February; 27(2):119-24.
19. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990 July 1; 50(13):4087-91.

20. Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP. The c-erbB-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. *Crit Rev Oncog* 1994; 5(2-3):313-29.
21. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989 May 12; 244(4905):707-12.
22. Balsari A, Casalini P, Tagliabue E, Greco M, Pilotti S, Agresti R et al. Fluctuation of HER2 expression in breast carcinomas during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1999 November; 155(5):1543-7.
23. Hunter T, Cooper JA. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell* 1981 June; 24(3):741-52.
24. Cohen S, Carpenter G, King L, Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 1980 May 25; 255(10):4834-42.
25. Carpenter G. Epidermal growth factor: biology and mechanism of action. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1980; 16(2):61-72.
26. Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat* 1995 July; 35(1):115-32.
27. Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, Aaronson SA. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* 1988 December; 8(12):5570-4.
28. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987 July 10; 237(4811):178-82.
29. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996 April 15; 93(8):1493-5.
30. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991 December; 5(12):1806-14.

31. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991 June 25; 266(18):11947-54.
32. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 June 15; 161(2):851-8.
33. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993 December; 4(12):1317-26.
34. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 December 16; 181(2):902-6.
35. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992 December 25; 267(36):26031-7.
36. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995 January; 26(1):86-91.
37. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996 May 1; 56(9):2013-6.
38. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996 April; 73(7):931-4.
39. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993 October 1; 53(19):4727-35.
40. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993 November; 143(5):1255-62.
41. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004 August; 25(4):581-611.

42. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003 June;9(6):669-76.
43. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, Martino S et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003 March 15; 21(6):976-83.
44. Zöfel P. *Statistik in der Praxis*. 2005. UTB Verlag, Stuttgart, 1992.
45. Brunner E. *Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten*. 2005. Oldenburg Verlag, München, Wien, Oldenburg, 1999.
46. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003 September 1; 21(17):3357-65.
47. Colomer R, Ruibal A, Genolla J, Rubio D, Del Campo JM, Bodi R et al. Circulating CA 15-3 levels in the postsurgical follow-up of breast cancer patients and in non-malignant diseases. *Breast Cancer Res Treat* 1989 March; 13(2):123-33.
48. Kallioniemi OP, Oksa H, Aaran RK, Hietanen T, Lehtinen M, Koivula T. Serum CA 15-3 assay in the diagnosis and follow-up of breast cancer. *Br J Cancer* 1988 August; 58(2):213-5.
49. Okamoto T, Obara T, Izuo M, Ito Y, Yamashita T, Tanaka R et al. Decision Making Using Postoperative CEA and CA 15-3 for Detection of Breast Cancer Recurrence. *Breast Cancer* 1995 October 31; 2(2):127-31.
50. Briasoulis E, Andreopoulou E, Tolis CF, Bairaktari E, Katsaraki A, Dimopoulos MA et al. G-CSF induces elevation of circulating CA 15-3 in breast carcinoma patients treated in an adjuvant setting. *Cancer* 2001 March 1; 91(5):909-17.
51. Pentheroudakis G, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Damala K, Vassou A, Vartholomatos G et al. The neutrophil, not the tumor: serum CA 15-3 elevation as a result of granulocyte--colony-stimulating factor-induced neutrophil MUC1 overexpression and neutrophilia in patients with breast carcinoma receiving adjuvant chemotherapy. *Cancer* 2004 October 15; 101(8):1767-75.
52. Shering SG, Sherry F, McDermott EW, O'Higgins NJ, Duffy MJ. Preoperative CA 15-3 concentrations predict outcome of patients with breast carcinoma. *Cancer* 1998 December 15;83(12):2521-7.
53. Safi F, Kohler I, Rottinger E, Beger H. The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. A comparative study with carcinoembryonic antigen. *Cancer* 1991 August 1; 68(3):574-82.

