

## **2. Material und Methoden**

### 2.1. Patientinnenkollektiv

In die Studie wurden insgesamt 62 an Brustkrebs erkrankte Patientinnen (europäische Kaukasierinnen) aufgenommen. Dies erfolgte im Rahmen ihrer antitumoralen Therapie in der Mamma-Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Charité, Standort Mitte in Berlin. Elf der Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einer neoadjuvanten Chemotherapie, so dass diese Patientinnen keine Fernmetastasen, aber einen Primärtumor aufwiesen. Bei den 51 anderen Patientinnen erfolgte die Blutentnahme bereits in einem fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung mit diagnostizierten Fernmetastasen. Achtunddreißig dieser Frauen hatten Knochenmetastasen und eventuell Viszeral- und/oder Weichteilmetastasen, während die dreizehn anderen Frauen keinen ossären, aber einen Viszeral- und/oder Weichteilbefall aufwiesen. Das Einschlusskriterium war die Erkrankung an einem Mammakarzinom unter Therapie (systemische Chemotherapie oder Hormontherapie und/oder Antikörpertherapie). Alle Patientinnen mit Knochenmetastasen wurden mit einem Bisphosphonat behandelt.

### 2.2. Klinische Beurteilung des Primärtumors und der Fernmetastasen

Die viszerale Metastasen, Weichteilmetastasen und Primärtumore wurden mittels Computertomographie, konventionellem Röntgen, Sonographie, Knochenszintigraphie, MRT oder selten PET diagnostiziert und kontrolliert; die Knochenmetastasen mittels Knochenszintigraphie, Computertomographie, konventionellem Röntgen und/oder MRT. Zur Beurteilung des Ansprechens wurde die WHO-Nomenklatur (20;21), wie in Tabelle 1 dargestellt, verwendet. Für die Beurteilung des Ansprechens (best response) unterteilten wir die Patientinnen in drei Gruppen: eine Gruppe mit kompletter oder partieller Remission (CR/PR), eine Gruppe mit stabiler Erkrankung (SD) und eine Gruppe mit Progression (PD).

**Tabelle 1:** Remission bei soliden Tumoren nach WHO-Definitionen

Kategorie	Messbarer Tumor	Nicht-messbarer Tumor	Skelettmetastasierung *
CR Komplette Remission	Vollständiger Rückgang oder operative Entfernung sämtlicher Tumorbefunde für mindestens 4 Wochen	Vollständiger Rückgang sämtlicher Tumorsymptome für mindestens 4 Wochen	Vollständige Rückbildung sämtlicher ossärer Tumorbefunde (röntgenologisch und/oder szintigraphisch) für mindestens 4 Wochen
PR Partielle Remission	≥ 50%ige Verkleinerung der Tumordimensionen für mindestens 4 Wochen, keine neuen Metastasen, keine Tumorprogression in irgendeiner Lokalisation	≥ 50%ige Abnahme der Tumorsymptome für mindestens 4 Wochen, keine neuen Metastasen, keine Zunahme der Tumorsymptome in irgendeiner Lokalisation	Größenreduktion osteolytischer Läsionen, Rekalzifizierung osteolytischer Läsionen, röntgenologische Dichteabnahme osteoblastischer Läsionen für mindestens 4 Wochen
SD Stable disease oder stabile Erkrankung	< 50%ige Verkleinerung der Tumordimensionen, ≤ 25%ige Vergrößerung der Tumordimensionen in einem oder mehreren Herden für mindestens 4 Wochen	< 50%ige Abnahme der Tumorsymptome, ≤ 25%ige Zunahme der Tumorsymptome, unveränderter Befund der Tumorsymptome für mindestens 4 Wochen	Unveränderter Befund für mindestens 4 Wochen, frühestens feststellbar 8 Wochen nach Therapiebeginn oder –änderung
PD Tumorprogression	> 25%ige Vergrößerung der Tumordimensionen in einem oder mehreren Herden, Auftreten neuer Herde	> 25%ige Zunahme der Tumorsymptome, Auftreten neuer Herde	Größenzunahme der ossären Tumorbefunde (röntgenologisch), Auftreten neuer Läsionen

\* Diagnostische Erfassung von Skelettmetastasen allein durch Szintigraphie nicht ausreichend. Abheilung einer pathologischen Fraktur als Bewertungsgrundlage allein nicht ausreichend

