

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

DISSERTATION

Ein neuer, automatisierter PINP-Assay im Vergleich zu
etablierten Markern des Knochenmetabolismus und der Tumormasse
in der Verlaufsbeurteilung des ossär metastasierten Mammakarzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Frau Diane Pollmann
aus Bordeaux

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. Med. D. Lüftner
2. Prof. Dr. Med. Dr. h. c. D.-D. Costa
3. Priv.-Doz. Dr. Med. A. Reles

Datum der Promotion: 23.09.2007

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	8
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNGEN	9
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Patientinnenkollektiv.....	13
2.2. Klinische Beurteilung des Primärtumors und der Fernmetastasen	13
2.3 Probenmaterial	15
2.4. PINP-Assay	16
2.4.1. Bestimmung der Intra-Assay-Präzision	16
2.4.2. Ringversuch	17
2.4.3. Inter-Assay-Präzision.....	18
2.5. Osteocalcin-Assay.....	19
2.6. β -Crosslaps-Assay	19
2.7. CA 27-29-Assay.....	20
2.8. Statistik.....	21
3. ERGEBNISSE.....	23
3.1. Präzision des automatisierten PINP-Assays.....	23
3.1.1. Intra-Assay-Ergebnisse	23
3.1.1.a. Intra-Assay-Ergebnisse in Berlin.....	23
3.1.1.b. Intra-Assay-Ergebnisse in den fünf Zentren.....	24
3.1.2. Ringversuch	25
3.1.2.a. Ergebnisse des Ringversuchs in Berlin.....	25
3.1.2.b. Ergebnisse der Ringversuche in den fünf Zentren.....	26
3.1.3. Inter-Assay-Ergebnisse	26
3.1.3.a. Inter-Assay- Ergebnisse in Berlin.....	26
3.1.3.b. Inter-Assay-Ergebnisse in den fünf Zentren.....	29
3.2. Demographische Angaben zu den Patientinnenkollektiven.....	30

3.3 Die vier biochemischen Marker zur Differenzierung der drei Patientinnengruppen	32
3.3.1. PINP zur Differenzierung zwischen Patientinnen mit und ohne Knochenbefall.....	32
3.3.2. ROC-Analyse für die drei Marker des Knochenstoffwechsels.....	35
3.3.3. Deskriptive Statistik der vier Marker zum Zeitpunkt baseline	37
3.4. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zur Menopause.....	42
3.5. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zum Ausmaß der Knochenmetastasierung	45
3.6. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zu Knochenfrakturen	48
3.7. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zum Typ der Knochenmetastasen.....	51
3.8. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zum Tumoransprechen	52
3.9. Verlauf der biochemischen Marker in Relation bei späterer Progression.....	57
4. DISKUSSION	62
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	71
6. LITERATURVERZEICHNIS	73
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	79
LEBENS LAUF	80
DANKSAGUNG.....	82
ADRESSENVERZEICHNIS	83
ERKLÄRUNG	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bildung der Kollagenmoleküle mit Abspaltung der zwei Carboxy- und Aminoterminal-Propeptide durch Proteasen. Die α -1Kette des aminoterminalen Propeptides zeigt zwei Formen: eine Variante mit einer Tripelhelix (Hochgewichtsmolekül) und eine zweite Variante mit einer Nichttripelhelixdomäne (Niedriggewichtsmolekül)

Abbildung 2: Graphische Darstellung der Variationskoeffizienten der Intra-Assay-Präzision in den fünf Zentren

Abbildung 3: Graphische Darstellung der Wiederfindungswerte des Ringversuches in den fünf Zentren

Abbildung 4: Graphische Darstellung der Variationskoeffizienten für den Inter-Assay in den fünf Zentren

Abbildung 5: PINP-Konzentrationen der Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu PINP-Konzentrationen der Patientinnen ohne ossäre Filiae (Primärtumor im loco primario unter neoadjuvanter Chemotherapie oder Brustkrebs im Stadium IV ohne Knochenmetastasen)