54. Molina R, Filella X, Alicarte J, Zanon G, Pahisa J, Munoz M et al. Prospective evaluation of CEA and CA 15.3 in patients with locoregional breast cancer. *Anticancer Res* 2003 March; 23(2A):1035-41.
55. Luftner D, Jung A, Schmid P, Geppert R, Kienle E, Wernecke KD et al. Upregulation of HER-2/neu by ovarian ablation: results of a randomized trial comparing leuprorelin to CMF as adjuvant therapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003 August; 80(3):245-55.
56. Schwartz MK, Smith C, Schwartz DC, Dnistrian A, Neiman I. Monitoring therapy by serum HER-2/neu. *Int J Biol Markers* 2000 October; 15(4):324-9.
57. Marx J, Leitzel K, Ali S. Serum EGFR in metastatic breast cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2002.
58. Muller V, Witzel I, Pantel K, Krenkel S, Luck HJ, Neumann R et al. Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 2006 March; 26(2B):1479-87.
59. Sandri MT, Johansson HA, Zorzino L, Salvatici M, Passerini R, Maisonneuve P et al. Serum EGFR and serum HER-2/neu are useful predictive and prognostic markers in metastatic breast cancer patients treated with metronomic chemotherapy. *Cancer* 2007 June 8.
60. Souder C, Leitzel K, Ali SM, Demers L, Evans DB, Chaudri-Ross HA et al. Serum epidermal growth factor receptor/HER-2 predicts poor survival in patients with metastatic breast cancer. *Cancer* 2006 November 15; 107(10):2337-45.
61. De VF, Orditura M, Lieto E, Infusino S, Morgillo F, Martinelli E et al. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2004 January 15; 100(2):270-8.
62. Curigliano G, Petit JY, Bertolini F, Colleoni M, Peruzzotti G, de BF et al. Systemic effects of surgery: quantitative analysis of circulating basic fibroblast growth factor (bFGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in patients with breast cancer who underwent limited or extended surgery. *Breast Cancer Res Treat* 2005 September; 93(1):35-40.
63. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res* 2000 June 1; 60(11):2898-905.

-
64. Bonadonna G, Moliterni A, Zambetti M, Daidone MG, Pilotti S, Gianni L et al. 30 years' follow up of randomised studies of adjuvant CMF in operable breast cancer: cohort study. *BMJ* 2005 January 29; 330(7485):217.
 65. Braun S, Naume B. Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol* 2005 March 10;23(8):1623-6.
 66. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003 September 15; 21(18):3469-78.
 67. Kummel S, Krockner J, Kohls A, Breitbach GP, Morack G, Budner M et al. Randomised trial: survival benefit and safety of adjuvant dose-dense chemotherapy for node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2006 May 8; 94(9):1237-44.
 68. Moebus VJ, Untch M, Du Bois A, Lueck HJ, Thomssen C, Kuhn W et al. Dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin(E), paclitaxel (T) and cyclophosphamide (C) (ETC) is superior to conventional dosed chemotherapy in high-risk breast cancer patients (4 +LN). First results of an AGO-trial. *J.Clin.Oncol.* 2004.
 69. Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A, Jager W. Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1997 March; 43(1):87-95.
 70. Fehm T, Maimonis P, Katalinic A, Jager WH. The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology* 1998 January; 55(1):33-8.
 71. Menard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology* 2001; 61 Suppl 2:67-72.
 72. Grunt TW, Saceda M, Martin MB, Lupu R, Dittrich E, Krupitza G et al. Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the c-erbB-2 signaling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int J Cancer* 1995 November 15; 63(4):560-7.
 73. Dati C, Antoniotti S, Taverna D, Perroteau I, De BM. Inhibition of c-erbB-2 oncogene expression by estrogens in human breast cancer cells. *Oncogene* 1990 July; 5(7):1001-6.
 74. Read LD, Keith D, Jr., Slamon DJ, Katzenellenbogen BS. Hormonal modulation of HER-2/neu protooncogene messenger ribonucleic acid and p185 protein expression in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1990 July 1; 50(13):3947-51.