## 2.3 Probenmaterial

Für die Prüfung des PINP-Tests von Roche® Diagnostics im Rahmen des methodischen Teils dieser Arbeit (Intra-Assay-Präzision, Ringversuch und zum Teil Inter-Assay-Präzision) wurden Proben von Roche® Diagnostics zur Verfügung gestellt. Für den zweiten Teil der Inter-Assay-Präzision sowie den klinischen Teil dieser Arbeit, der sich mit der klinischen Anwendung der PINP-Messung im Vergleich zu dem Tumormarker CA 27-29 (oder CA 15-3) und den Markern der Knochenmetastasierung  $\beta$ -Crosslaps oder  $\beta$ -CTX und Osteocalcin befasst, wurden die Proben in der Mamma-Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Charité, Standort Mitte in Berlin, wie folgt gesammelt:

Den neoadjuvanten Patientinnen wurde die erste Blutprobe nach Erstdiagnose des Brustkrebses vor Einleitung der neoadjuvanten Chemotherapie und weitere Blutproben alle drei bis vier Wochen bis zum Therapieende abgenommen. Den 51 anderen Patientinnen wurde das Blut vor Einleitung einer neuen Therapie und dann alle drei bis vier Wochen bis zum Abbruch der Therapie abgenommen. Die Abnahme von 10 ml Blut mittels einer Serum-Monovette erfolgte immer vor einer Therapie, vormittags zwischen neun und elf Uhr, nach schriftlichem Einverständnis. Die Serumproben wurden lichtgeschützt in schwarzen Plastiktüten transportiert und innerhalb von zwei Stunden bei 2000xg für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Serumproben wurden bei  $-28^{\circ}\text{C}$  in 1,5 ml-Eppendorfküvetten bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Jede Eppendorfküvette enthielt 1 ml Serum, mindestens drei Küvetten wurden pro Blutprobe eingefroren. Die Messungen der PINP-,  $\beta$ -Crosslaps- und Osteocalcinwerte erfolgten innerhalb von 2 Monaten zwischen Dezember 2002 und Januar 2003 im Zentrallabor (Leiter: Professor Köttgen) der Charité Berlin auf dem Campus Virchow-Klinikum, und die Messungen von CA 27-29 wurden im Februar 2003 im Labor von Frau PD Dr. med. Lüftner in der Charité Berlin auf dem Campus Mitte durchgeführt. Vor jeder Messung wurden die Serumproben in den Eppendorfküvetten bei Raumtemperatur aufgetaut und bei 14.000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang homogenisiert. Es wurde kontrolliert, dass kein Fibrindepot vorlag. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die aufgetauten Serumproben im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Proben, die nicht am gleichen Tag bearbeitet wurden, wurden vernichtet.

## 2.4. PINP-Assay

PINP wird beim Verfahren des Elektrochemilumineszenzimmunoassays (ECLIA) im Serum gemessen. Im Rahmen dieser Studie wurden Immunoassay-Analysenautomaten von Roche® Diagnostics verwendet (Elecsys 2010® in Berlin und Brno, Elecsys 170® in Essen und Brüssel und Elecsys 1010® in Altötting). Spezifisch für diesen Kit sind zwei Inkubationsphasen. Zwanzig Mikroliter des Serums werden mit einem biotinylierten, monoklonalen PINP-spezifischen Antikörper inkubiert. Die zweite Inkubation beginnt nach Zugabe eines mit Ruthenium-Komplex (Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)complex(Ru(bpy)<sub>2/3+</sub>)) markierten, monoklonalen PINP-spezifischen Antikörpers und Streptavidin-beschichteter Mikropartikel. Die drei Reagenzien bilden einen Sandwich-Komplex, der mit Hilfe der Streptavidin-beschichteten Mikropartikel über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Festphase gebunden wird. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Durch Anlegen einer Spannung über 1,4 Sekunden wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Der Photomultiplier misst die Intensität des Signals in RLU (Relative Light Units). Die gemessenen Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Danach werden die ungebundenen Substanzen mit Procell entfernt. Die Messzelle ist unmittelbar bereit für die nächste Messung. Der Test dauert insgesamt achtzehn Minuten.

Das Gerät wird jede Woche kalibriert. Ein Kalibrator darf nicht mehr als fünfmal angewendet werden und wird nach jeder Kalibration zurück in den Kühlschrank gestellt werden.

Die nachfolgend beschriebenen Tests zur Überprüfung dieses Verfahrens wurden teils in Berlin (ein Teil der Methodik und der ganze klinische Teil) und teils in Essen, Altötting, Brno und Brüssel (Rest der Methodik) nach einem Protokoll durchgeführt, das den NCCLS-Kriterien für Knochenmarker entspricht (22).