Abbildung 6: PINP-Konzentrationen im Zusammenhang mit der Verteilung der Metastasen: ausschließlich im Knochen oder an anderen Lokalisationen wie Viszera oder Weichteile

Abbildung 7: Häufigkeit der PINP-Baselinekonzentrationen für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen, zusammen dargestellt mit der Sensitivität und der Spezifität der einzelnen PINP-Konzentrationen (Gerhard-plot)

Abbildung 8: ROC-Kurve für PINP

Abbildung 9: ROC-Kurve für CTX

Abbildung 10: ROC-Kurve für Osteocalcin

Abbildung 11: Box plot der PINP-baseline-Werte der metastasierten Patientinnen mit und ohne ossäre Filiae und der neoadjuvanen Patientinnen. Der Medianwert wird als schwarze horizontale Linie abgebildet; der graue Bereich wird vom 25%-Quantil und 75%-Quantil begrenzt; die vertikalen Linien zeigen jeweils das Maximum und das Minimum der Daten. „*“ und „°“ bezeichnen Ausreißer

Abbildung 12: Box plot der CA 15-3-baseline-Werte der metastasierten Patientinnen mit und ohne ossäre Filiae sowie der neoadjuvanen Patientinnen

Abbildung 13: Box plot der β -Crosslaps-baseline-Werte der metastasierten Patientinnen mit und ohne ossäre Filiae sowie der neoadjuvanen Patientinnen

Abbildung 14: Box plot der Osteocalcin-baseline-Werte der metastasierten Patientinnen mit und ohne ossäre Filiae sowie der neoadjuvanten Patientinnen

Abbildung 15: Box plot der PINP-baseline-Werte der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen (einschließlich neoadjuvanter Patientinnen) in Abhängigkeit von deren Menopausenstatus

Abbildung 16: Box plot der CTX-baseline-Werte der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen (einschließlich neoadjuvanter Patientinnen) in Abhängigkeit von deren Menopausenstatus

Abbildung 17: Box plot der Osteocalcin-baseline-Werte der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen (einschließlich neoadjuvanter Patientinnen) in Abhängigkeit von deren Menopausenstatus

Abbildung 18: Box plot der CA 15-3-baseline-Werte der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen (einschließlich neoadjuvanter Patientinnen) in Abhängigkeit von deren Menopausenstatus. Für die graphische Darstellung wurden drei Ausreißer herausgenommen

Abbildung 19: Box plot der PINP-baseline-Werte von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen im Vergleich zur Patientinnen mit mehr als sieben Knochenfiliae

Abbildung 20: Box plot der Osteocalcin-baseline-Werte von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen im Vergleich zu Patientinnen mit mehr als sieben Knochenfiliae

Abbildung 21: Box plot der Crosslaps-baseline-Werte von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen im Vergleich zu Patientinnen mit mehr als sieben Knochenfiliae

Abbildung 22: Box plot der CA 15-3-baseline-Werte von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen im Vergleich zu Patientinnen mit mehr als sieben Knochenfiliae

Abbildung 23: Box plot der PINP-baseline-Werte von Patientinnen mit Zustand nach Knochenfrakturen im Vergleich zu Patientinnen ohne Frakturen

Abbildung 24: Box plot der Osteocalcin-baseline-Werte von Patientinnen mit Zustand nach Knochenfrakturen im Vergleich zu Patientinnen ohne Frakturen

Abbildung 25: Box plot der β -CTX-baseline-Werte von Patientinnen mit Zustand nach Knochenfrakturen im Vergleich zu Patientinnen ohne Frakturen

Abbildung 26: Box plot der CA 15-3-baseline-Werte von Patientinnen mit Zustand nach Knochenfrakturen im Vergleich zu Patientinnen ohne Frakturen

Abbildung 27: Box plot der PINP-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den PINP-Konzentrationen zum Zeitpunkt best response

Abbildung 28: Box plot der CTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline bei Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den CTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt best response