75. Antoniotti S, Taverna D, Maggiora P, Sapei ML, Hynes NE, De BM. Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *Br J Cancer* 1994 December; 70(6):1095-101.
76. Warri AM, Laine AM, Majasuo KE, Alitalo KK, Harkonen PL. Estrogen suppression of erbB2 expression is associated with increased growth rate of ZR-75-1 human breast cancer cells in vitro and in nude mice. *Int J Cancer* 1991 October 21; 49(4):616-23.
77. Newman SP, Bates NP, Vernimmen D, Parker MG, Hurst HC. Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene* 2000 January 27; 19(4):490-7.
78. De Vita F, Orditura M, Lieto E, Infusino S, Morgillo F, Martinelli E et al. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2004 January 15; 100(2):270-8.
79. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992 November 1; 176(5):1375-9.
80. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991 December 1; 78(11):2791-808.
81. Dent GA, Civalier CJ, Brecher ME, Bentley SA. MUC1 expression in hematopoietic tissues. *Am J Clin Pathol* 1999 June; 111(6):741-7.
82. Uzumaki H, Okabe T, Sasaki N, Hagiwara K, Takaku F, Tobita M et al. Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 December; 86(23):9323-6.
83. Yong K, Cohen H, Khwaja A, Jones HM, Linch DC. Lack of effect of granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors on cultured human endothelial cells. *Blood* 1991 April 15; 77(8):1675-80.
84. Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SG, Baldwin GC, Weisbart RH et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood* 1990 February 15; 75(4):851-7.
85. Bussolino F, Ziche M, Wang JM, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O et al. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest* 1991 March; 87(3):986-95.

-
86. Perissi V, Menini N, Cottone E, Capello D, Sacco M, Montaldo F et al. AP-2 transcription factors in the regulation of ERBB2 gene transcription by oestrogen. *Oncogene* 2000 January 13; 19(2):280-8.
 87. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995 June 15; 10(12):2435-46.
 88. Sainsbury JR, Farndon JR, Sherbet GV, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985 February 16; 1(8425):364-6.
 89. Bagli L, Dittadi R, Zancan M, Panzini I, Monti F, Ravaioli A. HER-2/neu serum levels and menopausal status. *Int J Biol Markers* 2001 January; 16(1):69-70.
 90. Tsakountakis N, Sanidas E, Stathopoulos E, Kafousi M, Anogiannaki N, Georgoulas V et al. Correlation of breast cancer risk factors with HER-2/neu protein overexpression according to menopausal and estrogen receptor status. *BMC Womens Health* 2005 February 4; 5(1):1.
 91. Zheng W, Zheng J, Ma L, Meng F, Huang L, Ma D. Comparison of HER-2/neu, ER and PCNA expression in premenopausal and postmenopausal patients with breast carcinoma. *APMIS* 2005 March; 113(3):175-81.
 92. Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang HJ, Bauerfeind I, Epstein M et al. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004 March 1; 10(5):1706-16.

5.2 Abkürzungen

ASG	Adjuvans Studiengruppe
bzw.	beziehungsweise
CA 15-3	carbohydrate antigen 15-3
CA 27.29	carbohydrate antigen 27.29
d	Tag
ECD	extracellular domain
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Erdanziehungskraft
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hormonrezeptor
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
LK	Lymphknoten
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
min	Minuten
s-EGFR	epidermal growth factor receptor im Serum
s-HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2 im Serum
s-VEGF	vascular endothelial growth factor im Serum
TGF- α	transforming growth factor α
TGF- β	transforming growth factor β
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
wiss.	wissenschaftlich
z. B.	zum Beispiel