### 2.4.1. Bestimmung der Intra-Assay-Präzision

Der Inhalt dieser Messungen besteht darin, die Wiederholbarkeit des Tests unter den genau gleichen Bedingungen (gleiches Gerät, gleicher Tag, gleiche Person, die den Test durchführt)

zu prüfen. Es wurde verifiziert, dass das Gerät gut funktioniert, und die beteiligten Personen konnten sich mit dem Verfahren und den Reagenzien vertraut machen. Dieser Test wurde einmal mit Kontrollproben von Roche® Diagnostics und anschließend mit Serumproben durchgeführt. Dafür wurden für den ersten Teil der Messung 3 x 21 Kontrollproben von Roche® Diagnostics zur Verfügung gestellt (PreciControl Bone, Control 1: PCB1 mit PINP-Wert von 58,5 ng/ml, Control 2: PCB2 mit PINP-Wert von 572 ng/ml und Control 3: PCB3 mit PINP-Wert von 1164 ng/ml, etwa 200 µl pro Probe). Für den zweiten Teil der Messung wurden drei Gruppen von Proben im Labor wie folgt zusammengestellt: die Serumproben des Patientinnenkollektivs wurden gemessen und in drei Gruppen anhand der PINP-Konzentration wie folgt verteilt:

- HSP low mit PINP-Wert zwischen 30 - 80 ng/ml
- HSP medium mit PINP-Wert zwischen 100 - 300 ng/ml
- HSP high mit PINP-Wert > 500 ng/ml

Die Messungen wurden mit den Reagenzien und Geräten von Roche® Diagnostics an einem einzigen Tag und ohne Pause von der gleichen Person durchgeführt. Für jede Messung wurde kontrolliert, dass der PINP-Wert sich in dem vorher spezifizierten Bereich befand. Median-, Mittel-, Maximal- und Minimalwert sowie Standardabweichung und Variationskoeffizient wurden berechnet. Der Variationskoeffizient soll für jede Gruppe von 21 Proben  $\leq 4\%$  sein. Die Ergebnisse der fünf Zentren wurden gemeinsam ausgewertet. Das Zentrum Berlin nahm nur am ersten Teil des Tests mit den Proben von Roche® Diagnostics teil.

#### 2.4.2. Ringversuch

Der Inhalt dieser Messung besteht darin, die „intermediate precision“ (oder Präzisionskontrolle von Tag zu Tag), also die Reproduzierbarkeit des Tests innerhalb eines Labors, zu prüfen. Es wird verifiziert, dass der Test trotz Variationen innerhalb eines Labors (verschiedene Messungen an unterschiedlichen Tagen oder zu unterschiedlichen Uhrzeiten, durchgeführt von unterschiedlichen Personen, mit Kontrollproben wie auch Serumproben) äquivalente Ergebnisse liefert. Dafür wurden 3 x 10 Serumproben pro Serumgruppe (3 Serumgruppen: QA 1 mit PINP-Wert zwischen 30 - 80 ng/ml, QA 2 mit PINP-Wert zwischen 100 - 300 ng/ml und QA 3 mit PINP-Wert > 500 ng/ml, etwa 200 µl pro Probe) sowie Kontrollproben mit präzisiertem PINP-Wert von Roche® Diagnostics (siehe Intra-Assay-Präzision) zur Verfügung gestellt. Diese Proben wurden insgesamt zehnmal mit maximal zwei

Messungen pro Tag gemessen. Für jede Messung wurde kontrolliert, dass die PINP-Werte der Kontrollproben von Roche® Diagnostics sich in dem vorher spezifizierten Bereich befanden. Median-, Mittel-, Maximal- und Minimalwert sowie Standardabweichung, Variationskoeffizient und recovery wurden berechnet. Die Variationskoeffizienten sollen für PCB1  $\leq 5\%$  und für PCB2 sowie PCB3  $\leq 6\%$  sein, die Wiederfindungswerte sollen für die sechs Gruppen von Proben zwischen 90% und 110% liegen. Die Ergebnisse der fünf Zentren wurden gemeinsam ausgewertet.

#### 2.4.3. Inter-Assay-Präzision

Der Inhalt dieser Messung besteht darin, die Reproduzierbarkeit des Tests in unterschiedlichen Laboren, in verschiedenen Städten und Ländern zu überprüfen. Es wurde verifiziert, dass die verschiedenen Zentren, die an der Studie teilnehmen, äquivalente Ergebnisse erzielen. Jedes Zentrum sollte die Reproduzierbarkeit des Tests innerhalb seines Labors sowie im Vergleich zu den anderen Zentren nachweisen sowie ähnliche Wiederfindungswerte (recovery level) der von Roche® Diagnostics gelieferten Proben wie die anderen Teilnehmer finden. Dafür wurden drei Gruppen von 10 Kontrollproben (siehe Intra-Assay-Präzision) von Roche® Diagnostics zur Verfügung gestellt. Die restlichen drei Gruppen von Proben wurden im Labor wie folgt zusammengestellt: Die Serumproben des Patientinnenkollektivs wurden untersucht und in drei Gruppen anhand der PINP-Konzentration wie folgt verteilt:

- Serumprobe 1 (HSP low) mit PINP-Wert zwischen 30 - 80 ng/ml
- Serumprobe 2 (HSP medium) mit PINP-Wert zwischen 100 - 300 ng/ml
- Serumprobe 3 (HSP high) mit PINP-Wert  $> 500$  ng/ml

Diese Proben wurden sechsmal hintereinander, maximal zweimal pro Tag und insgesamt zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Für jede Messung wurde kontrolliert, dass die PINP-Werte der Kontrollproben von Roche® Diagnostics sowie die vom Labor zusammengestellten drei Gruppen von Proben sich in dem vorher spezifizierten Bereich befanden. Median-, Mittel-, Maximal- und Minimalwert sowie Standardabweichung und Variationskoeffizient wurden für jedes Zentrum berechnet und graphisch mit den Ergebnissen der anderen Zentren dargestellt, die an der Studie teilnahmen. Die Variationskoeffizienten sollen für PCB1  $\leq 5\%$  und für PCB2 sowie PCB3  $\leq 6\%$ , für die HSP low  $\leq 5\%$  und für die

zwei anderen Serumproben (HSP medium und HSP high)  $\leq 6\%$  sein. Die Ergebnisse der fünf Zentren wurden gemeinsam ausgewertet.

## 2.5. Osteocalcin-Assay

Osteocalcin wird beim Verfahren des Elektrochemilumineszenzimmunoassays (ECLIA) im Serum gemessen. Es kommt das Gerät Elecsys 2010® von Roche® Diagnostics zur Anwendung. Für die erste Inkubation werden 20  $\mu\text{l}$  des Serums mit einem biotinylierten, monoklonalen N-MID Osteocalcin-spezifischen Antikörper und einem Ruthenium-Komplex-(Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)complex(Ru(bpy)<sub>2/3+</sub>)) markierten monoklonalen N-MID Osteocalcin-spezifischen Antikörper gemischt. Die drei Reagenzien bilden einen Sandwich-Komplex. Während der zweiten Inkubation werden Streptavidin-beschichtete Mikropartikel hinzugefügt und der Komplex wird über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Durch Anlegen einer Spannung über 1,4 Sekunden wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Der Photomultiplier misst die Intensität des Signals in RLU (Relative Light Units). Die gemessenen Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine, über den Reagenzbarcode mitgelieferte, Masterkurve gerätespezifisch generiert. Danach werden die ungebundenen Substanzen mit Procell entfernt. Die Messzelle ist unmittelbar bereit für die nächste Messung. Der Test dauert insgesamt achtzehn Minuten.

Osteocalcin wurde nur in Berlin für den klinischen Teil des Protokolls gemessen.

## 2.6. $\beta$ -Crosslaps-Assay

$\beta$ -Crosslaps wird beim Verfahren des Elektrochemilumineszenzimmunoassays (ECLIA) im Serum gemessen. Es kommt das Gerät Elecsys 2010® von Roche® Diagnostics zur Anwendung. Für diesen Test werden 50  $\mu\text{l}$  des Serums mit einem biotinylierten monoklonalen anti- $\beta$ -Crosslaps-Antikörper inkubiert, wobei das Antigen der Probe von Serumbestandteilen getrennt wird. Die zweite Inkubation beginnt nach Zugabe eines mit Ruthenium-Komplex-

(Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)complex(Ru(bpy)<sub>2/3+</sub>)) markierten monoklonalen  $\beta$ -Crosslaps-spezifischen Antikörpers. Die drei Reagenzien bilden einen Sandwich-Komplex, der mit Hilfe von Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Festphase gebunden wird. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Durch Anlegen einer Spannung über 1,4 Sekunden wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Der Photomultiplier misst die Intensität des Signals in RLU (Relative Light Units). Die gemessenen Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine, über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert. Danach werden die ungebundenen Substanzen mit Procell entfernt. Die Messzelle ist unmittelbar bereit für die nächste Messung. Der Test dauert insgesamt achtzehn Minuten.

$\beta$ -Crosslaps wurde nur in Berlin für den klinischen Teil des Protokolls gemessen. Die Messungen von PINP, Osteocalcin und  $\beta$ -Crosslaps können gleichzeitig auf dem Gerät aus der gleichen Probe erfolgen.

## 2.7. CA 27-29-Assay

Die Bestimmung des allgemeinen Tumorantigens CA 27-29 wurde mit einem vollautomatisierten Immunoassay auf Chemilumineszenzbasis auf dem genannten klinisch-chemischen Analyseapparat ACS (Automated Chemiluminescence System) 180 BR® von Bayer® Diagnostics durchgeführt. Dieses Verfahren benötigt 25  $\mu$ l einer Serumprobe für eine Einfachbestimmung. Das Lite-Reagenz enthält einen CA 27-29-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper, der mit einem Acridiniumester markiert ist. Der im Assay verwendete Antikörper, Mab B27.29, bindet an ein Peptidepitop in der Tandem-Wiederholregion des MUC-1 Genproducts. Die solide Phase als zweites Reagenz enthält gereinigtes CA 27-29, das kovalent an paramagnetische Partikel gebunden ist. Die Probe wird mit Lite-Reagenz und Solid-Phase-Reagenz gleichzeitig 7,5 Minuten lang inkubiert. Nach Auftauen bei Raumtemperatur und Mischung der Eppendorfküvetten führt das System automatisch die folgenden Schritte durch:

- dispensiert 25  $\mu$ l Serum und 22  $\mu$ l Vorbehandlungs-Reagenz in eine Küvette;

- dispensiert 50 µl Lite-Reagenz und 250 µl feste Phase und inkubiert 7,5 Minuten lang bei 37°C;
- trennt, aspiriert und reinigt die Küvette mit deionisiertem Wasser;
- dispensiert jeweils 300 µl Reagenz 1 und Reagenz 2, um die Chemilumineszenzreaktion auszulösen.

In der sich anschließenden Reaktion wird Licht emittiert. Durch die Menge des emittierten Lichts lässt sich der Gehalt von CA 27-29 in der Probe errechnen. Der Gehalt an CA 27-29 in der Patientinnenprobe ist umgekehrt proportional zur Menge der vom System gemessenen relativen Lichteinheiten (RLUs). Die CA 27-29-Ergebnisse werden mit Hilfe einer 7-Punkte-Standardkurve kalkuliert und in der Einheit U/ml angegeben. Die CA 27-29-Konzentration in Serumproben kann bis zu einem Maximalwert von 450 U/ml mit einer messbaren Mindestkonzentration von 3,5 U/ml bestimmt werden. Auch dieses Testverfahren weist eine Kapazität von 180 Testergebnissen pro Stunde auf. Der ACS:180® BR-Test benötigt eine Basiskurvenkalibration, sobald Lite-Reagenz und Solid-Phase einer neuen Charge verwendet werden. Des weiteren wird eine 2-Punkt-Kalibration alle sieben Tage durchgeführt. CA 27-29 wird auch CA 15-3 genannt. Die unterschiedliche Namensgebung dieser beiden Tumormarker beruht auf dem Umstand, dass der nachweisende Antikörper B 27-29 ein anderes Epitop erkennt als der für den Tumormarker CA 15-3 verwendete Antikörper (23). Soweit im Folgenden von dem Tumormarker CA 15-3 die Rede ist gelten die entsprechenden Ausführungen zugleich auch für den Tumormarker CA 27-29. CA 15-3 wurde nur in Berlin für den klinischen Teil des Protokolls gemessen.

## 2.8. Statistik

Die erhobenen Daten wurden in eine Excel-Tabelle (Microsoft® Excel 2000) eingegeben und gegliedert. Für die statistische Analyse des methodischen Teils der Arbeit wurden vorprogrammierte Makros von Microsoft® Excel verwendet (z. B. Histogramm, Min., Max., Mittelwert, Median, STD, CV). Die Sensitivität, die Spezifität, der negativ-prädiktive Wert sowie der positiv-prädiktive Wert wurden mit diesem Programm für jede einzelne PINP-Konzentration berechnet.

Für den klinischen Teil der Arbeit wurde die deskriptive Statistik (Mittelwert, Median, Bereiche, Standardabweichung) für jeden einzelnen gemessenen Marker (PINP, CTX,

Osteocalcin und CA 15-3) berechnet. Die diagnostische Präzision der Marker wurde anhand einer ROC-Analyse evaluiert. Für die verschiedenen Zeitpunkte (baseline / best response oder best response / Progression oder baseline / spätere Progression) wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis- und des Mann-Whitney-Tests alle Markerkonzentrationen getestet, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Patientinnensubgruppen nachzuweisen.

Die weiteren statistischen Berechnungen wurden mit SPSS 12.0 für Windows (SPSS, München, Deutschland) kalkuliert. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.