Abbildung 29: Box plot der Osteocalcin-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline bei Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den Osteocalcin-Konzentrationen zum Zeitpunkt best response

Abbildung 30: Box plot der CA 15-3-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den CA 15-3-Konzentrationen zum Zeitpunkt best response. Für die graphische Darstellung wurden drei Ausreißer herausgenommen

Abbildung 31: Box plot der PINP-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen im Vergleich zu den PINP-Konzentrationen zum Zeitpunkt der späteren Progression

Abbildung 32: Box plot der β -CTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen im Vergleich zu den β -CTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt der späteren Progression

Abbildung 33: Box plot der Osteocalcin-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen im Vergleich zu den Osteocalcin-Konzentrationen zum der späteren Zeitpunkt Progression

Abbildung 34: Box plot der CA 15-3-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen im Vergleich zu den CA 15-3-Konzentrationen zum Zeitpunkt der späteren Progression

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Remission bei soliden Tumoren nach WHO-Definitionen

Tabelle 2: Ergebnisse des Intra-Assays in Berlin (Elecsys 2010®)

Tabelle 3: Ergebnisse des Ringversuches in Berlin (Elecsys 2010®)

Tabelle 4: Ergebnisse der Inter-Assay-Präzision in Berlin (Elecsys 2010®)

Tabelle 5: Demographische Angaben zu den Patientinnenkollektiven

Tabelle 6: Vierfelder-Tafeln der Verteilung der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen und der PINP-Konzentrationen höher oder niedriger als der Normbereich von 95 ng/ml zum Zeitpunkt baseline

Tabelle 7: Mediane der vier gemessenen Marker im Zusammenhang mit dem Tumorbefall

Tabelle 8: Mediane der vier Marker in Relation zu Knochenfrakturen in der Anamnese

Tabelle 9: Mediane der vier Marker in Relation zum Typ der Knochenmetastasen

Tabelle 10: Mediane der vier Marker für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen zum Zeitpunkt baseline und zum Zeitpunkt best response

Tabelle 11: Mediane der vier Marker zum Zeitpunkt baseline und zum Zeitpunkt spätere Progression für die Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen

5. Zusammenfassung

Neben der etablierten Knochenszintigraphie wäre der frühzeitige Nachweis und das Monitoring von Skelettmetastasierung durch spezifische Knochenmarker wünschenswert. Das aminoterminal Propeptid des Kollagen Typ 1 (PINP) stellt einen solchen potenziellen biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels (Formationsmarker) dar. In der vorliegenden Arbeit sollte der Nutzen von PINP zur Detektion und Charakterisierung von Knochenmetastasen bei Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu zwei etablierten Markern des Knochenmetabolismus, Osteocalcin und β -Crosslaps, und einem Tumormarker, CA 15-3, untersucht werden.

Für den methodischen Teil der Untersuchung wurden mit dem total PINP Test Präzisionsuntersuchungen mit Kontroll- und Serumproben am Elecsys 2010®, Elecsys 170® und Elecsys 1010® Analysensystem (Elektrochemilumineszenzimmunoassay (ECLIA), Roche® Diagnostics) durchgeführt. Variationskoeffizienten zwischen 1% – 3,7% wurden für die Serienpräzision (Intra-Assay) in Kontrollen erzielt. Die gesamte Genauigkeit (total imprecision) (nach NCCLS Protokoll) war mit 1,7% - 6,7% sehr gut. Die Wiederfindung bei Ringversuchsproben lag zwischen 88,7% - 117,2%.

Für den klinischen Teil der Arbeit wurden 51 metastasierte Brustkrebspatientinnen (davon 38 mit Knochenmetastasen und 13 mit Viszera- oder Weichteilmetastasen) und 11 neoadjuvante Patientinnen eingeschlossen. Alle Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme vor Einleitung einer Therapie (Chemo- oder Hormon- und / oder Antikörpertherapie). Alle Patientinnen mit Knochenmetastasen bekamen ein Bisphosphonat. Für diesen Teil der Arbeit wurden die drei Knochenmarker auf dem Elecsys 2010® und CA 15-3 auf dem ACS180 BR® von Bayer® Diagnostica gemessen. Die Normbereiche der vier Marker waren wie folgt: PINP < 95 ng/ml, β -CTX < 0,1008 ng/ml, Osteocalcin < 0,413 ng/ml und CA 15-3 < 30 U/ml.