5.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Publikationen in Journals

1. Lüftner D, Mazurek S, Henschke P, Mesterharm J, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K: Plasma levels of HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine-phosphorylated metabolite in advanced breast cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 991-998.
2. Lüftner D, Jozereau D, Schildhauer S, Geppert R, Müller C, Fiolka G, Wernecke KD, Possinger K: PINP as serum marker of metastatic spread to the bone in breast cancer patients. *Anticancer Res* 2005; 25: 1491-1500.
3. Lüftner D, Pollmann D, Schildhauer S, Sehouli J, Possinger K: Perspectives of immunotherapy in metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 2005; 25: 4599-4604.
4. Lüftner D, Henschke P, Pollmann D, Schildhauer S, Possinger K: Prescription pattern of aromatase inhibitors in the adjuvant setting in Germany – Final results of a survey among German breast specialists. *Onkologie* 2005; 28: 639-644.

Publikationen in Büchern

5. Büntzel J, Bruns F, Lüftner D, Schildhauer S: Protektive Medikamente (Organprotektoren). In: Link, Bokemeyer, Feyer (Hrsg.): Supportivtherapie bei malignen Erkrankungen. Deutscher Ärzteverlag 2003; 99-114.
6. Pollmann D, Schildhauer S, Lüftner D: Venenzugänge, Kathetersysteme (Ports). In: Link, Bokemeyer, Feyer (Hrsg.): Supportivtherapie bei malignen Erkrankungen. Deutscher Ärzteverlag 2003; 293-302.

Abstracts veröffentlicht in Journals

7. Lüftner D, Henschke P, Mesterharm J, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K: Plasma levels of HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine phosphorylated metabolite in advanced breast cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 481 (#25).
8. Lüftner D, Henschke P, Mesterharm J, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K: Circulating HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine phosphorylated metabolite in advanced breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 58 (#P298).
9. Lüftner D, Eggemann H, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Weigand M, Budner M, Zeiser T, Kohls A, Possinger K, Elling D: Longitudinal serum results of HER-2/neu, EGFR and CA27.29 in a randomized trial comparing dose-dense, biweekly epirubicin (E) followed by paclitaxel (P) to 3-weekly epirubicin (E) plus cyclophosphamide (C) followed by paclitaxel (P) for adjuvant therapy of nodal-positive (1-3) breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82: 130 (#536).

10. Lüftner D, Eggemann H, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Weigand M, Budner M, Zeiser T, Kohls A, Possinger K, Elling D: Upregulation of HER-2/neu in independent of the menopausal status of primary breast cancer patients: Plasma results from a randomized trial comparing dose-dense chemotherapy with G-CSF support to 3-weekly chemotherapy for adjuvant therapy of nodal-positive (1-3) breast cancer (German Adjuvant Study Group ASG). Proc ASCO 2005; 23: 38 (#638).
11. Lüftner D, Schildhauer S, Eggemann H, Geppert R, Wernecke K, Possinger K, Elling D: Upregulation of HER-2/neu in independent of the menopausal status of primary breast cancer patients: Plasma results from a randomized trial comparing dose-dense chemotherapy with G-CSF support to 3-weekly chemotherapy for adjuvant therapy of nodal-positive (1-3) breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2005; 94: 104 (#2060).
12. Ghani F, Schildhauer S, Eggemann H, Geppert R, Wernecke K, Weigand M, Possinger K, Elling D, Lüftner D: Confirmation of C9741 Intergroup results in a prospectively randomized trial comparing dose-intense chemotherapy with G-CSF support to 3-weekly chemotherapy for adjuvant therapy of nodal-positive (1-2 LN) breast cancer: Longitudinal CA 27.29 results indicate higher decay of minimal residual disease in the dose-dense arm. Proc ASCO 2004; 23: 77 (#805).
13. Schildhauer S, Pollmann D, Geppert R, Ocran K, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: Plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) for monitoring of advanced colorectal cancer. Eur J Cancer 2005; 3 (2): 182 (#644).
14. Schildhauer S, Sammler C, Pollmann D, Pecher G, Rick O, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: Randomized phase III study in squamous cell carcinoma of the head & neck (SCCHN) using lipoplatin: First safety results of a multicenter trial. Eur J Cancer 2005; 3 (2): 286 (#996).
15. Pollmann D, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: The amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen is a clinically valid indicator of bone turnover in osseous metastatic breast cancer while osteocalcin and CTX show inferior monitoring performance. Eur J Cancer 2005; 3 (2): 112 (#403).
16. Schildhauer S, Sammler C, Pollmann D, Pecher G, Rick O, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: Liposomal formulated cisplatin (Lipoplatin) in the treatment of squamous cell carcinoma of the head & neck (SCCHN): First safety results of a randomized phase III study. Onkologie 2005; 28 (suppl 3): 48 (#132).
17. Schildhauer S, Pollmann D, Geppert R, Ocran K, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK): plasma levels of 2 novel biochemical markers of patients with advanced colorectal cancer. Onkologie 2005; 28 (suppl 3): 43 (#116).
18. Pollmann D, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: The amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen is a clinically valid indicator of bone turnover in osseous metastatic breast cancer while osteocalcin and CTX show inferior monitoring performance. Onkologie 2005; 28 (suppl 3): 208 (#647).
19. Hartung G, Eschenburg H, Wolff D, Thiele B, Pollmann D, Schildhauer S, Jost K, Laser

- N, Steiner B, Freund M, Lüftner D: Phase II study of a weekly irinotecan plus 24-h infusion with 5-fluorouracil and simultaneous sodium-folinic acid in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Onkologie* 2005; 28 (suppl 3): 238 (#737).
20. Pollmann D, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: The amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen is a clinically valid indicator of bone turnover in osseous metastatic breast cancer while osteocalcin and CTX show inferior monitoring performance. *Anticancer Res* 2005; 25: 4814 (#86).
21. Lüftner D, Siepman S, Jehn C, Pollmann D, Pecher G, Wernecke KD, Possinger K: Randomized phase III trial comparing liposomal platinum with cisplatin in patients (pts) with advanced squamous cell carcinoma of the head & neck (SCCHN) regarding safety and efficacy profiles. *Proc ASCO* 2006; 24: 296 (#5564).
22. Jehn C, Siepman S, Pecher G, Wernecke K, Possinger K, Lüftner D: First safety and response results of a randomized phase III study with liposomal platinum in the treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head & neck (SCCHN). [accepted for ASCO 2007, Orlando (USA), June 2007]

Abstracts veröffentlicht in Kongressberichten

23. Lüftner D, Schildhauer S, Schweigert M, Mesterharm J, Geppert R, Possinger K: Validity of TuM2-PK as tumor activity marker in advanced, solid tumors with focus on breast – and colorectal cancer. *ISOBM* 2001, Barcelona (Spain), September 29-October 3, 2001: 27 (#L-23).
24. Lüftner D, Mazurek S, Schildhauer S, Mesterharm J, Geppert R, Possinger K: Tyrosine phosphorylation of TuM2-PK in advanced breast cancer: Biological background and clinical value. 24th Winter Meeting of the EORTC- Pharmacology and Molecular Mechanisms Group, Florence (Italy), February 5-8, 2003; 46.
25. Lüftner D, Mazurek S, Schildhauer S, Mesterharm J, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K: Clinical value and biology of TuM2-PK in advanced breast cancer. 12th AEK Cancer Congress, Würzburg (Germany), March 25-28, 2003; 72.
26. Lüftner D, Eggemann H, Schildhauer S, Wernecke KD, Weigand M, Budner M, Zeiser T, Kohls A, Possinger K, Elling D: Results of HER-2/neu, EGFR and CA 27.29 in serum in a randomized trial comparing biweekly epirubicin (E) followed by paclitaxel (P) with G-CSF support to 3-weekly epirubicin (E) plus cyclophosphamide (C) followed by paclitaxel (P) for adjuvant therapy of nodal-positive breast cancer. *Proc AACR* 2003; 1270 (#6354).
27. Lüftner D, Pollmann D, Schildhauer S, Possinger K: New targeted therapies for older patients. 2nd Bologna Conference: Breast Cancer in the older woman. Bologna (Italy), March 21st, 2005; 34-35.
28. Jehn C, Siepman S, Pecher G, Wernecke K, Possinger K, Lüftner D: First safety and response results of a randomized phase III study with liposomal platinum in the treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). [accepted for the First World Congress of the International Adademy of Oral Oncology, Amsterdam, April 20, 2007]

Präsentationen veröffentlicht in Journals oder Kongressberichten

29. Lüftner D, Schildhauer S, Schweigert M, Mesterharm J, Geppert R, Possinger K: Validity of TuM2-PK as tumor activity marker in advanced, solid tumors with focus on breast – and colorectal cancer. ISOBM 2001, Barcelona (Spain), October 2, 2001.
30. Lüftner D, Henschke P, Mesterharm J, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K: Plasma levels of HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine phosphorylated metabolite in advanced breast cancer. 11. Hamburger Symposium über Tumormarker, Hamburg (Germany), January 27, 2002.
31. Lüftner D, Mazurek S, Schildhauer S, Mesterharm J, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K: Clinical value and biology of TuM2-PK in advanced breast cancer. 12th AEK Cancer Congress, Würzburg (Germany), March 25-28, 2003.
32. Schildhauer S, Sammler C, Pollmann D, Pecher G, Rick O, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: Randomized phase III study in squamous cell carcinoma of the head & neck /SCCHN) using lipoplatin: First safety results of a multicenter trial. ECCO 13, Paris (France), October 30, 2005.

Posterpräsentationen veröffentlicht in Journals oder Kongressberichten

33. Lüftner D, Henschke P, Mesterharm J, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K: Circulating HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine phosphorylated metabolite in advanced breast cancer. 25. Deutscher Krebskongreß 2002, Berlin (Germany), March 12, 2002.
34. Lüftner D, Mazurek S, Schildhauer S, Mesterharm J, Geppert R, Possinger K: Tyrosine phosphorylation of TuM2-PK in advanced breast cancer: Biological background and clinical value. EORTC Pharmacology and molecular mechanisms group. 24th Winter Meeting of the EORTC-PAMM Group, Florence (Italy), February 5-8, 2003.
35. Lüftner D, Eggemann H, Schildhauer S, Wernecke KD, Weigand M, Budner M, Zeiser T, Kohls A, Possinger K, Elling D: Results of HER-2/neu, EGFR and CA 27.29 in serum in a randomized trial comparing biweekly epirubicin (E) followed by paclitaxel (P) with G-CSF support to 3-weekly epirubicin (E) plus cyclophosphamide (C) followed by paclitaxel (P) for adjuvant therapy of nodal-positive breast cancer. 94th AACR Annual Meeting, Washington (USA), July 14, 2003.
36. Lüftner D, Eggemann H, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Weigand M, Budner M, Zeiser T, Kohls A, Possinger K, Elling D: Longitudinal serum results of HER-2/neu, EGFR and CA27.29 in a randomized trial comparing dose-dense, biweekly epirubicin (E) followed by paclitaxel (P) to 3-weekly epirubicin (E) plus cyclophosphamide (C) followed by paclitaxel (P) for adjuvant therapy of nodal-positive (1-3) breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio (USA), December 4, 2003.
37. Lüftner D, Eggemann H, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Weigand M, Budner M, Zeiser T, Kohls A, Possinger K, Elling D: Upregulation of HER-2/neu in independent of the menopausal status of primary breast cancer patients: Plasma results from a randomized trial comparing dose-dense chemotherapy with G-CSF support to 3-weekly

- chemotherapy for adjuvant therapy of nodal-positive (1-3) breast cancer (German Adjuvant Study Group ASG). American Society of Clinical Oncology 2005, Orlando, May 16, 2005.
38. Schildhauer S., Pollmann D., Geppert R., Ocran K., Wernecke K.-D., Possinger K., Lüftner D.: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 (TIMP-1) and Tumor Type M2 Pyruvate Kinase (TuM2-PK) – Plasma Levels of Two Novel Biochemical Markers of Patients with Advanced Colorectal Cancer. DGHO, Hannover (Germany), October 2, 2005.
 39. Schildhauer S, Pollmann D, Pecher G, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: Liposomal formulated cisplatin (lipoplatin) in the treatment of squamous cell carcinoma of the head & neck (SCCHN): First safety results of a randomized phase III study. DGHO, Hannover (Germany), October 2, 2005.
 40. Pollmann D, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: The amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen is a clinically valid indicator of bone turnover in osseous metastatic breast cancer while osteocalcin and CTX show inferior monitoring performance. DGHO 2005, Hannover (Germany), October 1-5, 2005.
 41. Schildhauer S, Pollmann D, Geppert R, Ocran K, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: Plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) for monitoring of advanced colorectal cancer. ECCO 13, Paris (France), October 30, 2005.
 42. Pollmann D, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: The amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen is a clinically valid indicator of bone turnover in osseous metastatic breast cancer while osteocalcin and CTX show inferior monitoring performance. ECCO 13, Paris (France), October 30, 2005.
 43. Siepmann S, Pollmann D, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) were compared with established markers in advanced colorectal cancer. Proc ASCO 2006; 24: 296 (#5564).
 44. Jehn C, Siepmann S, Pecher G, Wernecke K, Possinger K, Lüftner D: First safety and response results of a randomized phase III study with liposomal platinum in the treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head & neck (SCCHN). [accepted for ASCO 2007, Orlando (USA), June 2007]

5.4 Danksagung

Mein Dank gilt

insbesondere Frau PD Dr. med. Diana Lüftner für ihr Vertrauen und die Möglichkeit, ein prospektives wissenschaftliches Begleitprogramm zu einer multizentrischen, nationalen Studie zu betreuen. Ihre Erfahrungen und Ratschläge ließen mich mit diesem Projekt wachsen, vorangetrieben durch ihr Engagement und eine hervorragende Betreuung. Ihre zielstrebige Art und offene Kritik begleiteten mich über die Jahre und belebten die Auswertung unserer Daten. Während des Verfassens dieser Dissertationsschrift stand sie mir jederzeit hilfreich beiseite und ich durfte die aparte Art einer besonderen Persönlichkeit schätzen lernen.

nicht minder unserer Forschungs-MTA, Frau Rita Geppert, die mich in die Abläufe des Labors einarbeitete, die praktischen Fertigkeiten lehrte und mich über Berge und durch Täler eines solchen Projekts begleitete.

Herrn Prof. Dr. med. K. Possinger für seine Unterstützung und die Möglichkeit als Ärztin im Praktikum und später als Assistenzärztin dieses Projekt an seiner Klinik zum Ende zu führen.

Herrn Prof. Dr. Wernecke und Frau Dr. B. Wegner vom Institut für medizinische Biometrie der Humboldt Universität für die Einarbeitung in die Grundlagen statistischer Analysen und ihre unermüdliche Geduld in der Auswertung unserer Daten.

Herrn Prof. Dr. med. M. Geißler für die weitere Förderung auf dem Gebiet der klinischen Onkologie am Städtischen Klinikum Esslingen.

und den Firmen Bayer HealthCare[®] für die Bereitstellung der nötigen Materialien für die manuellen und automatisierten ELISA.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre stete Motivation und Unterstützung. Vielen herzlichen Dank an meinen Ehemann Jörg und meinen Sohn Max, die mir den nötigen Freiraum in der Familie gaben, um diese Schrift zu verfassen.

5.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Steffi Siepmann, an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel „Evaluation von zirkulierenden Biomarkern bei der adjuvanten Therapie des nodalpositiven Mammakarzinoms“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literaturquellen sind vollständig angegeben.

Ort, Datum

Steffi Siepmann