Die baseline-Werte von PINP und CA 15-3 waren signifikant höher bei Vorliegen von Knochenmetastasen (Median: 92,8 ng/ml für PINP, 165,9 U/ml für CA 15-3) im Vergleich zu der Gruppe von Patientinnen mit viszeralen oder Weichteilmetastasen (Median: 63,2 ng/ml und $p=0,044$ für PINP und Median: 44,2 U/ml und $p=0,004$ für CA 15-3) und im Vergleich zu den neoadjuvanten Patientinnen (Median: 33,6 ng/ml und $p=0,002$ für PINP und Median:

22,4 U/ml und $p=0,006$ für CA 15-3). Osteocalcin und β -CTX konnten die Gruppen von Patientinnen nicht unterscheiden. Patientinnen mit mehr als sieben Knochenmetastasen hatten einen signifikant höheren PINP-Wert (Median: 149,7 ng/ml) als die Frauen mit weniger als sieben ossären Filiae (Median: 67,6 ng/ml, $p=0,04$). Ein signifikanter Unterschied wurde ebenso für Osteocalcin and β -CTX mit jeweils $p=0,02$ und $p=0,04$ gefunden, aber die Mediane beider Marker blieben unter dem Normbereich. Für CA 15-3 fanden wir keinen Unterschied in Bezug auf die Anzahl an Knochenfiliae. In unserer Untersuchung fanden wir weder Unterschiede für die vier Marker in Bezug auf den Menopausenstatus noch in Bezug auf den Typ der Knochenmetastasierung. Ossär metastasierte Patientinnen mit einer Knochenfraktur in der Anamnese wiesen einen statistisch signifikant höheren PINP-Wert (Median: 131,1 ng/ml versus 74,7 ng/ml, $p=0,049$) auf als die Frauen mit Knochenmetastasen, aber ohne Fraktur. Für die drei anderen Marker ergab sich kein Unterschied. Im Rahmen der Verlaufsbeurteilung von ossär metastasierten Patientinnen fielen die PINP-Konzentrationen bei Patientinnen, die auf die Therapie angesprochen hatten, von 194,3 ng/ml auf 100,4 ng/ml ($p=0,23$), bei stabilen Erkrankungen blieben sie stabil bei etwa 70 ng/ml ($p=0,16$) und erhöhten sich bei progredienten Patientinnen von 83,4 ng/ml auf 176,5 ng/ml ($p=0,14$). Keiner dieser Unterschiede erreichte eine statistische Signifikanz, eine Folge der niedrigen Patientenzahl. Auch für Osteocalcin und β -Crosslaps fanden wir ebenso keinen Unterschied, während CA 15-3 das Ansprechen auf die Therapie gut nachweisen konnte.

Zusammengefasst zeigt der PINP-Test eine sehr gute Reproduzierbarkeit und Stabilität. Die PINP-Werte können die Patientinnen mit Knochenbefall von denen ohne Knochenbefall unterscheiden, sie spiegeln das Ausmaß an Knochenmetastasen und den Zustand nach Knochenfraktur wieder. Osteocalcin und β -CTX erscheinen in unserer Untersuchung deutlich weniger geeignet, um Knochenmetastasen zu beurteilen. Der Tumormarker CA 15-3 ist besser geeignet, das Ansprechen auf die Therapie zu kontrollieren.

7. Abkürzungsverzeichnis

AP: alkalische Phosphatase

ACS: Automated Chemiluminescence System

ASCO: American Society of Clinical Oncology

AUC: area under the curve

BMD: bone mass density

CTX oder Crosslaps: (α -asparaginsäure) carboxyterminal Telozeptid

β -CTX oder β -Crosslaps: isomeres (β -asparaginsäure) carboxyterminal Telozeptid

CR: komplette Remission

CV: Variationskoeffizient

DEXA: dual energy X-ray absorptiometry bone scan

DPD-Crosslinks: Deoxypyridinolin

ECLIA: Elektrochemilumineszenzimmunoassay

ELISA: Enzym Linked Immunosorbent Assay

ICTP: carboxyterminales Telozeptid vom Kollagen Typ I

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

PICP: Carboxyterminales Propeptid des Pro-Kollagens Typ I

PINP: Aminoternales Propeptid des Pro-Kollagens Typ I

PD : Progressive Erkrankung

PR: Partielle Remission

PYD: Pyridinolin

RIA: Radioimmunoassay

RLU: Relative Light Units

ROC: Receiver operating characteristics

SAS-Programm: Statistical Analysis System

SD: Stabile Erkrankung

STD: Standardabweichung

Trap 5b: Tartrate-resistente saure phosphatase 5b

WHO: World Health Organisation

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Veröffentlichungen

1. Lüftner D, **Jozereau D**: Experiences with UFT/LV as maintenance therapy in a first-line setting. Clinical experiences with UFT/LV: A series of case studies. *Anti-Cancer Drugs* 2003; 14: S5.
2. Lüftner D, **Jozereau D**, Possinger K: Catheter occlusion by calcium carbonate: A well known problem persists in spite of better knowledge. *Onkologie* 2003; 26: 425-426.
3. Lüftner D, **Jozereau D**, Possinger K: Anämie und Neutropenie bei onkologischen Patienten. *Pflegezeitschrift* 2003; 56: 784-785
4. 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.
5. Lüftner D, **Pollmann D**, Schildhauer S, Sehouli J, Possinger K: Perspectives of immunotherapy in metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 2005 Nov-Dec; 25(6C): 4599-604.
6. 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 Dec;28(12):639-44.
7. **Pollmann D**, Siepmann S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K, Lüftner D: the amino-terminale propeptide (PINP) of type I collagen is a clinically valid indicator of bone turnover and extent of metastatic spread in osseous metastatic breast cancer. [accepted for “anticancer research” 03/06]

Danksagung

Frau PD Dr. med. Lüftner danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, ihre gute Betreuung, ihr Vertrauen und die unermüdliche Unterstützung von Beginn an.

Mein Dank gebührt den Ärzten, Krankenschwestern und Patientinnen der Mamma-Ambulanz der Charité Mitte für ihre Hilfe bei der Materialsammlung. Ich danke Frau Geppert, für die Bearbeitung der frischen Blutproben, ihre Geduld und ihr Verständnis.

Vielen Dank an das Labor von Prof. Dr. Dr. med. Köttgen in der Charité Campus Virchow Klinikum für die Messung der Proben des methodischen Teils der Arbeit, insbesondere Frau Fiolka für ihre freundliche Hilfe.

Bei der Firma Roche® Diagnostics bedanke ich mich für die Zurverfügungstellung des Materials, um PINP, Osteocalcin und β -Crosslaps zu messen.

Ich danke Frau Dr. Wegner aus dem Institut für Statistische Biometrie der Charité für ihre Geduld und ihre immer freundliche Unterstützung.

Schließlich möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen meinem Ehemann Johannes für seine Geduld und seine Unterstützung, meinem Schwiegervater Dr. phil. Armin Pollmann und Dr. med. Anne Regierer für die Durchsicht wesentlicher Teile der Arbeit, sowie meiner Familie, die mich immer in allem unterstützt.

Erklärung

„Ich, Diane Pollmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
Ein neuer, automatisierter PINP-Assay im Vergleich zu
etablierten Markern des Knochenmetabolismus und der Tumormasse
in der Verlaufsbeurteilung des ossär metastasierten Mammakarzinoms
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne
die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten
dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift