

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. D. Teupser

**Zelltodmarker im Serum von Patientinnen
mit Mammakarzinom bei der Vorhersage
und frühzeitigen Beurteilung des Ansprechens
auf eine neoadjuvante Chemotherapie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Debora Monika Irena Fersching-Gierlich
aus Freiburg im Breisgau

2013

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Stefan Holdenrieder

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Irmela Jeremias
Prof. Dr. med. Hans-Joachim Stemmler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2013

Gewidmet meinen Eltern

Publikationen (Originalarbeiten)

Stoetzer OJ, **Fersching D**, Holdenrieder S.

Soluble high mobility group box 1 in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy.

Inflammation Research, Proc Monduzzi TSIS 2010; 174-177.

Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, **Fersching D**, Leszinski G, Siegele B, Stoetzer OJ, Holdenrieder S.

Comparison of nucleosomes and quantitative PCR using diverse DNA isolation methods.

In Gahan P. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, Springer 2011; 1st edition: 269-273.

Stoetzer OJ, **Fersching D**, Holdenrieder S.

Circulating nucleosomes and DNase in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy.

In Gahan P. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, Springer 2011; 1st edition: 85-89.

Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, **Fersching D**, Leszinski G, Siegele B, Stoetzer OJ, Holdenrieder S.

Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield.

Clin Chim Acta 2011; 412: 2085-8.

Fersching D, Nagel D, Siegele B, Salat C, Heinemann V, Stoetzer OJ, Holdenrieder S.

Apoptosis-related biomarkers sFAS, MIF, ICAM-1 and PAI-1 in serum of breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy.

Anticancer Res 2012 May;32(5):2047-58

Wittwer C, Lehner J, **Fersching D**, Stoetzer OJ, Siegele B, Holdenrieder S.
Methodical and preanalytical evaluation of a RAGE immunoassay.
Anticancer Res 2012 May; 32(5):2075-8.

Lehner J, Wittwer C, **Fersching D**, Stoetzer OJ, Siegele B, Holdenrieder S.
Methodical and preanalytical evaluation of an HMGB1 immunoassay.
Anticancer Res 2012 May; 32(5):2059-62.

Stoetzer OJ, Wittwer C, Lehner J, Fahmueller Y, Kohles N, **Fersching D**, Leszinski G, Roessner J, Holdenrieder S.
Circulating nucleosomes and biomarkers of immunogenic cell death as predictive and prognostic markers in cancer patients undergoing cytotoxic therapy.
Exp Opin Biol Ther 2012 Jun;12 Suppl 1:S217-24.

Stoetzer OJ, **Fersching D**, Salat C, Steinkohl O, Gabka CJ, Hamann U, Braun M, Feller AM, Heinemann V, Siegele B, Nagel D, Holdenrieder S.
Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients by circulating circulating nucleosomes, DNase activity, M30 and survivin.
BMC Cancer 2012; in review.

Stoetzer OJ, **Fersching D**, Salat C, Steinkohl O, Gabka CJ, Hamann U, Braun M, Feller AM, Heinemann V, Siegele B, Nagel D, Holdenrieder S.
Immunogenic cell death biomarkers HMGB1 and RAGE in breast cancer patients undergoing to neoadjuvant chemotherapy.
Int J Cancer 2012; submitted.

Beiträge bei wissenschaftlichen Kongressen (Poster und Vorträge)

Fersching D, Stoetzer OJ, Schwarz MJ, Holdenrieder S.

Circulating nucleosomes and oncologic biomarkers in predicting response to neoadjuvant chemotherapy of breast cancer patients.

Conference of the International Society of Oncological BioMarkers (ISOBM) 2009 in Amsterdam, Niederlande; Poster

Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, **Fersching D**, Leszinski G, Siegele B, Holdenrieder S.

Comparison of three column - based methods for DNA isolation from plasma.

Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS VI) 2009 in Hong Kong, China; Poster

Fersching D, Stoetzer OJ, Schwarz MJ, Holdenrieder S.

Circulating nucleosomes and oncologic biomarkers in predicting response to neoadjuvant chemotherapy of breast cancer patients.

Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS VI) 2009 in Hong Kong, China; Poster

Stoetzer OJ, **Fersching D**, Schwarz MJ, Holdenrieder S.

HMGB1 and apoptotic markers in predicting response to neoadjuvant chemotherapy of breast cancer patients.

8th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis - TSIS 2010, München; Vortrag

Fersching D, Stoetzer OJ, Siegele B, Nagel D, Holdenrieder S.

Nucleosomes, RAGE and HMGB1 in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients.

Conference of the International Society of Oncological BioMarkers (ISOBM) 2010 in München; Poster

Lehner J, Wittwer C, **Fersching D**, Stoetzer OJ, Siegele B, Holdenrieder S.
Methodical validation of an immunoassay for the determination of soluble high mobility group box 1 (sHMGB1).

Conference of the International Society of Oncological BioMarkers (ISOBM) 2010 in München; Poster

Wittwer C, Lehner J, **Fersching D**, Siegele B, Holdenrieder S.
Methodical validation of an immunoassay for the determination of soluble receptors of advanced glycation end products (sRAGE).

Conference of the International Society of Oncological BioMarkers (ISOBM) 2010 in München; Poster

Holdenrieder S, Roessner J, Hoecherl EF, Wolf K, Durner J, Hofmann W, **Fersching D**, Stoetzer OJ, Lehner J, Wittwer C, Siegele B, Nagel D.

Clinical relevance of soluble HMGB1, RAGE and nucleosomes in trauma and cancer patients.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) 2010, Mannheim; Poster.

Wittwer C, Lehner J, **Fersching D**, Siegele B, Stoetzer OJ, Holdenrieder S.
Methodical and preanalytical evaluation of a RAGE immunoassay.

Hamburg Symposium on Tumor Markers 2011, Hamburg; Poster.

Lehner J, Wittwer C, **Fersching D**, Siegele B, Stoetzer OJ, Holdenrieder S.
Methodical and preanalytical evaluation of an HMGB1 immunoassay.

Hamburg Symposium on Tumor Markers (HSTM) 2011, Hamburg; Poster.

Fersching D, Stoetzer OJ, Siegele B, Nagel D, Holdenrieder S.

Bead-based multiplex method for apoptotic markers measurement in breast cancer patients.

Hamburg Symposium on Tumor Markers (HSTM) 2011, Hamburg; Vortrag.

Lehner J, Stoetzer OJ, **Fersching D**, Nagel D, Holdenrieder S.

Relevance of plasma DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy.

Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS VII) 2011 in Madrid, Spanien; Poster

Lehner J, Stoetzer OJ, Wittwer C, **Fersching D**, Nagel D, Holdenrieder S.

Plasma DNA and DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy.

Conference of the International Society of Oncological BioMarkers (ISOBM) 2011 in Florenz, Italien; Poster.

Inhalt

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	HINTERGRUND.....	3
2.1	Mammakarzinom.....	3
2.1.1	Epidemiologie	3
2.1.2	Ätiologie.....	4
2.1.3	Neoadjuvante Therapie.....	4
2.1.4	Prädiktive und prognostische Faktoren	13
2.2	Apoptose.....	18
2.2.1	Historischer Hintergrund	18
2.2.2	Morphologie der Apoptose und weiterer Zelltodformen	21
2.2.3	Biochemische Grundlagen der Apoptose	24
2.2.4	Die physiologische Bedeutung der Apoptose	31
2.2.5	Die pathogenetische Bedeutung der Apoptose	33
2.2.6	Verfahren zum Nachweis der Apoptose in vitro	34
2.2.7	Verfahren zum Nachweis der Apoptose in vivo	36
2.2.8	Verfahren zum Nachweis der Apoptose in Körperflüssigkeiten	36
2.3	Marker	36
2.3.1	MIF.....	37
2.3.2	sFAS	38
2.3.3	sICAM.....	39
2.3.4	tPAI-1	40
2.3.5	M30	41
2.3.6	Nukleosomen.....	41
2.3.7	CA 15-3	43
2.3.8	CEA.....	43
3	PATIENTINNEN UND KONTROLLPERSONEN.....	45
3.1	Patientinnen mit Mammakarzinom ohne Fernmetastasen	45
3.1.1	Altersverteilung.....	45
3.1.2	Prätherapeutisches Stadium.....	45
3.1.3	Postoperatives Stadium	47
3.1.4	Therapie.....	49
3.1.5	Beurteilung des Therapieansprechens	49
3.2	Kontrollpersonen.....	50
3.2.1	Gesunde Frauen.....	50

3.2.2	Patientinnen mit benigner Brusterkrankung.....	50
3.2.3	Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom.....	50
4	MATERIAL UND METHODEN.....	51
4.1	Gewinnung und Vorbehandlung der Blutproben	51
4.2	Messung der Biomarker	51
4.2.1	MIF, sFAS, sICAM und tPAI-1	52
4.2.2	M30	55
4.2.3	Nukleosomen.....	57
4.2.4	CEA und CA 15-3	60
4.3	Statistik.....	60
5	ERGEBNISSE.....	63
5.1	Vergleich der Biomarker bei verschiedenen Patientengruppen.....	63
5.1.1	Werteverteilung	63
5.1.2	Differenzierung der Patientengruppen.....	70
5.1.3	Diagnostische Wertigkeit.....	71
5.1.4	Zusammenfassung	77
5.2	Korrelationen der Biomarker untereinander	78
5.2.1	Alle Diagnosegruppen.....	78
5.2.2	Gesunde Frauen.....	79
5.2.3	Patientinnen mit benigner Brusterkrankung	80
5.2.4	Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom	81
5.2.5	Patientinnen mit metastasiertem Karzinom	82
5.2.6	Zusammenfassung	82
5.3	Prädiktive Wertigkeit der Marker.....	83
5.3.1	Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie	84
5.3.2	Variante I: NC versus PR+CR	86
5.3.3	Variante II: CR versus PR+NC.....	95
6	DISKUSSION	105
7	ZUSAMMENFASSUNG	127
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	129
	LITERATURVERZEICHNIS	135

DANKSAGUNG	153
LEBENSLAUF	155

1 Einleitung und Fragestellung

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau. Durch die Früherkennung und die Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten sinkt die Mortalität seit Mitte der 1990er Jahre. Dennoch weist das Mammakarzinom in Deutschland derzeit mit 17,6% den größten Anteil an der krebisbedingten Mortalität auf.

Mit dem Einsatz der neoadjuvanten Chemotherapie kann eine Verbesserung der Prognose sowie der Operabilität der Tumoren erzielt werden. Jedoch profitieren nicht alle Patientinnen von einer zytostatischen Behandlung. Zytostatika wirken zudem äußerst toxisch und können schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen.

Die Therapieeffizienz wird heute klinisch und mit bildgebenden Verfahren, insbesondere der Sonografie der Brust, beurteilt. Mit diesen Verfahren kann das Ansprechen des Tumors jedoch meist erst nach mehreren Therapiezyklen abgeschätzt werden. Zudem ist eine präzise Beurteilung der biochemischen Reaktionen des Tumors auf die Therapie nicht möglich. Lediglich mit der Positronen-Emissions-Tomografie (PET) in Kombination mit der Computertomografie können auch funktionelle Veränderungen des Tumors bildgebend dargestellt werden. Diese Methode kann jedoch aufgrund der Strahlenbelastung und der hohen Kosten nicht routinemäßig und nicht wiederholt eingesetzt werden. Histopathologische Untersuchungen bieten derzeit die größte Aussagekraft bezüglich lokaler Veränderungen im Tumorgewebe, können aber wegen der Invasivität ebenfalls nicht wiederholt durchgeführt werden.

Ein wenig invasives und kostengünstiges Verfahren, das früher als die Bildgebung die Effizienz der neoadjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom anzeigen kann, wäre demzufolge äußerst wünschenswert. Die Behandlung könnte damit frühzeitig angepasst, die Prognose verbessert und unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden.

Bei malignen Erkrankungen wie dem Mammakarzinom ist die Apoptoserate verändert und wird durch eine Chemotherapie gezielt beeinflusst. Bei gesteigerter Apoptoserate werden verschiedene Zellbestandteile in den Extrazellularraum und ins zirkulierende Blut freigesetzt. Die Konzentration solcher Apoptoseprodukte in Blutproben kann mit immunchemischen Methoden gemessen werden und die Zelltodrate im Organismus widerspiegeln.

Ziel der vorliegenden prospektiven Studie war, erstmals die Wertigkeit verschiedener zirkulierender Apoptoseprodukte (MIF, sFAS, sICAM, tPAI-1, M30-Antigen und Nukleosomen) zur Vorhersage und frühzeitigen Beurteilung der Effizienz einer neoad-

juvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom zu untersuchen. Wie von der European Group on Tumor Markers empfohlen wird, erfolgte zudem ein Vergleich mit den etablierten Biomarkern CA 15-3 und CEA. Die Konzentrationen der Apoptosemarker sowie von CA 15-3 und CEA wurden in Serum- und teilweise Plasmaproben von 51 Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom vor und während neoadjuvanter Chemotherapie mit immunchemischen Methoden analysiert. Als Kontrollen dienten Blutproben von 28 Patientinnen mit fernmetastasiertem Mammakarzinom, 13 Patientinnen mit gutartigen Brustveränderungen sowie 31 gesunden Frauen.

Es wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Unterscheiden sich die absoluten Markerkonzentrationen in Blutproben von gesunden Frauen, Patientinnen mit gutartigen Veränderungen der Brust und Patientinnen mit Mammakarzinom? Haben die Marker diagnostische Relevanz?
- Unterscheiden sich die absoluten Markerkonzentrationen in Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom in frühen Stadien und Patientinnen mit bereits nachgewiesenen Fernmetastasen?
- Korrelieren die verschiedenen Marker miteinander?
- Unterscheiden sich bei den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom die prätherapeutischen absoluten Markerkonzentrationen zwischen Patientinnen mit gutem und schlechtem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie? Erlauben sie eine Vorhersage des Therapieansprechens?
- Unterscheiden sich bei den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom die absoluten Markerkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten während der neoadjuvanten Chemotherapie zwischen Patientinnen mit gutem und schlechtem Therapieansprechen? Erlauben sie eine frühzeitige Beurteilung der Therapieeffizienz?
- Unterscheidet sich bei den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom die Kinetik der Markerkonzentrationen während der neoadjuvanten Chemotherapie zwischen Patientinnen mit gutem und schlechtem Therapieansprechen?

2 Hintergrund

2.1 Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist in Deutschland sowie weltweit die häufigste bösartige Erkrankung der Frau. Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister und das Robert-Koch-Institut geben für das Jahr 2002 in Deutschland 55 150 Neuerkrankungen an. Das entspricht 26,8% der jährlichen Krebsneuerkrankungen bei Frauen. Das Mammakarzinom weist damit gefolgt von Neoplasien des Darms und der Lunge nach wie vor die höchste Krebsinzidenz auf. Weltweit erkranken jährlich ca. 1,15 Millionen Frauen an Brustkrebs (Engel et. al., 2007).

Seit 1970 wird eine Zunahme der Inzidenz beobachtet, die durch vollständigere Erfassungsraten und den Einsatz der Mammografie mit daraus resultierender Diagnose in früheren Stadien erklärt wird. Ein Vergleich der Erkrankungsraten weltweit zeigt deutliche regionale Unterschiede. Die Inzidenz ist in den stärker entwickelten Ländern wesentlich höher als in den weniger stark entwickelten Ländern (Engel et. al., 2007).

Die Mortalität des Mammakarzinoms nimmt seit Mitte der 1990er Jahre ab. Diese Entwicklung wird auf die Früherkennung und die adjuvante systemische Therapie zurückgeführt. Dennoch weist das Mammakarzinom in Deutschland heute mit einem Anteil von 17,6% noch immer die höchste krebsbedingte Mortalität auf. Im Jahr 2005 wurden 17 455 brustkrebsbedingte Sterbefälle in Deutschland gezählt (Engel et. al., 2007).

Im Vergleich zur hohen Mortalität erscheint die Letalität des Mammakarzinoms relativ niedrig. Das Tumorregister München gibt Gesamtüberlebensraten von 76,9% nach 5 Jahren und von 47,6% nach 10 Jahren an (Engel et. al., 2007).

Da das Mammakarzinom eine hohe Inzidenz und gleichzeitig eine relativ gute Prognose hat, weist es die größte Prävalenz aller malignen Erkrankungen auf. Es wird geschätzt, dass derzeit etwa 4,4 Millionen Frauen weltweit leben, bei denen innerhalb der letzten 5 Jahre Brustkrebs diagnostiziert wurde (Parkin et. al., 2005).

Nach Angaben des Tumorregisters München liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 63,4 Jahren mit einem Median von 62,9 Jahren und einer Standardabweichung von 14,2 Jahren. Die Altersverteilung stellt sich nahezu symmetrisch dar. Bei Diagnosestellung sind 32,1% der Patientinnen über 70 Jahre alt, 49,1% gehören zur Altersgruppe der 50- bis 69-Jährigen und 18,8% haben das 50. Lebensjahr noch nicht vollendet (Engel et. al., 2007).

2.1.2 Ätiologie

Die Mechanismen, die an der Entstehung des Mammakarzinoms beteiligt sind, sind nicht im Detail geklärt. Es ist jedoch von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen, bei dem verschiedene Regulationsebenen der Zellhomöostase gestört sind.

Es sind bestimmte Gruppen von Frauen bekannt, die besonders gefährdet sind, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Hierzu zählen aufgrund der Altersverteilung des Mammakarzinoms ältere Frauen. Auch Frauen mit bereits aufgetretenen Brusterkrankungen und Präkanzerosen tragen ein erhöhtes Risiko. Darüber hinaus haben Frauen mit familiärer Belastung ein besonders hohes Risiko, wobei Umfang und Grad der Verwandtschaft entscheidend sind. Ein erbliches Mammakarzinom liegt bei etwa 5-10% der Patientinnen vor. Der genetische Hintergrund bleibt bei 50% der hereditären Mammakarzinome ungeklärt. Etwa 5% der Fälle treten im Rahmen eines Karzinom-Syndroms auf. Beispiele hierfür sind das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom, das Li-Fraumeni-Syndrom, das Peutz-Jeghers-Syndrom und das Cowden-Syndrom. Fast die Hälfte der eindeutig erblichen Fälle ist auf eine heterozygote Mutation in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 oder BRCA2 zurückzuführen. Eine Mutation des BRCA1- oder BRCA2-Gens geht mit einem bis zu 80% höheren Erkrankungsrisiko einher (Wolf et. al., 2007).

Es gilt zudem als gesichert, dass eine Exposition gegenüber endogenen oder exogen zugeführten Östrogenen die Entstehung eines Mammakarzinoms begünstigen kann. Daher erhöhen auch folgende Faktoren das Mammakarzinomrisiko: frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität beziehungsweise wenige Schwangerschaften (Wolf et. al., 2007), Hormonersatztherapie, postmenopausale Adipositas und erhöhte postmenopausale Östrogenblutspiegel (Gießelmann et. al., 2004).

Hinzuzufügen ist außerdem der Einfluss konstitutioneller Faktoren. So zeigt sich beispielsweise mit steigendem Body Mass Index eine signifikante Zunahme von Inzidenz und Mortalität. Mehrere Studien ergaben zudem eine positive Korrelation mit linearer Zunahme der Inzidenz in Abhängigkeit von der täglich zugeführten Alkoholmenge. Außerdem können weitere bekannte Karzinogene wie z.B. die Einwirkung ionisierender Strahlung das Brustkrebsrisiko verstärken (Wolf et. al., 2007).

2.1.3 Neoadjuvante Therapie

Das Mammakarzinom wird heute als Systemerkrankung mit früher Dissemination von Tumorzellen und nicht mehr nur als lokales Geschehen betrachtet. Dieses Umdenken führte in den letzten Jahrzehnten zu einem Wandel in der Brustkrebsbehandlung. Die radikale Operation als wichtigster Bestandteil der Therapie hat an Bedeutung verloren, während die systemische Behandlung heute fest in die Mammakarzinombehandlung

integriert ist. Neben zytostatischen Chemotherapeutika und endokrinen Therapieformen werden heute auch zunehmend spezifische Antikörper bei der Behandlung eingesetzt (Rühl et. al., 2004).

Nomenklatur

Bei der systemischen Tumorthherapie kann zwischen der neoadjuvanten, der adjuvanten und der palliativen Behandlung unterschieden werden.

Die neoadjuvante systemische Therapie bezeichnet alle medikamentösen Therapieformen, die nach der histologischen Diagnose und vor Durchführung der Operation verabreicht werden. Synonym findet man in der Literatur die Begriffe „primär systemische“, „präoperative“, oder „Induktions“-Therapie (Rühl et. al., 2004).

Unter der adjuvanten systemischen Therapie versteht man entsprechend die medikamentöse Behandlung im Anschluss an eine Operation. Sie wird auch als postoperative Therapie bezeichnet. Bestandteil der adjuvanten Behandlung des Mammakarzinoms ist neben der systemischen Applikation von Medikamenten die Radiatio der Brust (Harbeck et. al., 2007).

Das metastasierte Mammakarzinom muss als unheilbare Krankheit angesehen werden. Unter dem Begriff der palliativen Therapie werden Behandlungen zusammengefasst, deren Ziel vor allem in einer langfristigen Erhaltung und Wiederherstellung der Leistungsfähigkeit besteht. Sowohl Medikamente also auch operative Eingriffe und Bestrahlung werden eingesetzt, um Symptome zu lindern und das Hinzukommen neuer Symptome zu vermeiden (Heinemann et. al., 2007).

Historische Entwicklung

Bereits in den 1970er Jahren wurde die adjuvante systemische Therapie fest in die Brustkrebsbehandlung integriert. Metaanalysen der Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group konnten damals zeigen, dass durch die neue Behandlungsstrategie sowohl die Mortalität als auch das Rezidivrisiko gesenkt wurden (Harbeck et. al., 2007).

In derselben Dekade entstanden zudem die ersten Protokolle für die neoadjuvante Behandlung des Mammakarzinoms. Sie beschränkten sich zunächst auf die palliative Behandlung inoperabler Tumoren. Erst der Einsatz der hocheffektiven Anthrazykline führte zu einer Ausweitung der Indikation. Sie zeigten gute Ansprechraten und bewirkten in vielen Fällen eine Größenreduktion des Tumors, die eine Operation in sano ermöglichte. Besonders gute Ergebnisse zeigten sich darüber hinaus beim inflammatorischen Karzinom (Rühl et. al., 2004).

Seit vielen Jahren ist die neoadjuvante Behandlung daher Therapie der Wahl bei lokal weit fortgeschrittenen und inflammatorischen Karzinomen (Rühl et. al., 2004).

Retrospektiv erhobene Daten konnten jedoch nicht nur eine Verbesserung der Operabilität, sondern auch eine Korrelation zwischen dem Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie und dem krankheitsfreien Intervall beziehungsweise dem Gesamtüberleben zeigen (Harbeck et. al., 2007; Untch et. al., 2011).

Durch die Ergebnisse der NSABP B18-Studie kam der neoadjuvanten Therapie weitere Bedeutung zu. In dieser prospektiven randomisierten Studie wurden 1523 Patientinnen mit je 4 Zyklen Doxorubicin/Cyclophosphamid prä- oder postoperativ behandelt. Die neoadjuvante Behandlung zeigte sich gegenüber der adjuvanten äquieffektiv. Hinsichtlich der Überlebensraten nach einer Nachbeobachtungszeit von 9 Jahren und dem krankheitsfreien Überleben zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Therapiearmen. In der neoadjuvant behandelten Gruppe konnten mehr Patientinnen brusterhaltend operiert werden. Außerdem war die Rate der nodalpositiven Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation deutlich niedriger als in der adjuvantbehandelten Gruppe. Bezüglich der lokalen und regionären Rezidivraten konnte nach 9 Jahren Beobachtungszeit beim gesamten Kollektiv kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch eine signifikant höhere Lokalrezidivrate bei den Frauen, bei denen ursprünglich eine Mastektomie indiziert gewesen war und nach gutem Ansprechen doch brusterhaltend operiert wurde (15,9% in der Gruppe mit brusterhaltender Operation nach Indikationswechsel versus 9,9% in der Gruppe mit ursprünglich geplanter brusterhaltender Operation; $p=0,04$). (Die aufgeführten Ergebnisse der NSABP B18-Studie wurden einer Zusammenfassung des Tumormanual Mammakarzinome vom Tumorzentrum München entnommen, siehe (Bauerfeind et. al., 2007).)

Tab. 1: Ergebnisse der NSABP B18-Studie (9 Jahre Nachbeobachtungszeit)

Untersuchter Parameter	neoadjuvante Gruppe	adjuvante Gruppe
Überlebensrate	69,0%	70,0%
Krankheitsfreies Überleben	53,0%	55,0%
Rate der brusterhaltenden Operationen	68,0%	60,0%
Rate an nodalpositiven Patientinnen (bei OP)	42,0%	60,0%
Lokale Rezidivrate (nach Lumpektomie)	10,7%	7,6%
Regionäre Rezidivrate (unabhängig von der Art der Operation)	4,3%	3,4%

Indikationen und Ziele

Vor Beginn der systemischen Therapie erfolgen in jedem Fall eine gründliche klinische und bildgebende Diagnostik sowie eine histologische Diagnosesicherung. Die aktuellen Indikationen und Ziele der systemischen neoadjuvanten Therapie basieren im Wesentlichen auf den Ergebnissen der oben beschriebenen NSABP B18-Studie.

Die Ziele können wie folgt zusammengefasst werden:

- Überführung eines primär inoperablen in ein operables Mammakarzinom
- Erhöhung der Rate brusterhaltender Operationen
- Abschätzung der Prognose in Abhängigkeit des primären Tumoransprechens
- Nachweis des Therapieeffekts für Arzt und Patientin
- Evaluation neuer Medikamente und neuer Medikamentenkombinationen
- Zeitnaher Beginn der adjuvanten Radiatio nach der Operation
- Evaluation prädiktiver Faktoren für ein sensibleres beziehungsweise frühzeitigeres Erkennen therapieresistenter Tumore

Etablierte Indikationen sind heute:

- Inflammatorische Mammakarzinome
- Lokal weit fortgeschrittene Mammakarzinome
- Alle Mammakarzinome, bei denen aufgrund der klinischen, bildgebenden und histologischen Diagnostik und der daraus resultierenden Risikoabschätzung eine adjuvante Therapie indiziert wäre
- Möglichkeit, die Voraussetzungen für eine brusterhaltende Operation zu schaffen

Neuere Daten konnten darüber hinaus zeigen, dass weitere Gruppen von Patientinnen besonders von einer systemischen neoadjuvanten Therapie profitieren. Hierzu gehören Patientinnen mit:

- Klinischer Remission nach zwei Zyklen TAC¹
- Schlecht differenzierten Tumoren (G3)
- Alter unter 40 Jahren
- Triple-negativen Tumoren (Östrogen-, Progesteron- und Her2neu-Rezeptoren negativ).

¹ Docetaxel/Doxorubicin/Cyclophosphamid

Medikamente

Bereits die NSABP B18-Studie zeigte, dass die histopathologische Komplettremission (ypCR) signifikant mit einer günstigen Prognose (krankheitsfreies und Gesamtüberleben) korreliert. Aus diesem Grund ist das wichtigste Ziel zur Verbesserung der neoadjuvanten Therapie die Erhöhung der Rate an histopathologischen Komplettremissionen.

Die primär systemische Therapie umfasst den Einsatz von Chemotherapeutika, Antikörpern und endokriner Therapie (Hanusch et. al., 2011). In Bezug auf Zytostatika zur neoadjuvanten Therapie zeigen bisher vorliegende Studien die besten Ergebnisse für ein Therapieregime mit mindestens 6 Zyklen präoperativ, in dem zunächst ein Anthrazyklin und anschließend ein Taxan verabreicht werden (Bauerfeind et. al., 2007).

Bei Her-2/neu-überexprimierenden Tumoren wird zusätzlich zur neoadjuvanten Chemotherapie eine postoperative Therapie mit Trastuzumab empfohlen. Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor auf den Krebszellen gerichtet ist. Buzdar et al. konnten außerdem zeigen, dass der simultane Einsatz von Trastuzumab mit einer neoadjuvanten Therapie bestehend aus Paclitaxel und FEC² die Rate an Komplettremissionen signifikant erhöht. Da die Zwischenauswertung nach nur 34 Patientinnen einen signifikanten Unterschied zeigte, musste diese Studie abgebrochen werden (Bauerfeind et. al., 2007).

Die Ergebnisse bisher ausgewerteter Studien zur Erprobung der primär systemischen Chemotherapie sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

² 5-Fluorouracil/Epirubicin/Cyclophosphamid

Tab. 2: Ergebnisse bisher ausgewerteter Studien zur Erprobung der primär systemischen Chemotherapie bei Her2/neu-negativen Tumoren, übernommen aus (Bauerfeind et. al., 2007; Hanusch et. al., 2011).

Studie	n	Protokolle	pCR (%)	pCR und yTis (%)	BET um PST (%)
NSABP B-27 2001	2286	4xAc vs. 4x Ac →4xDoce	9,6 vs. 18,9 (s)	13,7 vs. 26,1	61,6 vs. 63,7
GEPARDUO 2002	913	4xADoce (q2w) vs. 4xAc→4xDoce (q3w)	7,0 vs. 14,3 (s)		65,8 vs. 75,1
M.D. Anderson 2002	236	4xPac→FAC vs. Pac weekly→FAC		15 vs. 28 (s)	
Aberdeen 2001	97	8xCVAPd vs. 4xCVAPd→4xDoce		16 vs. 34 (s)	
ACCOG 2002	184	6xAc vs. 6xADoce	ns		
AGO Münchener 2002	475	4xEPac vs. 3xE→3xPac		10 vs. 18	55 vs. 66
ECTO 2009	893	Arm A: 4xAPac→4xCMF (postop. Cht.) vs. Arm B: 4xAPac→4xCMF (neoadj. Cht.) (postop. Cht.) vs. Arm C: 4xAPac→4xCMF (präop. Cht.)	ns	ns	35% vs. 33% vs. 63% (s)
NSABP B-18	1523	4xAc (60/600)	9		68
GEPARTRIO 2006	2090	(Responder) 4xTAC vs. 6xTAC (non Responder) 4xNX vs. 4xTAC	21,0 vs. 23,5 (ns) 6,0 vs. 5,3 (ns)	28,6 vs. 33,2 (ns) 7,7 vs. 11,1 (ns)	68,5 vs. 67,5 (ns) 59,8 vs. 57,3 (ns)

Legende: pCR=histopathologisch komplette Remission; Tis=in situ-Karzinom; BET=brusterhaltende Therapie; s=signifikant; ns=nicht signifikant; A=Adriamycin; C=Cyclophosphamid; Doce=Docetaxel; E=Epirubicin; F=5-Fluorouracil; Pac=Paclitaxel; Pd=Prednisolon; V=Vincristin, NX=Vinorelbin und Capecitabin, vs=versus

Tab. 3: Ergebnisse bisher ausgewerteter Studien zur Erprobung der primär systemischen Chemotherapie bei Her2/neu-positiven Tumoren, übernommen aus (Eiermann et. al., 2009; Hanusch et. al., 2011; Untch et. al., 2012).

Studie	n	Protokolle	pCR (%)	pCR und yTis (%)	BET um PST (%)
GEPAR-QUATTRO 2010 (Phase III)	1512	4x EC → 4x Doce bzw. 4x Doce/X bzw. 4x Doce → 4x X + Trastuzumab	31,8	nd	nd
NOAH 2010 (Phase III)	327	3xAPac → 4x Pac → 3x CMF +/- Trastuzumab	38	43	63
GEPAR-QUINTO 2012	620	4xEC → 4x Doce + Trastuzumab vs. 4xEC → 4x Doce + Lapatinib	30 vs. 22,7		

Legende: pCR=histopahtologisch komplette Remission; Tis=in situ-Karzinom; BET=brusterhaltende Therapie; Doce=Docetaxel; A=Adriamycin; Pac=Paclitaxel; E=Epirubicin; C=Cyclophosphamid; X=Capecitabin; M=Methotrexat; F=5-Fluorouracil; nd=nicht untersucht

Die primär endokrine Therapie stellt eine Behandlungsoption dar für Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Tumor

- höheren Alters (über 70 Jahre),
- bei denen eine primäre Operation nicht durchgeführt werden kann,
- bei denen eine neoadjuvante Behandlung indiziert ist und eine Chemotherapie aus medizinischen Gründen nicht möglich ist,
- bei denen eine neoadjuvante Behandlung indiziert ist, die jedoch eine Chemotherapie ablehnen (Bauerfeind et. al., 2007).

Es gilt als bewiesen, dass endokrine Therapieformen bei postmenopausalen Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus wirksam sind. Es ist darüber hinaus bekannt, dass die Wirksamkeit einer Chemotherapie im Alter abnimmt. Für die genannten Indikationen wird derzeit eine Therapie mit einem Aromatasehemmer der dritten Generation empfohlen (Kreienberg et. al., 2008).

Besonderheiten des operativen Vorgehens

Bereits vor Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie sollte das operative Vorgehen abgeschätzt werden. Nach Abschluss der Chemotherapie und erneuter bildgebender Diagnostik kann der ursprüngliche Behandlungsplan entsprechend der Tumorremission modifiziert werden.

Grundsätzlich ist eine Exzision des Tumors in den neuen Tumorgrenzen möglich. Dabei ist jedoch gefordert, dass die Resektionsränder ausreichend tumorfrei sind. Der Sicherheitsabstand sollte mindestens 1 mm beim invasiven und 5-10 mm beim intraduktalen Tumoranteil betragen (Bauerfeind et. al., 2007).

Wenn präoperativ nicht abschließend geklärt werden kann, ob eine brusterhaltende Operation möglich ist, sollte zweizeitig vorgegangen und die Patientin entsprechend aufgeklärt werden. Eine brusterhaltende Operation ist kontraindiziert bei

- ungünstigem Tumor-zu-Brust-Verhältnis
- trotz wiederholter Nachresektion nicht im Gesunden entferntem Tumor
- multizentrischem Mammakarzinom
- Undurchführbarkeit der adjuvanten Bestrahlungstherapie
- inflammatorischem Mammakarzinom wegen unzureichender Datenlage (relative Kontraindikation).

Die Operation sollte etwa 2 bis 3 Wochen nach der letzten Applikation der Chemotherapie erfolgen, denn dann hat sich die Funktion des Knochenmarks in der Regel erholt und es muss nicht mit erhöhter Infektionsgefährdung, Störungen der Wundheilung oder Transfusionsbedarf gerechnet werden.

Wichtiger Bestandteil der operativen Therapie des Mammakarzinoms ist neben der Entfernung des Tumors beziehungsweise der ganzen Brust die Bestimmung des histologischen Nodalstatus. Bei Patientinnen, bei denen die klinische Untersuchung und die Bildgebung keinen Hinweis auf eine Lymphknoten- und Fernmetastasierung ergaben und die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, wird heute zunächst die Entfernung des Sentinel-Lymphknotens empfohlen, also desjenigen Lymphknotens, der als erster von der abfließenden Lymphe passiert wird. Nur wenn sich im Schnellschnitt ein Tumorbefall dieses Sentinel-Lymphknotens zeigt, wird eine klassische Axilladisektion durchgeführt. Die Schulter-Arm-Morbidität wird so signifikant gesenkt. Nach neoadjuvanter Chemotherapie wird dieses Vorgehen jedoch nicht empfohlen. Die operative Therapie der Wahl ist hier die axilläre Lymphonodektomie im Level I und II (Bauerfeind et. al., 2007).

Besonderheiten der postoperativen Bestrahlungstherapie

Im Gegensatz zum operativen Vorgehen wird die Indikation zur adjuvanten Radiotherapie vor Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie endgültig gestellt und ist unabhängig vom Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie.

Für den behandelnden Radiologen ist es hilfreich, wenn vor Beginn der Therapie eine genaue Dokumentation des Lymphknotenbefalls in der Axilla, eine Tumorseiznung oder eine Fotodokumentation sowie eine intraoperative Clipmarkierung des Tumorbetts erfolgen.

Die Indikationen entsprechen denen zur Strahlentherapie nach brusterhaltender Therapie oder Mastektomie (Schaffer et. al., 2007).

Beurteilung des Therapieansprechens

Das Therapieansprechen sollte nach jedem Zyklus klinisch beurteilt werden. Nach Abschluss der neoadjuvanten Therapie wird das Therapieansprechen am objektivsten am pathologisch-anatomischen Präparat beurteilt. In der Regel werden sowohl die Art als auch die Ausdehnung eines Tumorrests bestimmt. Eine neoadjuvante Chemotherapie kann keine, eine partielle oder eine komplette Regression des Tumors induzieren. Typische Zeichen einer Regression sind narbenartiges fibröses Gewebe meist ohne Drüsengewebe, herdförmige Schaumzellen, lymphozytäre Infiltrate, Blutungszeichen, Fremdkörpergranulome und fibrosierte beziehungsweise obliterierte Gänge mit Mikrokalk bei Regression einer DCIS-Komponente. Eine Graduierung der Regression erfolgt meist nach den Kriterien von Sinn et al. (Bauerfeind et. al., 2007).

Tab. 4: Einteilung des Regressionsgrads nach Sinn et al. (Nährig et. al., 2007).

Regressionsgrad nach Sinn et al.	Charakteristika des pathologischen Präparats
0	keine Effekte
1	vermehrte Tumorsklerose mit herdförmiger resorptiver Entzündung und/oder deutlich zytopathische Effekte
2	weitgehende Tumorsklerose mit nur fokal noch nachzuweisenden, evtl. auch multifokalem, minimal-invasivem Resttumor (< oder =0,5cm), häufig ausgedehnte intraduktale Tumorausbreitung
3	kein invasiver Resttumor
4	kein Resttumor

Gemäß den „Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“ (RE-CIST) wird eine Abnahme des längsten Tumordurchmessers um 30% als partielle Remission bezeichnet (Rühl et. al., 2004). Unter dem längsten Tumordurchmesser versteht man hierbei den Abstand der am weitesten voneinander entfernten Tumorzellen.

Eine Komplettremission liegt vor, wenn keine Tumorzellen in der Brust und in den axillären Lymphknoten nachgewiesen werden können (Kreienberg et. al., 2008). Patientinnen mit Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie haben eine signifikant bessere Überlebenschance als Patientinnen mit partieller Remission (Bauerfeind et. al., 2007).

Da sich nicht alle Autoren an dieser Definition orientieren, lassen sich vorliegende Studien schwer vergleichen. Die NSABP bezeichnet mit dem Begriff Komplettremission beispielsweise lediglich das Fehlen eines invasiven Tumors in der Brust, unabhängig vom axillären Lymphknotenstatus und Vorhandensein eines DCIS (Rühl et. al., 2004).

2.1.4 Prädiktive und prognostische Faktoren

Klinische, histopathologische, biologische und biochemische Parameter helfen, den individuellen Krankheitsverlauf einer Patientin beziehungsweise das Ansprechen der Erkrankung auf ein bestimmtes Therapieregime vorherzusagen. Man bezeichnet diese Parameter als Prognose- beziehungsweise prädiktive Faktoren.

Klassische prognostische Faktoren

Folgende Parameter besitzen evidenzgesicherte klinische Relevanz als Prognosemarker und sollen regelmäßig bestimmt werden (Rack et. al., 2007):

- Alter
- Menopausenstatus
- TNM-Stadium (Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung)
- Morphologische Kriterien: Differenzierungsgrad, histologischer Typ, peritumorale Lymph- und Hämangiosis, Steroidhormonrezeptorstatus und Her2neu-Status.

Der stärkste prognostische Faktor ist der axilläre Lymphknotenstatus. Die Anzahl der vom Tumor befallenen axillären Lymphknoten korreliert mit dem Rezidiv- und Todesrisiko. Welche Rolle der Nachweis von isolierten Tumorzellen und Mikrometastasen in axillären Lymphknoten spielt, ist noch unklar.

Die Tumorgröße korreliert positiv mit der Anzahl der befallenen axillären Lymphknoten und zählt ebenfalls zu den klassischen Prognosefaktoren.

Der Hormonrezeptorstatus sollte nach den Empfehlungen der National Academy of Clinical Biochemistry bei allen neu diagnostizierten Mammakarzinomen bestimmt werden. Er kann genutzt werden, um Patientinnen zu identifizieren, die von einer endokrinen Therapie profitieren. Darüber hinaus besitzt er auch Bedeutung als prognostischer Faktor in Ergänzung zu den etablierten prognostischen Faktoren. Die Bestimmung sollte mit immunhistochemischen Methoden erfolgen (Sturgeon et. al., 2008). Der Anteil der anfärbbaren positiven Zellkerne wird dabei getrennt für den Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus angegeben. Tumoren mit einer Anfärbung von mindestens 10% der Zellkerne gelten als hormonsensibel und mit einer Anfärbung von 0% der Zellkerne als hormonunsensibel. Tumoren, die 0 bis 10% positive Zellkerne zeigen, werden als fraglich hormonsensibel eingestuft. Zusätzlich kann der sogenannte immunreaktive Score (IRS beziehungsweise Remmele-Score), das Produkt aus Färbeintensität und Prozentsatz positiver Zellen, angegeben werden (Mayr et. al., 2009). Einem positiven Progesteronrezeptorstatus bei negativem Östrogenrezeptorstatus wird keine prädiktive Bedeutung zugesprochen (Schaller et. al., 2011).

Etwa 20% der invasiven Mammakarzinome weisen eine Überexpression des Her-2/neu-Onkoproteins auf. Diese Tumore zeigen meist einen aggressiveren Krankheitsverlauf. Außerdem korreliert eine Überexpression des Her-2/neu-Onkoproteins mit der Herunterregulierung der Steroidhormonrezeptoren. Da die Korrelation zwischen der Überexpression des transmembranären Wachstumsfaktorrezeptors Her-2/neu und dem Krankheitsverlauf durch seine prädiktive Bedeutung bezüglich des Ansprechens auf eine Systemtherapie überdeckt wird, ist eine unabhängige prognostische Relevanz nicht gesichert (Rack et. al., 2007). Gemäß aktuellen Empfehlungen sollte der Her-2/neu-Status bei allen neu diagnostizierten Brustkrebsfällen bestimmt werden, um Patientinnen zu identifizieren, die von einer Therapie mit Trastuzumab profitieren. Der Her-2/neu-Status kann zudem bestimmt werden, um die Wirksamkeit einer Anthrazyklin-basierten adjuvanten Chemotherapie vorherzusagen (Sturgeon et. al., 2008).

Der Her2neu-Status wird immunhistochemisch (IHC) und mit Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH), Chromogen-In-situ-Hybridisierung (CISH) oder Silver-In-situ-Hybridisierung (SISH) an paraffinfixiertem Material bestimmt und entsprechend als positiv oder negativ eingeordnet. Für die quantitative Beurteilung des Her2neu-Status wird derzeit die semiquantitative immunhistochemische Methode empfohlen. Bei einem DAKO-Score + gilt der Tumor als Her2-neu-negativ und bei einem Score +++ als Her2-neu-positiv. Tumoren mit einem Score ++ sollten jedoch ergänzend mit einer In-situ-Hybridisierung (z.B. FISH) hinsichtlich der Genamplifikation untersucht werden (Mayr et. al., 2009).

Mittels immunhistochemischen Methoden kann außerdem Ki-67, ein Protein, das nur während der Zellteilung im Zellkern exprimiert wird, nachgewiesen werden. Bei einem Prozentsatz über 15 bis 20% besteht ein erhöhtes Risiko, während bei einem Prozentsatz kleiner 15% ein niedrigeres Risiko beobachtet wird. Auf dem Sankt Gallen-Konsensustreffen 2009 wurde daher die Bestimmung von Ki-67 zur Prognoseabschätzung empfohlen (Schaller et. al., 2011).

Zur Abschätzung sowohl der Prognose als auch des Ansprechens auf eine Chemotherapie werden heute verschiedene Subtypen des Mammakarzinoms unterschieden. Die Einteilung erfolgte ursprünglich mithilfe ihrer genetischen Signaturen, kann jedoch auch anhand der klassischen immunhistochemischen Untersuchungen erfolgen. Besonders klinisch interessant sind hierbei der „Luminal A“- , „Luminal B“- und „basal ähnliche“ (dreifach negative)-Typ (Wagner et. al., 2011). Während Luminal-A-Karzinome (ER/PR positiv, Her2/neu negativ, Ki-67 niedrig) eine sehr gute Prognose aufweisen, kann bei basal ähnlichen Karzinomen (ER/PR negativ, Her2/neu negativ) von einem aggressiven Krankheitsverlauf ausgegangen werden (Kreienberg et. al., 2010).

Neue prognostische Faktoren

Neben den klassischen sind heute viele weitere Prognosefaktoren bekannt. Es gibt jedoch nur wenige, deren klinische Relevanz evidenzbegründet ist. Die aktuellen Empfehlungen der American Society of Oncology (ASCO) zum Einsatz neuer Prognosefaktoren werden im Folgenden erläutert.

Während die beschriebenen klassischen Faktoren in Gewebeproben bestimmt werden, erfolgt die Messung von CA 15-3³ und CEA⁴ in Serumproben. CA 15-3 und CEA steigen im Serum mit zunehmender Tumormasse an. Bisher erhobene Daten konnten jedoch nicht zeigen, dass ein früherer Therapiebeginn oder eine Umstellung der adjuvanten Therapie nur aufgrund eines Anstiegs dieser Marker einen Vorteil bringt. Die Bestimmung dieser Marker im Blut alleine kann daher nicht zum Screening, zur Diagnostik, zum Staging oder zur Rezidiverkennung empfohlen werden. Die Bestimmung kann jedoch erfolgen, um die Therapie bei metastasierter Erkrankung zu überwachen. Dies wird jedoch nur als Ergänzung zu Anamnese, körperlicher Untersuchung und bildgebenden Verfahren oder bei einer Metastasierung, die der Bildgebung nicht zugänglich ist, empfohlen (Harris et. al., 2007; Rack et. al., 2007; Sturgeon et. al., 2008). Es ist dabei zu beachten, dass verschiedene Assays unterschiedlicher Hersteller zu signifikant

³ Cancer Antigen 15.3=Krebsantigen 15.3

⁴ Carcinoembryonic Antigen=Karzinoembryonales Antigen

unterschiedlichen Ergebnissen führen können (Molina et. al., 2005). Weitere Informationen zu CEA und CA 15-3 finden sich in 2.3.

Als weitere prognostische Faktoren sind Gewebe-uPA⁵ und -PAI-1⁶ zu nennen. Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp uPA und sein Inhibitor PAI-1 sind Teil des Plasminogen-Aktivierungssystems. Sie beeinflussen die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit eines Tumors sowie die Angiogenese (Rack et. al., 2007). Nach den Richtlinien der ASCO und der NACB können uPA und PAI-1 bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall bei der primären Diagnose im Operationspräparat bestimmt werden, um die Prognose abzuschätzen und Patientinnen zu identifizieren, bei denen eine adjuvante Chemotherapie nicht erforderlich ist beziehungsweise keinen zusätzlichen Nutzen bringt (Sturgeon et. al., 2008). Niedrige Level beider Parameter sind mit einem niedrigen Rezidivrisiko assoziiert, während hohe Level mit einem hohen Risiko einhergehen. Es ist zudem bekannt, dass Patientinnen mit hohen Leveln besonders von einer adjuvanten Chemotherapie nach dem CMF⁷-Schema profitieren (Harris et. al., 2007; Rack et. al., 2007). Für die Bestimmung von uPA und PAI-1 mittels ELISA ist Tumorfriechgewebe oder Tumorgewebe, das unverzüglich nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff oder bei -80° C gelagert wurde, erforderlich (Mayr et. al., 2009).

Darüber hinaus bestehen große Hoffnungen, dass das Mammakarzinom in Zukunft durch Genexpressionsprofile und Microarrays genauer klassifiziert und damit spezifischer behandelt werden kann. Eine solche molekulare Klassifikation könnte zudem die Diagnosemöglichkeiten und die Rezidivvorhersage verbessern. Therapeutische Entscheidungen auf dieser Grundlage sollten derzeit nach Angabe des Tumorzentrums München nur im Rahmen von Studien erfolgen (Rack et. al., 2007). Mit dem „Oncotype DX assay“ wird mittels einer „reverse transcriptase“-PCR der Aktivierungszustand von 21 Genen, die mit Zellproliferation, Tumordinvasion und der Östrogen- bzw. Her2-Rezeptoraktivität assoziiert sind, untersucht. Mit einem mathematischen Algorithmus wird ein Rezidivscore ermittelt. Patientinnen mit einem hohen Score (größer 18 bis 100) profitieren deutlich von einer Chemotherapie, während Patientinnen mit einem niedrigen Score (kleiner 18) kaum von einer Chemotherapie profitieren (Schaller et. al., 2011). Nach den Empfehlungen der ASCO kann jedoch der „Oncotype DX assay“, ein Verfahren, das auf einer „reverse transcriptase“-PCR basiert, genutzt werden, um bei neu diagnostiziertem Mammakarzinom ohne Lymphknotenbefall und mit positivem

⁵ Urokinase Plasminogen Aktivator

⁶ Plasminogen Aktivator Inhibitor

⁷ Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluoruracil

Östrogenrezeptorstatus das Rezidivrisiko abzuschätzen. Durch den „Oncotype DX assay“ können Patientinnen mit niedrigem Rezidivrisiko erkannt werden, die von einer adjuvanten Behandlung mit Tamoxifen deutlich profitieren, jedoch keinen weiteren Vorteil durch eine adjuvante Chemotherapie (CMF-Schema) gewinnen (Harris et. al., 2007). Ähnliche Testverfahren werden auf ihren klinischen Nutzen und ihren sinnvollen Einsatz hin untersucht. Als Beispiele sind zu nennen „Mamma Print“, „Rotterdam Signature“ und „Breast Cancer Gene Expression Ratio“ (Harris et. al., 2007).

Des Weiteren wird der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark als viel versprechender prognostischer Faktor diskutiert, jedoch noch nicht von der ASCO empfohlen. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark kann unter anderem mittels Antikörpern gegen Zytokeratinkomponenten von Epithelzellen erfolgen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass mit dieser Methode alle Epithelzellen im Knochenmark nachgewiesen werden und keine Differenzierung zwischen gutartigen und bösartigen Zellen erfolgt. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass große Mengen von Epithelzellen im Knochenmark meist aus einer Neoplasie stammen. Aktuelle gepoolte Analysen zeigen, dass der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark unabhängige prognostische Relevanz sowohl bei der primären Diagnose als auch während der rezidivfreien Nachbeobachtungszeit besitzt (Harris et. al., 2007).

Klassische prädiktive Faktoren

Bis heute sind nur wenige Faktoren bekannt, die prädiktive Bedeutung besitzen und somit genutzt werden können, um die Therapie an die einzelne Patientin anzupassen.

Der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus besitzt prädiktive Aussagekraft hinsichtlich endokriner Behandlungsformen. Neuere Daten weisen zudem darauf hin, dass der Hormonrezeptorstatus auch prädiktive Bedeutung bei der neoadjuvanten Chemotherapie besitzt. Hormonnegative Tumore zeigen ein besseres Therapieansprechen (Rack et. al., 2007).

Der Her2neu-Gewebestatus ist wichtig als prädiktiver Faktor für die Therapie mit Trastuzumab (Rack et. al., 2007).

Außerdem gilt der Menopausenstatus als entscheidender prädiktiver Faktor für die ovarielle Ablation (Rack et. al., 2007).

Neue prädiktive Faktoren

Als vielversprechender neuer prädiktiver Faktor ist der Nachweis von Her2neu-ECD, also der extrazellulären Domäne von Her2neu, im Blut zu erwähnen. Mehrere Studien

konnten zeigen, dass eine Korrelation zwischen dem Her2neu- Gewebestatus und dem Nachweis von Her2neu-ECD im Blut besteht (Rack et. al., 2007).

Außerdem ist bekannt, dass eine Überexpression der Topoisomerase II α mit einem besseren Ansprechen auf eine Chemotherapie mit einem Anthrazyklin im Vergleich zu einer Chemotherapie nach dem CMF-Schema einhergeht (Rack et. al., 2007).

Auch eine Korrelation zwischen starker Ki-67-Expression und hohen Raten an Komplettremissionen nach neoadjuvanter Chemotherapie konnte gezeigt werden (Schaller et. al., 2011).

Daneben sind viele weitere prädiktive Faktoren Gegenstand intensiver Forschung. Es ist jedoch bis heute kein validierter Faktor bekannt, der möglichst ohne invasives Vorgehen bestimmt werden kann und vor Beginn oder frühzeitig während einer neoadjuvanten Chemotherapie anzeigt, ob die einzelne Patientin von einer bestimmten Therapie profitiert (Harris et. al., 2007; Rack et. al., 2007).

2.2 Apoptose

Der apoptotische Zelltod ist wesentlich für den Erhalt der Gewebekomöostase. Im menschlichen Organismus werden täglich ca. 10 Billionen Zellen durch Mitose neu gebildet. Ebenso viele werden durch Apoptose abgebaut, um die Gewebekomöostase zu erhalten (Elmore, 2007).

Störungen des Gleichgewichts zwischen Zelltod und Zellneubildung gehen mit der Entstehung von Erkrankungen einher. Ein Überwiegen der Zellproliferation ruft beispielsweise maligne Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen hervor. Eine gesteigerte Apoptose mit inadäquater Neubildung von Zellen zeigt sich hingegen bei degenerativen, ischämischen, inflammatorischen und traumatischen Erkrankungen sowie bei Infertilität und Immundefizienz (Danial und Korsmeyer, 2004).

Da die Zelltodrate bei malignen Erkrankungen dereguliert ist und gezielt durch Zytostatika beeinflusst wird, eignet sich hier die Konzentrationsbestimmung von zirkulierenden Apoptoseprodukten im Blut als Biomarker (Holdenrieder et. al., 2005; Beachy und Repasky, 2008).

2.2.1 Historischer Hintergrund

Die Geschichte der Zelltodforschung reicht zurück bis in die griechische Antike. Aristoteles und später Galenus von Pergamon untersuchten damals regressive Veränderungen an Larven bzw. Feten während der Ontogenese (Clarke und Clarke, 1996). Außerdem benutzte schon Hippokrates vor über 2000 Jahren den Begriff „Apoptose“, um eine bei

der Behandlung von Frakturen mit Bandagen entstehende Gangrän zu beschreiben (Diamantis et. al., 2008).

Erst im 19. Jahrhundert wurde der Zelltod jedoch systematisch von Anatomen und Pathologen erforscht. Als Erstbeschreiber des „programmierten Zelltods“ im Jahre 1842 gilt Karl Vogt. Er beobachtete Zelltodprozesse bei Kröten während der Metamorphose. Im Jahre 1858 führte Rudolph Virchow in seinen Ausführungen über die Zellpathologie die Begriffe „Nekrose“ und „Nekrobiose“ ein. Als „Nekrobiose“ bezeichnete er morphologische Phänomene wie Zelldegeneration, Gewebeerweichung und Mortifikation. Er erkannte zudem, dass Zelltod nicht nur unter pathologischen, sondern ebenso unter physiologischen Bedingungen auftritt (Diamantis et. al., 2008).

Im Jahre 1885 beschrieb Walther Flemming das Phänomen der Chromatolyse mit dem Auftreten von typischem halbmondförmigem pyknotischem Chromatin und apoptotischen Körperchen bei der Rückbildung postovarieller Follikel (Majno und Joris, 1995; Diamantis et. al., 2008).

Des Weiteren definierte Gräper 1914 die Chromatolyse als eine Form der Elimination von Zellen, die physiologischerweise in allen Organen des Menschen vorkomme. Er beobachtete, dass die Überreste der Zelle im Anschluss an die Chromatolyse von benachbarten Zellen entfernt und bei sehr großen Mengen auch in Organlumina freigesetzt werden (Majno und Joris, 1995). Glücksmann konnte diese Erkenntnisse 1951 bestätigen. Er fand heraus, dass die Chromatolyse beispielsweise bei der Ausbildung der Finger während der Embryogenese eine wichtige Funktion hat (Rich et. al., 1999). Ferner wurde der Begriff der Chromatolyse von Neurologen verwendet, um die Degeneration von Neuronen, die mit dem Verlust der Nissl-Substanz einhergeht, zu beschreiben (Diamantis et. al., 2008).

Erst 1960 wurde durch Majno entdeckt, dass während des Zelltods als wesentlicher Teil der biochemischen Prozesse Proteine denaturiert werden. Er schlug vor, zwischen dem ischämischen Zelltod und der Nekrose zu unterscheiden. Unter dem ischämischen Zelltod verstand er den Zeitpunkt, an dem die Zelle unweigerlich dem Zelltod zugeführt wird („point of no return“). Der ischämische Zelltod findet zudem einige Zeit vor der Nekrose und vor dem Auftreten sichtbarer histologischer Veränderungen in der Zelle statt (Majno und Joris, 1995).

Lockshin prägte im Jahre 1964 den Begriff des „programmierten Zelltods“. Tata und Lockshin konnten durch den Einsatz von RNA- und Protein-Inhibitoren den Zelltod verhindern. Sie zogen daraus den Schluss, dass der programmierte Zelltod eine Abfolge

genetisch determinierter Ereignisse darstellt (Lockshin und Williams, 1964; Rich et. al., 1999).

In den 1970er Jahren gelang den Zelltodforschern durch die Elektronenmikroskopie ein großer Durchbruch. John F. Kerr untersuchte damals an Ratten das Absterben von Leberzellen nach Abschnüren der Pfortader. In einigen Zellen der ischämiebedingt atrophischen Leber beobachtete er zunächst licht- und später elektronenmikroskopisch Abläufe, die er als „shrinkage necrosis“ bezeichnete. Andrew Wyllie, Sir Alastair Currie und Allison Crawford beobachteten elektronenmikroskopisch das gleiche Phänomen in embryonalem und endokrinen sowie in pathologisch verändertem Gewebe. Im Jahre 1972 führten sie gemeinsam den Begriff „Apoptose“ ein, um den Zelltod mit den typischen licht- und elektronenmikroskopischen Charakteristika zu beschreiben (Kerr, 1971; Kerr, 2002). „Apoptose“ ist ein griechisches Wort und bedeutet „Abfallen der Blätter eines Baumes im Herbst“ (Diamantis et. al., 2008).

Noch im gleichen Jahrzehnt veröffentlichten Horvitz und Sulston erste Erkenntnisse zur genetischen Regulation des Zelltods während der Embryogenese der Nematode *Caenorhabditis elegans*. Bei der Entwicklung von *C. elegans* werden zunächst 1090 Zellen gebildet, von denen jedoch genau 131 Zellen apoptotisch abgebaut werden, sodass der adulte Organismus nur noch aus 959 Zellen besteht. Horvitz und Sulston entdeckten 1977 *ced-3*⁸ als erstes bekanntes Gen, das an der genetischen Regulation der Apoptose beteiligt ist (Diamantis et. al., 2008). In den folgenden Jahren wurden weitere die Apoptose regulierende Gene bei *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* gefunden. Heute wissen wir, dass es im menschlichen Organismus Homologe zu den Schlüsselgenen von *C. elegans* gibt (Danial und Korsmeyer, 2004; Diamantis et. al., 2008).

Die Erforschung der biochemischen Grundlagen wurde zudem durch elektrophoretische Untersuchungen des Chromatins aus Zellen bestrahlten lymphatischen Gewebes vorangetrieben. In der Elektrophorese zeigte sich ein typisches Leiterphänomen mit DNA-Bruchstücken von etwa 200 Basenpaaren (Majno und Joris, 1995). Wyllie stellte das Leiterphänomen zu Beginn der 1980er Jahre in Zusammenhang mit der Apoptose, bei der die DNA durch eine endogene Endonuklease gespalten werde. Dies war der erste Schritt der Entdeckung der Nukleosomen als biochemische Marker der Apoptose (Cotter, 2009).

⁸ *Ced-3=cell death-3*



Abb. 1: DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese einer normalen Zelle (links) und einer apoptotischen Zelle mit dem typischen Leiterphänomen (rechts) (Cotter, 2009).

Das Interesse an der Zelltodforschung ist seitdem immens. Doch trotz weitreichender Erkenntnisse sind die biochemischen Grundlagen auch heute noch nicht vollständig aufgedeckt. Der aktuelle Wissensstand wird in den folgenden Kapiteln in seinen Grundzügen dargestellt.

2.2.2 Morphologie der Apoptose und weiterer Zelltodformen

Aufbauend auf den Erkenntnissen von Kerr et al. (Kerr, 1971) wird bis heute anhand der morphologischen Charakteristika im Wesentlichen zwischen den zwei Zelltodformen Nekrose und Apoptose unterschieden. Äußere Auslöser wie z.B. starke Ischämie, Traumata oder Bestrahlung führen zur Nekrose der Zellen. Leichte Schädigungen der Zelle können jedoch auch die Apoptose einleiten. Außerdem wird eine Zelle, die alt, nicht mehr funktionsfähig oder für die Funktion eines Organs nicht mehr wichtig ist, physiologischerweise durch Apoptose abgebaut.

Nekrose

Die Nekrose findet unter pathologischen Bedingungen statt, betrifft immer ganze Gruppen von Zellen und zeigt sich makroskopisch als abgestorbenes Gewebe. Sie läuft passiv und energieunabhängig ab.

Äußere Schädigungen der Zelle betreffen zunächst das endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien und das Ubiquitin-System. Durch Dysfunktion der ATPasen und Energiemangel schwellen die genannten Organellen sowie die Zelle als Ganze an und die Membranen werden durchlässiger. Es kommt zu starkem Wassereinstrom in die Zelle.

Im Zellkern verklumpt unterdessen das Chromatin und wird unspezifisch fragmentiert. An der Zelloberfläche kann ein Phänomen, das als „Blebbing“ bezeichnet wird, beo-

bachtet werden: es bilden sich Bläschen, die immer größer werden und schließlich aufplatzen. Auch die Plasmamembran rupturiert letztlich und Zellbestandteile werden in den Extrazellulärraum freigesetzt. Hierdurch wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst und benachbarte Zellen werden durch freigesetzte Lysosomen angegriffen. Nach ca. 12 bis 24 Stunden ist der nekrotische Zelltod beendet (Kerr et. al., 1994; Majno und Joris, 1995).

Apoptose

Die Apoptose findet im Gegensatz zur Nekrose sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen statt. Unter physiologischen Bedingungen kommt ihr als Gegenstück der Mitose große Bedeutung beim Erhalt der Gewebekomöostase zu. Bei geringfügiger Schädigung kann eine Zelle ebenfalls durch Apoptose sterben, sofern ihr ausreichend Energie zur Verfügung steht. Die Apoptose betrifft charakteristischerweise einzelne Zellen und läuft ohne umgebende Entzündungsreaktion ab.

Bei Beginn der Apoptose einer Zelle kann elektronenmikroskopisch zunächst eine Kondensation des Chromatins im Nukleus beobachtet werden. Das Chromatin wird pyknotisch und lagert sich in Form von Halbmonden an der Innenseite der Kernmembran an. Die DNA wird indes spezifisch durch Endonukleasen an den Linker-Regionen gespalten, sodass zunächst Stücke von 50-300 Basenpaaren und schließlich Oligonukleosomen mit einer Länge von 180 Basenpaaren entstehen.

Sowohl die gesamte Zelle als auch der Zellkern schrumpfen und verdichten sich. Kerr bezeichnete die Apoptose daher zunächst als „shrinkage necrosis“. Der Zellkern kann dabei aufbrechen, was als Karyorhexis bezeichnet wird.

Während die Funktion der Mitochondrien, Lysosomen und der Plasmamembran zunächst noch erhalten bleibt, werden die Zellorganellen in membranständige Vesikel verpackt. Dies wird im Elektronenmikroskop als sogenanntes „Budding“ an der Zellmembran sichtbar. Die Vesikel werden schließlich von der Zellmembran abgeschnürt. Diese freigesetzten apoptotischen Körperchen werden rasch von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert und in den Lysosomen dieser Zellen degradiert. Da die apoptotischen Körperchen auf diesem Weg schnell entfernt werden und keine freien Zellbestandteile in den Extrazellulärraum gelangen, entsteht keine Entzündungsreaktion (Majno und Joris, 1995; Elmore, 2007).

Vom Beginn der Apoptose bis zur Bildung der apoptotischen Körperchen vergehen nur einige Minuten. Nach wenigen Stunden ist auch die Phagozytose dieser Körperchen abgeschlossen (Kerr et. al., 1994).

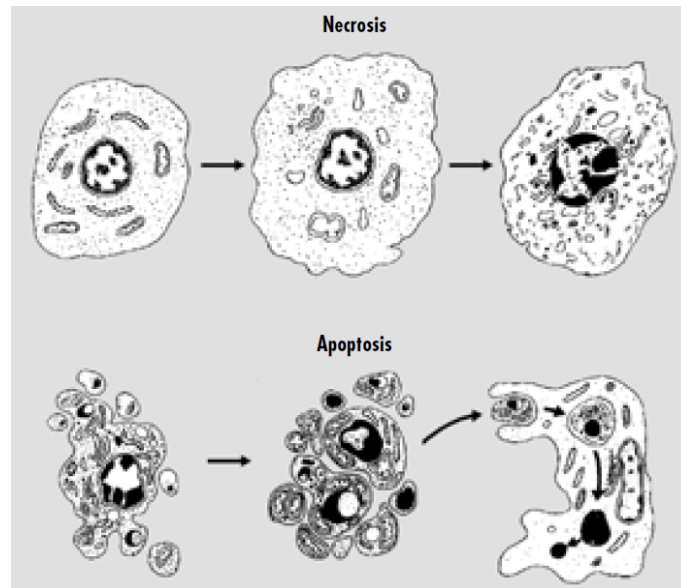


Abb. 2: Morphologische Charakteristika der Nekrose (oben) und der Apoptose (unten) (Krammer, 2000).

Weitere Formen des Zelltods

Über Jahrzehnte hinweg wurde ausschließlich zwischen der Nekrose und der Apoptose unterschieden. Heute wissen wir jedoch, dass diese beiden Formen des Zelltods nicht immer klar gegeneinander abgegrenzt werden können. Sie können unabhängig voneinander, nacheinander oder sogar gleichzeitig ablaufen. Die Art oder der Grad des Stimulus entscheidet darüber, ob die Zelle nekrotisch oder apoptotisch werden soll. Stimuli wie Hitze, Bestrahlung, Hypoxie und Zytostatika können in geringer Dosis die Apoptose induzieren, während sie in höherer Dosis zum nekrotischen Zelluntergang führen. Darüber hinaus könnte der Nekrose und der Apoptose nach Zeiss et al. ein gemeinsames biochemisches Netzwerk zugrunde liegen (Zeiss, 2003). Nach Zeiss et al. beginnt der Tod der Zelle mit der Apoptose. Steht der Zelle jedoch kein ausreichendes Angebot an Caspasen und ATP zur Verfügung, schlägt die Zelle den Weg der Nekrose ein. Zeiss et al. bezeichnen dies als „Apoptose-Nekrose-Continuum“ (Zeiss, 2003; Elmore, 2007).

Eine sekundäre Nekrose mit Entzündungsreaktion kann darüber hinaus nach primärer Apoptose auftreten, wenn die apoptotischen Körperchen nicht ausreichend durch Phagozyten aufgenommen werden (Leist und Nicotera, 1997).

Nach Majno et al. bezieht sich der Begriff „Nekrose“ nicht auf den Prozess des Zelltods, sondern vielmehr auf das Bild, das sich nach dem Zelltod zeigt. Majno et al. verwenden daher den Begriff „Onkose“, um den Prozess, der zur Nekrose mit Karyolyse und Anschwellen der Zelle führt, zu beschreiben (Majno und Joris, 1995).

Je genauer die Biochemie des Zelltods erforscht ist, desto deutlicher wird, dass neben der Apoptose weitere genetisch regulierte, energieabhängige Zelltodmechanismen existieren. Diese können unter dem Begriff des „programmierten Zelltods“ zusammengefasst werden. Dieser Begriff beschreibt physiologische Zelltodformen, die genetisch getriggert werden, ohne jedoch die Art des Zelltods genauer zu spezifizieren (Holdenrieder und Stieber, 2004a).

Für Zelltodmechanismen, die morphologisch sowohl der Nekrose als auch der Apoptose ähneln und dem programmierten Zelltod zugeordnet werden können, wurde die Bezeichnung „Aponekrose“ vorgeschlagen.

Sperandio et al. beobachteten während der Entwicklung in transgenen Mausmodellen der Chorea Huntington und der Amyotrophen Lateralsklerose eine Form des Zelltods, die weder der Nekrose noch der Apoptose morphologisch ähnelt. Sie bezeichnen diese Form des Zelltods als „Paraptose“.

Ein weiteres wichtiges Zelltodmodell ist die „Autophagie“ der Zelle. Teile des Zytoplasmas oder der Zellorganellen, die für die Funktion der Zelle nicht mehr gebraucht werden oder sogar schädlich für die Zelle sind, können in Vesikel verpackt und anschließend in den zelleigenen Lysosomen degradiert werden. Die Zelle kann sich also selbst kannibalisieren. Wie die Apoptose läuft auch die Autophagie unter Verbrauch von Energie und Synthese bestimmter Proteine ab. Man findet die Autophagie physiologischerweise bei Entwicklungsvorgängen, unter pathologischen Bedingungen als Reaktion auf ein unzureichendes Nährstoffangebot und bei bestimmten Krankheiten. Es wird postuliert, dass die Autophagie und die Apoptose miteinander verknüpft sind und ein Umstellen der Autophagie auf den apoptotischen Zelltod möglich ist (Elmore, 2007). Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren genauer beleuchtet, dass die Autophagie wie die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen spielt (Kirkegaard und Jaattela, 2009).

2.2.3 Biochemische Grundlagen der Apoptose

Die Apoptose kann über verschiedene Wege eingeleitet werden. Die wohl am besten erforschten Möglichkeiten sind der extrinsische über Todesrezeptoren vermittelte Weg, der intrinsische Weg, bei dem proapoptische Proteine aus den Mitochondrien freigesetzt werden, und die Induktion durch Zellen des Immunsystems über die Freisetzung von Granzymen. Alle drei Wege münden in einer gemeinsamen Endstrecke, der Aktivierung von Effektorcaspasen (Elmore, 2007).

Caspasen

Caspasen sind die Schlüsselenzyme der Apoptose. Sie sind Cysteiny-Aspartat-spezifische Proteasen. Es handelt sich also um Enzyme, die in ihrem aktiven Zentrum einen Cysteinrest tragen und Peptidbindungen c-terminal eines Aspartatrests spalten (Danial und Korsmeyer, 2004). Bis heute sind 14 verschiedene Caspasen bekannt, von denen ca. 2/3 bei der Apoptose beteiligt sind. Allen anderen Caspasen werden Funktionen bei der Prozessierung von Zytokinen und bei Entzündungsvorgängen zugeschrieben. Caspasen liegen in inaktiver Form als Proenzyme, sogenannte Zymogene, vor. Zymogene setzen sich aus je einer n-terminalen Prodomäne, einem p20/p10-Heterodimer und einer aktiven Einheit zusammen. Durch Spaltung der Peptidbindungen zwischen p20 und p10 sowie an der Prodomäne c-terminal eines Aspartatrests kann die Caspase aktiviert werden. Man unterscheidet Initiator- und Effektorcaspasen. Während Initiatorcaspasen durch Protein-Protein-Interaktion aktiviert werden, werden Effektorcaspasen meist durch proteolytische Spaltung von Initiatorcaspasen aktiviert (Hengartner, 2000). Zu den ca. 100 bekannten Substraten der Caspasen gehören im Rahmen der Apoptose neben anderen Caspasen auch DNasen, Inhibitoren von DNasen und Phospholipase A2 (Hengartner, 2000; Fadeel und Orrenius, 2005).

Caspasen sind für die intrazelluläre Transduktion des Apoptosesignals und einige der typischen morphologischen und biochemischen Charakteristika der Apoptose verantwortlich. Die Caspasen 3 und 7 aktivieren beispielsweise durch proteolytische Spaltung die CAD (caspasenaktivierte DNase), die die nukleäre DNA derart fragmentiert, dass in der Elektrophorese das typische Leiterphänomen beobachtet werden kann (Hengartner, 2000; Danial und Korsmeyer, 2004). Des Weiteren erfolgt die Spaltung der Kernmembran, die das typische „shrinking“ und „budding“ hervorruft, über die Aktivierung von Caspasen. Am Ende der Apoptose wird das Zytoskelett der Zelle, u.a. die Proteine Fodrin und Gelsolin, caspasenvermittelt reorganisiert (Hengartner, 2000).

Beim Abbau des Zytoskeletts epithelialer apoptotischer Zellen werden Zytokeratine, also wichtige intrazelluläre Strukturproteine, durch Caspasen gespalten. Hierbei entstehen Zytokeratinspaltprodukte, deren Bedeutung als Biomarker für benigne und maligne Erkrankungen bereits vielfach untersucht wurde. Als Beispiele sind zu nennen: CYFRA 21-1 (Spaltprodukt von Zytokeratin 19), TPA⁹ (Spaltprodukt von Zytokeratin 8, 18 und

⁹ tissue polypeptide antigen

19), TPS¹⁰ (Spaltprodukt von Zytokeratin 18) und M30-Antigen (Spaltprodukt von Zytokeratin 18) (Holdenrieder und Stieber, 2004a).

Todesrezeptoren und extrinsische Einleitung der Apoptose

Die sogenannten Todesrezeptoren sind Transmembranproteine, die zur TNF-Rezeptor-Familie zählen. Verschiedene Module, z.B. die Todesdomäne (DD) und die Todeseffektordomäne (DED) befähigen sie zur homotypischen Interaktion. Bindet extrazellulär ein spezifischer Ligand der TNF-Familie an den Todesrezeptor, wird die Apoptose der Zelle auf extrinsischem Weg eingeleitet. Das Todessignal wird intrazellulär über eine Caspasenkaskade weitergeleitet. Am Schluss der Caspasenkaskade steht die Aktivierung von Effektorcaspasen, die Todessubstrate spalten. Es sind heute viele verschiedene Todesrezeptoren mit den entsprechenden Liganden bekannt. Beispiele sind FasR/FasL, TNFR1/TNF- α , DR3/Apo3L, DR4/Apo2L und DR5/Apo2L (Krammer, 2000).

Der Todesrezeptor FasR ist am besten erforscht. Der durch FasR eingeleitete Signalweg soll daher als Beispiel für todesrezeptorvermittelte Apoptosewege genauer erläutert werden. FasR wurde im Jahre 1989 als erster Todesrezeptor entdeckt (Yonehara et. al., 1989). Synonym werden heute die Bezeichnungen Apo-1- und CD 95-Rezeptor verwendet. FasR wird in den meisten Säugetiergeweben exprimiert und kann als Splicevariante auch in löslicher Form vorliegen. Der spezifische Ligand von FasR wird FasL genannt. FasL wird im Gegensatz zu FasR nur in aktivierten T- und B- Lymphozyten, in natürlichen Killerzellen sowie in einigen nicht-lymphatischen Geweben wie Hoden (Yu et. al., 1999) und vorderer Augenkammer (Griffith et. al., 1995) exprimiert. Eine lösliche Form von FasL wurde ebenfalls beschrieben (Kayagaki et. al., 1995; Mariani et. al., 1995). Die Bindung von FasL an FasR induziert die Apoptose über eine Trimerisierung des Rezeptors, die die Bildung eines Proteinkomplexes auf der zytosolischen Seite der Zellmembran ermöglicht. Dieser Proteinkomplex wird DISC¹¹ genannt (Krammer, 2000).

¹⁰ tissue polypeptide-specific antigen

¹¹ DISC = death inducing signalling complex = apoptoseinduzierender Signalkomplex

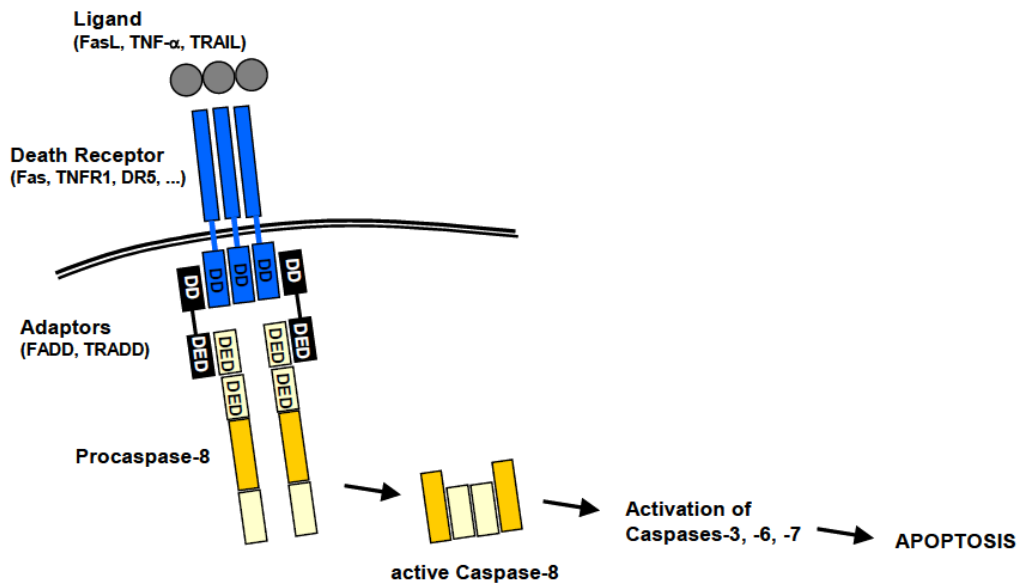


Abb. 3: Death inducing signalling complex (Gewies, 2003).

Der Signalkomplex setzt sich aus FasR, dem Adaptorprotein FADD/MORT und der Procaspase 8 zusammen. Das Adaptorprotein FADD/MORT bindet mit seiner Todeseffektordomäne an die Todesdomäne von FasR. Mit der Todeseffektordomäne von FADD/MORT wird die Procaspase 8 rekrutiert. In Typ I Zellen stellt der darauf folgende Signalweg eine reine Caspasenkaskade dar. Die autokatalytische Spaltung der Procaspase 8 zur aktiven Caspase 8 mündet direkt in der Aktivierung von Effektorcaspasen, u.a. der Caspase 3. Im Gegensatz dazu wird in Typ II Zellen nicht ausreichend DISC und Procaspase 8 gebildet, sodass eine Verstärkung des Todessignals über die Mitochondrien erforderlich ist. Die Caspase 8 kann in diesen Zellen das proapoptotische Protein Bid spalten und damit den Mitochondrien-vermittelten Signalweg induzieren, der mit der Ausschüttung von Cytochrom c, der Bildung des Apoptosoms und der Aktivierung der Caspase 9 einhergeht und ebenfalls in der Aktivierung der Caspase 3 mündet (Li et. al., 1998; Krammer, 2000).

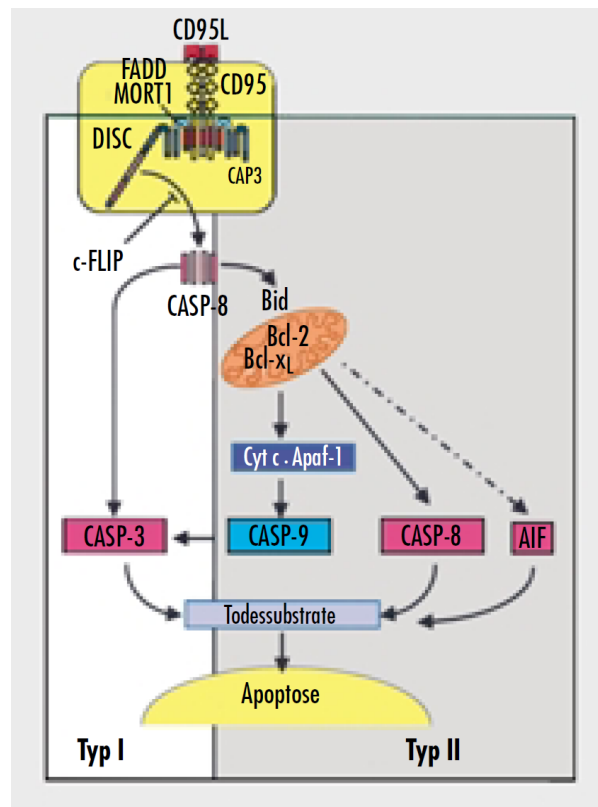


Abb. 4: Unterschiede von Signalwegen der Apoptose in Typ I- und Typ II-Zellen (Krammer, 2000).

Intrinsische Einleitung der Apoptose

Äußere Einflüsse können die Zelle auch auf dem intrinsischen Weg der Apoptose zuführen. Die nicht rezeptorvermittelten Stimuli der Apoptose umfassen sowohl negative Signale wie das Fehlen bestimmter Wachstumsfaktoren, Hormone oder Zytokine als auch positive, die Zelle schädigende Signale wie Bestrahlung, Toxine, Hypoxie, Hyperthermie, virale Infektionen oder freie Radikale (Elmore, 2007).

Die Mitochondrien, die vor allem als Energieproduktionsstätten der Zellen bekannt sind, spielen bei der intrinsischen Einleitung der Apoptose und bei der rezeptorvermittelten Apoptose in FasR-Typ-II-Zellen eine zentrale Rolle. Während der Apoptose öffnen sich Poren in der inneren Mitochondrienmembran. Dieser Vorgang, der als Permeabilitätstransition bezeichnet wird, verursacht einen starken Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials. Nach der Permeabilitätstransition wird aus den Mitochondrien eine Vielzahl proapoptotischer Proteine, die in 2 Gruppen unterteilt werden können, freigesetzt. Die Proteine der einen Gruppe aktivieren den caspasenvermittelten Signalübertragungsweg, während die Proteine der anderen Gruppe für die Kondensation des Chromatins verantwortlich sind (Elmore, 2007).

Die erste Gruppe umfasst Cytochrom c, Smac/DIABLO und die Serinprotease HtrA2/Omi. Cytochrom c ist ein essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette. Wird es im Rahmen der Apoptose aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt, wird es dort an APAF-1¹² gebunden. Der so gebildete Komplex wird Apoptosom genannt und aktiviert die Caspase 9. Die Caspase 9 aktiviert ihrerseits Effektorcaspasen wie die Caspase 3 (Elmore, 2007).

Zur zweiten Gruppe proapoptotischer Proteine zählen AIF¹³, Endonuklease G und CAD¹⁴. AIF transloziert nach der Freisetzung aus den Mitochondrien in den Zellkern und spaltet dort die DNA in Stücke von ca. 50-300 Kilobasen. Das Chromatin wird dadurch zum ersten Mal verdichtet. AIF besitzt außerdem Proteasenaktivität. Sie kann der Caspase 3 ähnliche Caspasen aktivieren und die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran induzieren. Auch Endonuklease G transloziert in den Zellkern, um das Chromatin zu spalten. Eine weitere Fragmentierung der DNA in Oligonukleosomen erfolgt durch die CAD. Die CAD muss jedoch zuvor durch die Caspase 3 oder 7 aktiviert werden, indem die inhibitorische Untereinheit ICAD abgespalten wird (Elmore, 2007).

Induktion der Apoptose durch Zellen des Immunsystems mittels Granzymen

Natürliche Killerzellen, T- und B-Lymphozyten können zur Abwehr von Fremdantigenen oder körpereigenen entarteten Zellen die Apoptose über die Ausschüttung von Granzymen induzieren. Granzym B kann bei der Apoptose über drei unterschiedliche Mechanismen wirken. Granzym B kann direkt die Effektorcaspase 3 aktivieren. Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung der Procaspase 10, die ihrerseits die Effektorcaspase 3 proteolytisch aktiviert. Darüber hinaus kann Granzym B Bid spalten und somit die Freisetzung proapoptotischer Proteine aus den Mitochondrien bewirken (Elmore, 2007).

Inhibitoren und Aktivatoren der Apoptose

Da fast alle Zellen des menschlichen Organismus Todesrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, muss die Einleitung der Apoptose streng reguliert werden. Die Modulation und insbesondere die Inhibition der Apoptose können dabei auf verschiedenen Ebenen stattfinden.

¹² APAF-1 = apoptotic protease activating factor 1

¹³ AIF = apoptosis inducing factor = Apoptoseinduzierender Faktor

¹⁴ CAD = caspases activated DNase = caspasenaktivierte DNase

Direkt zu Beginn der rezeptorvermittelten Signalkaskade können verschiedene Moleküle wie FLIP die Apoptose hemmen, indem sie die Rekrutierung der Caspase 8 und damit die Aktivierung des DISC verhindern. FLIP, die von Viren produziert werden, heißen v-FLIP. FLIP, die von Säugetierzellen hergestellt werden, nennt man hingegen c-FLIP (Krammer, 2000).

Einen weiteren Angriffspunkt der Apoptoseinhibition stellen die Mitochondrien dar. Mitglieder der Bcl-2-Familie können hier pro- oder antiapoptotisch wirken.

Kurz vor Abschluss der Apoptose können darüber hinaus die Caspase 9 und die Effektorcaspasen 3 und 7 durch Inhibitoren der Apoptoseproteine (IAP, inhibitors of apoptosis proteins) gehemmt werden. Die IAP werden ihrerseits durch weitere Moleküle wie Smac oder XAF 1 (X-linked IAP associated factor 1) und ubiquitinvermittelte Degradierung reguliert (Fadeel und Orrenius, 2005).

Gemeinsame Endstrecke

Nachdem die Apoptose über Zellen des Immunsystems, auf extrinsischem oder intrinsischem Weg eingeleitet wurde und das Todessignal intrazellulär weitergegeben wurde, wird das Zytoskelett der Zelle durch die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 gespalten und reorganisiert. Daneben wird die CAD aktiviert und die nukleäre DNA in Oligonukleosomen fragmentiert. An der Plasmamembran wird Phosphatidylserin an der Außenseite externalisiert. Phosphatidylserin ist neben weiteren Oberflächenmolekülen das wichtigste Erkennungssignal für phagozytierende Zellen. Benachbarte Zellen und Phagozyten erkennen die apoptotische Zelle und phagozytieren sie, ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen (Danial und Korsmeyer, 2004).

Genetische Regulation

Die Apoptose ist ein genetisch regulierter Prozess. Grundlegende Erkenntnisse über das genetische Zelltodprogramm wurden an der Nematode *Caenorhabditis elegans* gewonnen. Dieser Wurm, bei dessen Entwicklung zunächst exakt 1090 Zellen gebildet werden und während der Entwicklung genau 131 apoptotisch entfernt werden, erwies sich als geeigneter Modellorganismus für die Erforschung der genetischen Regulation der Apoptose im Säugetierorganismus (Danial und Korsmeyer, 2004).

Es wurden zunächst die Gene Ced 3, 4 und 9 und ihre Bedeutung für die Regulation der Apoptose entdeckt. Ced 3 und 4 zeigen proapoptotische Eigenschaften, während Ced 9 die Zelle vor dem Zelltod schützt. Kurz darauf wurde Egl-1¹⁵ als Initiator der Apoptose

¹⁵ Egg laying defense

entdeckt. Heute sind viele Homologe der apoptoseregulierenden Gene von *C. elegans* im Säugetierorganismus bekannt (Danial und Korsmeyer, 2004).

Bcl-2 ist das menschliche Homolog zu Ced-9. Bcl-2 wurde als Onkogen, das durch die Translokation t (14;18) in follikulären B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird, bekannt. Bcl-2 ruft nicht wie viele Onkogene eine Steigerung der zellulären Proliferationsrate hervor, sondern es verhindert die Apoptose der Zelle. Bcl-2 bildet zusammen mit heute 24 weiteren bekannten Molekülen mit pro- oder antiapoptotischen Eigenschaften die Bcl-2-Familie. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie mit proapoptotischen Eigenschaften umfassen unter anderem Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, PUMA und NOXA. Antiapoptotische Wirkung besitzen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w und BAG. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie scheinen ihre regulatorische Funktion auf die Apoptose der Zelle insbesondere über die Modulation der Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien auszuüben (Elmore, 2007).

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellneubildung und dem Zelltod kommt dem Tumorsuppressorprotein p53 zu. p53 wird daher auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Sionov und Haupt, 1999). In gesundem Gewebe lösen vielerlei Schädigungen der Zelle die Aktivierung von p53 aus, wodurch ggf. der Zellzyklus arretiert und die Apoptose der Zelle induziert wird. p53 vermag darüber hinaus direkt die Reparatur geschädigter DNA oder die Hemmung der Angiogenese zu initiieren. In über 50% der menschlichen Tumoren ist p53 jedoch mutiert und hat damit die Fähigkeit, das Wachstum geschädigter Zellen zu stoppen, verloren. Bei anderen Tumoren wurden zudem Defekte bei der Induktion der p53-Funktion beobachtet (Sionov und Haupt, 1999; Woods und Vousden, 2001).

Ein weiterer Regulator der Gewebekomöostase ist myc, das den Transkriptionsfaktor c-myc kodiert. Bei Vorhandensein von Wachstumsfaktoren regt die Expression von c-myc in der Zelle die Mitose, also die Bildung neuer Zellen, an. Wird die Zelle jedoch nicht ausreichend durch Wachstumsfaktoren stimuliert, kann die Expression von c-myc auch die Apoptose der Zelle induzieren. Myc ist wie p53 in vielen maligne entarteten Zellen mutiert, was in einer Deregulation sowohl der Zellneubildung als auch der Apoptose resultiert. Myc wird daher als Protoonkogen bezeichnet (Evan et. al., 1992; Cotter, 2009).

2.2.4 Die physiologische Bedeutung der Apoptose

Die präzise regulierte Apoptose mit hoher Spezifität und Effizienz ist essentiell für die Bildung, den Erhalt und die Reparatur von Geweben (Meier et. al., 2000).

Bei der Entwicklung des Fötus im Mutterleib wird zur Ausbildung verschiedener Organe und Körperteile zunächst ein Überschuss an Zellen produziert. Nur wenn bestimmte Zellen zu einem definierten Zeitpunkt durch Apoptose sterben, entsteht ein gesunder Fötus.

Man findet diesen Mechanismus z.B. bei der Bildung der primären Geschlechtsorgane. In jedem menschlichen Organismus werden zunächst sowohl weibliche als auch männliche Geschlechtsmerkmale angelegt. Erst durch die Rückbildung des Wolff- beziehungsweise Müller-Gangs durch apoptotischen Zelltod wird das Geschlecht des Fötus eindeutig festgelegt (Meier et. al., 2000).

Außerdem muss bei der Bildung von Händen und Füßen überschüssiges interdigitales mesenchymales Gewebe durch Apoptose abgebaut werden. Erst dadurch werden einzelne Finger und Zehen ohne Schwimmhäute modelliert (Danial und Korsmeyer, 2004).

Weitere Beispiele der Organogenese mit Produktion überzähliger Zellen sind die Ausbildung von Darmlumina, Gelenkhöhlen und die Morphogenese des Gesichts.

Auch postnatal ist die Apoptose wichtiger Bestandteil der weiteren Entwicklung. Im zentralen Nervensystem sterben beispielsweise über 50% der ursprünglich gebildeten Neurone aufgrund mangelnder neurotropher Faktoren. Nur die Neurone, die korrekte synaptische Verbindungen ausbilden, werden durch Neurotrophine stimuliert und überleben (Yuan und Yankner, 2000; Madden und Cotter, 2008).

Des Weiteren kommt der Apoptose im menschlichen Organismus große Bedeutung bei der Funktion des Immunsystems zu. Es werden fortlaufend neue Lymphozyten gebildet, die jedoch nicht alle voll funktionsfähig sind. Im gesunden Organismus werden daher Lymphozyten, die Fremdartigene nicht erkennen oder gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, apoptotisch eliminiert. Überdies können reife zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen die Apoptose in als schädlich erkannten Zellen induzieren (Bellamy et. al., 1995).

Bei der Heilung von Wunden wird eine exzessive Fibrosierung mit Narbenbildung durch Apoptose vermieden.

Ferner zeigt sich apoptotischer Zelltod bei der postovulatorischen Atresie eines unfruchteten Follikels und bei Involutionen wie z.B. der Involution der Mamma beim Abstillen (Elmore, 2007).

Neben all diesen Beispielen darf nicht vergessen werden, dass die Apoptose eine immense Bedeutung für den Erhalt der Gewebemöostase hat. Täglich entstehen im menschlichen Organismus ca. 10 Billionen neue Zellen durch Mitose. Durch genau re-

gulierte Apoptose alter, nicht mehr funktionsfähiger und schädlicher Zellen, wird das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelltod aufrechterhalten (Renehan et. al., 2001).

2.2.5 Die pathogenetische Bedeutung der Apoptose

Im gesunden Organismus wird das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod genauestens reguliert. Eine Störung dieses Gleichgewichts spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Hierzu zählen entzündliche Erkrankungen, Infektionserkrankungen wie beispielsweise AIDS, neurodegenerative Erkrankungen sowie durch Trauma und Ischämie bedingte Erkrankungen. Wie im folgenden Bild dargestellt ist, überwiegt bei einigen dieser Erkrankungen die Zellneubildung und bei anderen eher der Zelltod.

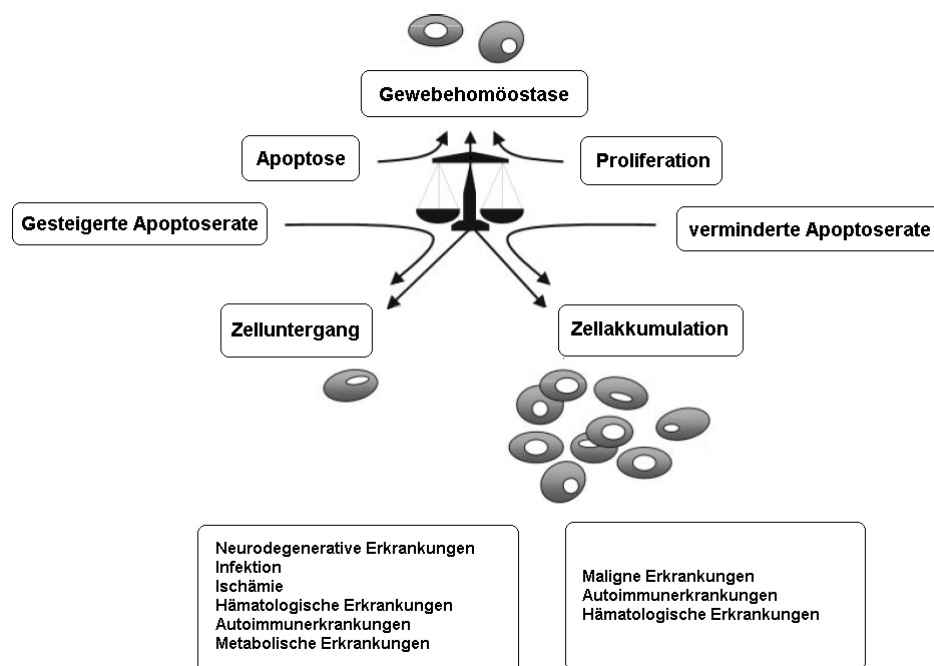


Abb. 5: Funktion der Apoptose für den Erhalt der Gewebemöostase modifiziert nach (Robertson et. al., 2002).

Bei der Entstehung maligner Erkrankungen überwiegt die Neubildung von Zellen gegenüber dem Zelltod. Es können sowohl eine gesteigerte Proliferationsrate, als auch eine erniedrigte Zelltodrate beteiligt sein. Auch eine Kombination aus beidem oder eine gleichsinnige Veränderung der Proliferations- und Zelltodrate mit Überwiegen der Wachstumskomponente wurden in Tumorgewebe beobachtet. Man geht heute davon aus, dass eine Zelle beziehungsweise ein Gewebe bei der Tumorigenese eine mehrstufige Entwicklungssequenz durchläuft. Normales Gewebe wird zunächst metaplastisch

und entartet schließlich. Während dieser Entwicklung erwirbt die Zelle verschiedene Fähigkeiten, die sie letztlich als maligne entartete Zelle auszeichnen: die Fähigkeit, unabhängig von Wachstumsfaktoren zu wachsen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Umgehung der Apoptose, unbegrenztes Potential sich zu teilen, Verstärkung der Angiogenese und Infiltration in umgebendes Gewebe sowie Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000).

Aotake et al. untersuchten das Ausmaß und Verhältnis von Apoptose, Proliferation und Angiogenese bei der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms. Am Übergang von normalen Epithelien zu Adenomen mit geringgradiger Dysplasie ist hier zunächst eine Steigerung der Proliferationsrate mit gleichzeitig bestehender Steigerung der Apoptoserate zu beobachten. Dies scheint am ehesten auf einen Mangel an Nährstoffen, Sauerstoff und Wachstumshormonen im proliferierenden Gewebe zurückzuführen zu sein. Adenome mit geringgradiger Dysplasie entwickeln sich aus diesem Grund sehr langsam zu Karzinomen. Bei Adenomen mit hochgradiger Dysplasie zeigt sich hingegen eine deutliche Steigerung der Proliferationsrate bei einem Abfall der Apoptoserate. Das Auftreten dieser synergistischen Effekte kann durch Mutationen bestimmter Gene wie dem ras- oder APC¹⁶-Gen erklärt werden. Des Weiteren ist bei diesen Adenomen oft eine ausgeprägte Neoangiogenese zu beobachten, die in einer besseren Versorgung des Gewebes mit Energie resultiert. Im weiteren Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz tritt wieder eine Zunahme der Apoptoserate auf (Aotake et. al., 1999).

Neben den Veränderungen der entartenden Zellen selbst spielt bei der Karzinogenese jedoch auch das umgebende Gewebe (Tumorstroma) eine wichtige Rolle. Bestandteile des Tumorstromas wie beispielsweise Myofibroblasten und extrazelluläre Matrixproteine können zum Schutz der entartenden Zellen gegenüber der Apoptose beitragen. Daneben sind auch zelluläre Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Integrine zu erwähnen. Außerdem können vielfältige Interaktionen mit Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen zu Dedifferenzierung und Apoptoseresistenz beitragen (Sebens und Schaffer, 2011).

2.2.6 Verfahren zum Nachweis der Apoptose in vitro

Es sind heute viele verschiedene Verfahren zum Nachweis der Apoptose an Gewebeproben oder Zellen in vitro bekannt. All diese Verfahren basieren im Wesentlichen auf dem Nachweis bestimmter Oberflächen- oder intrazellulärer Moleküle (Beachy und Repasky, 2008).

¹⁶ APC=Adenomatöse Polyposis Coli

Die wohl einfachste Möglichkeit zum Nachweis der Apoptose stellt die Färbung von Zellen mit Hämatoxylin-Eosin und die anschließende lichtmikroskopische Darstellung der morphologischen Charakteristika der apoptotischen Zelle dar. Die Lichtmikroskopie bietet außerdem die Möglichkeit, apoptotische Zellen nach der Färbung mit Toluidin- oder Methylenblau sichtbar zu machen. Zur Bestätigung können die typischen ultrastrukturellen morphologischen Charakteristika der apoptotischen Zelle elektronenmikroskopisch dargestellt werden.

Darüber hinaus können mit der „DNA-Leiter-Technik“ Produkte der DNA-Spaltung durch Endonukleasen gezeigt werden. Die DNA wird hierzu aus einem homogenisierten Zelllysate extrahiert und per Agarose-Gel-Elektrophorese in Fragmente aufgetrennt. DNA aus apoptotischen Zellen weist dabei das typische Leiter-Phänomen mit DNA-Spaltprodukten, die ca. 180 Basenpaare lang sind, auf (Wyllie, 1980). Eine weitere Möglichkeit, die charakteristische Fragmentierung der DNA sichtbar zu machen, ist eine Methode, die als TUNEL¹⁷ bezeichnet wird. Das 3'-Ende der DNA-Fragmente wird bei dieser Methode enzymatisch markiert. Die markierten Fragmente können sodann licht- oder fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch erkannt werden.

Auch der Nachweis von Caspasen, deren Substraten wie beispielsweise M30-Antigen, Inhibitoren und Aktivatoren dient dem Nachweis der Apoptose. Mögliche Methoden hierzu sind Westernblotting, Immunpräzipitation und Immunhistochemie.

Zu den neueren Methoden zählen Apoptose-Microarrays. Mit Hilfe der Echtzeit-PCR kann die Expression verschiedener an der Apoptose beteiligter Gene untersucht werden. Hierzu zählen Gene, die für Rezeptoren und deren Liganden, intrazelluläre Modulatoren und Transkriptionsfaktoren kodieren.

Des Weiteren können Phosphatidylserinreste, die von apoptotischen Zellen an der Plasmamembran externalisiert werden, mit Annexin V markiert und fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden.

Auch apoptotische Prozesse, die auf mitochondrialer Ebene ablaufen, können durch Färbung mit fluoreszierenden Farbstoffen und konfokaler Lasermikroskopie dargestellt werden.

In größeren Mengen von Zellen kann Apoptose zudem durch die Färbung mit azidophilen Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Azidophile Farbstoffe färben Regionen mit hoher lysosomaler und phagozytischer Aktivität (Elmore, 2007).

¹⁷ TUNEL = Terminal dUTP Nick End-Labeling

2.2.7 Verfahren zum Nachweis der Apoptose in vivo

Zunehmend werden auch Verfahren, die den Nachweis der Apoptose im lebenden Organismus ermöglichen, bekannt. Gut erforscht ist der Einsatz von radiomarkiertem Annexin V. Der Nutzen dieses Verfahrens zeigte sich beispielsweise bei der Erkennung von Abstoßungsreaktionen bei Patienten nach Herztransplantation (Fadeel und Orrenius, 2005).

Außerdem bieten MRT-basierte Verfahren neue Möglichkeiten. In Mäusen mit Tumoren, die mit Zytostatika behandelt wurden, konnten apoptotische Zellen nach Gabe von Synaptotagmin mit der MRT dargestellt werden. Synaptotagmin ist ein Kontrastmittel, das an Phosphatidylserin auf der Oberfläche apoptotischer Zellen bindet (Fadeel und Orrenius, 2005).

2.2.8 Verfahren zum Nachweis der Apoptose in Körperflüssigkeiten

Es bestehen heute vielfältige Möglichkeiten, Apoptoseprodukte qualitativ und quantitativ in Körperflüssigkeiten wie Serum und Plasma, Urin, Liquor, Pleuraergüssen und Aszites nachzuweisen. Zu den nachweisbaren Apoptoseprodukten zählen Rezeptoren und deren Liganden wie Fas und FasL, Bestandteile des Zytoskeletts wie Zytokeratine und Laminine, intrazelluläre Enzyme wie LDH und NSE, Zellkernbestandteile wie Metalloproteinasen, DNA und Nukleosomen sowie Zelltodprodukte und Regulatoren wie Caspasen, Cytochrom c, APAF1, PARP, ICAD, Survivin, IAPs, Bcl-2 und p53 (Holdenrieder und Stieber, 2004a).

2.3 Marker

Bei malignen Erkrankungen wie dem Mammakarzinom ist die Apoptoserate dereguliert. Die Apoptoserate wird außerdem durch Zytostatika gezielt beeinflusst. Biomarker, die abhängig von der Apoptoserate ins Blut freigesetzt werden, bieten daher Potential zur Vorhersage beziehungsweise frühzeitigen Beurteilung der Therapieeffektivität (Holdenrieder und Stieber, 2004a).

Im Folgenden wird auf die Biomarker, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, genauer eingegangen.

2.3.1 MIF

Makrophagen-Migration-Inhibierungs-Faktor (MIF) ist ein Zytokin, das aus 115 Aminosäuren zusammengesetzt ist und ein Molekulargewicht von 12,5 kDa¹⁸ hat. In seiner Sekundärstruktur besteht MIF aus zwei antiparallel angeordneten α -Helices und sechs β -Faltblättern. Es weist damit große Ähnlichkeit zu MHC¹⁹-Molekülen auf. In der Tertiärstruktur findet man ein Homotrimer (Bach et. al., 2008). Ursprünglich wurde MIF im Jahre 1966 als Molekül, das von T-Lymphozyten exprimiert wird und die Migration von Makrophagen hemmt, beschrieben. Mittlerweile sind viele verschiedene immunstimulatorische und proinflammatorische Eigenschaften von MIF bekannt. MIF kann beispielsweise den MAPK²⁰-Signalweg, die Sekretion von Tumornekrosefaktor α und die Aktivität der Cyclooxygenase 2 verstärken. MIF wird bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie zum Beispiel rheumatoider Arthritis, Sepsis und Atherosklerose überexprimiert (Lue et. al., 2002; Calandra und Roger, 2003; Morand et. al., 2006; Zernecke et. al., 2008). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass MIF nicht nur von Immunzellen, sondern auch von verschiedenen parenchymalen und Tumorzellen sezerniert wird (Calandra und Roger, 2003). MIF spielt zudem bei der Regulation der Zellhomöostase, der Kanzerogenese und der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle. Es wurde beispielsweise vermutet, dass Tumorzellen durch die Sekretion von MIF über autokrine Amplifikation ihre Proliferation verstärken können. Des Weiteren weist MIF eine wichtige Funktion beim Zelltod auf, weil es über die Hemmung der p53-abhängigen Genexpression die Apoptose der Zelle blockieren kann (Hudson et. al., 1999). Eine Überexpression von MIF zeigte sich nicht nur in Mammakarzinom-Zelllinien und humanem Mammakarzinomgewebe, sondern auch in Malignomen der Prostata, der Lunge, der Haut, des Gehirns, der Leber und des Kolons (Yasasever et. al., 2007). Krockenberger et al. zeigten, dass MIF im Ovarialkarzinom überexprimiert ist und über Herunterregulation von NKG2D die antitumorale Aktivität von NK-Zellen unterdrücken kann. Normalerweise binden NK-Zellen an den NKG2D-Rezeptor auf der Oberfläche von Tumorzellen und erkennen diese als schädlich (Häusler, 2011). Neben dem Nachweis der MIF-Expression in Gewebeproben ist auch der Nachweis in Blutproben möglich. Erhöhte MIF-Konzentrationen im Serum fanden sich bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen wie Systemischen Lupus Erythematoses, Glomerulonephritis, Uveitis und Rheumatoider Arthritis sowie bei Patienten mit Neoplasien wie Prostatakarzinom (Meyer-Siegler et. al., 2002) und Magenkarzinom (Xia et. al., 2009). Bei Patienten mit

¹⁸ Kilodalton

¹⁹ Major Histocompatibility Complex

²⁰ Mitogen Activated Protein Kinase = Mitogenaktivierte Proteinkinase

Prostata- oder Magenkarzinom korrelierten hohe MIF-Konzentrationen im Serum mit einer schlechteren Prognose (Meyer-Siegler et. al., 2002; Xia et. al., 2009). Bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom zeigte sich eine positive Korrelation zwischen MIF-Expression im Tumorgewebe und den MIF-Levels im Plasma. Die MIF-Plasma-Levels korrelierten signifikant mit dem krankheitsfreien und Gesamtüberleben. Des Weiteren war 30 Tage nach Tumorresektion ein deutlicher Abfall der MIF-Plasma-Levels zu beobachten (Zhao et. al., 2011).

2.3.2 sFAS

Der Todesrezeptor Fas gehört zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie und findet sich auf der Oberfläche zahlreicher Zellarten, unter anderem auch auf Tumorzellen. Die Bindung eines spezifischen Liganden, wie FasL oder eines agonistischen Antikörpers, führt zur Trimerisierung des Fas-Rezeptors und induziert die Apoptose der betreffenden Zelle (siehe auch 2.2.3). Es ist bekannt, dass Störungen der Fas-vermittelten Apoptose eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren spielen. Physiologischerweise können zytotoxische T-Lymphozyten durch Produktion von FasL die Apoptose von Tumorzellen einleiten. Tumorzellen vermögen jedoch, durch Reduktion der Fas-Expression dieser lymphozyteninduzierten Apoptose zu entgehen. Da FasL auch auf Tumorzellen beobachtet wurde, wird vermutet, dass Tumorzellen darüber hinaus befähigt sind, die Apoptose von Immunzellen herbeizuführen. Durch alternatives mRNA-Splicing können aus dem Fas-Gen zwei verschiedene Fas-Formen entstehen: eine membranständige Form mit transmembranären Anteil und eine lösliche Form (sFas). Lösliches sFas spielt im Extrazellulärraum eine Rolle als sogenannter „Decoy-Rezeptor“²¹. Tumorzellen können sich durch Produktion von sFas, das FasL bindet, vor der Apoptose schützen (Boroumand-Noughabi et. al., 2010). Mit immunhistochemischen Methoden kann sFAS im Blut nachgewiesen werden. Erhöhte Konzentrationen von sFAS im Blut wurden bei Patienten mit verschiedenen hämatopoetischen (Knipping et. al., 1995) und nicht-hämatopoetischen (Midis et. al., 1996) malignen Erkrankungen beschrieben. Es ist derzeit nicht eindeutig geklärt, woher erhöhte sFas-Konzentrationen im Serum von Patienten mit malignen Erkrankungen stammen. Es werden im Wesentlichen folgende drei Theorien diskutiert: sFas könnte von den Tumorzellen selbst stammen (Owen-Schaub et. al., 1995), von peripheren Lymphozyten im Blut (Knipping et. al., 1995) oder vom den Tumor umgebenden Stroma nach Stimulation durch den Tumor oder das Immunsystem (Midis et. al., 1996). Diesen Theorien zufolge gehen hohe Konzentrationen von sFas im Serum von Patienten mit malignen Erkrankungen mit einer

²¹ Decoy (englisch) = Lockvogel

Hemmung der Apoptose in Tumorzellen sowie einer Induktion der Apoptose von Immunzellen einher. Ein Zusammenhang zwischen den sFas-Levels im Serum und der Effizienz von Tumorthapien konnte bereits gezeigt werden. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem inoperablem Rektumkarzinom fanden sich bei kompletter oder partieller Remission nach Radiochemotherapie signifikant niedrigere prä- und posttherapeutische sFas-Serumkonzentrationen als bei stabiler oder progredienter Erkrankung. Patienten mit Rektumkarzinom hatten zudem signifikant höhere prä- und posttherapeutische sFas-Serumkonzentrationen als gesunde Kontrollpersonen (Liang et. al., 2010). Außerdem zeigte sich bei 52 Patienten mit Bronchialkarzinom ein signifikanter Anstieg der sFas-Serumkonzentration 24 Stunden nach Applikation einer Chemotherapie. Dieser Effekt konnte nicht für die Fas-Expression im Tumorgewebe gezeigt werden. Die Patienten mit Bronchialkarzinom zeigten höhere prätherapeutische sFas-Levels als eine Kontrollgruppe bestehend aus 19 Patienten mit benignen Lungenerkrankungen und 35 gesunden Probanden. Darüber hinaus bestand eine statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen den prätherapeutischen sFas-Serumkonzentrationen und dem Gesamtüberleben (Ulukaya et. al., 2010).

2.3.3 sICAM

sICAM ist die lösliche Form eines interzellulären Adhäsionsmoleküls. Die zellmembranständige Form ICAM (CD54) zählt zu den Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie. ICAM ist Ligand für verschiedene Integrine und wird in vielen Geweben wie z.B. Lymphozyten, Endothel- und Epithelzellen exprimiert. Die Expression von ICAM wird durch proinflammatorische Zytokine stimuliert. Eine stabile Verbindung zwischen ICAM auf Leukozyten und dem Endothel ist essentiell für die Migration von Leukozyten zu Entzündungsherden. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass ICAM eine Rolle bei der Metastasierung von Tumoren spielt. Auch Tumorzellen scheinen sich über ICAM ans Gefäßendothel anlagern und sich somit über das Lymph- und Blutgefäßsystem ausbreiten zu können (O'Hanlon et. al., 2002; Gogali et. al., 2010). Es wird vermutet, dass Tumorzellen durch die Produktion von löslichem sICAM der Bekämpfung durch Zellen des Immunsystems entgehen (Koyama, 1994). Bei verschiedenen Neoplasien wurde zudem eine fehlende, verminderte oder gestörte Expression von Adhäsionsmolekülen beobachtet. Lösliche Formen von Adhäsionsmolekülen wie sICAM werden insbesondere durch proteolytische Spaltung, wie sie bei der Apoptose stattfindet, ins zirkulierende Blut freigesetzt. Bei malignen Erkrankungen entstammen im Blut zirkulierende lösliche Adhäsionsmoleküle entweder den Tumorzellen direkt oder tumorassoziiertem Stroma und spiegeln den Verlust von Diffusionsbarrieren sowie das Tumorumfängen wider (O'Hanlon et. al., 2002; Gogali et. al., 2010). Eine Chemotherapie kann Auswirkungen auf die sICAM-Serum-Levels bei Tumorerkrankungen haben. Bei 147

Patientinnen mit Mammakarzinom zeigte sich nach adjuvanter Chemotherapie ein signifikanter Anstieg der sICAM-Levels im Serum im Vergleich zu den prätherapeutischen Levels. Eine signifikante Korrelation zu prognostischen Kriterien konnte nicht gezeigt werden (Eggeman et. al., 2011).

2.3.4 tPAI-1

Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1), ein Glykoprotein mit aktivem Zentrum, ist Teil des Plasminogen Aktivator Systems. Zu diesem werden auch Plasminogen Aktivator Inhibitor 2 (PAI-2), Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), Gewebe Plasminogen Aktivator (tPA) und membrangebundener Rezeptor (uPAR) gezählt (Schneider et. al., 2008). PAI-1 wird unter physiologischen Bedingungen v. a. von Hepatozyten, Adipozyten, Zellen der glatten Muskulatur und Thrombozyten in den Extrazellularraum freigesetzt. Unter pathologischen Bedingungen finden sich jedoch größere Mengen an PAI-1, die dann auch von Tumorzellen, Endothelzellen nach Stimulation durch Zytokine und anderen an Entzündungsvorgängen beteiligten Zellen freigesetzt werden (Binder et. al., 2002). Das Plasminogen Aktivator System spielt insbesondere eine wichtige Rolle bei Gerinnungsvorgängen. Eine verstärkte Produktion von Plasmin aus Plasminogen führt zur Aktivierung der Fibrinolyse. Des Weiteren ist Plasmin an der Degradierung von Matrixproteinen, an der Aktivierung von Proteasen (z.B. Matrixmetalloprotease) und Wachstumsfaktoren beteiligt. PAI-1 übt bei diesen Vorgängen eine inhibierende Wirkung auf die Plasminproduktion aus (Schneider et. al., 2008). Es hemmt also die Fibrinolyse, beeinflusst die Zellmigration und spielt somit auch eine wichtige Rolle für die Invasions-, Metastasierungs- und Angiogenesefähigkeit von Tumoren (Minisini et. al., 2007). Des Weiteren beeinflusst es auf verschiedenen Wegen die Apoptose. Apoptose wird unter anderem durch einen Verlust der Zelladhäsion initiiert. PAI-1 kann daher über Hemmung der Plasminproduktion die Zelladhäsion verstärken und die Apoptose vermindern. Andererseits kann PAI-1 durch Bindung an Vitronektin die Zelladhäsion vermindern und somit eine apoptoseverstärkende Wirkung ausüben. Darüber hinaus kann PAI-1 die intrazelluläre Weiterleitung des Apoptosesignals stören, indem es das Schlüsselenzym Caspase 3 inhibiert. Dabei wird vermehrt FLIP exprimiert. FLIP wandelt das ursprüngliche proapoptotische Signal um in ein Signal, das die Proliferation von Lymphozyten anregt (Schneider et. al., 2008). Es wurde in mehreren Studien bestätigt, dass die PAI-1-Expression in Tumorgewebe prognostischen Wert besitzt. Bei den meisten Tumoren wie auch dem Mammakarzinom gehen hohe PAI-1-Expressionslevel mit einer schlechteren Prognose einher (Minisini et. al., 2007). Weitere Informationen zur Bedeutung von PAI-1 beim Mammakarzinom finden sich in 2.1.4. Neben der Bestimmung der PAI-1-Konzentration in Gewebeproben ist auch der Nachweis in Serum- und Plasmaproben möglich (Abendstein et. al., 2000). Für PAI im Serum von Patienten mit ver-

schiedenen Krebserkrankungen konnte bereits Wertigkeit als diagnostischer und prädiktiver Marker gezeigt werden (Wu et. al., 2005; Parekh et. al., 2007; Iwadate et. al., 2008; Herszenyi et. al., 2008; Havrilesky et. al., 2008; Kim et. al., 2009). Aktuelle Daten hierzu sind jedoch kontrovers.

2.3.5 M30

Während der Apoptose wird das Zytoskelett der Zelle von Protein spaltenden Caspasen (siehe 2.2.3) abgebaut. Zytokeratin 18 ist ein 21 Kilodalton schweres Intermediärfilament-Protein und Bestandteil des Zytoskeletts. Es wird bei der Apoptose spezifisch hinter den Aminosäuren Asp²³⁸ sowie Asp³⁹⁶ gespalten. Dabei entsteht an dem mittleren Bruchstück an der C-terminalen Domäne hinter Asp³⁹⁶ ein Neoepitop (CK18Asp³⁹⁶-Neoepitop), das vom M30-Antikörper gebunden wird. Der immunhistochemische Nachweis des M30-Antigens im Blut gilt daher als selektiver Biomarker für die Apoptose epithelialer Zellen (Leers et. al., 1999). Da die Spaltung des Zytokeratin 18 ein frühes Ereignis während der Apoptose ist, können durch den Nachweis von M30-Antigen auch frühe Stadien von Tumorerkrankungen erkannt werden (Ueno et. al., 2003). Bei der Nekrose hingegen wird vor allem ungespaltenes Zytokeratin 18 aus dem Zytoskelett freigesetzt, das mit dem M65-Antikörper detektiert werden kann (Schutte B. und Henfling M., 2004). Patientinnen in frühen Brustkrebsstadien zeigen höhere M30-Konzentrationen im Serum als gesunde Kontrollpersonen (Ueno et. al., 2003). Auch Patienten mit fortgeschrittenem Magen- und Pankreaskarzinom zeigen höhere M30-Konzentrationen im Serum bzw. Plasma als gesunde Kontrollpersonen (Yaman et. al., 2010; Dive et. al., 2010). Bei Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom hatten zudem Patienten mit Fernmetastasen signifikant höhere M30-Serumlevels als Patienten mit nur lokal fortgeschrittener Erkrankung. Patienten mit sehr hohen M30-Serumkonzentrationen wiesen darüber hinaus ein signifikant kürzeres medianes Überleben auf (Yaman et. al., 2010). Ein Zusammenhang von höheren M30-Konzentrationen im Plasma und dem Vorliegen von Fernmetastasen konnte außerdem beim Pankreaskarzinom gezeigt werden (Dive et. al., 2010). Des Weiteren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass ein Anstieg der M30-Konzentration nach Applikation von Zytostatika mit einem guten Therapieansprechen einhergeht (Biven et. al., 2003; Pichon et. al., 2006). M30-Antigen wird im Folgenden kurz als M30 bezeichnet.

2.3.6 Nukleosomen

Etwa 99% der DNA finden sich im menschlichen Körper proteingebunden im Zellkern. Die DNA liegt dort meist in kondensierter, maximal komprimierter Form als Heterochromatin vor. Bei Replikations-, Transkriptions- und Reparaturvorgängen geht die DNA jedoch in einen lockeren, dekontensierten Zustand über, um den beteiligten Enzymen

Zugang zu den entsprechenden Genabschnitten zu ermöglichen (Kornberg und Lorch, 1999; Nelson et. al., 2004). Das Chromatin besteht in seiner Sekundärstruktur aus einer Kette von Nukleosomen. Als Nukleosom bezeichnet man einen scheibenähnlichen Komplex aus DNA und basischen Histonproteinen mit einem Molekulargewicht von 206 Kilodalton. Ein Oktamer aus je einem Histon H2A, H2B, H3 und H4 bildet den Kern eines Nukleosoms. Um diesen Histonkern herum sind 146 Basenpaare doppelsträngige DNA gewickelt. Die Nukleosomen sind untereinander über die sogenannte Linker-DNA verbunden und bilden eine Kette, die durch das Histonprotein H1 weiter stabilisiert wird (Luger, 2003; Nelson et. al., 2004).

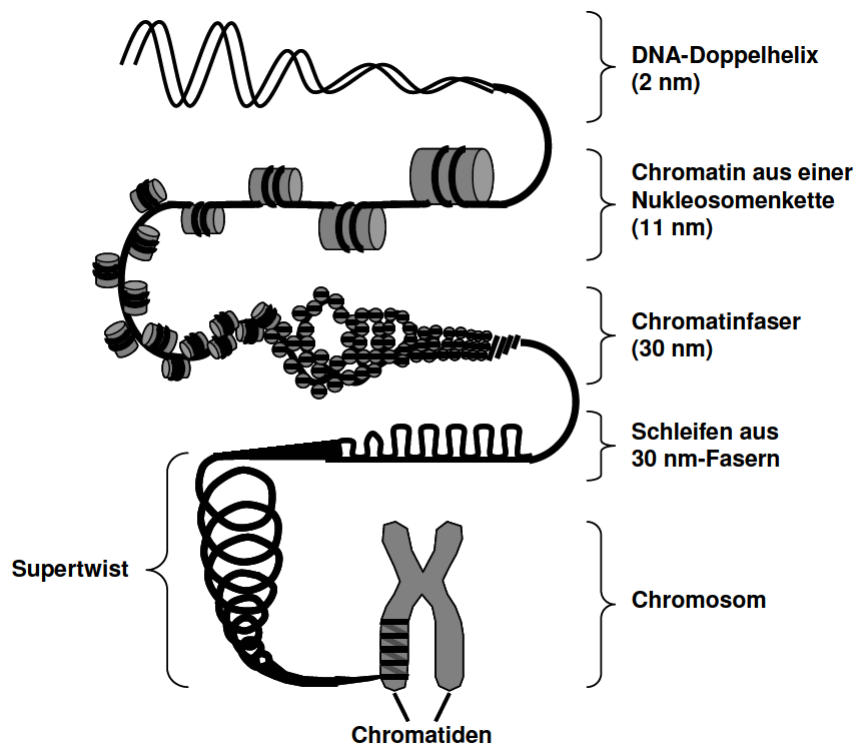


Abb. 6: Aufbau des Chromatins modifiziert nach (Plattner und Hentschel, 1997)

Während des Zelltods und insbesondere der Apoptose wird das Chromatin an den Linker-Stellen von Endonukleasen wie der CAD gespalten. Dabei entstehen Mono- und Oligonukleosomen (Enari et. al., 1998). Diese werden normalerweise wie andere Zellbestandteile in apoptotische Körperchen verpackt und rasch durch phagozytierende Zellen eliminiert (Kerr et. al., 1994). Bei erhöhter Zelltodrate beziehungsweise erhöhtem Zellumsatz wie z.B. beim Vorliegen maligner Erkrankungen oder während einer zytostatischen Behandlung scheinen diese Mechanismen jedoch überlastet zu sein. Als Folge treten die Nukleosomen in die Blutzirkulation über und können dort in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (Stroun et. al., 2000). Es ist bekannt, dass bereits

in den ersten Tagen nach einer Chemotherapie bei Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen ein Anstieg der bereits prätherapeutisch erhöhten Nukleosomenkonzentration im Blut nachgewiesen werden kann. Nach etwa einer Woche ist wieder ein Abfall der Konzentration zu beobachten. In vitro-Studien konnten für diese frühe Nukleosomenfreisetzung einen dosis- und zeitabhängigen Effekt zeigen. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der Nukleosomenkonzentration im Blut und der Effizienz zytostatischer Tumorthérapie demonstriert werden (Holdenrieder et. al., 2008b).

2.3.7 CA 15-3

Das Cancer Antigen 15.3 ist ein hochmolekulares Kohlenhydratantigen. Es gehört zur Gruppe der Muzine der Milchfettkügelchen-Membran (MUC-1-Protein) und hat ein Molekulargewicht von etwa 400 Kilodalton. CA 15-3 kann bei Patienten mit einigen benignen Erkrankungen wie dialysepflichtiger Niereninsuffizienz, Leber- und Lungenerkrankungen sowie Mastopathie erhöhte Serumspiegel aufweisen. Die Sensitivität von CA 15-3 bei der Therapie- und Verlaufsbeobachtung des Mammakarzinoms liegt je nach Ausdehnung bei 50-80% (Bruhn et. al., 2008). Die Bestimmung von CA 15-3 zum Screening oder zur Früherkennung des Mammakarzinoms wird nicht empfohlen. Präoperativ sollte CA 15-3 jedoch im Serum bestimmt werden. Hohe präoperative CA 15-3-Konzentrationen gehen mit einer ungünstigen Prognose einher (Molina et. al., 2005). Zur frühzeitigen Erkennung eines Rezidivs oder von Metastasen kann CA 15-3 seriell bestimmt werden. Die wichtigste Rolle kommt CA 15-3 bei der Überwachung einer Chemotherapie bei Patientinnen mit metastasierter Erkrankung zu. Hier wird die regelmäßige Bestimmung von CA 15-3 zusätzlich zu klinischen und bildgebenden Untersuchungen empfohlen (Molina et. al., 2005; Sturgeon et. al., 2008) (siehe auch 2.2.3).

2.3.8 CEA

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) ist ein Glykoprotein mit variablem Kohlenhydratanteil (55-65%) und einem Molekulargewicht von 180 Kilodalton (Bruhn et. al., 2008). Wie α -Fetoprotein zählt CEA zu den onkofetalen Antigenen. Diese werden physiologischerweise während der Embryonal- und Fetalzeit exprimiert (Böcker et. al., 2008). Nach der Fetalzeit findet sich CEA außerdem physiologischerweise in verschiedenen sekretorischen Geweben, wie z.B. in der Darmmukosa. Dem Karzinoembryonalen Antigen kommt eine Funktion bei Zell-Zell-Kontakten und somit bei der Metastasierung von Tumoren zu (Söletormos et. al., 1996). Die CEA-Spiegel im Blut sind altersabhängig. Bei gesunden Erwachsenen findet man nur sehr geringe Spiegel, die allerdings bei Rauchern deutlich erhöht sein können. Höhere Werte findet man außerdem bei Patienten mit gutartigen gastrointestinalen Erkrankungen wie Kolitis, Ulcus, Darmpolypen, Hepatitis und Leberzirrhose. Die größte Bedeutung kommt CEA bei der

postoperativen Verlaufsbeobachtung beim kolorektalen Karzinom zu. Hier wird eine stadienabhängige Sensitivität von 15-80% sowie eine Spezifität von 90% angegeben. Bei anderen Tumoren, z.B. Magen- und Mammakarzinom, wird eine Sensitivität von lediglich 45-50% beschrieben (Bruhn et. al., 2008). Dennoch kann CEA beim Mammakarzinom additive Informationen zu CA 15-3 liefern und sollte daher in Kombination mit CA 15-3 entsprechend den oben aufgeführten Empfehlungen bestimmt werden (Molina et. al., 2005) (siehe auch 2.1.4).

3 Patientinnen und Kontrollpersonen

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen einer prospektiven Studie, die am Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität in Zusammenarbeit mit der hämatoonkologischen Schwerpunktpraxis von Dr. Stötzer, Prof. Dr. Salat und Prof. Dr. Hiller durchgeführt wurde. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilians Universität München bewertet und genehmigt. Für die vorliegende Arbeit wurden im Zeitraum von März 2007 bis November 2009 die Daten und Blutproben von insgesamt 51 Patientinnen mit Mammakarzinom ohne Fernmetastasen, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten, sowie von drei Kontrollgruppen bestehend aus 28 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, 13 Patientinnen mit benigner Brusterkrankung und 31 gesunden Frauen analysiert. Alle Patientinnen und Kontrollpersonen wurden vor Aufnahme in die Studie umfassend informiert und aufgeklärt. Ihr schriftliches Einverständnis wurde vor Aufnahme in die Studie eingeholt.

3.1 Patientinnen mit Mammakarzinom ohne Fernmetastasen

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Beurteilung der prädiktiven Relevanz von im Blut zirkulierenden Apoptosemarkern sowie der etablierten Tumormarker CEA und CA 15-3 bei Patientinnen mit Mammakarzinom unter neoadjuvanter Chemotherapie. Hierzu wurden 51 Patientinnen mit Mammakarzinom ohne Nachweis von Fernmetastasen in die Studie eingeschlossen. Alle Patientinnen wurden in der Praxis von Dr. Stötzer, Prof. Dr. Salat und Prof. Dr. Hiller intensiv betreut und erhielten dort eine neoadjuvante Chemotherapie. Diese Gruppe wird nachfolgend Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom genannt.

3.1.1 Altersverteilung

Das Alter der Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom lag zwischen 26,5 Jahren und 65,9 Jahren. Der Mittelwert betrug 47,17 und der Median 46,2 Jahre. Das junge Alter der Patientinnen lässt sich dadurch erklären, dass eine neoadjuvante Chemotherapie besonders bei jungen Patientinnen eingesetzt wird.

3.1.2 Prätherapeutisches Stadium

Vor Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie wurden die Patientinnen in der Praxis von Dr. Stötzer, Prof. Dr. Salat und Prof. Dr. Hiller klinisch und sonografisch untersucht. Die Befunde der weiteren standardmäßig durchzuführenden Staging-Untersuchungen wie Mammografie, Röntgenuntersuchung des Thorax und Skelettszin-

tigrafie wurden von kooperierenden Ärzten erhoben und in der Praxis von Dr. Stötzer und Prof. Dr. Salat gesammelt. Sämtliche Befunde wurden von mir persönlich für die Studie gesammelt und mit Hilfe eines Computerprogramms des Instituts für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München dokumentiert. Für jede Patientin wurde das entsprechende prätherapeutische cTNM-Stadium ermittelt. Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung des cTNM-Stadiums der Patientinnen mit lokalisiertem Mammakarzinom vor Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie.

Tab. 5: Verteilung des prätherapeutischen cTNM-Stadiums

Eigenschaft	Patientinnen	
	Anzahl	Anteil in %
cT		
1	6	11,8
2	30	58,8
3	12	23,5
4	2	3,9
unbekannt	1	2
cN		
0	19	37,2
1	29	56,8
2	1	2
3	1	2
unbekannt	1	2
cM		
-	51	100
+	0	0

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass bei 31 Patientinnen (60,76%) sonografisch ein Lymphknotenbefall darstellbar war. Bei keiner der Patientinnen waren Fernmetastasen nachweisbar.

Anhand der cTNM-Stadien erfolgte des Weiteren eine Einteilung gemäß den UICC-Kriterien.

Tab. 6: Verteilung des prätherapeutischen UICC-Stadiums

UICC-Stadium	Patientinnen	
	Anzahl	Anteil in %
I	1	2
IIA	16	31,4
IIB	23	45,1
IIIA	7	13,7
IIIB	2	3,9
IIIC	1	2
unbekannt	1	2

3.1.3 Postoperatives Stadium

Das postoperative pTNM-Stadium wurde wie das präoperative durch mich anhand der in der Praxis von Dr. Stötzer, Prof. Dr. Salat und Prof. Dr. Hiller gesammelten Befunde dokumentiert. Das pT- und pN-Stadium wurde entsprechend den standardmäßig geltenden Kriterien durch die jeweils zuständigen Pathologen im Operationspräparat bestimmt. Wurde primär eine Chemotherapie durchgeführt, spricht man vom ypTNM-Stadium.

Tab. 7: Verteilung des posttherapeutischen ypTNM-Stadiums

Eigenschaft	Patientinnen	
	Anzahl	Anteil in %
ypT		
0	11	21,6
1	30	58,8
2	6	11,8
3	4	7,8
4	0	0
ypN		
0	32	62,7
1	10	19,6
2	6	11,8
3	3	5,9
ypM		
-	51	100
+	0	0

Tab. 8: Verteilung des posttherapeutischen UICC-Stadiums

UICC-Stadium	Patientinnen	
	Anzahl	Anteil in %
kein invasiver Resttumor	9	17,6
I	14	27,4
IIA	16	31,4
IIB	3	5,9
IIIA	6	11,8
IIIC	3	5,9

Anhand der Histomorphologie wurden zudem der Differenzierungsgrad G, der Hormonrezeptorstatus, der Her2neu-Gewebestatus und der histologische Subtyp des Mammakarzinoms bestimmt. Der Her2neu-Status wurde hierbei nach den aktuellen Empfehlungen ermittelt (siehe auch 2.1.4). Im Folgenden bedeutet Her2-neu positiv = DAKO-Score +++ oder FISH positiv, während Her2neu negativ = DAKO-Score + oder FISH negativ bedeutet.

Tab. 9: Verteilung postoperativ histopathologisch erhobener Parameter

Eigenschaft	Patientinnen	
	Anzahl	Anteil in %
Differenzierungsgrad G		
0	9	17,6
1	1	2
2	19	38,8
3	14	28,6
unbekannt	6	11,8
Hormonrezeptorstatus		
Östrogenrezeptor +	35	70,0
Östrogenrezeptor -	15	30,0
Progesteronrezeptor +	29	58,0
Progesteronrezeptor -	21	42,0
Her2neu-Status		
negativ	35	68,6
positiv	13	25,5
unbekannt	3	5,9
Histologie		
invasiv duktales Karzinom	42	82,4
invasiv lobuläres Karzinom	3	5,9
Adenokarzinom	2	3,9
unklare Dignität	4	7,8

3.1.4 Therapie

Alle 51 Patientinnen mit Mammakarzinom ohne Fernmetastasen wurden präoperativ mit einer Chemotherapie behandelt. Die meisten Patientinnen erhielten 2 verschiedene Zytostatika-Kombinationen. 49 Patientinnen (96%) wurden zunächst mit 4 Zyklen Cyclophosphamid in Kombination mit Epirubicin behandelt. Bei 6 (11,8%) dieser Patientinnen erfolgte keine weitere Chemotherapie. Eine anschließende zytostatische Behandlung erhielten 29 Patientinnen (56,9%) mit 4 Zyklen Docetaxel und 12 Patientinnen (23,5%) mit 4 Zyklen Paclitaxel. Bei 2 weiteren Patientinnen (3,9%) wurde die Therapie zunächst mit Docetaxel weitergeführt, jedoch wegen schlechter Verträglichkeit auf Paclitaxel umgestellt. Außerdem wurden 2 Patientinnen initial mit einer Kombination aus Cyclophosphamid, Epirubicin und 5-Fluorouracil sowie anschließend mit Docetaxel behandelt. Bei der Kombinationstherapie aus Cyclophosphamid und Epirubicin betrug die Dosierung in der Regel 600 und 90mg/m² KOF²². Bei der Kombination von Fluorouracil mit Epirubicin und Cyclophosphamid wurden 500, 100 und 500mg/m² KOF verabreicht. Die Dosis von Docetaxel war 75mg/m² KOF und die von Paclitaxel 175mg/m² KOF. Patientinnen mit positivem Her2-neu-Gewebestatus in der prätherapeutischen stanzbioptischen Untersuchung (n=10) erhielten zusätzlich eine Therapie mit Herceptin. Nach Abschluss der primären Chemotherapie erfolgte je nach Ausdehnung des Tumors eine Operation der Brust und der axillären Lymphknoten.

Tab. 10: Verteilung der applizierten Zytostatika-Kombinationen

neoadjuvante Chemotherapie			Anzahl	Anteil in %
Therapie 1	Therapie 2	Therapie 3		
Cyclophosphamid + Epirubicin			6	11,8
Cyclophosphamid + Epirubicin	Docetaxel		29	56,9
Cyclophosphamid + Epirubicin	Docetaxel	Paclitaxel	2	3,9
Cyclophosphamid + Epirubicin	Paclitaxel		12	23,5
Cyclophosphamid + Epirubicin + Fluorouracil	Docetaxel		2	3,9

3.1.5 Beurteilung des Therapieansprechens

Die Beurteilung des Therapieansprechens erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand des postoperativ erhobenen pathologischen Befunds entsprechend den RECIST-Kriterien. Die Patientinnen wurden in drei Gruppen eingeteilt. Patientinnen, bei denen kein invasiver Resttumor nachweisbar war, wurden in die Gruppe mit kompletter Re-

²² KOF = Körperoberfläche

mission (CR) eingeteilt. Patientinnen mit invasivem Tumorrest und einer Reduktion des längsten Tumordurchmessers um mindestens 30% im Operationspräparat gegenüber dem prätherapeutisch erhobenen sonografischen Befund wurden der Gruppe mit partieller Remission (PR) zugewiesen. Patientinnen, bei denen kein invasiver Resttumor im ursprünglichen Tumorbett, aber ein Befall von Lymphknoten nachgewiesen wurde, wurden ebenfalls zu den Patientinnen mit partieller Remission gezählt. Alle anderen Patientinnen wurden zur Gruppe mit ausbleibender Remission (NC) gezählt.

3.2 Kontrollpersonen

Für die Beurteilung der diagnostischen Relevanz der verschiedenen untersuchten Biomarker wurden verschiedene Kontrollgruppen in die Studie miteinbezogen.

3.2.1 Gesunde Frauen

Als Kontrollgruppe wurden Blutproben von 31 freiwilligen gesunden Frauen untersucht. Es wurden nur gesunde Frauen eingeschlossen, die sowohl anamnestisch als auch laborchemisch unauffällig waren. Folgende laborchemische Parameter lagen bei allen gesunden Frauen im Referenzbereich: Blutbild, Urinstatus, Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, GPT, GOT, LDH, Cholesterin, Triglyzeride, CRP.

Das Alter lag im Bereich von 23,1 bis 60,7 Jahren. Der Mittelwert betrug 40,2 und der Median 41,9 Jahre.

3.2.2 Patientinnen mit benigner Brusterkrankung

13 freiwillige Patientinnen mit unterschiedlichen benignen Brusterkrankungen, unter anderem Fibroadenomen, Papillomen oder Mastitis, dienten als weitere Kontrollgruppe. Sie waren 32,6 bis 76,7 Jahre alt. Der Mittelwert betrug 48,0 und der Median 44,7 Jahre.

3.2.3 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Es wurden darüber hinaus Blutproben von 28 Patientinnen mit in multiple Lokalisationen metastasiertem Mammakarzinom analysiert. Fernmetastasen ließen sich in Leber (60,7%), Skelett (67,9%), Lunge (21,4%), Haut (7,1%) und Gehirn (14,3%) nachweisen. Bei 11 Patientinnen (39,3%) zeigte sich eine ausgedehnte Lymphknotenmetastasierung. Von den 28 Patientinnen wiesen 4 (14,3%) ein Lokalrezidiv zusätzlich zu Fernmetastasen auf. Das Alter umfasste einen Bereich von 33,6 bis 81 Jahren mit einem Mittelwert von 61 und einem Median von 64,2 Jahren.

4 Material und Methoden

4.1 Gewinnung und Vorbehandlung der Blutproben

Bei den Patientinnen mit Mammakarzinom und den Patientinnen mit benigner Brustkrankung wurden die Blutabnahmen mit anfallenden Routineblutabnahmen kombiniert, sodass keine zusätzliche Belastung entstand. Die Blutabnahmen bei den Patientinnen unter neoadjuvanter Chemotherapie erfolgten zu 4 definierten Zeitpunkten:

- vor Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie,
- acht Tage nach Applikation des ersten Therapiezyklus,
- direkt vor Applikation des zweiten Therapiezyklus,
- posttherapeutisch beziehungsweise bei mehr als fünf applizierten Chemotherapiezyklen kurz vor dem sechsten Zyklus.

Bei den Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde möglichst vor Beginn einer palliativen Therapie Blut abgenommen. Die Blutabnahmen bei den freiwilligen gesunden Frauen sollten ebenfalls eine möglichst geringe Belastung darstellen und wurden standardisiert vormittags 3-4 Stunden nach dem Frühstück durchgeführt.

Das Blut wurde mittels Einmal-Blutabnahmebestecks möglichst hämolysefrei aus einer Vene der oberen Extremität in Serum- und EDTA-Plasmaröhrchen entnommen. Sowohl die Serum- als auch die Plasmaproben wurden am Ort der Blutentnahme innerhalb von ein bis zwei Stunden zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zentrifugation der Serumproben erfolgte für 15 Minuten bei 4000 U/min. Im Anschluss wurde, wenn genug Serum vorhanden war, je 1 ml der Serumproben mit 100 µl Ethylendiamin-Tetraacetat-Säure (EDTA 100 mM) stabilisiert. Die EDTA-Plasmaproben wurden zunächst bei 2500 U/min zentrifugiert. Sodann wurde der Überstand dekantiert, erneut für 30 Minuten zentrifugiert und wiederum der neu entstandene Überstand dekantiert. Mit der zweifachen Zentrifugation wurde eine größtmögliche Zellfreiheit des Plasmas angestrebt. Die so gewonnen Proben von Serum, EDTA-stabilisiertem Serum und EDTA-Plasma wurden schnellstmöglich in Aliquots überführt und bei -80° C tiefgefroren. Zur Messung der Marker wurden die Proben frisch aufgetaut. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wurde vermieden.

4.2 Messung der Biomarker

Alle für die vorliegende Arbeit bestimmten Marker wurden mit immunochemischen Verfahren nachgewiesen und quantifiziert. Immunochemische Nachweisverfahren beruhen auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Nachweis der Apoptosemarker, der Nukle-

osomen, von M30, CEA und CA 15-3 erfolgte nach dem Prinzip eines sogenannten double-antibody-sandwich-ELISAs²³. Diese Methode wird im Folgenden kurz erläutert.

Es werden zwei Antikörper benötigt, die spezifisch an zwei verschiedenen Epitopen des nachzuweisenden Antigens binden können. Der erste Antikörper bindet an eine feste Phase, meist an eine Mikrotiterplatte. Wird die zu untersuchende Probe darauf gegeben und inkubiert, bindet der Antikörper das nachzuweisende Antigen. Nach der Inkubation werden alle ungebundenen Bestandteile der Blutprobe durch Waschen entfernt, sodass nur noch das am Antikörper gebundene Antigen vorhanden ist. Wird nun der Detektions-Antikörper hinzugegeben, bindet dieser an einem anderen Epitop des Antigens. Nach erneutem Waschen bleibt nur noch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, der wie ein Sandwich aufgebaut ist, zurück. Überschüssige Antikörper werden entfernt. An einem Ende des Detektionsantikörpers ist ein Enzym gebunden. Durch Zugabe eines Substrats dieses Enzyms wird eine enzymatisch katalysierte Reaktion in Gang gesetzt und es entsteht ein Reaktionsprodukt, das durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann. Der quantitative Nachweis erfolgt meist mithilfe einer Kalibrierungskurve, die durch Messung einer Serie bekannter Antigenkonzentrationen erstellt wird.

Anstelle eines Enzym-gekoppelten Detektionsantikörpers wird auch häufig ein ungebundener Detektionsantikörper in Kombination mit einem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper verwendet. Ein solcher Sekundärantikörper bindet universell den Fc-Teil anderer Antikörper. Seine Herstellung ist deutlich billiger als die Herstellung Enzym-gekoppelter spezifischer Detektionsantikörper.

4.2.1 MIF, sFAS, sICAM und tPAI-1

Die Bestimmung von MIF, sFAS, sICAM und tPAI-1 erfolgte mit dem Human Sepsis/Apoptosis Lincoplex Kit der Firma Millipore (St. Charles, Missouri).

Testprinzip des Human Sepsis/Apoptosis Lincoplex Kit

Mit dem Human Sepsis/Apoptosis Lincoplex Kit können mehrere Biomarker simultan in einer Serumprobe quantifiziert werden. Dies wird durch die Luminex-X-Map-Technologie ermöglicht. Grundlage dieser Technologie sind mikroskopisch kleine sphärische Polystyrolpartikel, sogenannte Mikrosphären oder Beads. Zum Nachweis mehrerer unterschiedlicher Antigene wird die Serumprobe mit verschiedenen Bead-Populationen, die sich durch einen individuellen roten Fluoreszenzfarbton unterschei-

²³ ELISA=Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

den, inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung der Beads ist die Grundlage für ihre Erkennung durch das Analysegerät und ihre exakte Zuordnung zur entsprechenden Population. Die Beads sind mit verschiedenen Antikörpern beladen und bilden Komplexe mit ihrem spezifischen Analyten. Die an Beads gekoppelten Analyten werden von sodann hinzugefügten biotinylierten Detektionsantikörpern gebunden. Schließlich erfolgt die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs Streptavidin-Phycoerythrin, der im Wellenlängenbereich des grünen Lichts emittiert, an die Bead-Analyt-Detektionsantikörper-Komplexe. Analyse und Auswertung erfolgten mittels Laser vollautomatisch im Luminex-Analysesystem. Die verschiedenen roten Fluoreszenzfarbstoffe der Beads dienen der Klassifizierung, während die Quantifizierung anhand des grünen Fluoreszenzfarbstoffs der konjugatgebundenen Detektionsantikörper durchgeführt wird. Die Luminex-X-Map-Technologie stellt somit eine Kombination aus immunchemischer Detektion und zytometrischer Quantifizierung dar und erlaubt die parallele Bestimmung mehrerer Parameter aus einem kleinen Volumen einer Serum- oder Plasmaprobe.

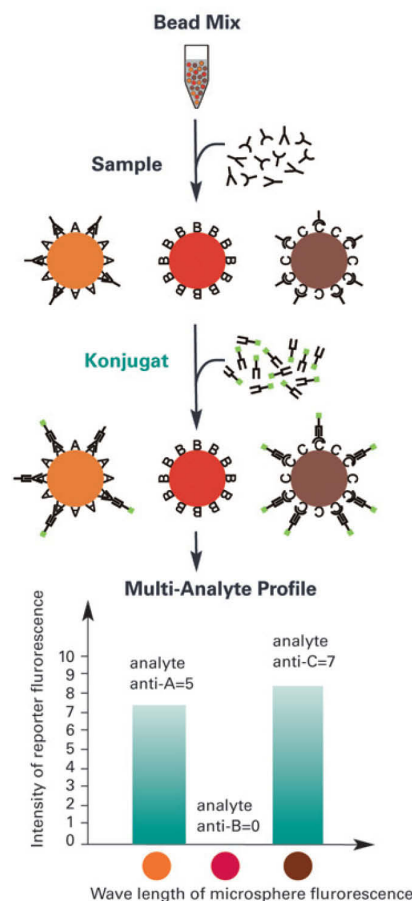


Abb. 7: Prinzip der Luminex-X-Map-Technologie (Abbildung aus der mit dem Testkit gelieferten Anleitung des Herstellers übernommen)

Verwendete Materialien

Für die Bestimmung der 4 Apoptosemarker mit dem Human Sepsis/Apoptosis Lin-coplex Kit werden die folgenden Materialien benötigt, die entweder gebrauchsfertig im Testkit enthalten sind oder zunächst hergestellt werden müssen:

- Antikörper-immobilisierte-Beads: Je 0,15ml der Anti-sFAS-, Anti-MIF-, Anti-sICAM- und Anti-tPAI-1-Beads werden in 2,4ml Bead-Verdünnung aufgelöst. Da die Beads lichtempfindlich sind, müssen sie beziehungsweise die Mikrotiterplatte bei allen Inkubationsschritten mit Aluminiumfolie abgedeckt werden.
- Standards: Der Standard-Cocktail wird in 250µl deionisiertem Wasser gelöst. Die Konzentrationen betragen dann 50pg/ml für sFAS, MIF, tPAI-1 und 250pg/ml für sICAM. Zur Anfertigung einer Verdünnungsreihe werden in 6 Tubes je 150µl Assay-Puffer pipettiert und anschließend je 50µl der letzten mit einem Vortex homogenisierten Verdünnung in ein neues Tube überführt. Die Verdünnungen der Standards betragen dann 1:4, 1:16, 1:64, 1:256., 1:1024 und 1:4096. Assay-Puffer dient als Background.
- Qualitätskontrollen: Die lyophilisierten Kontrollen I und II werden in je 250µl deionisiertem Wasser gelöst.
- Detektionsantikörper: Gebrauchsfertige Lösung der Detektionsantikörper in Assay-Puffer.
- Streptavidin-Phycoerythrin: Gebrauchsfertige Lösung von Streptavidin-Phycoerythrin in Assay-Puffer.
- Assay-Puffer: Gebrauchsfertige Lösung, die aus 50mM PBS²⁴ mit 25mM EDTA, 0,08% Sodiumazid, 0,05% Tween 20 und 1% Rinderserumalbumin auf pH=7,4 justiert ist.
- Waschpuffer: 30µl Waschpuffer werden mit 270µl deionisiertem Wasser verdünnt (10mM PBS mit 0,05% Proclin und 0,05% Tween 20 auf pH=7,4 justiert).
- Serum-Matrix: Die lyophilisierte Serum-Matrix wird in 5ml deionisiertem Wasser gelöst.
- Mikrotiterfilterplatte, Plattensealer und Mischfläschchen.

²⁴ PBS=Phosphate Buffer Saline

Testdurchführung

Die Testdurchführung erfolgte wie in der Anleitung des Kits beschrieben. Es wurden ausschließlich Serumproben verwendet. Diese wurden, wie in der Anleitung angegeben, im Verhältnis 1:10 mit Serum-Matrix verdünnt.

Die Mikrotiterfilterplatte wird zunächst geblockt, indem je 200µl Assay-Puffer in jede Kammer pipettiert werden und eine Inkubation auf einem Plattenrüttler bei Raumtemperatur für 10 Minuten erfolgt. Der Assay-Puffer wird anschließend durch Anlegen eines Vakuums und Abtrocknen mit einem Papiertuch von unten entfernt. Sodann werden je 25µl der Standards oder Kontrollen in die entsprechenden Kammern auf der Platte pipettiert. Je 25µl Assay-Puffer werden in die Kammern für den Background und die Serumproben pipettiert. In die Kammern des Backgrounds, der Standards und der Kontrollen werden dann je 25µl Serum-Matrix hinzugefügt. Je 25µl der Serumproben werden in die Kammern der Proben gefüllt. Schließlich werden je 25µl der Beads in alle Kammern zugegeben. Die Mikrotiterfilterplatte wird in Aluminiumfolie gewickelt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wird überschüssige Flüssigkeit von der Platte durch Anlegen eines Vakuums und Waschen mit je 200µl Waschpuffer entfernt. Nach Zugabe von je 25µl der Detektionsantikörper in jede Kammer wird die Platte wieder in Aluminiumfolie gewickelt und auf einem Plattenrüttler bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Nun werden je 25µl Streptavidin-Phycoerythrin hinzugefügt und es erfolgt eine erneute Inkubation auf einem Plattenrüttler bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Schließlich wird die Platte noch einmal durch Anlegen eines Vakuums und zweimaliges Waschen mit 200µl Waschpuffer pro Kammer gereinigt. Nach Zugabe von 100µl „Sheath Fluid“ werden die Beads durch 5-minütiges Rütteln der Platte resuspendiert und die Analyse durch das Luminex-Analyse-System kann erfolgen. Die Konzentration der vier Apoptosemarker wird durch Messung des emittierten roten Lichtes zur Klassifizierung des Analyten und Messung des emittierten grünen Lichts zur Quantifizierung mithilfe der Signalverarbeitung des Luminex-Analyse-Systems bestimmt. Sie wird in Picogramm pro Milliliter angegeben.

4.2.2 M30

Der Nachweis von M30-Antigen in den Serumproben erfolgte mit dem M30-Apoptosense-ELISA der Firma Peviva. Der hierbei verwendete M30-Antikörper ist gegen ein Neoepitop in der C-terminalen Domäne des Zytokeratin 18 (Aminosäuren 387-396) gerichtet.

Testprinzip

Der M30-Apoptosense-ELISA ist ebenfalls ein ELISA, der nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs funktioniert. Die Kammern der Mikrotiterplatte sind mit Polystyren beschichtet und mit monoklonalen M30-Antikörpern ausgekleidet. In einer Serumprobe vorhandenes M30 wird von diesen Festphasenantikörpern gebunden. Hinzugefügte, mit einer Peroxidase konjugierte Antikörper binden simultan ein anderes Epitop von M30 und dienen als Detektionsantikörper. Nach der Bildung dieser Festphaseantikörper-Antigen-Detektionsantikörper-Komplexe wird ungebundenes Konjugat durch Waschen entfernt. Es folgt eine Inkubation mit TMB-Substrat. Anschließend wird die Reaktion gestoppt und die Farbentwicklung fotometrisch bei 450nm gemessen. Durch Erstellen einer Standardkurve mit Proben bekannter M30-Konzentration kann eine Quantifizierung erfolgen. Die Konzentration wird in Units (=Einheiten) pro Liter angegeben.

Verwendete Materialien

Die nachfolgenden Materialien müssen vor Testdurchführung hergestellt werden oder werden gebrauchsfertig im Kit geliefert:

- Mikrotiterplatte: Die Kammern der Mikrotiterplatte sind mit Antikörpern ausgekleidet. Es handelt sich um monoklonale Mausantikörper, die gegen Zytokeratin 18 gerichtet sind.
- Detektionsantikörper: Die monoklonalen M30-Mausantikörper, die mit Merrettich-Peroxidase konjugiert sind, werden in 0,4ml Phosphatpuffer mit Protein stabilisatoren geliefert. Vor Testdurchführung ist eine 24fache Verdünnung mit Konjugat-Verdünnungs-Puffer notwendig.
- Substrat: Gebrauchsfertige Lösung mit 22ml TMB²⁵.
- Stop-Lösung: Gebrauchsfertige Lösung mit 1,0M H₂SO₄.
- Standards: Gebrauchsfertige Standards mit einer Konzentration von 50, 125, 500 und 1000U/L.
- Kontrollen: Eine hohe Kontrolle mit einer Konzentration von 650 bis 850 U/L und eine niedrige Kontrolle mit einer Konzentration von 90 bis 110 U/L M30.
- Verdünnungslösung: Gebrauchsfertige Lösung aus Phosphatpuffer und FCS.
- Waschlösung: 50ml konzentrierte Waschlösung müssen mit 450ml destilliertem Wasser verdünnt werden. Der verdünnte Waschlösungspuffer enthält 0,014M Phosphatpuffer mit 0,15M Natriumchlorid und 0,1% Tween 20.

Testdurchführung

Für die Messung der M30-Konzentration wurden Serumproben verwendet. Zu Beginn der Testdurchführung werden je 25µl Standard, Kontrolle oder Serumprobe in die entsprechenden Kammern auf der Mikrotiterplatte pipettiert. Ohne zeitliche Verzögerung werden 75µl der verdünnten Peroxidase-Lösung in alle Kammern hinzugefügt. Die Platte wird dann 4 Stunden auf einem Plattenrüttler inkubiert und anschließend dreimal mit Waschlösung gewaschen. Nach Zugabe von 200µl TMB-Substrat pro Kammer wird die Kammer in Dunkelheit für 19 bis 21 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von Stopplösung und Rütteln der Platte für 5-110 Sekunden wird die Reaktion unterbrochen. Nach 5 Minuten Wartezeit kann die Absorption bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen werden. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe einer Standardkurve.

4.2.3 Nukleosomen

Die Konzentration der Nukleosomen wurde mit dem Cell Death Detection ELISA plus (CDDE-Test) der Firma Roche Diagnostics, Mannheim gemessen.

Testprinzip des Cell Death Detection ELISA^{plus}

Der Cell Death Detection ELISA^{plus} ist ein nicht-kompetitiver Immunoassay, mit dem spezifisch Mono- und Oligonukleosomen nachgewiesen und quantifiziert werden können. Er funktioniert nach dem oben beschriebenen Prinzip eines double-antibody-sandwich-ELISA. Es werden 2 monoklonale Mausantikörper eingesetzt. Der Festphasen-Antikörper bindet an die Proteinkomponente der Nukleosomen, die sogenannten Histone, und fixiert sie an der mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte. Der Detektions-Antikörper hingegen bindet den DNA-Teil und ist mit Peroxidase markiert. Sind in der Probe beide Komponenten der Nukleosomen, Histone und DNA, vorhanden, setzt Peroxidase das zugegebene Substrat ABTS²⁶ um. Es entsteht ein Farbumschlag, der proportional zur gemessenen Konzentration an Nukleosomen ist und dessen Grad bei einer Wellenlänge von 405nm fotometrisch bestimmt wird.

²⁵ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

²⁶ 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-Sulfonat))

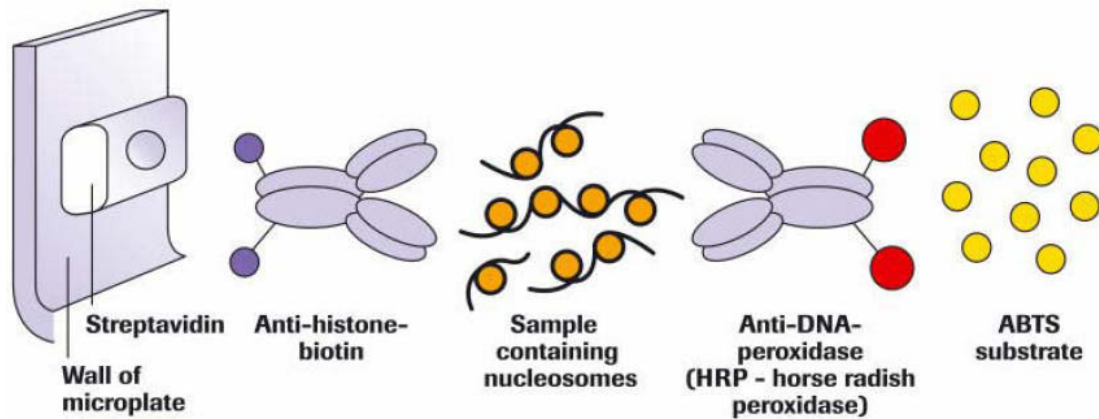


Abb. 8: Testprinzip des Cell Death Detection ELISA^{plus} (Abbildung aus der mit dem Testkit gelieferten Anleitung des Herstellers übernommen)

Verwendete Materialien

Bei der Durchführung des CDDE-Tests werden folgende Materialien benötigt, die teilweise bereits gebrauchsfertig im Testkit enthalten sind oder zunächst vorbereitet werden müssen:

- **PBS (Phosphate Buffer Saline):** Gebrauchsfertige Lösung, die 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄ x 2H₂O und 0,2g KH₂PO₄ in einem Liter Wasser enthält und auf pH=7,4 justiert ist.
- **Inkubationspuffer:** Gebrauchsfertige Lösung, die PBS mit 1% Rinderserumalbumin, 0,5% Tween 20 und 1mM EDTA enthält.
- **Anti-Histon-Biotin:** Tablette eines lyophilisierten und biotinylierten Anti-Histon-Antikörper-Panels, die in 450µl bidestilliertem Wasser aufgelöst wird.
- **Anti-DNA-POD:** Tablette eines lyophilisierten und mit Peroxidase markierten Anti-DNA-Antikörper-Panels, die in 450µl bidestilliertem Wasser aufgelöst wird.
- **Immunreagens:** 1/20 Volumenanteile der biotinylierten Anti-Histon-Antikörper und 1/20 Volumenanteile der mit Peroxidase markierten Anti-DNA-Antikörper werden vorsichtig mit 18/20 Volumenanteilen Inkubationspuffer homogenisiert.
- **Substratpuffer:** Gebrauchsfertige Lösung, die 1047,5mg Zitronensäure, 62,5mg Natriumperborat x 3 H₂O, 9,77mg CaCl₂ x 2 H₂O in 125ml enthält und auf pH=4,5 justiert ist.
- **Substrat:** Drei Tabletten mit 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-Sulfonat) (ABTS), die unmittelbar vor Gebrauch in 15ml Substratpuffer gelöst werden und lichtgeschützt gelagert werden müssen.

- Streptavidin-beschichtete-Mikrotiterplatte und Adhäsiv-Folien.

Die verwendeten Antikörper sind monoklonale Mausantikörper. Die Anti-Histon-Antikörper werden im Mausklon H11-4 gezüchtet und besitzen spezifische Affinität gegen die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4. Die Anti-DNA-Antikörper stammen aus dem Mausklon M-CA-33 und binden sowohl an Einzel- als auch an Doppelstrang-DNA.

Testdurchführung

Es wurden sowohl Proben aus Serum (teilweise mit EDTA stabilisiert) als auch aus Plasma gemessen. Die Testdurchführung erfolgte wie von Holdenrieder et al. beschrieben (Holdenrieder et. al., 2001b). Die aufgetauten Proben werden zunächst mit einem Vortex homogenisiert und mit Inkubationspuffer im Verhältnis 1:4 verdünnt (20µl Probe und 60 µl Inkubationspuffer). Anschließend werden die Proben nochmals 3 Sekunden „gevortext“ und je 20µl in die Kammern der Mikrotiterplatte pipettiert. Sodann werden je 80µl des Immunreagens hinzugefügt, die Mikrotiterplatte mit Adhäsiv-Folie bedeckt und auf einem Mikroplatten-Rüttler bei 500U/min zwei Stunden inkubiert.

Während dieser Inkubationszeit reagieren die im Immunreagens enthaltenen Anti-Histon-Antikörper mit der Proteinkomponente der Nukleosomen in der jeweiligen Probe und fixieren diese mithilfe des Biotins an der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte. Die DNA-Komponente der Nukleosomen wird indes von den Anti-DNA-Antikörpern gebunden.

Nach der Inkubation wird die Mikrotiterplatte dreimal mit je 300 bis 400µl Inkubationspuffer gewaschen, um die nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Die fixierten Sandwich-Komplexe aus Antikörper-Nukleosomen-Antikörper werden mit 100µl ABTS 30 Minuten inkubiert und erneut mit Adhäsivfolie bedeckt bei 500U/min gerüttelt. Die an die Anti-DNA-Antikörper gebundene Peroxidase reagiert währenddessen mit dem hinzugefügten ABTS, Dadurch entsteht ein Farbumschlag, der proportional zur Menge der gebundenen Anti-DNA-Antikörper und ist und fotometrisch bei einer Wellenlänge von 405nm gegen die Substratlösung als Blank (Referenzwellenlänge 492nm) quantifiziert wird.

Zur direkten Quantifizierung der Nukleosomen mit hoher Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Testläufen wird eine Kalibrierungskurve aus Referenzmaterial mit bekannter Nukleosomenkonzentration hergestellt. Dies ermöglicht eine Quantifizierung der Nukleosomen-DNA mit der Messeinheit ng/ml.

4.2.4 CEA und CA 15-3

Die Bestimmung der Tumorantigene CEA und CA 15-3 erfolgte am ElecSys 2010, einem vollautomatischen softwaregesteuerten Analysensystem der Firma Roche Diagnostics, Mannheim.



Abb. 9: ElecSys-Analysegerät der Firma Roche (von www.roche.com übernommen)

Der ElecSys 2010 arbeitet wie die anderen beschriebenen Tests auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs. Der ElecSys 2010 funktioniert jedoch im Gegensatz zu den anderen erwähnten Verfahren nach dem Elektro-Chemi-Lumineszenz-Verfahren (ECL-Verfahren). Hierbei werden aus stabilen Ausgangsstoffen durch Anlegen einer Spannung hochreaktive Stoffe erzeugt. Diese hochreaktiven Stoffe reagieren miteinander, wobei Licht emittiert wird. Beim ElecSys 2010 wird ein Ruthenium(II)-tris(bipyridyl)-Komplex verwendet. Die Tumorantigene in den Serumproben werden von biotinylierten spezifischen monoklonalen Antikörpern sowie von an Ruthenium-Komplexe gekoppelten spezifischen monoklonalen Antikörpern gebunden. Nach Zugabe von streptavidinbeschichteten Mikropartikeln werden die Sandwich-Komplexe über eine Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin an eine Festphase gebunden. In der Messzelle werden die Mikropartikel durch magnetische Felder auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert. Ungebundene Substanzen werden mit ProCell-Puffer entfernt. Die Emission der Chemolumineszenz wird durch Anlegen einer Spannung induziert und mit einem Fotomultiplier gemessen. Eine Kalibrationskurve dient der Quantifikation.

4.3 Statistik

Bei der statistischen Auswertung wurden zunächst die Werteverteilungen in den verschiedenen Diagnosegruppen, also in der Gruppe der gesunden Frauen, der Patientinnen mit gutartigen Brusterkrankungen, der Patientinnen mit lokal begrenztem und der Pati-

entinnen mit metastasiertem Mammakarzinom untersucht. Anschließend wurden die Werteverteilungen nur bei den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom in der Gruppe mit gutem und mit schlechtem Therapieansprechen untersucht. Das Therapieansprechen wurde auf zwei verschiedene Arten definiert. In Variante I wurden Patientinnen mit Komplet- und partieller Remission als Gruppe mit gutem Ansprechen zusammengefasst. In Variante II hingegen wurden nur Patientinnen mit Komplettremission als Gruppe mit gutem Ansprechen betrachtet. Die Werteverteilungen wurden für jeden Blutabnahmezeitpunkt und für jeden Marker einzeln gezeigt. Außerdem wurde die Kinetik der Marker von Beginn der Therapie bis zum 2. Therapiezyklus beziehungsweise bis Ende der Therapie berechnet. Die Kinetik wurde als prozentuale Veränderung der Markerkonzentration von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 2 definiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden deskriptiv in Form von Dot plot-Grafiken und Tabellen dargestellt. In den Dot plot-Grafiken wurde die Verteilung aller Einzelwerte besonders anschaulich gezeigt. Der Median wurde zusätzlich als horizontale Gerade angegeben. Außerdem wurden in Übersichtstabellen Fallzahlen, Mediane, 75. und 95. Perzentile und die Bandbreite der Werteverteilungen sowie der Kinetikverteilungen für jeden einzelnen Marker dargestellt.

Da die Werte nicht normalverteilt waren, wurden die Unterschiede zwischen je zwei Diagnose- oder Ansprechgruppen mit dem U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon für unverbundene Stichproben auf Signifikanz geprüft. Dabei wurde bei p-Werten kleiner 0,05 von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen.

Zur Überprüfung der Wertigkeit der Marker für die Diagnose beziehungsweise die Vorhersage des Therapieansprechens wurden darüber hinaus ROC²⁷-Kurven erstellt. ROC-Kurven zeigen die Sensitivität und die Spezifität eines Markers bei verschiedenen Cut-off-Werten. Außerdem wurde die AUC²⁸ für jede Kurve berechnet. Bei der Berechnung der ROC-Kurven und der AUCs wurde einheitlich bei allen Markern davon ausgegangen, dass Patientinnen mit Karzinom beziehungsweise mit schlechtem Therapieansprechen höhere Werte aufwiesen als die jeweils andere Gruppe. Bei Abweichungen von dieser Annahme wurde dies gesondert angegeben.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die einzelnen Marker miteinander korrelieren. Hierzu wurden Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten berechnet. Von einer relevanten Kor-

²⁷ ROC = receiver operating characteristic curve

²⁸ AUC = area under the curve = Fläche unter der Kurve

relation wurde bei einem Korrelationskoeffizienten größer 0,3 oder kleiner -0,3 ausgegangen, um schwache Korrelationen nicht überzubewerten.

Die statistischen Kalkulationen wurden mit Software der Firma SAS durchgeführt. Die Erstellung der Dot plot-Grafiken und ROC-Kurven sowie die Berechnung der AUC erfolgte mit dem Programm Matlab der Firma The Mathworks.

5 Ergebnisse

5.1 Vergleich der Biomarker bei verschiedenen Patientengruppen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Marker Bedeutung als diagnostische Faktoren besitzen. Hierzu wurden alle Marker in vier verschiedenen Patienten- beziehungsweise Probandengruppen bestimmt:

- Gruppe gesunder Frauen (kurz: Gesunde)
- Gruppe der Frauen mit benigner Brusterkrankung (kurz: Benigne)
- Gruppe der Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom (kurz: Lok. MaCa)
- Gruppe der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (kurz: Met. MaCa).

Von den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom wurden Blutproben verwendet, die vor Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie gewonnen wurden. Auch von den Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurden Blutproben herangezogen, die möglichst vor Beginn einer palliativen Chemotherapie oder frühestens zwei Wochen nach Applikation eines Chemotherapiezyklus abgenommen wurden, um einen unmittelbaren Therapieeinfluss zu vermeiden. Alle Marker wurden in Serumproben bestimmt. Die Messung der Nukleosomen erfolgte zusätzlich in Plasmaproben.

5.1.1 Werteverteilung

Die Verteilung der Einzelwerte und Mediane in den verschiedenen Diagnosegruppen wurde für jeden Marker einzeln als Dot plot-Grafik dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung bei teilweise großer Streuung wurde hierbei eine logarithmische Skalierung der y-Achse gewählt.

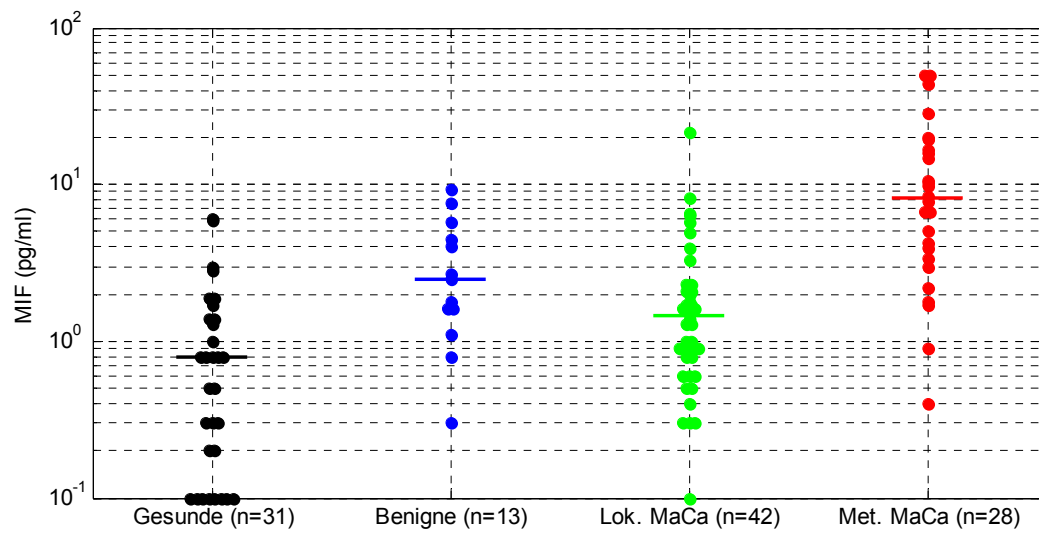


Abb. 10: Einzelwerte und Mediane von MIF in den verschiedenen Diagnosegruppen

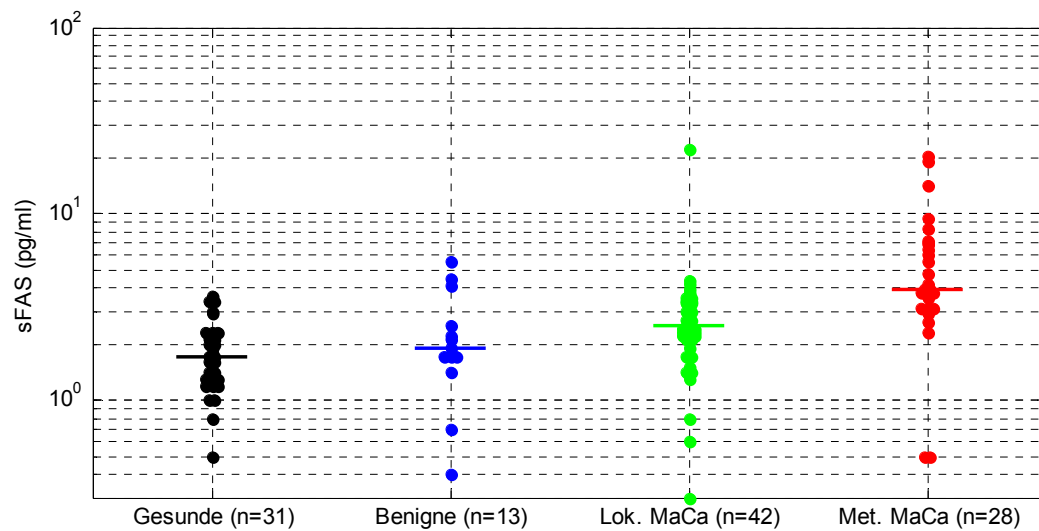


Abb. 11: Einzelwerte und Mediane von sFAS in den verschiedenen Diagnosegruppen

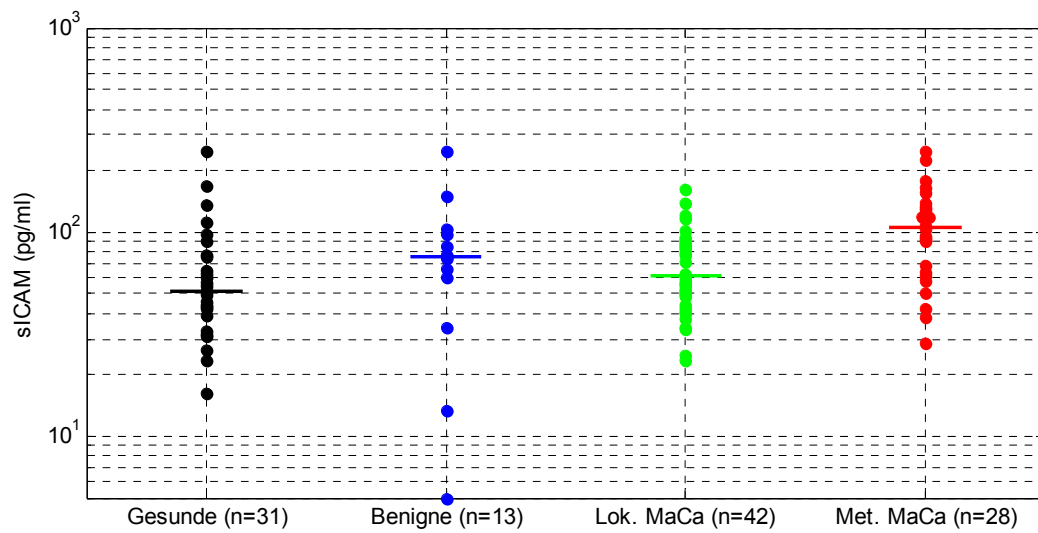


Abb. 12: Einzelwerte und Mediane von sICAM in den verschiedenen Diagnosegruppen

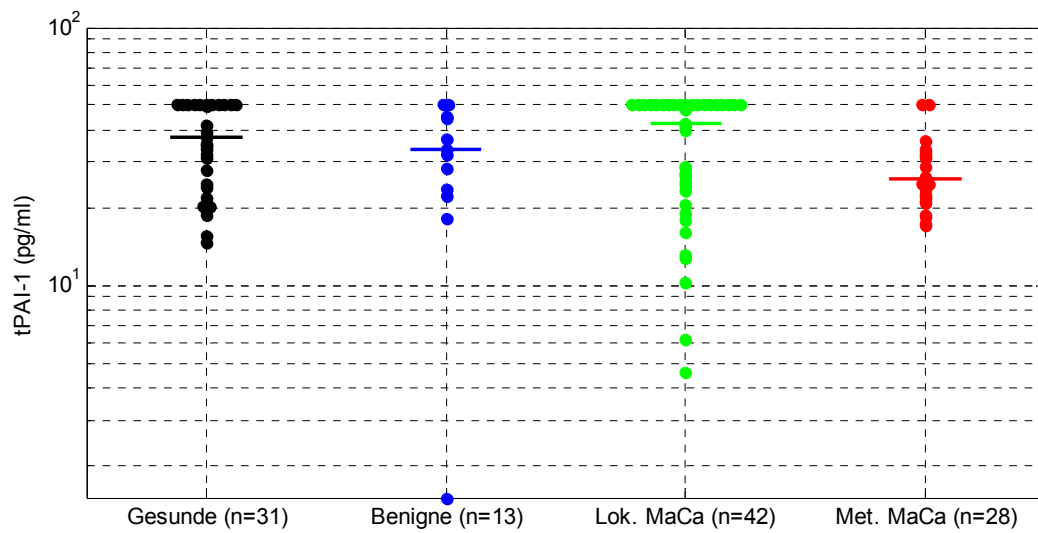


Abb. 13: Einzelwerte und Mediane von tPAI-1 in den verschiedenen Diagnosegruppen

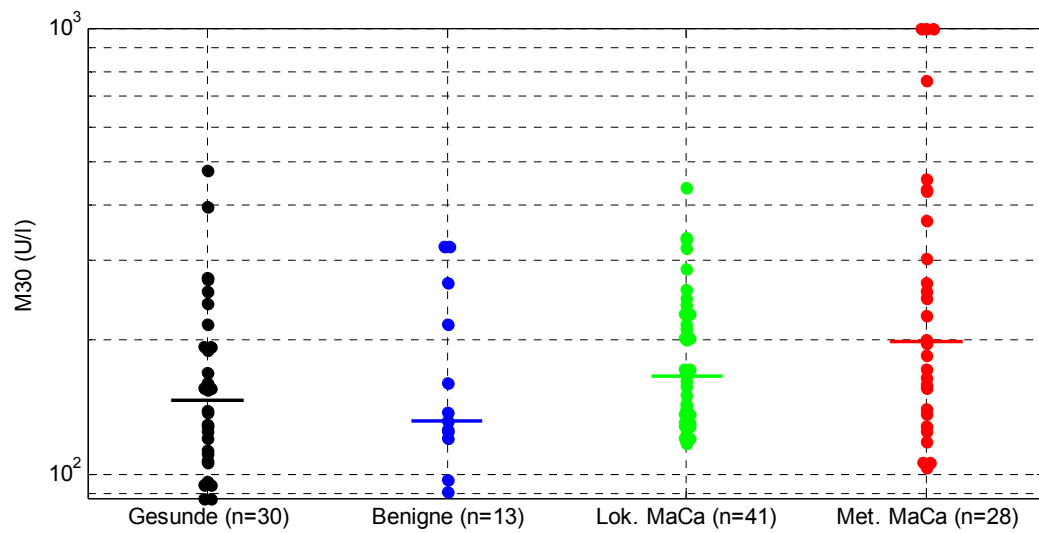


Abb. 14: Einzelwerte und Mediane von M30 in den verschiedenen Diagnosegruppen

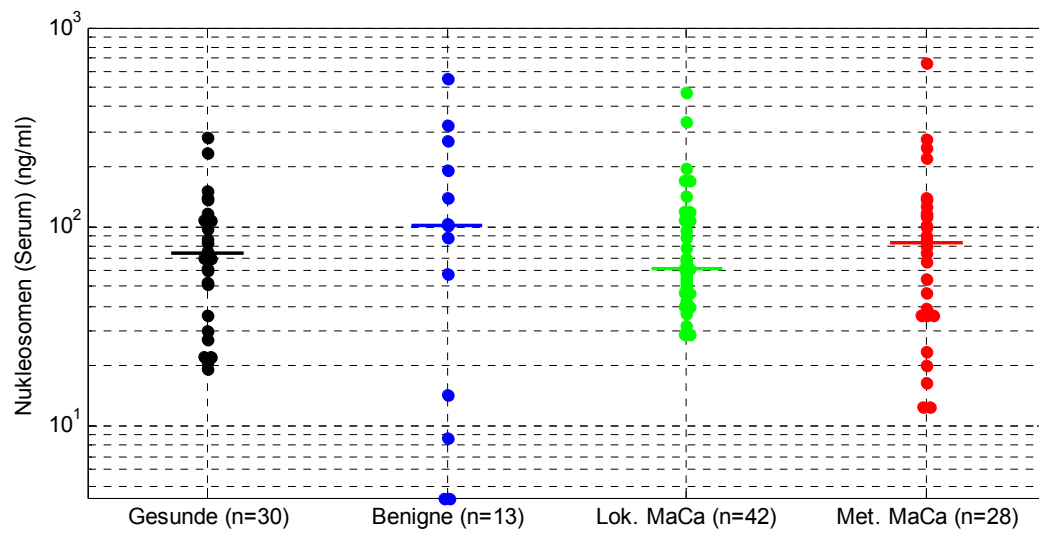


Abb. 15: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Serum) in den verschiedenen Diagnosegruppen

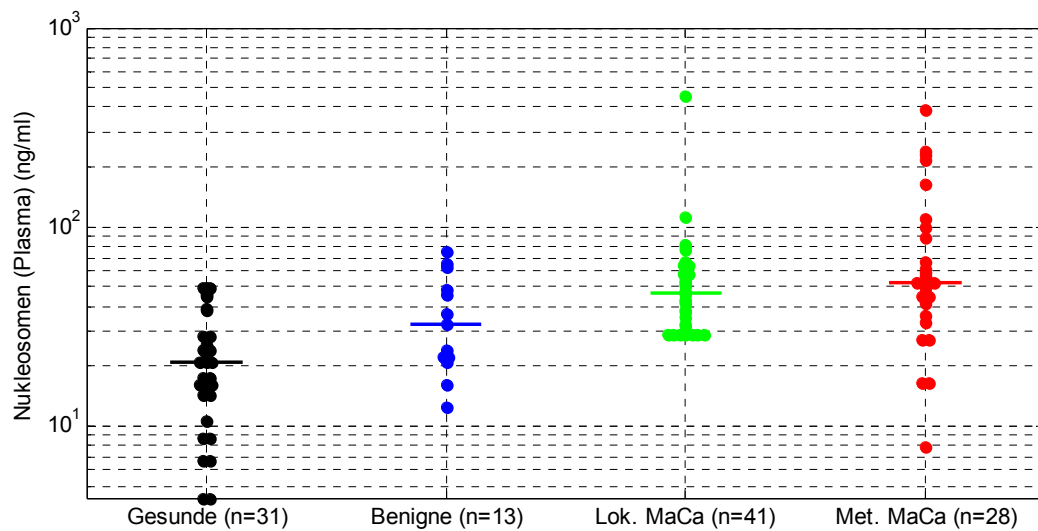


Abb. 16: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Plasma) in den verschiedenen Diagnosegruppen

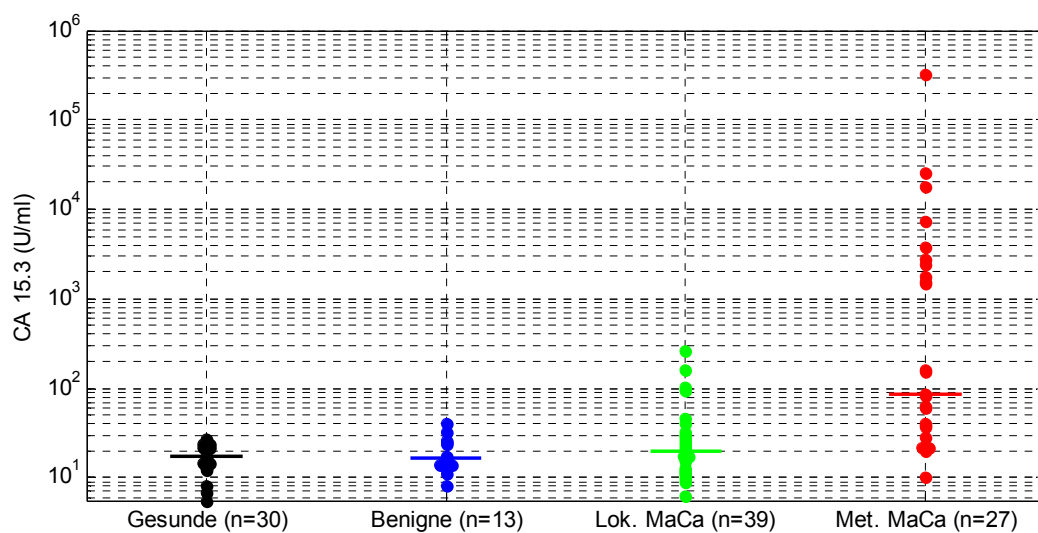


Abb. 17: Einzelwerte und Mediane von CA 15-3 in den verschiedenen Diagnosegruppen

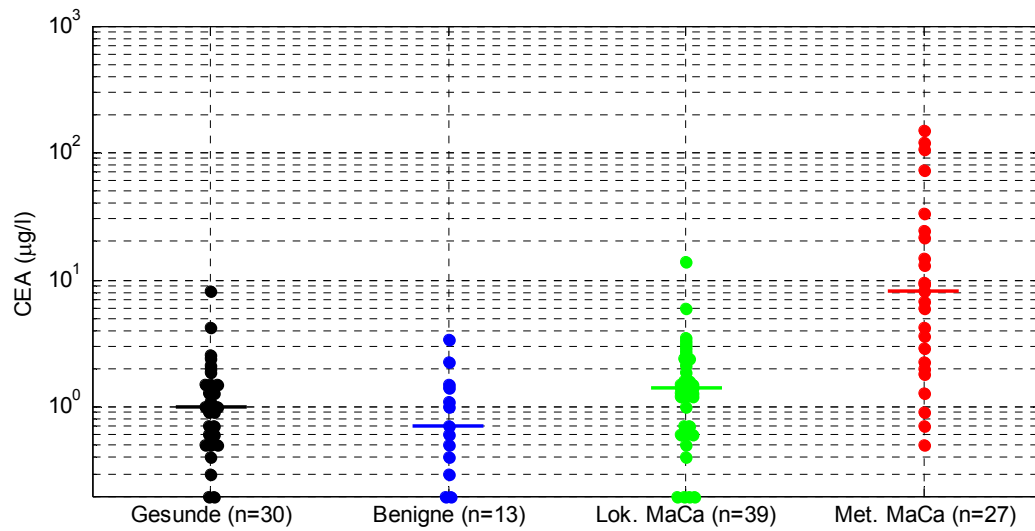


Abb. 18: Einzelwerte und Mediane von CEA in den verschiedenen Diagnosegruppen

Ergänzend zur grafischen Darstellung sind die Mediane sowie die Bandbreite, die 75. und die 95. Perzentile in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 11: Verteilung der Werte in den verschiedenen Diagnosegruppen (angegeben sind für jeden Marker einzeln Median, Bandbreite, 75. und 95. Perzentile)

	Gruppe	Anzahl	Median	Bandbreite	75%	95%
MIF (pg/ml)	Gesunde	31	0,8	0,1 - 6	1,4	5,9
	Benigne	13	2,5	0,3 - 9,3	4,4	9,3
	Lok. MaCa	42	1,5	0,1 - 21,5	2,3	6,5
	Met. MaCa	28	8,1	0,4 - 50	18,1	50,0
sFAS (pg/ml)	Gesunde	31	1,7	0,5 - 3,6	2,3	3,4
	Benigne	13	1,9	0,4 - 5,5	2,5	5,5
	Lok. MaCa	42	2,5	0,3 - 22,2	3,3	4,2
	Met. MaCa	28	4,0	0,5 - 20,5	6,9	19,3
sICAM (pg/ml)	Gesunde	31	51,6	16,4 - 250	75,4	167
	Benigne	13	76,4	5 - 247	97,1	247
	Lok. MaCa	42	61,5	23,3 - 163	87	120
	Met. MaCa	28	105,0	28,4 - 250	136,0	249,1
tPAI-1 (pg/ml)	Gesunde	31	37,5	14,7 - 50	50	50
	Benigne	13	33,7	1,5 - 50	44,8	50
	Lok. MaCa	42	42,2	4,6 - 50	50	50
	Met. MaCa	28	26,0	17,2 - 50	32,0	50,0
M30 (pg/ml)	Gesunde	30	146	88,3 - 477	193	397
	Benigne	13	131	91,4 - 324	216	324
	Lok. MaCa	41	165	117 - 439	229	337
	Met. MaCa	28	198,0	103 - 1000	400,5	1000,0
Nukleosomen (Serum) (ng/ml)	Gesunde	30	73	19,2 - 283	107	234
	Benigne	13	101	4,4 - 558	194	558
	Lok. MaCa	42	61,7	28,8 - 475	107	198
	Met. MaCa	28	82,3	12,4 - 664	121,0	312,1
Nukleosomen (Plasma) (ng/ml)	Gesunde	31	20,8	4,4 - 49,6	38,2	49,6
	Benigne	13	32,7	12,4 - 74,4	48,5	74,4
	Lok. MaCa	41	46,9	28,8 - 458	58,8	81
	Met. MaCa	28	52,2	7,78 - 390	93,7	255,0
CA 15.3 (U/ml)	Gesunde	30	17,7	5,6 - 27,4	23,3	26,9
	Benigne	13	17	8,2 - 41,1	25	41,1
	Lok. MaCa	39	19,5	6,3 - 258	29,1	164
	Met. MaCa	27	87,7	10 - 319000	2298,3	69941,5
CEA (µg/l)	Gesunde	30	1	0,2 - 8,2	1,5	4,2
	Benigne	13	0,7	0,2 - 3,4	1,4	3,4
	Lok. MaCa	39	1,4	0,2 - 14,1	2,4	5,9
	Met. MaCa	27	8,3	0,5 - 149	20,0	126,1

Die Mediane aller Marker, außer t-PAI-1 und in Serumproben gemessener Nukleosomen, waren bei den gesunden Frauen am niedrigsten und bei den Patientinnen mit Mammakarzinom am höchsten. Außerdem zeigten sich für alle Marker außer M30 und in Serum- oder Plasmaproben gemessene Nukleosomen höhere Werte bei den Patientinnen mit metastasiertem als mit lokal begrenztem Mammakarzinom. Wie aus den Grafiken und der Tabelle ersichtlich ist, waren die Ergebnisse hinsichtlich der Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen wesentlich inkonsistenter.

5.1.2 Differenzierung der Patientengruppen

Um eine genauere Aussage bezüglich der diagnostischen Wertigkeit der Marker treffen zu können, wurde die diagnostische Signifikanz für je zwei Diagnosegruppen mit dem U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon für unverbundene Stichproben berechnet.

Tab. 12: Diagnostische Signifikanz ausgedrückt in Form von p-Werten (markiert: $p < 0,05$)

Marker	Gesunde vs. Benigne	Gesunde vs. Lok. MaCa	Gesunde vs. Met. MaCa	Benigne vs. Lok. MaCa	Benigne vs. Met. MaCa	Lok. MaCa vs. Met. MaCa
MIF	0,0014	0,0026	<0,0001	0,0881	0,0033	<0,0001
sFAS	0,3672	0,0007	<0,0001	0,2009	0,0014	<0,0001
sICAM	0,1534	0,1291	0,0006	0,5656	0,1199	0,0008
tPAI-1	0,3033	0,9355	0,0045	0,3129	0,1374	0,0199
M30	0,9367	0,0808	0,0142	0,1657	0,0624	0,1691
Nukleosomen (Serum)	0,6722	0,6354	0,9132	0,5068	0,8009	0,7552
Nukleosomen (Plasma)	0,0445	<0,0001	<0,0001	0,0360	0,0320	0,3527
CA 15.3	1,0000	0,1585	<0,0001	0,3579	0,0002	<0,0001
CEA	0,3269	0,1615	<0,0001	0,0625	<0,0001	<0,0001

Patientinnen mit Mammakarzinom versus gesunde Frauen

MIF, sFAS und in Plasmaproben gemessene Nukleosomen diskriminierten signifikant zwischen den gesunden Frauen und den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakar-

zinom. Die etablierten Marker CA 15-3 und CEA zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. Alle Marker außer in Serumproben bestimmte Nukleosomen zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den gesunden Frauen und den Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom.

Darüber hinaus bewiesen MIF, sFAS, sICAM, tPAI-1, CA 15-3 und CEA diagnostische Signifikanz zwischen den Patientinnen mit lokal begrenztem und metastasiertem Mammakarzinom.

Patientinnen mit Mammakarzinom versus Patientinnen mit benigner Brust-erkrankung

In vielen Situationen, insbesondere bei der Diagnose des Mammakarzinoms, ist nicht nur die Abgrenzung gegenüber gesunden Frauen, sondern auch gegenüber Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen klinisch relevant. In der vorliegenden Arbeit diskriminierten nur in Plasmaproben bestimmte Nukleosomen signifikant zwischen den Patientinnen mit benigner Brusterkrankung und mit lokal begrenztem Mammakarzinom. CEA zeigte mit $p=0,0625$ einen nahezu signifikanten Unterschied. CA 15-3 zeigte hingegen keinen Unterschied.

Zwischen den Frauen mit benigner Brusterkrankung und den Patientinnen mit metastasiertem Karzinom fand sich für MIF, sFAS, Nukleosomen in Plasmaproben, CA 15-3 und CEA ein signifikanter Unterschied.

5.1.3 Diagnostische Wertigkeit

Zur Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit der Marker wurden ROC-Kurven erstellt und die AUC²⁹ berechnet. Die ROC-Kurven zeigen die Sensitivität und die Spezifität eines Markers für jeden Cut-off-Wert. Die AUC ist ein Maß für die Güte des Markers.

Zunächst wurden ROC-Kurven erstellt, bei denen die gesunden Frauen und die Frauen mit benigner Brusterkrankung als je eine Gruppe allen Patientinnen mit Mammakarzinom gegenübergestellt wurden. Die Sensitivität wurde dabei bei allen Markern als Anteil der Patientinnen mit Karzinom und Markerkonzentration oberhalb des Cut-off an der Gesamtheit der Patientinnen mit Karzinom definiert. Als Spezifität wurde dementsprechend der Anteil der Patientinnen ohne Karzinom und mit Markerkonzentration unterhalb des Cut-off an der Gesamtheit der gesunden Frauen beziehungsweise der Frauen mit benigner Brusterkrankung bezeichnet.

²⁹ AUC=Area under the curve

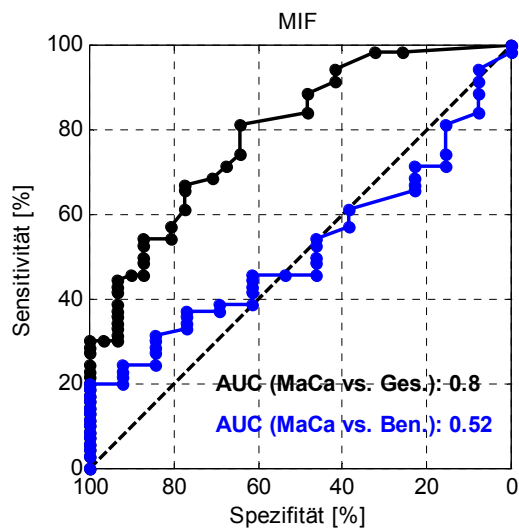


Abb. 19: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von MIF

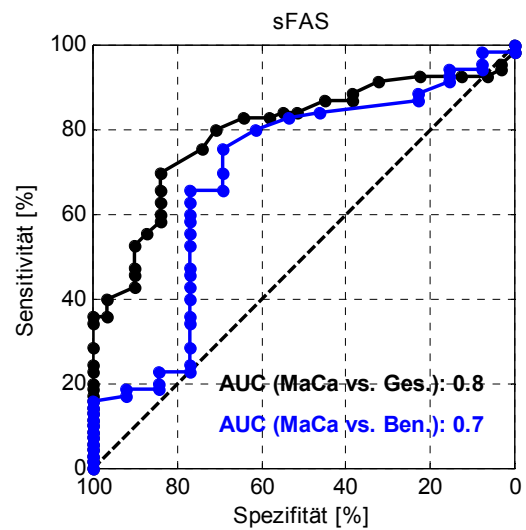


Abb. 20: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von sFAS

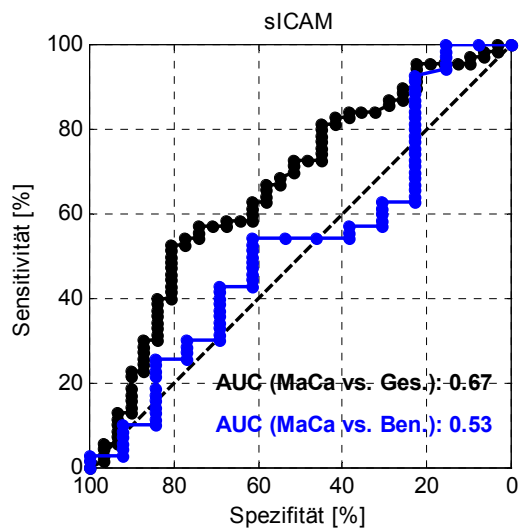


Abb. 21: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von sICAM

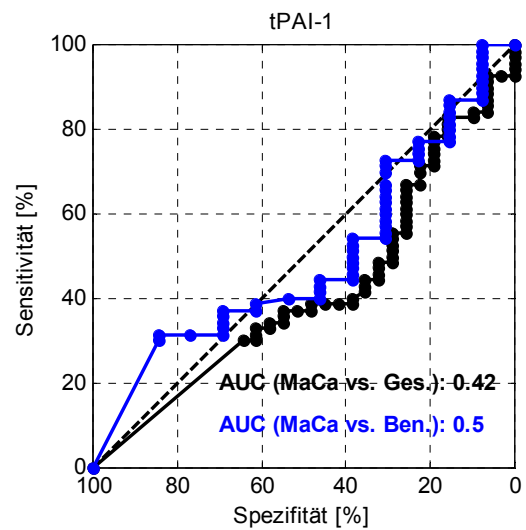


Abb. 22: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von tPAI-1

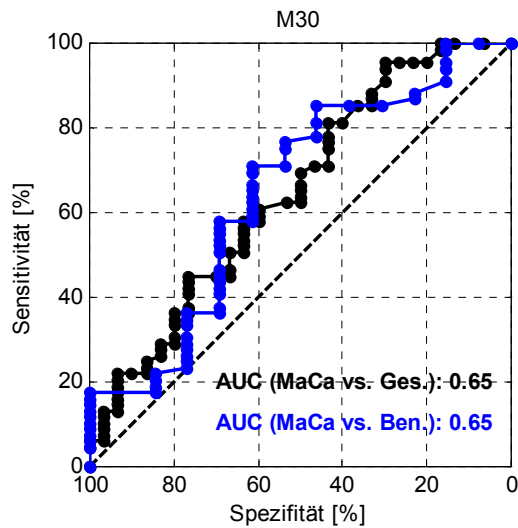


Abb. 23: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von M30

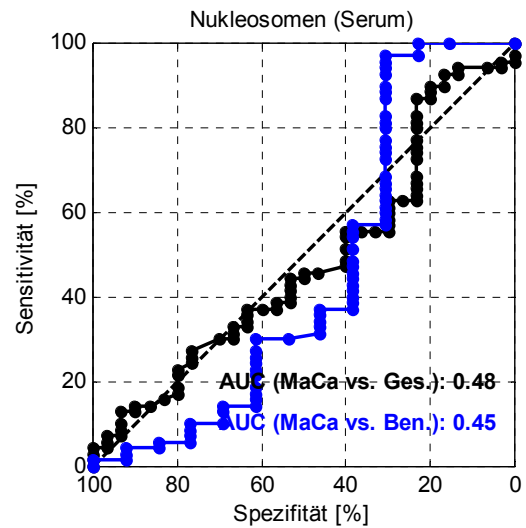


Abb. 24: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von Nukleosomen (Serum)

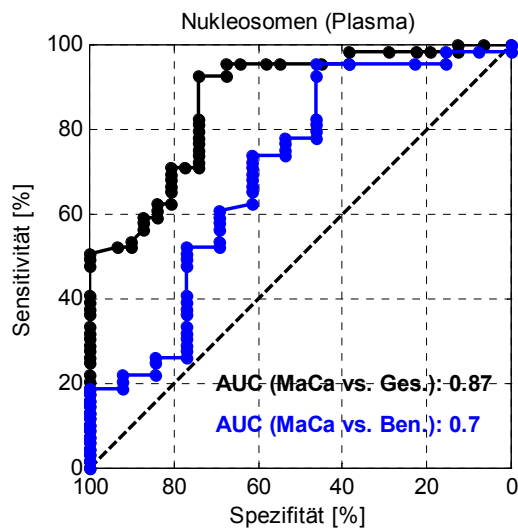


Abb. 25: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von Nukleosomen (Plasma)

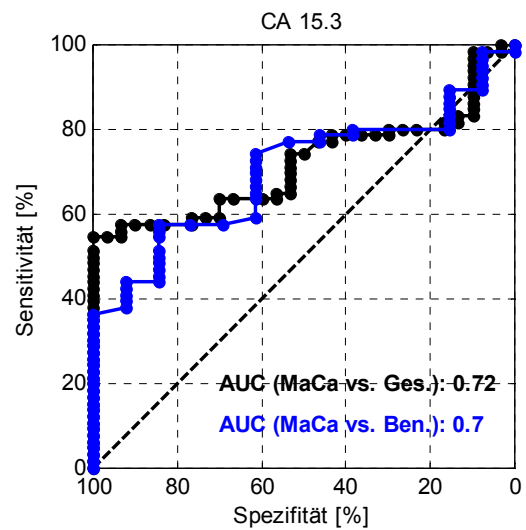


Abb. 26: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von CA 15-3

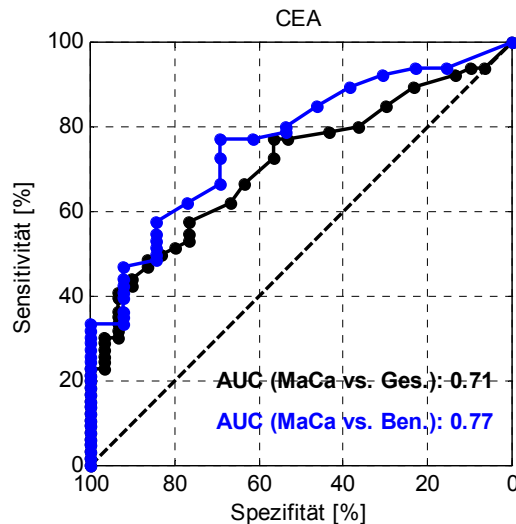


Abb. 27: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von CEA

Der Vergleich der Markerkonzentrationen der Patientinnen mit Mammakarzinom gegenüber den gesunden Frauen zeigte mit einer AUC von 0,87 das beste Sensitivitäts-Spezifitätsprofil für in Plasmaproben gemessene Nukleosomen. Auch MIF und sFAS wiesen eine AUC größer 0,8 auf. Die etablierten Marker CA 15-3 und CEA zeigten mit einer AUC von 0,72 und 0,71 hingegen etwas schlechtere Ergebnisse. Sie zeigten jedoch bei hoher Spezifität (100%) hohe Sensitivitäten von ca. 40%. Bei tPAI-1 und in Serumproben gemessenen Nukleosomen glichen die Kurven hingegen fast den Winkelhalbierenden.

Beim Vergleich der Markerkonzentrationen von Patientinnen mit Mammakarzinom und Frauen mit gutartiger Brusterkrankung zeigten alle Marker außer M30, in Serumproben gemessenen Nukleosomen und CEA schlechtere Ergebnisse. Während keiner der Marker eine AUC größer 0,8 zeigte, wiesen sowohl sFAS und in Plasmaproben gemessene Nukleosomen als auch die etablierten Marker CA 15-3 und CEA eine AUC größer 0,7 auf.

Da die gesunden Frauen die größere und homogenere Kontrollgruppe darstellten, wurden diese genauer im Vergleich mit den Mammakarzinompatientinnen untersucht. Es wurden ROC-Kurven für den Vergleich der Gesunden und der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom erstellt. Da bei einem Marker für die Früherkennung des Mammakarzinoms besonders wichtig ist, dass Frauen mit Brustkrebs in frühen Stadien erfasst werden, wurden des Weiteren ROC-Kurven erstellt, bei denen die gesunden Frauen nur den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom gegenübergestellt wurden. Sensitivität und Spezifität wurden bei allen Markern wie bei der vorangehenden Fragestellung definiert.

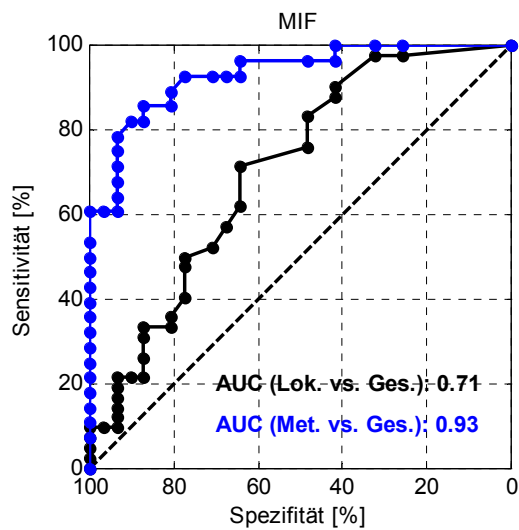


Abb. 28: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von MIF

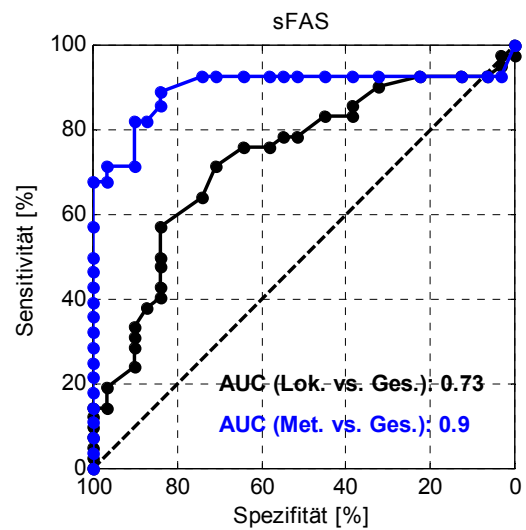


Abb. 29: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von sFAS

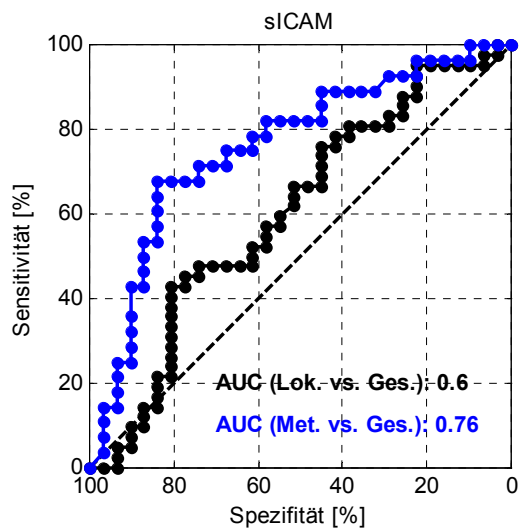


Abb. 30: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von sICAM

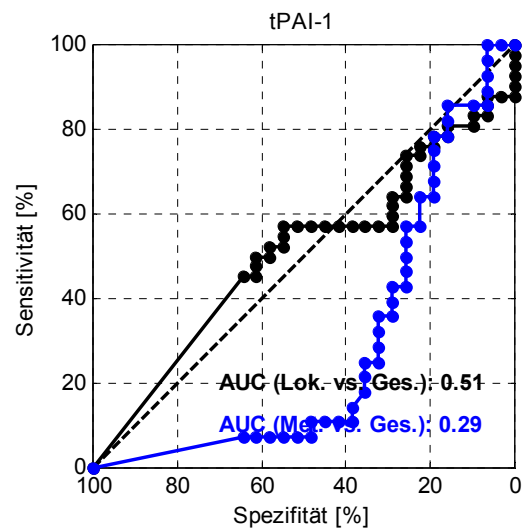


Abb. 31: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von tPAI-1

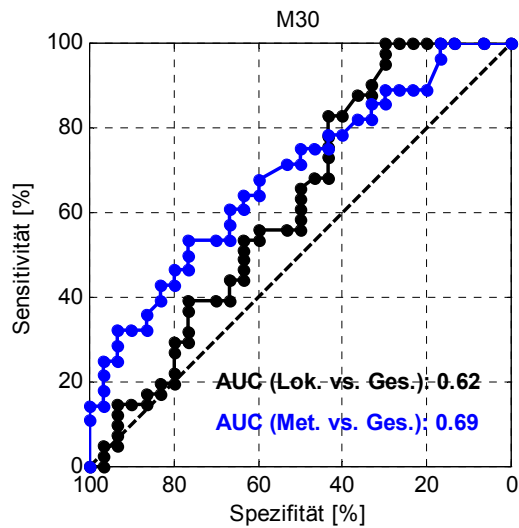


Abb. 32: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von M30

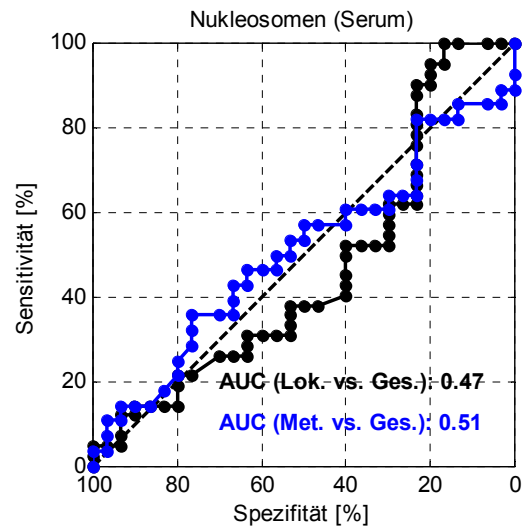


Abb. 33: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von Nukleosomen (Serum)

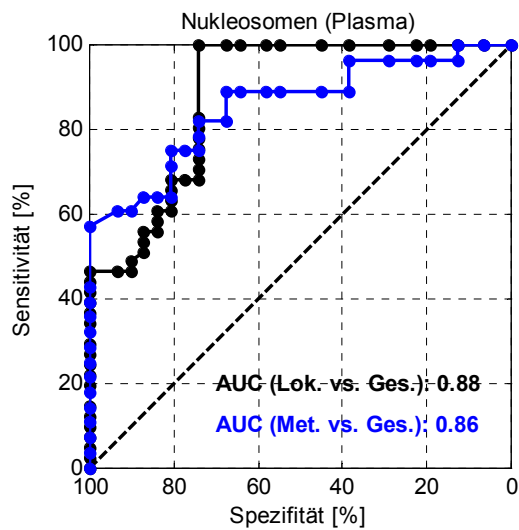


Abb. 34: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von Nukleosomen (Plasma)

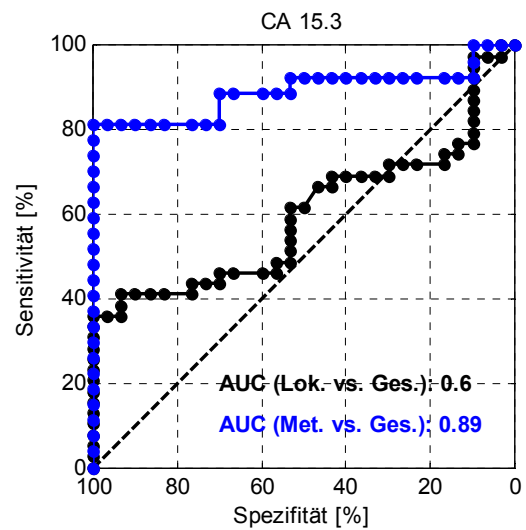


Abb. 35: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von CA 15-3

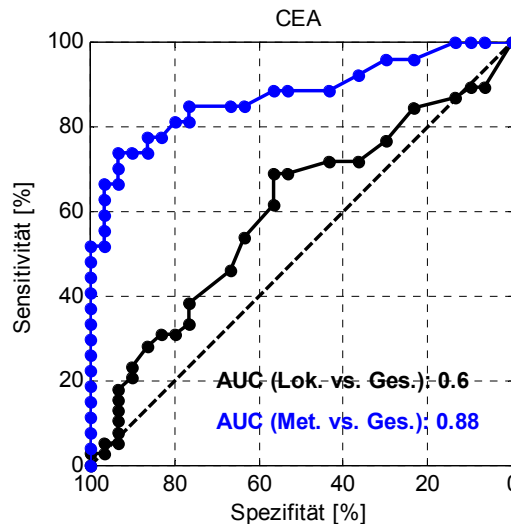


Abb. 36: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von CEA

Alle Marker zeigten bei der Differenzierung der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom gegenüber den gesunden Frauen ein ähnlich gutes oder besseres Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil als bei der Differenzierung der Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom gegenüber den gesunden Frauen. Bei der Differenzierung der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zeigte MIF mit einer AUC von 0,93 das beste Ergebnis. sFAS zeigte mit einer AUC von 0,9 ein ähnlich gutes Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil. Die etablierten Marker erbrachten wie in Plasmaproben gemessene Nukleosomen etwas schlechtere Ergebnisse (AUCs größer 0,8). Bei in Serumproben gemessenen Nukleosomen glich die ROC-Kurve fast der Winkelhalbierenden.

Bei der speziell für die Früherkennung wichtigen Fragestellung, also dem Vergleich der Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom gegenüber gesunden Frauen, zeigten nur in Plasmaproben gemessene Nukleosomen eine AUC größer 0,8 mit hoher Sensitivität bei ebenfalls großer Spezifität. Während MIF und sFAS AUCs größer 0,7 aufwiesen, zeigten die etablierten Marker CA 15-3 und CEA nur AUCs von 0,6 mit geringerer Sensitivität als in Plasmaproben gemessene Nukleosomen.

5.1.4 Zusammenfassung

Es lässt sich zusammenfassen, dass ein deutlicher Unterschied der Markerkonzentrationen zwischen den Patientinnen mit lokal begrenztem und mit metastasiertem Mammakarzinom bestand. Auch zwischen den gesunden Frauen und den Patientinnen mit Mammakarzinom unterschieden sich die Markerkonzentrationen eindeutig. Die Ergebnisse bezüglich der Patientinnen mit benigner Brusterkrankung waren hingegen wesentlich inkonsistenter. Das beste Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil zur Diagnose eines Mam-

makarzinoms bereits in frühem Stadium fand sich für in Plasmaproben gemessene Nukleosomen.

5.2 Korrelationen der Biomarker untereinander

Die Korrelation der Marker untereinander wurde untersucht. Es wurden hierzu Spearman-Korrelationskoeffizienten und p-Werte für die Werte der einzelnen Diagnosegruppen sowie aller Diagnosegruppen zusammengefasst berechnet. Bei einem Korrelationskoeffizienten größer als 0,3 beziehungsweise kleiner als -0,3 und einem p-Wert kleiner 0,05 wurde von einer positiven beziehungsweise negativen Korrelation ausgegangen. Die Korrelationskoeffizienten sowie die p-Werte sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Korrelationskoeffizienten größer 0,3 wurden blau und p-Werte kleiner 0,05 wurden gelb markiert.

5.2.1 Alle Diagnosegruppen

Tab. 13: Spearman-Korrelationskoeffizienten (Korr.) und p-Werte (p) berechnet für die prätherapeutisch gemessenen Werte von allen Patientinnen/Probanden (zwischen 105 und 114 Beobachtungen)

		MIF	sFAS	sICAM	tPAI-1	M30	Nukl. (Serum)	Nukl. (Plasma)	CA 15.3
sFAS	Korr.	0,431							
	p	<0,001							
sICAM	Korr.	0,263	0,390						
	p	0,005	<0,001						
tPAI-1	Korr.	0,002	-0,111	0,123					
	p	0,979	0,239	0,194					
M30	Korr.	0,081	0,084	0,210	0,082				
	p	0,398	0,380	0,026	0,388				
Nukl. (Serum)	Korr.	0,178	-0,067	-0,021	-0,046	0,176			
	p	0,059	0,478	0,829	0,628	0,063			
Nukl. (Plasma)	Korr.	0,271	0,287	0,249	0,013	0,314	0,115		
	p	0,004	0,002	0,008	0,893	0,001	0,227		
CA 15.3	Korr.	0,324	0,256	0,271	-0,021	0,321	0,079	0,268	
	p	0,001	0,007	0,004	0,825	0,001	0,413	0,005	
CEA	Korr.	0,345	0,381	0,287	-0,088	0,189	0,034	0,255	0,425
	p	<0,001	<0,001	0,003	0,362	0,050	0,722	0,008	<0,001

Bei den Werten aller Diagnosegruppen bestand für tPAI-1 und in Serumproben gemessene Nukleosomen keine Korrelation mit anderen Markern. Die etablierten Marker CA 15-3 und CEA korrelierten signifikant miteinander. CA 15-3 korrelierte zudem signifikant mit MIF und M30, während CEA signifikant mit MIF und sFAS korrelierte. Signi-

signifikante Korrelationen zeigten sich außerdem zwischen sFAS und sICAM sowie zwischen M30 und in Plasmaproben gemessenen Nukleosomen.

5.2.2 Gesunde Frauen

Tab. 14: Spearman-Korrelationskoeffizienten (Korr.) und p-Werte (p) berechnet für die gemessenen Werte der gesunden Frauen (zwischen 27 und 31 Beobachtungen)

		MIF	sFas	sICAM	tPAI-1	M30	Nukl. (Serum)	Nukl. (Plasma)	CA15.3
FAS	Korr.	0,366							
	p	0,043							
sICAM	Korr.	-0,312	0,089						
	p	0,088	0,633						
tPAI-1	Korr.	-0,310	-0,253	0,372					
	p	0,090	0,169	0,040					
M30	Korr.	-0,253	-0,198	0,066	0,017				
	p	0,178	0,293	0,729	0,928				
Nukl. (Serum)	Korr.	0,109	-0,070	-0,028	-0,244	0,264			
	p	0,565	0,712	0,885	0,194	0,159			
Nukl. (Plasma)	Korr.	-0,268	0,227	-0,012	-0,358	0,156	0,168		
	p	0,146	0,220	0,950	0,048	0,411	0,375		
CA15.3	Korr.	0,005	0,008	0,318	0,175	0,160	-0,184	-0,202	
	p	0,980	0,965	0,087	0,355	0,397	0,330	0,283	
CEA	Korr.	0,016	0,008	0,026	0,094	-0,167	-0,231	0,043	0,179
	p	0,932	0,965	0,890	0,622	0,379	0,220	0,822	0,344

Bei den Werten der gesunden Frauen korrelierten die etablierten Marker CEA und CA 15-3 nicht miteinander. Es zeigte sich auch keine signifikante Korrelation der etablierten Marker zu den anderen gemessenen Markern, was wohl auf die kleinen Fallzahlen zurückzuführen war. Allerdings zeigten MIF und sFAS sowie tPAI-1 und sICAM eine signifikante Korrelation.

5.2.3 Patientinnen mit benigner Brusterkrankung

Tab. 15: Spearman-Korrelationskoeffizienten (Korr.) und p-Werte (p) berechnet für die gemessenen Werte der Frauen mit benigner Brusterkrankung (13 Beobachtungen)

		MIF	sFas	sICAM	tPAI-1	M30	Nukl. (Serum)	Nukl. (Plasma)	CA15.3
sFAS	Korr.	0,191							
	p	0,532							
sICAM	Korr.	0,132	0,171						
	p	0,667	0,576						
tPAI-1	Korr.	0,441	0,382	-0,275					
	p	0,132	0,198	0,363					
M30	Korr.	-0,391	-0,072	-0,264	0,146				
	p	0,186	0,815	0,383	0,634				
Nukl. (Serum)	Korr.	0,515	-0,412	-0,110	0,044	0,193			
	p	0,072	0,162	0,720	0,886	0,528			
Nukl. (Plasma)	Korr.	-0,150	0,058	-0,355	0,267	0,485	0,238		
	p	0,624	0,851	0,234	0,378	0,093	0,433		
CA 15.3	Korr.	-0,199	-0,272	-0,188	-0,185	0,019	0,243	-0,017	
	p	0,514	0,368	0,539	0,544	0,950	0,423	0,957	
CEA	Korr.	0,116	-0,094	-0,184	-0,061	0,175	0,413	0,132	-0,080
	p	0,707	0,760	0,547	0,844	0,568	0,161	0,667	0,795

Die Analyse der Werte der Patientinnen mit benigner Brusterkrankung ergab, dass bei diesem kleinen Kollektiv keiner der Marker eine signifikante Korrelation zu anderen Markern zeigte.

5.2.4 Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom

Tab. 16: Spearman-Korrelationskoeffizienten (Korr.) und p-Werte (p) berechnet für die prätherapeutisch gemessenen Werte der Frauen mit lokal begrenztem Mammakarzinom (zwischen 38 und 42 Beobachtungen)

		MIF	sFas	sICAM	tPAI-1	M30	Nukl. (Serum)	Nukl. (Plasma)	CA15.3
sFAS	Korr.	-0,039							
	p	0,807							
sICAM	Korr.	0,155	0,160						
	p	0,327	0,312						
tPAI-1	Korr.	0,457	0,084	0,223					
	p	0,002	0,595	0,155					
M30	Korr.	-0,056	-0,241	0,229	0,157				
	p	0,727	0,130	0,151	0,327				
Nukl. (Serum)	Korr.	0,138	0,006	-0,080	0,181	-0,037			
	p	0,383	0,972	0,615	0,252	0,819			
Nukl. (Plasma)	Korr.	0,260	-0,145	0,129	0,172	-0,065	0,100		
	p	0,100	0,367	0,421	0,281	0,685	0,534		
CA15.3	Korr.	-0,017	-0,086	-0,059	0,161	0,102	0,068	-0,150	
	p	0,921	0,601	0,719	0,329	0,541	0,681	0,369	
CEA	Korr.	-0,078	0,336	0,081	0,037	-0,163	0,125	-0,200	-0,063
	p	0,637	0,036	0,624	0,825	0,328	0,447	0,228	0,705

Die Werte der Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom ergaben für sICAM, M30, in Serum- sowie in Plasmaproben gemessene Nukleosomen und CA 15-3 keine Korrelation mit anderen Markern.

5.2.5 Patientinnen mit metastasiertem Karzinom

Tab. 17: Spearman-Korrelationskoeffizienten (Korr.) und p-Werte (p) berechnet für die gemessenen Werte der Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom (zwischen 27 und 28 Beobachtungen)

		MIF	sFAS	sICAM	tPAI-1	M30	Nukl. (Serum)	Nukl. (Plasma)	CA 15.3
sFAS	Korr.	0,304							
	p	0,116							
sICAM	Korr.	0,358	0,444						
	p	0,062	0,018						
tPAI-1	Korr.	0,254	-0,003	0,563					
	p	0,193	0,988	0,002					
M30	Korr.	0,287	0,192	0,383	0,421				
	p	0,139	0,328	0,044	0,026				
Nukl. (Serum)	Korr.	0,246	-0,149	0,011	-0,242	0,231			
	p	0,207	0,449	0,957	0,214	0,238			
Nukl. (Plasma)	Korr.	0,212	0,306	0,555	0,374	0,399	0,059		
	p	0,278	0,113	0,002	0,050	0,035	0,767		
CA 15.3	Korr.	0,276	0,268	0,378	0,327	0,610	0,093	0,539	
	p	0,164	0,177	0,052	0,096	0,001	0,643	0,004	
CEA	Korr.	0,317	0,381	0,445	0,147	0,445	0,078	0,472	0,813
	p	0,107	0,050	0,020	0,465	0,020	0,698	0,013	<0,001

Die Werte der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zeigten die meisten signifikanten Korrelationen. Die etablierten Marker CEA und CA 15-3 korrelierten signifikant miteinander sowie mit M30 und in Plasmaproben gemessenen Nukleosomen. CEA zeigte zudem eine signifikante Korrelation mit sICAM. sICAM korrelierte auch signifikant mit sFAS, tPAI-1, M30 und in Plasmaproben gemessenen Nukleosomen. Eine weitere signifikante Korrelation fand sich für tPAI-1 und M30.

5.2.6 Zusammenfassung

Die Korrelationen der Marker untereinander unterschieden sich in den verschiedenen Gruppen. Die meisten signifikanten Korrelationen fanden sich bei den Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, während sich bei den Frauen mit benigner Brustkrankung keine signifikante Korrelation zeigte. Die etablierten Marker CEA und CA 15-3 zeigte eine starke Korrelation untereinander sowie zu anderen Markern.

5.3 Prädiktive Wertigkeit der Marker

Die Hauptfragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob die untersuchten Marker zur Vorhersage beziehungsweise zur frühzeitigen Beurteilung des Ansprechens auf eine neoadjuvante Chemotherapie geeignet sind. Die Patientinnen wurden hierzu gemäß dem pathologisch-anatomischen Befund und in Anlehnung an die RECIST³⁰-Kriterien in drei Gruppen eingeteilt:

- Patientinnen mit kompletter Remission (CR): kein invasiver Tumorrest im ursprünglichen Tumorbett und in den untersuchten Lymphknoten nachweisbar
- Patientinnen mit partieller Remission (PR): Abnahme des längsten Tumordurchmessers um mindestens 30% gegenüber dem prätherapeutisch erhobenen Sonografiebefund
- Patientinnen ohne Remission (NC): alle restlichen Patientinnen.

Bei der statistischen Auswertung der Daten wurde das Therapieansprechen auf zwei unterschiedliche Arten definiert. Es wurden zunächst die CR- und PR-Patientinnen als Patientinnen mit gutem Therapieansprechen zusammengefasst und den NC-Patientinnen gegenübergestellt (Variante I). In einem zweiten Schritt wurden die PR- und NC-Patientinnen als Patientinnen mit schlechtem Therapieansprechen den CR-Patientinnen gegenübergestellt (Variante II). Die Gründe hierfür waren folgende:

- Derzeit wird eine applizierte neoadjuvante zytostatische Therapie weitergeführt, wenn sich klinisch eine partielle Remission zeigt. Nur bei Patientinnen ohne Remission oder mit Größenzunahme des Tumors nach dem zweiten Chemotherapiezyklus wird die Behandlung abgebrochen oder intensiviert (Bauerfeind et. al., 2007). Aus diesem Grund war es sinnvoll zu untersuchen, ob die Marker hilfreich sind, die NC-Patientinnen gegenüber den CR- und PR-Patientinnen zu selektionieren (Variante I).
- Demgegenüber ist jedoch zu beachten, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich für die Patientinnen mit kompletter histopathologischer Remission eine gute Langzeitprognose beschrieben ist. Daraus ließ sich die Hypothese bilden, dass die Prognose insgesamt verbessert werden könnte, indem man sowohl die PR- als auch die NC-Patientinnen selektioniert, um ihnen eine andere, effektivere Behandlung zukommen zu lassen und die Tumornachsorge zu intensivieren (Variante II).

³⁰ response evaluation criteria in solid tumors

Alle Marker wurden in Blutproben bestimmt, die zu vier festgelegten Zeitpunkten gewonnen wurden:

- Prätherapeutisch
- Am Tag 8 nach Beginn der Therapie
- Direkt vor Applikation des 2. Chemotherapiezyklus
- Posttherapeutisch beziehungsweise bei mehr als fünf verabreichten Chemotherapiezyklen kurz vor dem 6. Zyklus

Die Werteverteilungen mit Patientenanzahl, Medianen, Bandbreiten, 75. und 95. Perzentilen sowie p-Werten wurden für alle Zeitpunkte in Tabellen getrennt für die beiden Varianten dargestellt. Auch die Markerkinetiken, also der Anstieg beziehungsweise die Abnahme der Markerkonzentrationen in prozentualem Verhältnis zum prätherapeutischen Basiswert, wurden in diesen Tabellen aufgeführt. Zur besseren Darstellung der prädiktiven Wertigkeit wurden zudem AUCs sowie Sensitivitäten berechnet. Bei der Berechnung der AUCs wurde einheitlich davon ausgegangen, dass hohe Werte beziehungsweise bei den Kinetiken ansteigende Werte mit einem schlechteren Therapieansprechen assoziiert sind. Die AUCs sind ebenfalls den Übersichtstabellen zu entnehmen. Die Einzelwerte und Mediane wurden zusätzlich prätherapeutisch und vor Applikation des 2. Chemotherapiezyklus als Dot plot-Grafiken veranschaulicht. Wie bei der Präsentation der Diagnosegruppen wurde die y-Achse auch hier logarithmisch skaliert. Darüber hinaus wurden einige ausgewählte ROC-Kurven in der Arbeit dargestellt.

5.3.1 Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie

Das Ansprechen der Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom auf die neoadjuvante Chemotherapie wurde anhand des dokumentierten pathologisch-anatomischen Befunds erhoben (genaue Kriterien siehe 3.1.5). Von den 51 Patientinnen zeigten 9 Patientinnen (17,7%) eine komplette Remission. 29 Patientinnen (56,9%) zeigten eine partielle Remission und 13 Patientinnen (25,5%) zeigten keine Remission. Eine Progression der Erkrankung während der Therapie wurde bei keiner der Patientinnen dokumentiert.

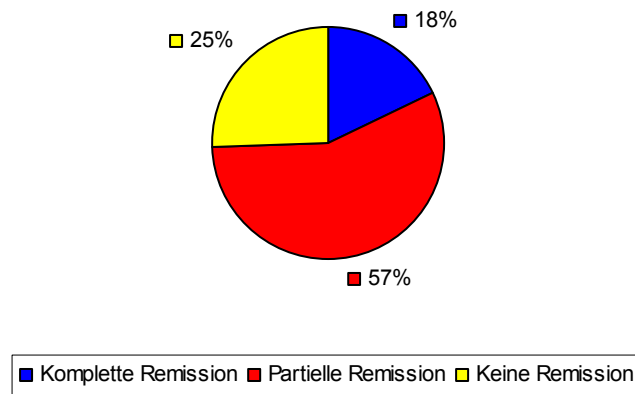


Abb. 37: Ansprechen der Patientinnen auf die neoadjuvante Chemotherapie

Demzufolge zeigten in Variante I 38 Patientinnen (74,51%) eine komplette oder partielle Remission und 13 Patientinnen (25,49%) keine Remission. In Variante II hatten 9 Patientinnen (17,65%) eine komplette Remission und 42 Patientinnen (82,35%) eine partielle oder keine Remission.

5.3.2 Variante I: NC versus PR+CR

Verteilung und prädiktive Wertigkeit der Biomarker zu verschiedenen Zeitpunkten

Tab. 18: Patientenanzahl (n), Median, Bandbreite, 75. und 95. Perzentile, p-Wert und AUC zu allen untersuchten Zeitpunkten sowie zur Kinetik 1 und 2 (prozentuale Veränderung vom prätherapeutischen Basiswert bis zum 2. Zyklus beziehungsweise bis zum Ende der Therapie, positiv=Anstieg und negativ=Abfall der Werte) angegeben für alle Marker im Vergleich zwischen Patientinnen mit partieller und kompletter Remission (CR+PR) gegenüber Patientinnen ohne Remission (NC), p-Werte < 0,05 gelb markiert, p-Werte < 0,1 blau markiert

Marker	Zeitpunkt	Einheit	CR+PR					NC					p-Wert	AUC
			n	Median	Bandbreite	75%	95%	n	Median	Bandbreite	75%	95%		
MIF	präth.	pg/ml	30	1,2	0,1 - 8,2	2,0	6,5	12	2,0	0,5 - 21,5	3,6	21,5	0,0815	0,68
	Tag 8	pg/ml	13	0,8	0,1 - 15,6	2,3	15,6	3	1,5	1,5 - 2,2	2,2	2,2	0,2327	0,64
	vor 2. Zyklus	pg/ml	32	1,4	0,2 - 8,4	2,9	6,0	11	1,4	0,5 - 10,0	4,7	10,0	0,4860	0,57
	postth.	pg/ml	32	1,4	0,2 - 11,2	2,6	9,8	11	2,9	0,3 - 46,3	4,2	46,3	0,3297	0,60
	Kinetik 1	%	24	5,6	-84,1 - 900,0	141,7	300,0	10	-11,2	-68,4 - 376,2	60,0	376,2	0,6500	0,45
	Kinetik 2	%	25	40,0	-85,4 - 1766,7	100,0	862,5	10	28,2	-87,9 - 660	166,7	660,0	0,4763	0,42
sFas	präth.	pg/ml	30	2,4	0,8 - 4,4	3,3	4,2	12	2,8	0,3 - 22,2	3,4	22,2	0,8454	0,48
	Tag 8	pg/ml	13	3,5	2,5 - 5,3	3,9	5,3	3	3,1	2,8 - 28,3	28,3	28,3	0,9364	0,47
	vor 2. Zyklus	pg/ml	32	3,2	1,0 - 7,0	3,9	5,5	11	2,4	0,9 - 27,4	4,6	27,4	0,5869	0,44
	postth.	pg/ml	32	3,2	1,1 - 21,3	3,8	5,4	11	2,7	0,5 - 25,6	5,9	25,6	0,4516	0,42
	Kinetik 1	%	24	20,9	-30,8 - 268,4	39,8	91,7	10	22,2	-42,9 - 433,3	41,2	433,3	0,6231	0,44
	Kinetik 2	%	25	33,3	-19,4 - 508,6	56,5	92,9	10	20,2	-38,5 - 500	106,2	500,0	0,5467	0,43
sICAM	präth.	pg/ml	30	61,5	23,3 - 138,0	88,0	120,0	12	69,1	33,9 - 163,0	84,3	163,0	0,8783	0,52
	Tag 8	pg/ml	13	79,2	43 - 154,0	86,5	154,0	3	89,6	43,8 - 236,0	236,0	236,0	0,1771	0,64
	vor 2. Zyklus	pg/ml	32	72,0	31,1 - 184,0	97,4	176,0	11	69,5	24 - 178,0	87,8	178,0	0,5495	0,44
	postth.	pg/ml	32	87,4	31,3 - 250,0	102,5	153,0	11	80,3	56,2 - 145,0	109,0	145,0	0,9667	0,51
	Kinetik 1	%	24	11,2	-8,2 - 91,6	30,7	51,8	10	6,9	-70,6 - 58,4	37,9	58,4	0,7768	0,47
	Kinetik 2	%	25	20,4	-11,1 - 155,3	65,4	148,0	10	19,0	-11,0 - 83,5	30,2	83,5	0,2501	0,37
tPAI-1	präth.	pg/ml	30	35,8	4,6 - 50,0	50,0	50,0	12	45,0	18,0 - 50,0	50,0	50,0	0,6297	0,55
	Tag 8	pg/ml	13	50,0	7,5 - 50,0	50,0	50,0	3	48,1	40,4 - 50,0	50,0	50,0	0,2034	0,53
	vor 2. Zyklus	pg/ml	32	50,0	6,6 - 50,0	50,0	50,0	11	50,0	18,9 - 50,0	50,0	50,0	0,6362	0,46
	postth.	pg/ml	32	48,7	4,5 - 50,0	50,0	50,0	11	40,1	20,6 - 50,0	50,0	50,0	0,7357	0,47
	Kinetik 1	%	24	0,0	-16,7 - 987,0	30,0	212,5	10	0,0	-60,7 - 58,3	17,2	58,3	0,5100	0,43
	Kinetik 2	%	25	0,0	-61,2 - 987,0	35,3	212,5	10	-6,9	-39,4 - 85,6	0,0	85,6	0,3462	0,40

Marker	Zeitpunkt	Einheit	CR+PR					NC					p-Wert	AUC
			n	Median	Bandbreite	75%	95%	n	Median	Bandbreite	75%	95%		
M30	präh.	pg/ml	29	166,0	117,0 - 438,0	229,0	337,0	12	163,0	128,0 - 439,0	215,0	439,0	0,5665	0,56
	Tag 8	pg/ml	13	221,0	128,0 - 526,0	244,0	526,0	3	156,0	138,0 - 179,0	179,0	179,0	0,8118	0,18
	vor 2. Zyklus	pg/ml	32	165,0	84,8 - 866,0	218,0	544,0	11	158,0	126,0 - 448,0	200,0	448,0	0,6863	0,46
	postth.	pg/ml	33	161,0	85,8 - 556,0	192,0	443,0	11	145,0	117,0 - 476,0	179,0	476,0	0,7143	0,46
	Kinetik 1	%	23	-5,1	-29,3 - 33,1	13,1	24,2	10	-11,2	-23,6 - 10,7	-1,6	10,7	0,3573	0,40
	Kinetik 2	%	25	-10,8	-46,9 - 42,2	5,4	27,7	10	-18,1	-40,6 - 13,3	-7,3	13,3	0,7014	0,46
Nukl. (Serum)	präh.	ng/ml	30	53,7	28,8 - 170,0	78,9	170,0	12	92,4	28,8 - 475,0	169,5	475,0	0,0380	0,71
	Tag 8	ng/ml	13	48,3	26,5 - 182,0	56,1	182,0	3	73,7	56,1 - 81,5	81,5	81,5	0,4743	0,78
	vor 2. Zyklus	ng/ml	32	60,9	28,8 - 273,0	87,8	171,0	11	47,8	28,8 - 286,0	131,0	286,0	0,8673	0,48
	postth.	ng/ml	33	33,2	4,4 - 1132,0	74,1	201,0	11	56,1	25,4 - 154,0	84,2	154,0	0,2370	0,62
	Kinetik 1	%	24	3,0	-81,4 - 300,3	51,8	256,1	10	-44,3	-70,9 - 15,7	-35,7	-15,7	0,0038	0,18
	Kinetik 2	%	26	-14,6	-92,0 - 1559,8	55,2	328,6	10	-50,3	82,0 - 68,1	-28,5	68,1	0,2099	0,36
Nukl. (Plasma)	präh.	ng/ml	29	51,7	28,8 - 458,0	64,1	112,0	12	44,3	28,8 - 77,1	52,9	77,1	0,1816	0,36
	Tag 8	ng/ml	13	40,0	28,8 - 98,4	52,9	98,4	3	41,2	31,6 - 64,5	64,5	64,5	0,9365	0,51
	vor 2. Zyklus	ng/ml	32	52,2	28,8 - 121,0	60,6	102,0	11	48,7	28,8 - 72,8	62,9	72,8	0,6864	0,46
	postth.	ng/ml	33	38,0	14,2 - 84,0	54,9	76,6	11	52,9	16,5 - 1799,0	57,4	1799,0	0,6837	0,54
	Kinetik 1	%	23	5,4	-87,7 - 136,6	35,7	51,7	10	17,8	-38,3 - 57,6	38,9	57,6	0,3996	0,60
	Kinetik 2	%	25	-5,4	-91,7 - 60,9	0,0	22,0	10	-1,6	-65 - 4153	0,0	4153,0	0,5107	0,57
CA 15-3	präh.	U/ml	28	20,5	6,3 - 258,0	30,8	164,0	11	19,0	9,1 - 102,0	29,1	102,0	0,8515	0,48
	Tag 8	U/ml	13	23,2	7,2 - 151,0	36,3	151,0	3	17,4	10,8 - 19,3	19,3	19,3	0,9367	0,33
	vor 2. Zyklus	U/ml	27	22,3	9,8 - 73,0	29,7	54,3	11	25,1	10,7 - 103,0	32,7	103,0	0,9487	0,51
	postth.	U/ml	34	32,7	16,0 - 50,4	37,8	48,0	11	27,3	13,9 - 81,4	41,5	81,4	0,3092	0,40
	Kinetik 1	%	20	17,8	-63,7 - 52,8	30,4	48,9	9	9,7	-7,0 - 48,4	32,1	48,4	0,9812	0,49
	Kinetik 2	%	25	46,7	-80,1 - 209,8	82,8	183,3	9	17,8	-34,9 - 114,3	55,1	114,3	0,4350	0,41
CEA	präh.	µg/l	28	1,4	0,2 - 14,1	2,3	3,3	11	1,2	0,5 - 5,9	2,7	5,9	0,9751	0,50
	Tag 8	µg/l	13	1,3	0,9 - 3,0	1,6	3,0	3	0,9	0,6 - 2,3	2,3	2,3	0,8107	0,33
	vor 2. Zyklus	µg/l	28	1,3	0,2 - 11,2	2,1	3,5	11	1,1	0,5 - 6,2	2,9	6,2	0,7665	0,53
	postth.	µg/l	34	1,7	0,2 - 14,0	2,5	10,8	11	1,9	0,5 - 4,5	2,1	4,5	0,7016	0,54
	Kinetik 1	%	21	0,0	-30,8 - 92,9	6,1	50,0	9	5,1	-33,3 - 33,3	10,0	33,3	0,4914	0,58
	Kinetik 2	%	25	16,7	-87,2 - 900,0	75,0	750,0	9	0,0	-26,7 - 216,7	60,0	216,7	0,6962	0,45

Einzelwerte und Mediane prätherapeutisch

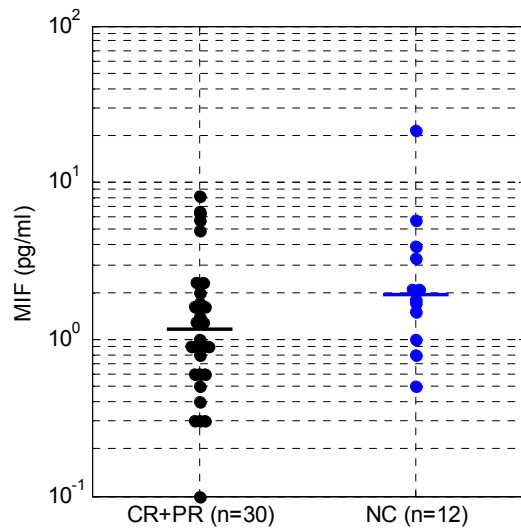


Abb. 38: Einzelwerte und Mediane von MIF in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

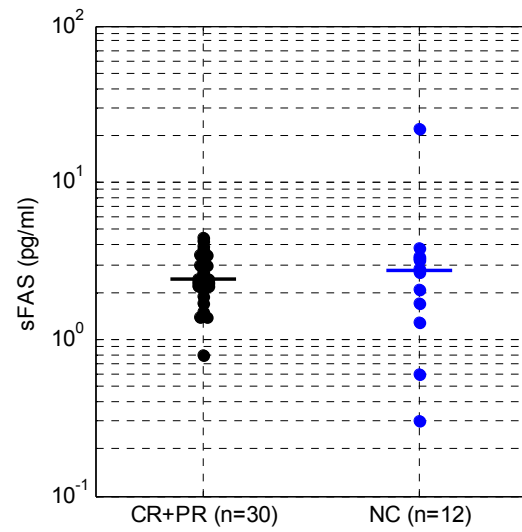


Abb. 39: Einzelwerte und Mediane von sFAS in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

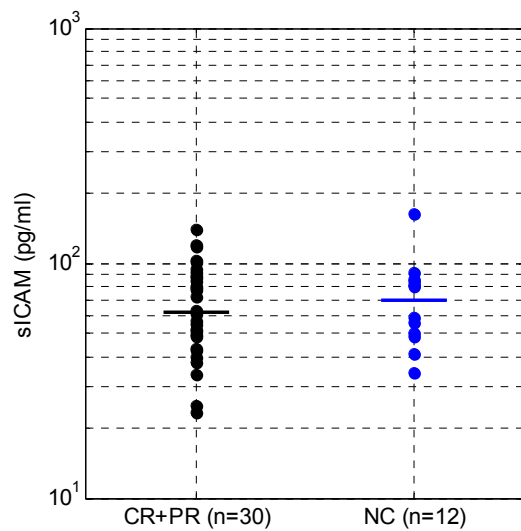


Abb. 40: Einzelwerte und Mediane von sICAM in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

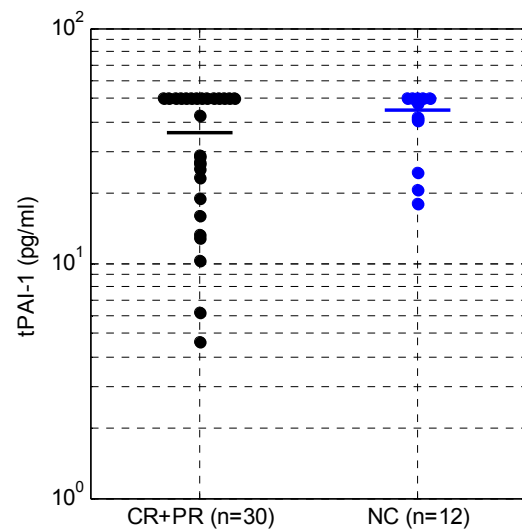


Abb. 41: Einzelwerte und Mediane von tPAI-1 in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

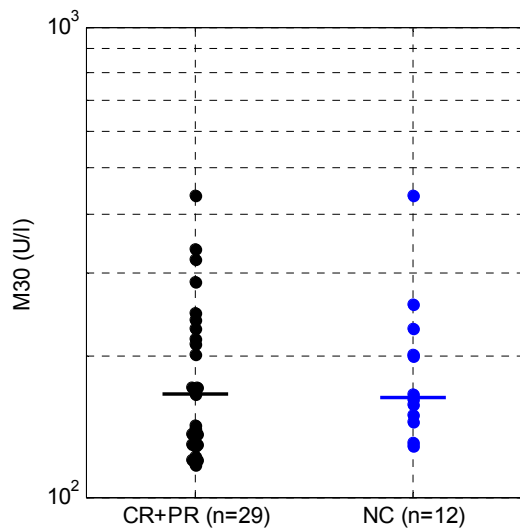


Abb. 42: Einzelwerte und Mediane von M30 in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

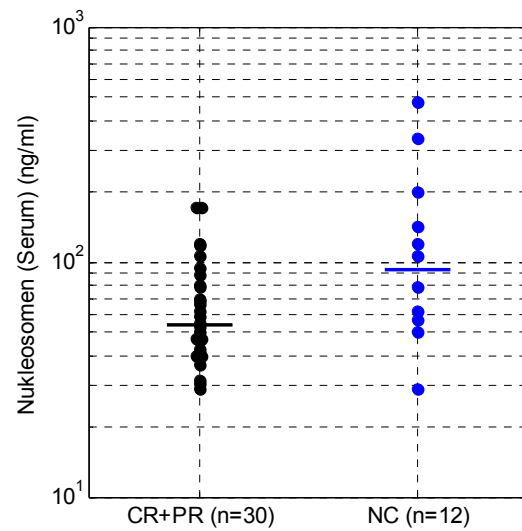


Abb. 43: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Serum) in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

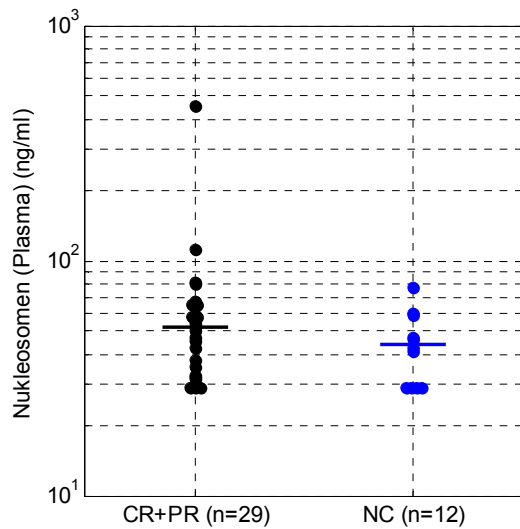


Abb. 44: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Plasma) in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

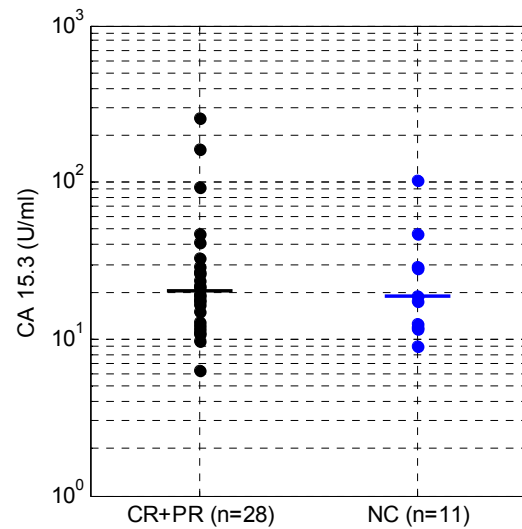


Abb. 45: Einzelwerte und Mediane von CA 15.3 in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

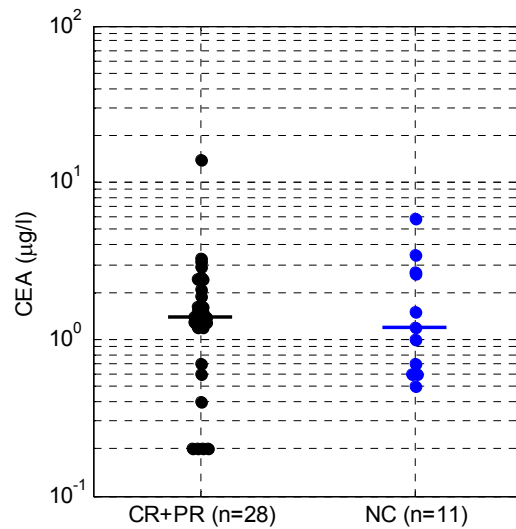


Abb. 46: Einzelwerte und Mediane von CEA in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

Einzelwerte und Mediane direkt vor Applikation des 2. Chemotherapiezyklus

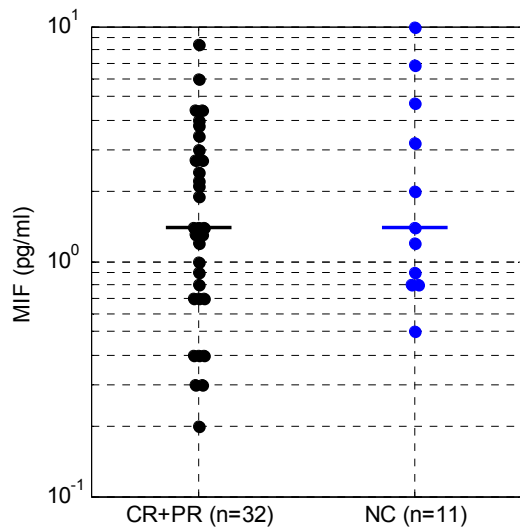


Abb. 47: Einzelwerte und Mediane von MIF in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

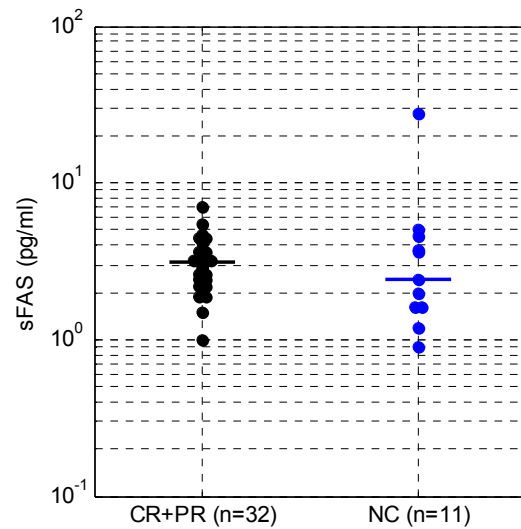


Abb. 48: Einzelwerte und Mediane von sFAS in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

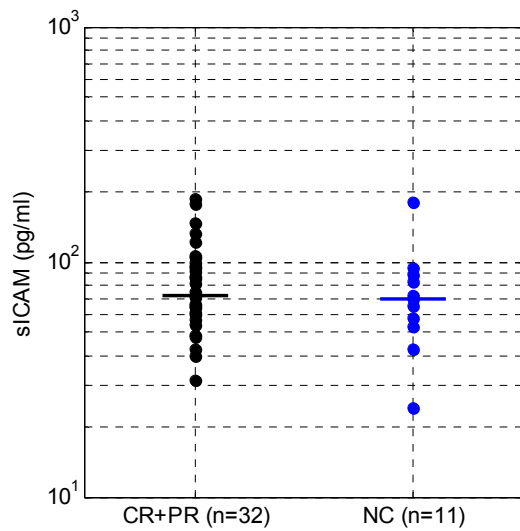


Abb. 49: Einzelwerte und Mediane von sICAM in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

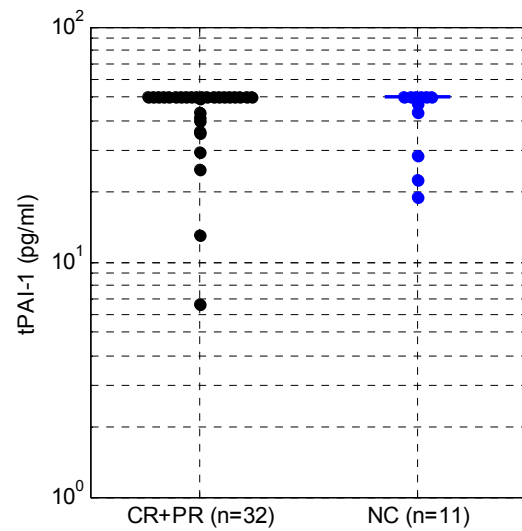


Abb. 50: Einzelwerte und Mediane von tPAI-1 in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

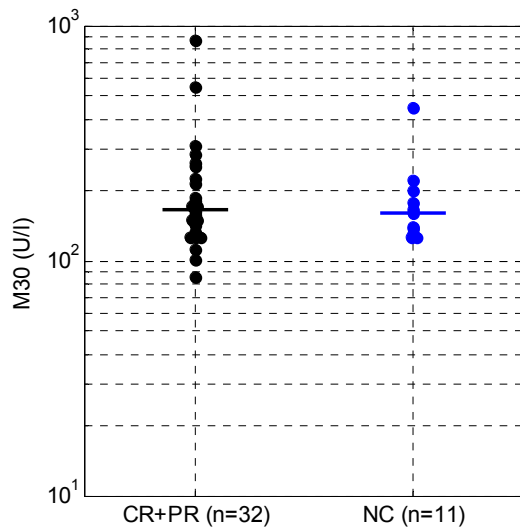


Abb. 51: Einzelwerte und Mediane von M30 in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

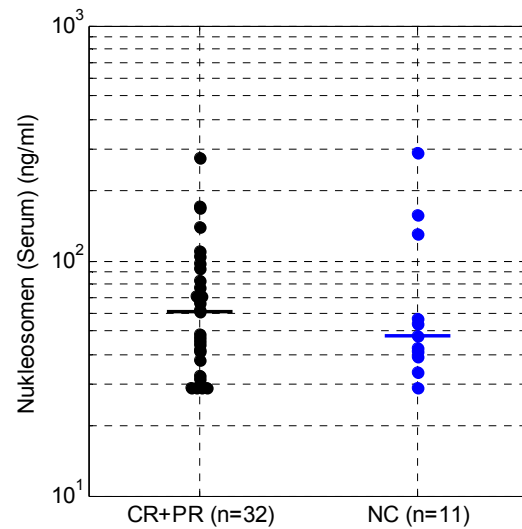


Abb. 52: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Serum) in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

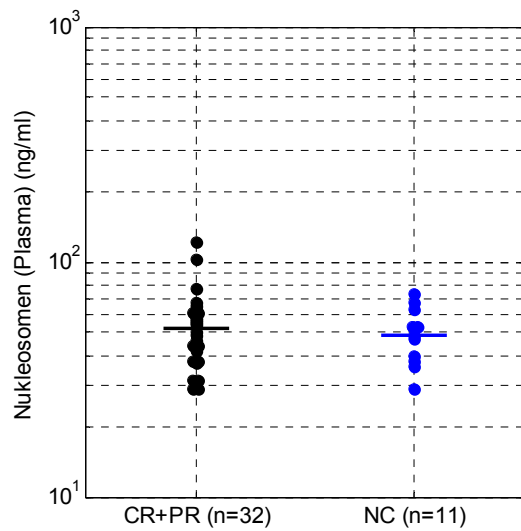


Abb. 53: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Plasma) in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

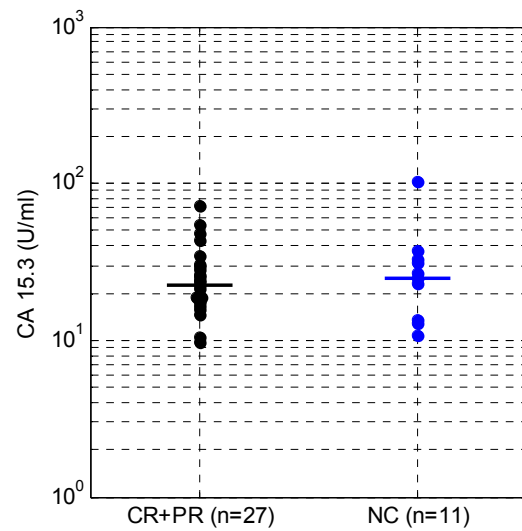


Abb. 54: Einzelwerte und Mediane von CA 15.3 in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

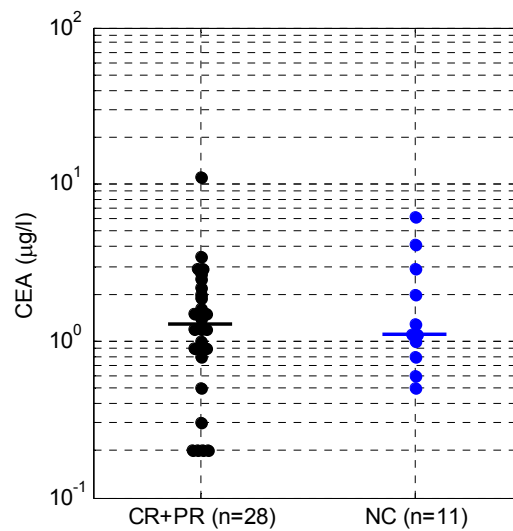


Abb. 55: Einzelwerte und Mediane von CEA in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

ROC-Kurven

Für die Marker, bei denen sich ein signifikanter oder zumindest nahezu signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansprechgruppen zeigte, sind im Folgenden die ROC-Kurven dargestellt.

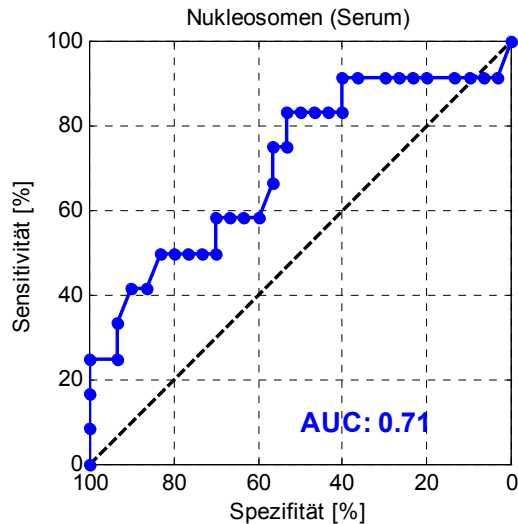


Abb. 56: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von Nucleosomen (Serum) prätherapeutisch zur Prädiktion eines schlechten Therapieansprechens (NC-Patientinnen Wert > Cut-off)

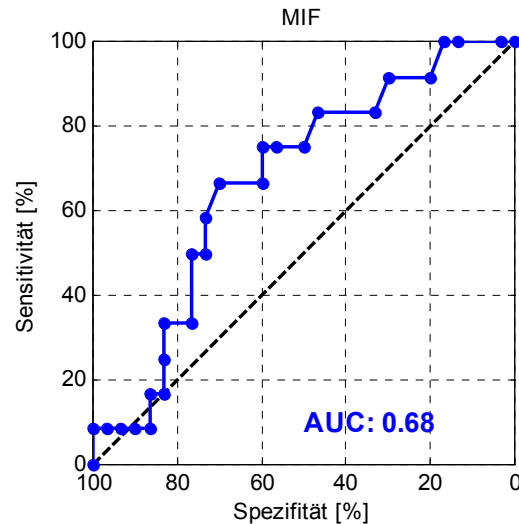


Abb. 57: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von MIF prätherapeutisch zur Prädiktion eines schlechten Therapieansprechens (NC-Patientinnen Wert > Cut-off)

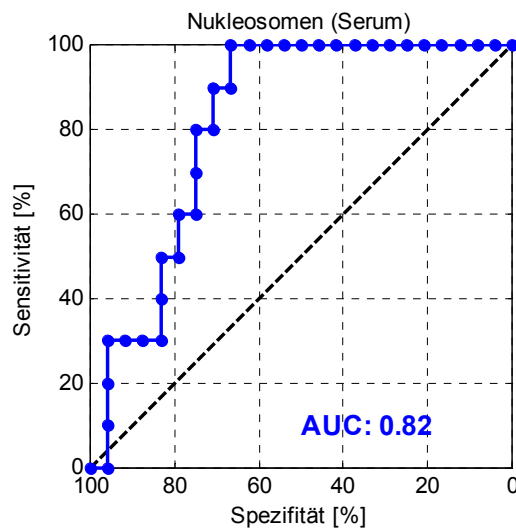


Abb. 58: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil der Kinetik von Nucleosomen (Serum) vom prätherapeutischen Basiswert zum 2. Chemotherapiezyklus zur Prädiktion eines schlechten Therapieansprechens (NC-Patientinnen Wert < Cut-off)

Zusammenfassung

Es lässt sich zusammenfassen, dass nur prätherapeutisch in Serumproben gemessene Nukleosomen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Ansprechgruppen in Variante I zeigten. Patientinnen ohne Remission zeigten signifikant höhere Werte als Patientinnen mit partieller und kompletter Remission (Median 92,4 versus 57,7ng/ml; $p=0,0380$). Die hierzu ermittelte ROC-Kurve zeigte eine AUC von 0,71 sowie eine Sensitivität von 50% bei einer festgesetzten Spezifität von 90%.

Die prätherapeutischen Werte von MIF waren zudem tendenziell höher bei Patientinnen ohne Remission gegenüber Patientinnen mit partieller und kompletter Remission. (Median 2,0 versus 1,2 pg/ml; $p=0,0815$) Die AUC betrug hierbei 0,68. Es wurde eine Sensitivität von 33% bei einer festgesetzten Spezifität von 90% erreicht.

Darüber hinaus zeigte die Kinetik von in Serumproben gemessenen Nukleosomen vom prätherapeutischen Basiswert bis zum 2. Zyklus einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Ansprechgruppen. Patientinnen mit kompletter und partieller Remission zeigten kaum Veränderung der prätherapeutischen Ausgangswerte, während Patientinnen ohne Remission deutlich abfallende Werte zeigten (Median 3% versus -44%; $p=0,0038$). Davon ausgehend, dass Patientinnen ohne Remission einen Abfall der Werte zeigen, war eine AUC von 0,82 festzustellen.

5.3.3 Variante II: CR versus PR+NC

Verteilung und prädiktive Wertigkeit der Biomarker zu verschiedenen Zeitpunkten

Tab. 19: Patientenanzahl (n), Median, Bandbreite, 75. und 95. Perzentile, p-Wert und AUC zu allen untersuchten Zeitpunkten sowie zur Kinetik 1 und 2 (prozentuale Veränderung vom prätherapeutischen Basiswert bis zum 2. Zyklus beziehungsweise bis zum Ende der Therapie, positiv=Anstieg und negativ=Abfall der Werte) angegeben für alle Marker im Vergleich zwischen Patientinnen mit kompletter Remission (CR) gegenüber Patientinnen mit partieller Remission und Patientinnen ohne Remission (PR+NC), p-Werte < 0,05 gelb markiert, p-Werte < 0,1 blau markiert

Marker	Zeitpunkt	Einheit	CR					PR+NC					p-Wert	AUC
			n	Median	Bandbreite	75%	95%	n	Median	Bandbreite	75%	95%		
MIF	präth.	pg/ml	7	1,4	0,4 - 8,2	6,4	8,2	35	1,5	0,1 - 21,5	2,1	6,5	0,8526	0,48
	Tag 8	pg/ml	2	2,4	2,0 - 2,7	2,7	2,7	14	1,1	0,1 - 15,6	2,2	15,6	0,2327	0,21
	vor 2. Zyklus	pg/ml	8	1,9	0,3 - 8,4	5,2	8,4	35	1,4	0,2 - 10,0	3,0	6,8	0,5018	0,42
	postth.	pg/ml	7	1,5	0,4 - 11,2	7,2	11,2	36	1,5	0,2 - 46,3	3,4	9,8	0,4690	0,41
	Kinetik 1	%	6	-25,0	-84,1 - 300,0	160,9	300,0	28	0,0	-83,7 - 900,0	106,7	376,2	0,7928	0,59
	Kinetik 2	%	6	9,8	-85,4 - 1766,7	50,0	1766,7	29	44,4	-87,9 - 862,5	166,7	666,7	0,7928	0,54
sFas	präth.	pg/ml	7	2,7	1,7 - 3,7	3,5	3,7	35	2,4	0,3 - 22,2	3,3	4,4	0,4372	0,40
	Tag 8	pg/ml	2	3,9	2,5 - 5,3	5,3	5,3	14	3,4	2,8 - 28,3	3,9	28,3	0,9364	0,54
	vor 2. Zyklus	pg/ml	8	3,9	2,4 - 4,7	4,3	4,7	35	2,8	0,9 - 27,4	3,6	7,0	0,1043	0,31
	postth.	pg/ml	7	3,6	1,7 - 21,3	4,6	21,3	36	2,9	0,5 - 25,6	3,8	6,6	0,4787	0,41
	Kinetik 1	%	6	18,7	8,3 - 41,2	20,0	41,2	28	24,2	-42,9 - 433,3	43,3	268,4	0,5545	0,56
	Kinetik 2	%	6	15,3	0 - 508,6	24,3	508,6	29	33,3	-38,5 - 500,0	59,1	247,1	0,5545	0,58
sICAM	präth.	pg/ml	7	84,2	52,0 - 138,0	102,0	138,0	35	58,8	23,3 - 163,0	84,5	120,0	0,1205	0,31
	Tag 8	pg/ml	2	114,0	87,0 - 141,0	141,0	141,0	14	78,2	43,0 - 236,0	86,5	236,0	0,1771	0,18
	vor 2. Zyklus	pg/ml	8	76,5	57,1 - 146,0	94,6	146,0	35	70,1	24,0 - 184,0	94,7	178,0	0,5022	0,42
	postth.	pg/ml	7	97,6	87,1 - 153,0	127,0	153,0	36	80,3	31,3 - 250,0	101,5	145,0	0,0264	0,23
	Kinetik 1	%	6	4,2	-8,2 - 16,9	15,6	16,9	28	11,2	-70,6 - 91,6	35,7	58,4	0,9825	0,65
	Kinetik 2	%	6	10,0	-5,1 - 133,0	89,8	133,0	29	20,4	-11,1 - 155,3	59,3	148,0	0,9825	0,51

Marker	Zeitpunkt	Einheit	CR				PR+NC				p-Wert	AUC		
			n	Median	Bandbreite	75%	95%	n	Median	Bandbreite			75%	95%
tPAI-1	präth.	pg/ml	7	50,0	23,3 - 50,0	50,0	50,0	35	40,2	4,6 - 50,0	50,0	50,0	0,1032	0,31
	Tag 8	pg/ml	2	50,0	50,0 - 50,0	50,0	50,0	14	46,2	7,5 - 50,0	50,0	50,0	0,2034	0,21
	vor 2. Zyklus	pg/ml	8	50,0	35,4 - 50,0	50,0	50,0	35	50,0	6,6 - 50,0	50,0	50,0	0,3672	0,41
	postth.	pg/ml	7	50,0	19,2 - 50,0	50,0	50,0	36	41,7	4,5 - 50,0	50,0	50,0	0,3490	0,39
	Kinetik 1	%	6	0,0	16,7 - 0	0,0	0,0	28	0,5	-60,7 - 987,0	30,0	212,5	0,5208	0,74
	Kinetik 2	%	6	0,0	-44,6 - 0	0,0	0,0	29	0,0	-61,2 - 987,0	35,3	212,5	0,5208	0,59
M30	präth.	pg/ml	7	138,0	120,0 - 438,0	229,0	438,0	34	165,5	117,0 - 439,0	229,0	337,0	0,5327	0,58
	Tag 8	pg/ml	2	335,5	145,0 - 526,0	526,0	526,0	14	201,5	128,0 - 261,0	240,0	261,0	0,8118	0,43
	vor 2. Zyklus	pg/ml	8	150,0	112,0 - 544,0	179,0	544,0	35	166,0	84,8 - 866,0	218,0	448,0	0,7667	0,54
	postth.	pg/ml	8	147,0	91,4 - 556,0	163,5	556,0	36	161,0	85,8 - 476,0	198,5	443,0	0,2935	0,62
	Kinetik 1	%	6	6,0	-19,2 - 33,1	24,2	33,1	27	-8,6	-29,3 - 20,3	1,8	14,8	0,1735	0,30
	Kinetik 2	%	7	5,0	-38,9 - 27,7	26,9	27,7	28	-16,9	-46,9 - 42,2	-0,5	13,3	0,1735	0,33
Nukleosomen (Serum)	präth.	ng/ml	7	69,6	42,3 - 170,0	107,0	170,0	35	56,7	28,8 - 475,0	107,0	338,0	0,3710	0,39
	Tag 8	ng/ml	2	62,5	49,0 - 76,0	76,0	76,0	14	48,5	26,5 - 182,0	73,7	182,0	0,4743	0,32
	vor 2. Zyklus	ng/ml	8	44,8	28,8 - 109,0	84,8	109,0	35	56,7	28,8 - 286,0	97,2	273,0	0,5322	0,57
	postth.	ng/ml	8	36,3	7,8 - 154,0	57,2	154,0	36	43,2	4,4 - 1132,0	80,1	201,0	0,3363	0,61
	Kinetik 1	%	6	-15,9	-81,4 - 30,7	1,9	30,7	28	-16,3	-70,9 - 300,3	40,6	256,1	0,2009	0,60
	Kinetik 2	%	7	-58,6	-90,1 - 43,9	19,5	43,9	29	-34,0	-92,0 - 1559,8	55,2	328,6	0,2009	0,66
Nukleosomen (Plasma)	präth.	ng/ml	7	53,8	28,8 - 67,0	64,5	67,0	34	46,5	28,8 - 458,0	58,8	112,0	0,4764	0,41
	Tag 8	ng/ml	2	44,9	37,5 - 52,2	52,2	52,2	14	40,6	28,8 - 98,4	60,6	98,4	0,9365	0,54
	vor 2. Zyklus	ng/ml	8	57,4	31,6 - 102,0	62,8	102,0	35	50,3	28,8 - 121,0	60,6	76,9	0,3254	0,39
	postth.	ng/ml	8	46,0	14,2 - 56,7	53,5	56,7	36	41,2	16,0 - 1799,0	55,4	84,0	0,9514	0,51
	Kinetik 1	%	6	-1,6	-37,5 - 51,7	35,7	51,7	27	10,9	-87,7 - 136,6	38,9	57,6	0,4452	0,53
	Kinetik 2	%	7	-15,4	-75,6 - 22,0	12,8	22,0	28	-3,8	-91,7 - 4153,0	0,0	60,9	0,4452	0,60
CA 15-3	präth.	U/ml	6	18,1	11,7 - 46,5	23,5	46,5	33	21,4	6,3 - 258,0	29,1	164,0	0,6266	0,57
	Tag 8	U/ml	2	18,6	13,3 - 23,9	23,9	23,9	14	19,6	7,2 - 151,0	36,3	151,0	0,9367	0,54
	vor 2. Zyklus	U/ml	7	21,5	15,7 - 54,3	26,3	54,3	31	23,7	9,8 - 103,0	30,9	73,0	0,8507	0,53
	postth.	U/ml	8	23,0	16,0 - 36,5	24,4	36,5	37	32,8	13,9 - 81,4	39,5	50,4	0,0350	0,74
	Kinetik 1	%	5	16,8	4,8 - 35,1	34,2	35,1	24	17,3	-63,7 - 52,8	31,1	48,4	0,3314	0,43
	Kinetik 2	%	6	16,0	-48 - 76,6	46,7	76,6	28	49,4	-80,1 - 209,8	84,6	183,3	0,3314	0,63

Marker	Zeitpunkt	Einheit	CR					PR+NC					p-Wert	AUC
			n	Median	Bandbreite	75%	95%	n	Median	Bandbreite	75%	95%		
CEA	präth.	µg/l	6	1,9	0,2 - 14,1	3,1	14,1	33	1,4	0,2 - 5,9	2,1	3,5	0,5718	0,42
	Tag 8	µg/l	2	2,0	0,9 - 3,0	3,0	3,0	14	1,3	0,6 - 2,3	1,6	2,3	0,8107	0,43
	vor 2. Zyklus	µg/l	7	2,0	0,2 - 11,2	2,9	11,2	32	1,2	0,2 - 6,2	2,0	4,1	0,4307	0,40
	postth.	µg/l	8	2,2	0,4 - 5,7	2,6	5,7	37	1,7	0,2 - 14	2,2	10,8	0,6452	0,45
	Kinetik 1	%	5	0,0	-30,8 - 28,6	16,0	28,6	25	0,0	-33,3 - 92,9	7,4	50,0	0,1752	0,52
	Kinetik 2	%	6	-11,0	-87,2 - 100,0	4,0	100,0	28	25,0	57,1 - 900,0	79,2	750,0	0,1752	0,68

Einzelwerte und Mediane prätherapeutisch

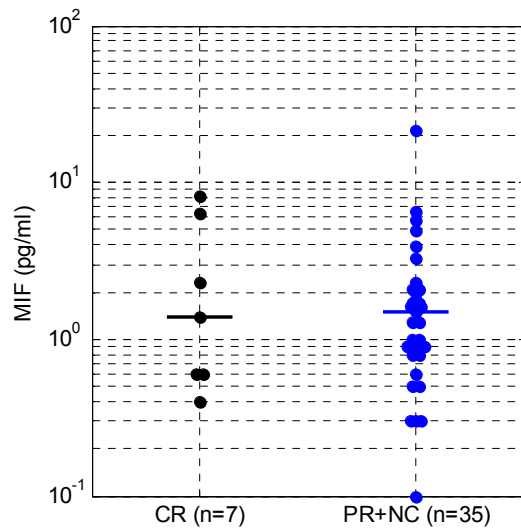


Abb. 59: Einzelwerte und Mediane von MIF in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

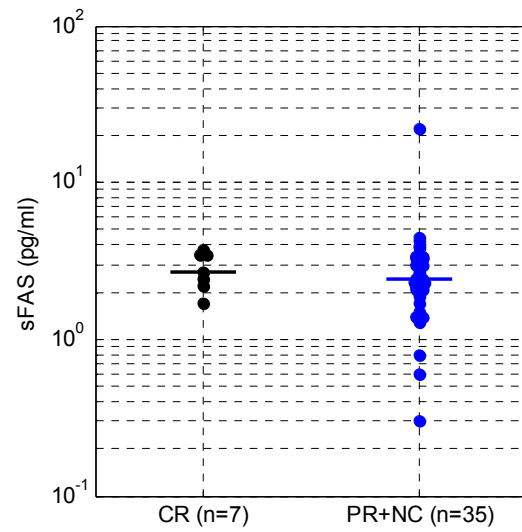


Abb. 60: Einzelwerte und Mediane von sFAS in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

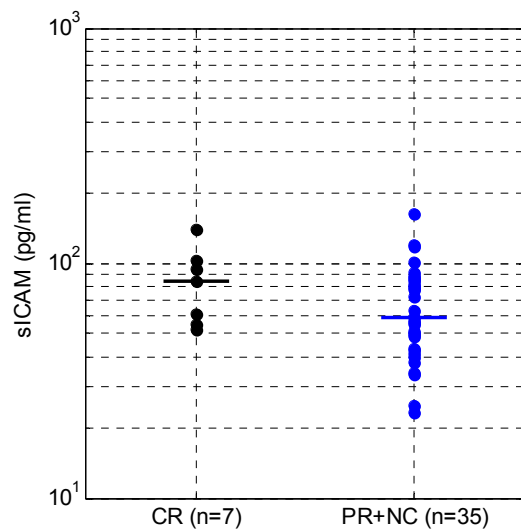


Abb. 61: Einzelwerte und Mediane von sICAM in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

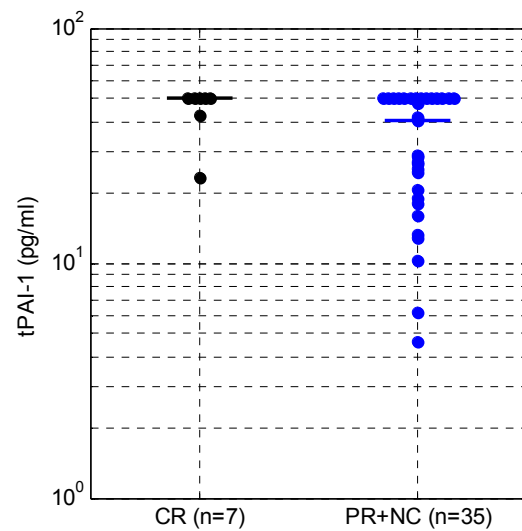


Abb. 62: Einzelwerte und Mediane von tPAI-1 in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

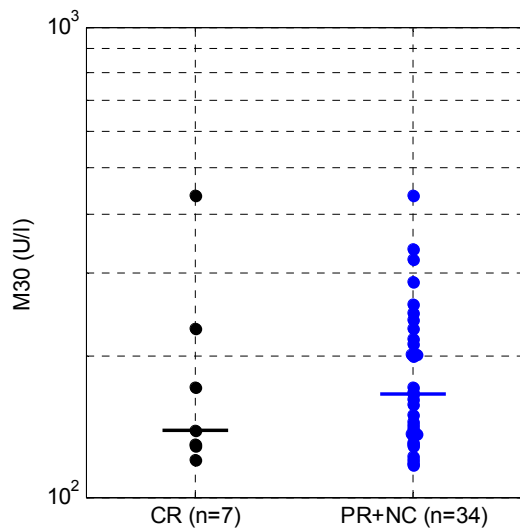


Abb. 63: Einzelwerte und Mediane von M30 in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

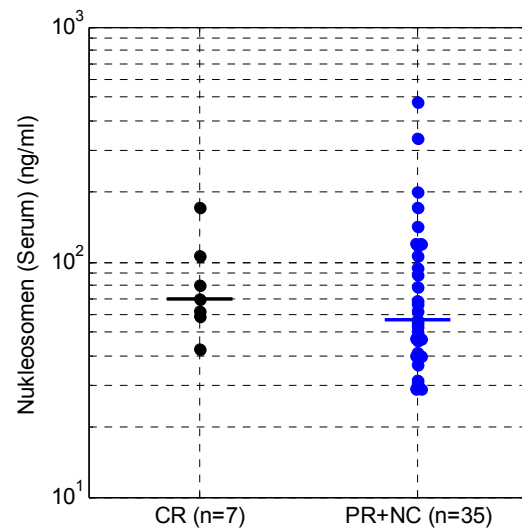


Abb. 64: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Serum) in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

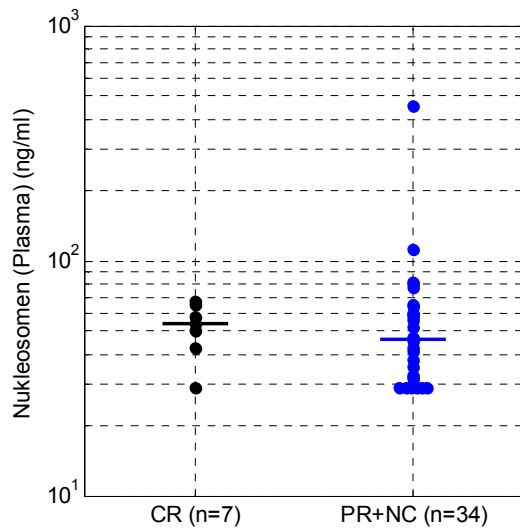


Abb. 65: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Plasma) in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

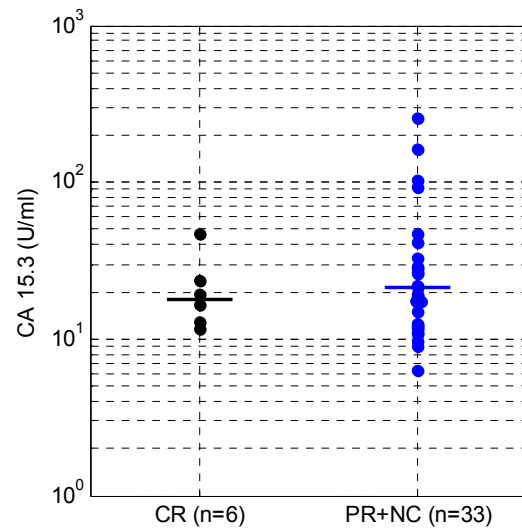


Abb. 66: Einzelwerte und Mediane von CA 15-3 in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

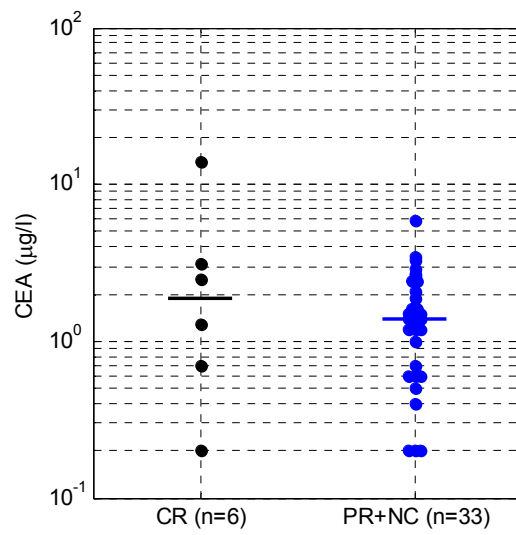


Abb. 67: Einzelwerte und Mediane von CEA in den beiden Ansprechgruppen prätherapeutisch

Einzelwerte und Mediane direkt vor Applikation des 2. Chemotherapiezyklus

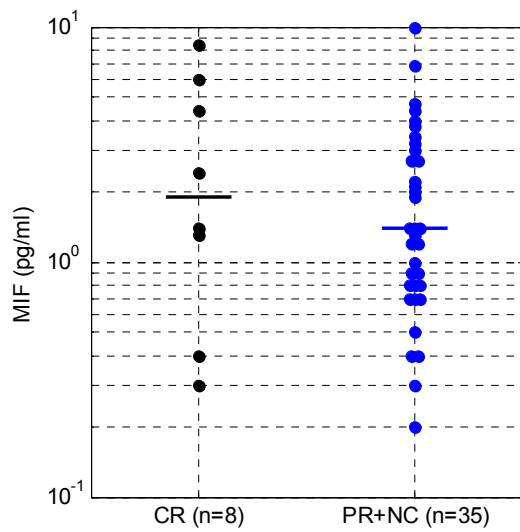


Abb. 68: Einzelwerte und Mediane von MIF in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

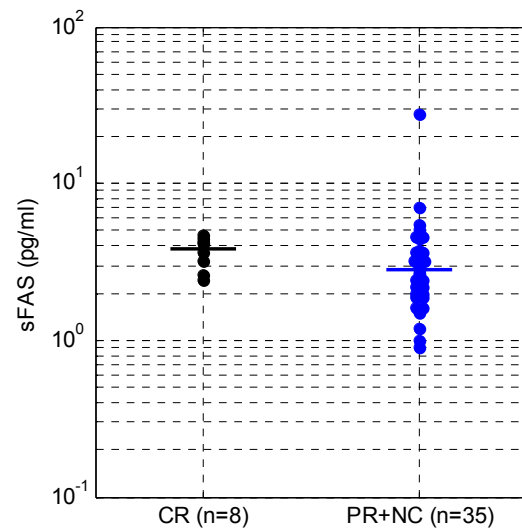


Abb. 69: Einzelwerte und Mediane von sFAS in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

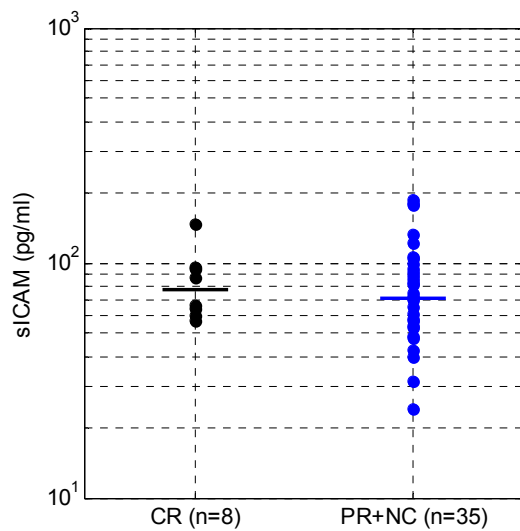


Abb. 70: Einzelwerte und Mediane von sICAM in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

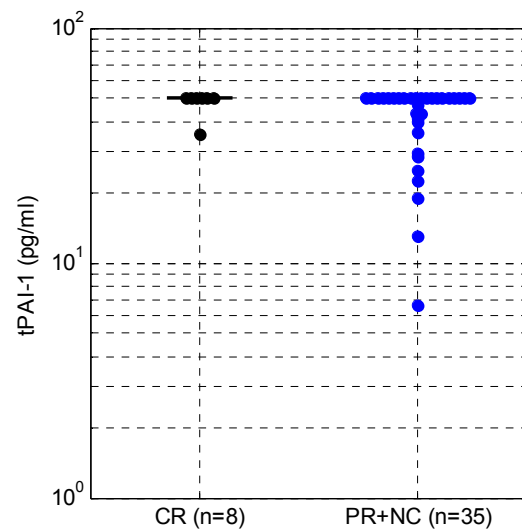


Abb. 71: Einzelwerte und Mediane von tPAI-1 in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

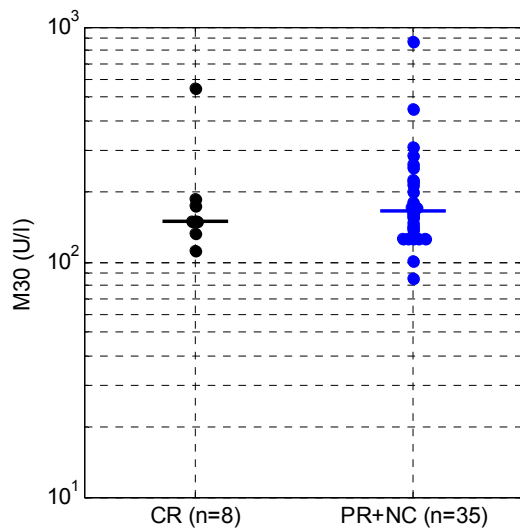


Abb. 72: Einzelwerte und Mediane von M30 in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

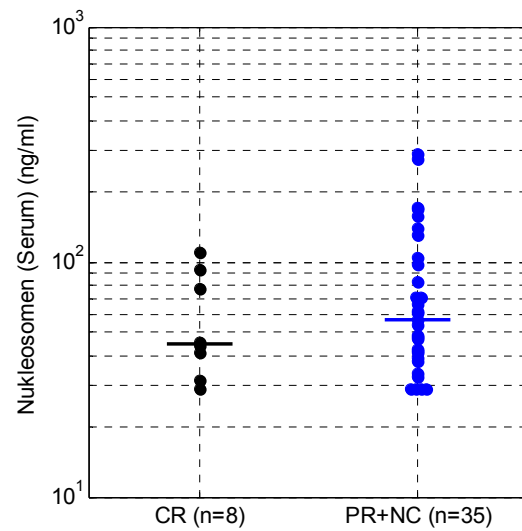


Abb. 73: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Serum) in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

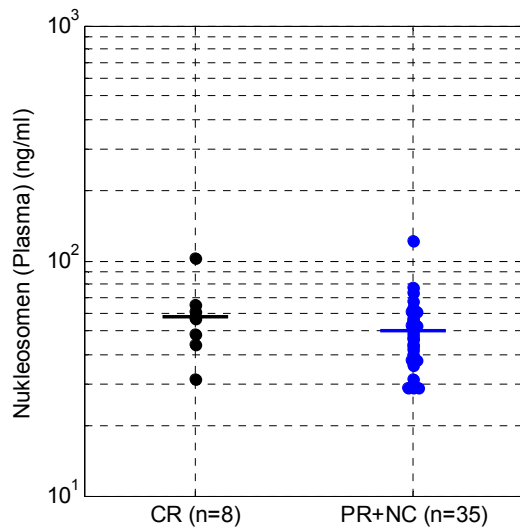


Abb. 74: Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen (Plasma) in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

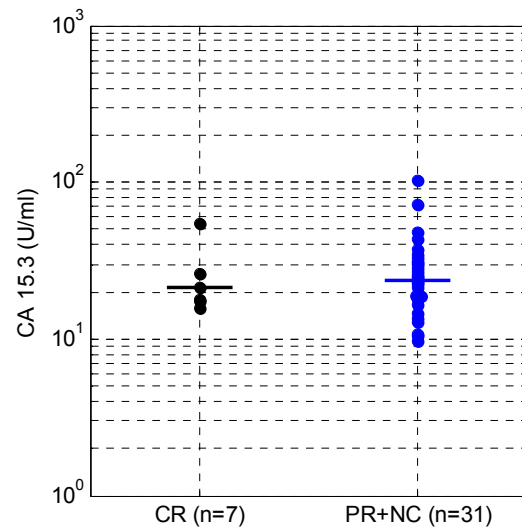


Abb. 75: Einzelwerte und Mediane von CA 15.3 in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

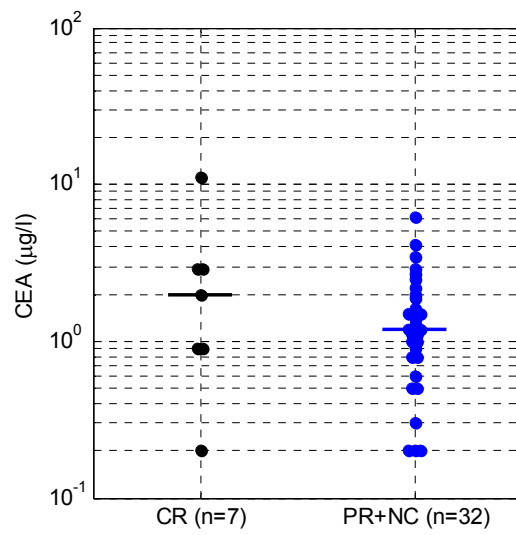


Abb. 76: Einzelwerte und Mediane von CEA in den beiden Ansprechgruppen direkt vor dem 2. Therapiezyklus

ROC-Kurven

Für die Marker, bei denen sich ein signifikanter oder zumindest nahezu signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansprechgruppen zeigte, sind im Folgenden die ROC-Kurven dargestellt.

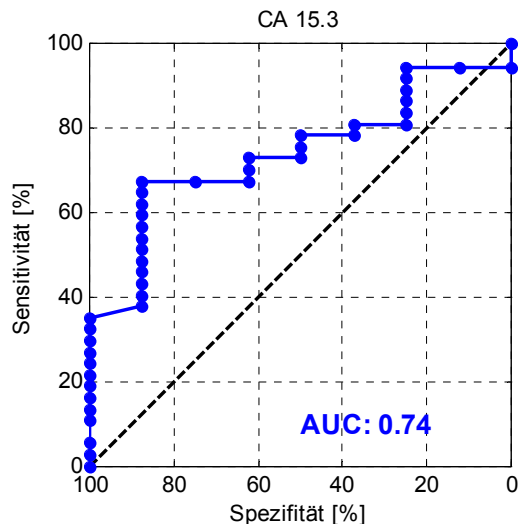


Abb. 77: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von CA 15-3 posttherapeutisch zur Prädiktion eines schlechten Therapieansprechens (PR+NC-Patientinnen Wert > Cut-off)

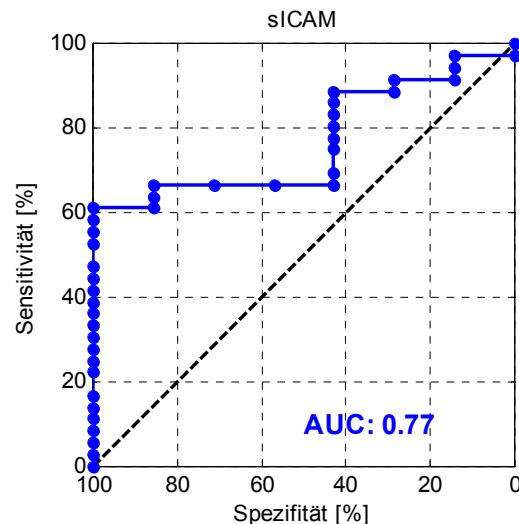


Abb. 78: Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil von sICAM posttherapeutisch zur Prädiktion eines schlechten Therapieansprechens (PR+NC-Patientinnen Wert < Cut-off)

Zusammenfassung

Es lässt sich zusammenfassen, dass prätherapeutisch, am Tag 8 und vor dem 2. Zyklus keiner der Marker einen signifikanten Unterschied zwischen Patientinnen mit kompletter Remission und Patientinnen mit partieller beziehungsweise ohne Remission zeigte. Lediglich die posttherapeutisch gemessenen Werte von sICAM und CA 15-3 zeigten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Ansprechgruppen. Patientinnen mit kompletter Remission zeigten signifikant niedrigere posttherapeutisch gemessene CA 15-3-Werte als Patientinnen mit partieller beziehungsweise ohne Remission (Median 23 versus 32,8 U/ml; $p=0,035$). Bei sICAM hingegen zeigten Patientinnen mit kompletter Remission signifikant höhere Werte (Median 97,6 versus 80,3 pg/ml; $p=0,0264$). Unter der Annahme, dass Patientinnen mit kompletter Remission posttherapeutisch höhere Werte aufweisen, zeigte sich für sICAM eine AUC von 0,77.

Die Kinetiken zeigten keine signifikanten Ergebnisse.

6 Diskussion

Aktueller klinischer Status

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau. Trotz verbesserter therapeutischer Optionen weist es die größte krebsbedingte Mortalität auf. Durch den Einsatz der neoadjuvanten, also präoperativen Chemotherapie können die Operabilität der Tumoren sowie die Prognose der Patientin verbessert werden. Jedoch sprechen nicht alle Patientinnen auf die Therapie an. Zytostatika wirken zudem äußerst toxisch und können schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen. Eine sichere Vorhersage der Therapieeffizienz ist derzeit nicht möglich. Die Beurteilung der Therapieeffizienz erfolgt heute anhand der Klinik und bildgebender Verfahren, insbesondere der Sonografie der Brust. Mit diesen Verfahren kann das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie jedoch erst nach Applikation mehrerer Zyklen abgeschätzt werden. Zudem ist eine präzise Beurteilung der biochemischen Reaktionen des Tumors auf die Therapie nicht möglich und diese Verfahren sind stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Eine für die Prognose wichtige Komplettremission des Tumors kann erst zum Zeitpunkt der Operation histopathologisch eindeutig festgestellt werden.

Um die Therapie des Mammakarzinoms weiter zu verbessern, sind demzufolge neue Verfahren zur Diagnostik, zur Prädiktion der Therapieeffizienz, zur Verlaufskontrolle sowie zur frühzeitigen Abschätzung der Prognose notwendig.

Ein Parameter, der standardisiert, wenig invasiv und kostengünstig in einer Blutprobe der Patientin analysiert werden kann, erscheint hierzu gut geeignet. Anders als z.B. ein Gewebemarker erfordert er nur eine geringe Belastung der Patientin und besonders bei der Verlaufskontrolle erforderliche wiederholte Messungen können erfolgen.

Wirkmechanismen und Resistenz bei chemotherapeutischer Behandlung

Zur Behandlung des Mammakarzinoms werden insbesondere Anthrazykline und Taxane eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom darüber hinaus präoperativ mit Cyclophosphamid und teilweise mit Fluorouracil behandelt.

Ein Anthrazyklin, das bei Brustkrebs häufig eingesetzt wird, ist Epirubicin. Es wird synthetisch hergestellt und wirkt auf verschiedenen Ebenen zytostatisch. Die Hauptwirkung ist die Interaktion mit der Topoisomerase II α . Durch kovalente Bindung von Epirubicin an Topoisomerase II α -DNA-Komplexe werden Transkriptions-, Replikations- oder Reparaturprozesse an der DNA gehemmt. Epirubicin ist außerdem eine interkalierende Substanz, die DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche verursachen kann. Darüber hinaus

ist Epirubicin zur Reduktion befähigt. Bei der Reduktion entstehende freie Radikale können zelluläre Proteine schädigen.

Zu den Taxanen zählen Paclitaxel und Docetaxel. Während Paclitaxel aus Eiben isoliert wird, wird Docetaxel heute semisynthetisch hergestellt. Taxane stören die Funktion des zellulären Spindelapparats und können so die Mitose blockieren. Des Weiteren können Taxane immunmodulatorisch wirken und die Angiogenese hemmen.

Cyclophosphamid zählt zu den alkylierenden Substanzen, die die Bildung von Quervernetzungen an der DNA induzieren können.

Fluorouracil bewirkt eine Inaktivierung der Thymidylat-Synthetase. Dadurch wird die DNA-Synthese blockiert.

Alle aufgeführten Zytostatika haben gemeinsam, dass die Schädigungen der Zelle schließlich dosisabhängig zum Zelltod, unter anderem zur Apoptose, führen. Nach einer neoadjuvanten Chemotherapie des Mammakarzinoms bleiben jedoch meist überlebende Tumorzellen übrig. Außerdem sprechen nicht alle Patientinnen gleich gut auf die Therapie an. Diese primäre oder erworbene Chemoresistenz kann auf Störungen der Apoptoseinduktion in den Tumorzellen zurückzuführen sein.

Zu den bekannten Ursachen der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Anthrazyklinen gehört beispielsweise ein verstärkter Efflux der Substanz über die P-Glykoprotein-Pumpe, die von sogenannten „multidrug-resistant“-Genen (MDR) kodiert wird. Außerdem scheint eine Hemmung von an der Apoptose beteiligten Caspasen eine Rolle zu spielen. Eine weitere Ursache der Chemoresistenz ist die vermehrte Expression des Antioxidans Glutathion, das die Zelle gegenüber Schädigung durch freie Radikale schützt. Daneben können Defekte verschiedener an der Apoptoseregulation beteiligter Gene wie p53 und Bcl-2 zur Chemoresistenz führen. Schädigungen der Zelle, beispielsweise durch Zytostatika, führen normalerweise zur Aktivierung von p53. Kann der Schaden nicht repariert werden, folgt darauf die Apoptose der Zelle. In in vitro- und Tierstudien konnte gezeigt werden, dass der Verlust der p53-Funktion mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika korreliert. Das p53-Gen ist beim Mammakarzinom häufig mutiert. Der prädiktive Wert solcher Mutationen ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Cleator et. al., 2002).

Praktisches Vorgehen

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer prospektiv durchgeführten, von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigten Studie. Die Studie wurde am Institut für Klinische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München

in Zusammenarbeit mit der hämato-onkologischen Schwerpunktpraxis von Prof. Dr. C. Salat, Prof. Dr. E. Hiller und Dr. O.J. Stötzer München durchgeführt. Alle Patientinnen mit Mammakarzinom wurden in der Praxis von äußerst erfahrenen Onkologen betreut. Sämtliche Blutabnahmen, die unten beschriebene Präanalytik sowie die sorgfältige Erhebung der klinischen Daten erfolgten dort. Die Blutproben und Daten der Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen stammten von verschiedenen mit oben genannter Praxis kooperierenden Zentren. Durch mich persönlich erfolgte die Eingabe der relevanten klinischen Daten in ein speziell hierfür vorgesehenes Computerprogramm des Instituts für Klinische Chemie. Des Weiteren erfolgte durch mich persönlich die Rekrutierung gesunder Frauen als Kontrollpersonen.

Standardisierte Präanalytik und Messungen

Besonderer Wert wurde bei der vorliegenden Studie auf eine standardisierte Präanalytik sowie Analytik gelegt. Bereits bei der Blutabnahme wurde darauf geachtet, das Blut möglichst hämolysefrei zu entnehmen. Die gewonnenen Blutproben wurden sodann innerhalb von 1-2 Stunden zentrifugiert, dekantiert und eingefroren. Der Transport der Proben aus der hämato-onkologischen Schwerpunktpraxis in das Institut für Klinische Chemie erfolgte erst nach dem Einfrieren und unter ständiger Kühlung. Für die Messungen der Markerkonzentration wurden jeweils frische Proben verwendet, sodass ein mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren vermieden wurde. Außerdem wurden die Messungen der einzelnen Marker bei allen Proben standardisiert durch dieselbe sehr erfahrene medizinisch-technische Assistentin oder nach intensiver Einarbeitung durch mich persönlich durchgeführt.

Auswahl der Kollektive

Zur Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit der Zelltodmarker wurde in der vorliegenden Studie ein Kollektiv von 79 Patientinnen mit Mammakarzinom mit einem Kollektiv von 31 gesunden Frauen verglichen. Darüber hinaus wurden 13 Patientinnen mit gutartigen Erkrankungen der Brust, die mit bildgebenden Verfahren nachgewiesen wurden, in die Studie eingeschlossen. Dieses Kollektiv erschien bei der Frage nach der diagnostischen Wertigkeit besonders interessant. Bisher konnten zwar mehrere Studien zur diagnostischen Wertigkeit von Zelltodmarkern, beispielsweise von zirkulierenden DNA-Fragmenten, eine deutliche Diskrimination zwischen Patienten mit malignen Erkrankungen und gesunden Personen zeigen. Es wurden jedoch erst in wenigen Studien Patienten mit malignen und benignen Erkrankungen verglichen. Die meisten der wenigen Studien hierzu konnten keinen Unterschied zwischen Patienten mit bös- und gutartigen Erkrankungen zeigen (Holdenrieder et. al., 2005). Gutartige Veränderungen der Brust spielen eine wichtige Rolle bei den Differenzialdiagnosen des Mammakarzinoms, da sie

sich bei 30-50% der Frauen zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr nachweisen lassen (Gerhard und Kiechle, 2006). Ein Nachteil der Studie war, dass bei den gesunden Frauen Veränderungen der Brust nicht explizit ausgeschlossen wurden. Es war davon auszugehen, dass sich auch in diesem Kollektiv einige Frauen mit gutartigen Brustveränderungen befanden.

Das Kollektiv der Patientinnen mit Mammakarzinom setzte sich aus 51 Patientinnen mit lokal begrenztem Befund und 28 Patientinnen, bei denen bereits Fernmetastasen nachgewiesen worden waren, zusammen. So konnte untersucht werden, ob ein Unterschied der Zelltodmarker zwischen frühen und fortgeschrittenen Stadien vorlag.

Beurteilung des Therapieansprechens

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war zu beurteilen, ob die Zelltodmarker geeignet sind, das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie vorherzusagen oder früh während der Therapie zu beurteilen. Das Ansprechen auf die Therapie sollte anhand des pathologisch-anatomischen Befunds des Operationspräparats beurteilt werden. Hierzu musste zunächst eine Definition des guten und schlechten Ansprechens erfolgen.

Im klinischen Alltag war bisher vor allem die Frage interessant, ob ein Tumor mindestens eine partielle Remission zeigt. Eine klinisch partielle Remission liegt gemäß RECIST vor, wenn sich der größte Tumordurchmesser um mindestens 30% reduziert (Rühl et. al., 2004). In diesem Fall wird die begonnene Therapie in der Regel weitergeführt. Nur wenn sich eine geringere Remission oder eine Größenzunahme des Tumors zeigt, wird das therapeutische Vorgehen geändert. Ein Marker, der früher als die bildgebenden Verfahren das Ausbleiben einer partiellen Remission anzeigt, wäre also hilfreich für die Entscheidung, ob das geplante Therapieregime fortgesetzt oder besser umgestellt werden sollte.

Es war jedoch auch zu beachten, dass bereits viele Studien wie beispielsweise die NSABP-B18/-B27- (Hanusch et. al., 2011) sowie die TECHNO-Studie (Untch et. al., 2011) zeigen konnten, dass nur die histopathologische Komplettremission mit einer guten Prognose (bezüglich krankheitsfreiem und Gesamtüberleben) korreliert (Bauerfeind et. al., 2007). Eine histopathologische Komplettremission liegt vor, wenn am Operationspräparat im ursprünglichen Tumorbett keine invasiven Tumorzellen mehr nachgewiesen werden können. Das Vorliegen einer in-situ-Komponente oder der Nachweis invasiver Tumorzellen in Lymphknoten wird unterschiedlich beurteilt. Unter diesem Gesichtspunkt schien es sinnvoll, auch zu untersuchen, ob die Marker hilfreich sind, Patientinnen, die keine histopathologische Komplettremission erreichen, herauszufiltern. Eine Veränderung des therapeutischen Vorgehens oder zumindest eine intensiviertere

Nachsorge nicht nur bei Patientinnen ohne Remission, sondern auch bei Patientinnen mit partieller Remission könnte in Zukunft die Prognose weiter verbessern.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus den genannten Gründen zwei Varianten der Definition des Therapieansprechens untersucht. Während in Variante II nur Patientinnen mit histopathologischer Komplettremission zur Gruppe mit gutem Therapieansprechen gezählt wurden, wurden in Variante I auch Patientinnen mit partieller Remission dazu gezählt.

Die Ergebnisse der beiden Varianten zeigten deutlich, welche Auswirkungen eine unterschiedliche Definition des Therapieansprechens hat und wie wichtig eine einheitliche Definition für den Vergleich verschiedener Studien ist. Die Aussage der hier präsentierten Ergebnisse war jedoch durch die relativ kleinen Fallzahlen begrenzt.

Auswahl der Blutabnahmezeitpunkte

Die Blutabnahmen bei den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom erfolgten in der vorliegenden Studie kurz vor und 8 Tage nach Applikation des ersten, direkt vor Applikation des zweiten und kurz vor Applikation des sechsten Chemotherapiezyklus. Dies hatte mehrere Gründe. Zum einen sollten die Blutabnahmen keine zusätzliche Belastung für die Patientinnen darstellen und wurden daher mit Routineblutabnahmen zusammengelegt. Darüber hinaus sollten neben den prätherapeutischen Werten insbesondere Werte, die möglichst früh während der Therapie zu erheben waren, untersucht werden. Blutabnahmen in den ersten Stunden und Tagen nach Gabe des Zytostatikums sind besonders interessant, weil zu diesem Zeitpunkt bei erfolgreicher Apoptoseinduktion ein weiterer Anstieg der bereits prätherapeutisch hohen Konzentrationen an Apoptoseprodukten im Blut erwartet wird. Die Patientinnen der vorliegenden Studie wurden jedoch alle ambulant in einer Tagesklinik behandelt. Die erste Routineblutabnahme nach Therapiebeginn erfolgte dort bei komplikationslosem Verlauf in der Regel frühestens am Tag 8. Doch einige Patientinnen wurden erst zur Gabe des zweiten Zyklus in der Tagesklinik vorgestellt, sodass bei nur wenigen Patientinnen Werte am Tag 8 erhoben werden konnten und somit keine eindeutige Aussage über die Tage 1 bis 8 möglich war. Der Zeitraum zwischen dem fünften und sechsten Zyklus wurde für die Bestimmung der späten, posttherapeutischen Werte gewählt, weil bei fast allen Patientinnen mindestens fünf und bei einigen nicht mehr als sechs Zyklen appliziert wurden. Die so gewählten Zeitpunkte hatten den Vorteil, dass sie im klinischen Alltag praktikabel waren und außer am Tag 8 regelmäßig bei fast allen Patientinnen Werte erhoben werden konnten.

Bei früheren Studien war ein Anstieg von Apoptosemarkern wie Nukleosomen im Serum bei 62 Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen bereits in den ersten 1

bis 3 Tagen nach Applikation des ersten Chemotherapiezyklus zu beobachten. Nach einer Woche ohne weitere Chemotherapie zeigte sich hingegen wieder ein Abfall der Markerkonzentrationen (Holdenrieder und Stieber, 2004c). In der vorliegenden Studie war es aus oben genannten organisatorischen Gründen leider nicht möglich, Blutproben in diesem Zeitraum kurz nach Applikation des ersten Chemotherapiezyklus zu gewinnen.

Auswahl der Biomarker

Da die Apoptoserate bei malignen Erkrankungen dereguliert ist und durch Zytostatika gezielt beeinflusst wird (Holdenrieder und Stieber, 2004a), wurden in der vorliegenden Studie Biomarker untersucht, die apoptoseabhängig ins Blut freigesetzt werden. Die Marker konnten alle in einer Blutprobe, also wenig invasiv und kostengünstig gemessen werden. Alle Testkits basierten auf immunchemischen Verfahren. Vier der untersuchten Biomarker (MIF, sFAS, sICAM und tPAI-1) konnten simultan und damit zeitsparend mit einem Multiplex-Testkit gemessen werden. Die Bestimmung aller Marker erfolgte in Serumproben. Die Messung der Nukleosomenkonzentrationen wurde zusätzlich in Plasmaproben durchgeführt, weil bei früheren Studien im Serum höhere Nukleosomenkonzentrationen gefunden wurden als im Plasma. Bis heute bleibt jedoch unklar, welches das geeignetere Medium für die Nukleosomenmessung darstellt (Holdenrieder et. al., 2001b). Alle ausgewählten Apoptosemarker wurden bereits in früheren Studien in erhöhten Konzentrationen im Blut von Patienten mit verschiedenen Karzinomen nachgewiesen und wurden bereits mit der Apoptose in Zusammenhang gebracht (siehe Referenzen zu einzelnen Markern in 2.3). Während MIF als Zytokin (Bach et. al., 2008) und tPAI-1 vor allem als Gerinnungsfaktor von verschiedenen Zellen in den Extrazellularraum sezerniert werden (Schneider et. al., 2008), kann Fas sowohl als zellmembrangebundener Rezeptor als auch als lösliche Form im Extrazellularraum gefunden werden (Boroumand-Noughabi et. al., 2010). Auch ICAM hat Bedeutung sowohl in zellmembrangebundener Form als interzelluläres Adhäsionsmolekül als auch als sezernierte lösliche Form (Koyama, 1994; Gogali et. al., 2010). Zytokeratin 18 liegt normalerweise intrazellulär als Bestandteil des Zytoskeletts vor. Der M30-Antikörper weist ein Neopepitop des Zytokeratin 18 nach, das während der Apoptose durch caspasenvermittelte Spaltung entsteht und dann auch in den Extrazellularraum übertritt (Leers et. al., 1999). Nukleosomen entstehen ebenfalls beim Abbau der Zelle während der Apoptose und treten bei unzureichenden Recyclingmechanismen in die Blutzirkulation über (Stroun et. al., 2000). Um die ausgewählten Apoptosemarker mit etablierten Biomarkern zu vergleichen, wie es von der European Group on Tumor Markers gefordert wird, wurden zudem CA 15-3 und CEA in die Studie integriert.

Vergleich der verschiedenen Kollektive

Neben der Frage nach der Wertigkeit der untersuchten Biomarker zur Prädiktion des Therapieansprechens war auch interessant, ob sich die Markerkonzentrationen von Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom gegenüber denen von gesunden Frauen unterschieden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Markerkonzentrationen bei Patientinnen in verschiedenen Krankheitsstadien und bei Patientinnen mit gutartigen Brusterkrankungen unterschieden. Hierbei konnte zudem die Wertigkeit der Biomarker zur Diagnose beziehungsweise zum Screening beleuchtet werden. Es war jedoch zu beachten, dass die Anforderungen an einen diagnostischen Marker für maligne Erkrankungen wie das Mammakarzinom besonders hoch sind. Ein diagnostischer Marker muss eine sehr hohe Sensitivität aufweisen. Falsch-negative Befunde könnten fatale Folgen nach sich ziehen. Daneben muss er jedoch auch eine sehr hohe Spezifität aufweisen. Falsch-positive Ergebnisse könnten zu unnötigen, teuren und möglicherweise invasiven Folgeuntersuchungen sowie seelischer Belastung der betroffenen Patientinnen führen (Holdenrieder et. al., 2005).

Es ist bis heute kein Biomarker bekannt, der diese Ansprüche erfüllt und sich für Screening-Untersuchungen zur Früherkennung des Mammakarzinoms eignet (Duffy, 2006).

Auch im Blut zirkulierende Apoptosemarker schienen bisher aufgrund fehlender Tumor- und Organspezifität nicht für Screening-Untersuchungen geeignet. Sie bieten jedoch das Potential, Informationen über ablaufende Prozesse der Kanzerogenese zu liefern. Bei malignen Erkrankungen ist das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und –untergang gestört. Das bedeutet, dass die Zelltodrate verändert ist. Je nach Stadium der Kanzerogenese kann die Zelltodrate gegenüber der physiologischen Ausgangssituation vermindert, unverändert oder gesteigert sein. Auch unter physiologischen Bedingungen findet Apoptose statt. Frei gesetzte Zellbestandteile werden normalerweise rasch durch Makrophagen und benachbarte Zellen entfernt. Bei pathologischen Zuständen wie der Kanzerogenese sind diese Recyclingmechanismen jedoch häufig gestört oder unzureichend. In den Extrazellulärraum freigesetzte Zellbestandteile treten dann ins Blut über und können dort in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden (Holdenrieder und Stieber, 2004b).

Vergleich von gesunden Frauen und Patientinnen mit Mammakarzinom

Wie oben beschrieben war zu erwarten, dass Patientinnen mit Mammakarzinom höhere Konzentrationen der Apoptosemarker aufweisen als gesunde Frauen. In der vorliegenden Studie zeigten alle Zelltodmarker außer tPAI-1 und den in Serumproben gemessenen Nukleosomen niedrigere Werte bei den gesunden Frauen als bei den Patientinnen

mit Mammakarzinom. Alle diese Marker zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den gesunden Frauen und den Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom. Nur MIF, sFAS und in Plasmaproben gemessene Nukleosomen zeigten jedoch auch einen signifikanten Unterschied zu den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom. Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit denen anderer Studien überein. Dass Patientinnen mit Mammakarzinom in frühem Stadium höhere Werte als gesunde Kontrollpersonen aufwiesen, wurde von anderen Arbeitsgruppen für MIF (Jesneck et. al., 2009), sFAS (Ueno et. al., 1999), sICAM (Altomonte et. al., 1999; Mills et. al., 2004), M30 (Ueno et. al., 2003) und im Plasma zirkulierende Nukleosomen (Kuroi et. al., 1999; Kuroi et. al., 2001; Silva et. al., 2002; Huang et. al., 2006) ebenfalls beschrieben. Eine Arbeit zu sICAM beschrieb jedoch, dass Patientinnen mit Mammakarzinom (n=98) niedrigere Werte als gesunde Kontrollpersonen (n=96) aufwiesen. Dieses Ergebnis war allerdings nicht signifikant und die ROC-Kurve wies eine AUC von nur 0,56 auf. Außerdem war in dieser Studie nicht angegeben, in welchen Stadien sich die Brustkrebspatientinnen befanden (Kim et. al., 2009).

Im Gegensatz zu den anderen Markern waren die tPAI-1-Werte in der vorliegenden Studie bei den Patientinnen mit metastasiertem Karzinom signifikant niedriger als bei den gesunden Frauen. Allerdings zeigten die Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom höhere Werte als die gesunden Frauen. Da in diesen beiden Gruppen jedoch viele Proben Konzentrationen größer als der höchste Standard aufwiesen, war diese Beobachtung begrenzt aussagekräftig. Die tPAI-1-Konzentrationen in den Proben der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom lagen jedoch im Bereich der Standardkurve und konnten somit quantifiziert werden. PAI-1 ist als umfassend evaluierter prognostischer Gewebemarker beim Mammakarzinom bekannt. Er spielt eine wichtige Rolle für die Invasions-, Metastasierungs- und Angiogenesefähigkeit von Tumoren. Große prospektive randomisierte Studien zeigten, dass eine hohe PAI-1-Expression im Tumor mit einer schlechteren Prognose korreliert. Patientinnen mit niedrigen Levels ohne Lymphknotenbefall haben hingegen ein geringes Rezidivrisiko und profitieren daher wenig von einer nebenwirkungsreichen adjuvanten Chemotherapie (Duffy und Crown, 2008). Studien zur diagnostischen Wertigkeit von tPAI-1 im Serum oder Plasma zeigten beim Ovarialkarzinom (Havrilesky et. al., 2008), kolorektalen Karzinom (Herszenyi et. al., 2008), Gliom (Iwadata et. al., 2008) und nasopharyngealen Karzinom (Wu et. al., 2005) höhere Werte bei Tumorpatienten als bei gesunden Kontrollpersonen. Die hier vorliegenden kontroversen Ergebnisse, dass gesunde Frauen höhere Werte aufweisen als Brustkrebspatientinnen, wurden durch eine Arbeit von Kim et al. bestätigt (Kim et. al., 2009). Außerdem wurden bei Patienten mit Prostatakarzinom niedrigere PAI-1-Serumlevel als bei Gesunden gefunden (Parekh et. al., 2007). Es lässt sich also zusam-

menfassen, dass für tPAI-1 im Serum von Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen Wertigkeit als diagnostischer Marker gezeigt wurde. Die Präanalytik spielte dabei eine besonders wichtige Rolle. Die vorliegenden Daten sind zudem äußerst kontrovers und große Studien mit Brustkrebspatientinnen fehlen bisher.

Die Zelltodmarker wurden mit CEA und CA 15-3 verglichen. Beide Marker zeigten, wie erwartet, niedrigere Werte bei den gesunden Frauen als bei den Patientinnen mit Mammakarzinom. Der Unterschied zwischen den Gesunden und den Patientinnen mit metastasiertem Karzinom war signifikant. Dies passt sehr gut zu bisherigen Ergebnissen. 75% der Patientinnen mit UICC-Stadium IV weisen erhöhte CA 15-3-Konzentrationen auf. In Stadium III, II und I haben jedoch nur noch 40%, 20% und 10% erhöhte Werte (Duffy, 2006). Neben der unzureichenden Sensitivität gelten CEA und CA 15-3 außerdem wegen unzureichender Tumor- und Organspezifität als nicht zur Frühdiagnostik des Mammakarzinoms geeignet (Harris et. al., 2007).

Vergleich von Patientinnen mit Mammakarzinom in frühen und fortgeschrittenen Stadien

Alle Zelltodmarker außer tPAI-1 zeigten bei den Patientinnen mit lokal begrenztem Befund niedrigere Werte als bei solchen mit Fernmetastasen. Außer bei M30 und Nukleosomen waren die Unterschiede signifikant. Ähnliche Ergebnisse wurden in anderen Studien gezeigt für sFAS (Ueno et. al., 1999), sICAM (Kostler et. al., 2001; O'Hanlon et. al., 2002) und M30 (Ueno et. al., 2003).

Der Vergleich mit CEA und CA 15-3 in der vorliegenden Arbeit zeigte ebenfalls signifikant höhere Werte bei den Patientinnen mit Fernmetastasen als bei den Patientinnen in lokal begrenztem Stadium. Es ist seit längerem bekannt, dass die CEA- und CA 15-3-Werte im Serum von Patientinnen mit Mammakarzinom mit Zunahme der Tumormasse und dem Auftreten von Fernmetastasen ansteigen. In einer von Di Gioia veröffentlichten Studie zeigten Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, bei denen während palliativer Chemotherapie eine Krankheitsprogression zu verzeichnen war, höhere CA 15-3- und CEA-Konzentrationen als Patientinnen ohne Progression (Di Gioia et. al., 2011). Die ASCO empfiehlt die Bestimmung von CEA und CA 15-3 derzeit nur als ergänzende Möglichkeit zur Überwachung der Therapie der metastasierten Erkrankung. Dabei kann eine Erhöhung von CA 15-3 auf das 5- bis 10fache des oberen Grenzwerts des Referenzbereichs Hinweis auf das Vorliegen von Fernmetastasen sein (Duffy, 2006).

Vergleich von Patientinnen mit gutartigen Brustveränderungen und gesunden Frauen

Ein signifikanter Unterschied der Markerkonzentrationen zwischen den gesunden Frauen und Patientinnen mit gutartigen Brustveränderungen konnte lediglich für MIF gezeigt werden. Wie bei Jesneck et al. fanden sich höhere MIF-Werte bei Patientinnen mit gutartigen Brustveränderungen als bei gesunden Frauen (Jesneck et. al., 2009).

Vergleich von Patientinnen mit gutartigen Brustveränderungen und mit Mammakarzinom

Alle Zelltodmarker außer in Serumproben gemessene Nukleosomen zeigten deutliche und teilweise statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Patientinnen mit gutartigen Brustveränderungen und denen mit metastasiertem Mammakarzinom. Dabei waren die Werte außer bei tPAI-1 bei den Patientinnen mit Karzinom höher. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Patientinnen mit gutartigen Brusterkrankungen und solchen mit lokal begrenztem Mammakarzinom konnte hingegen nur für sFAS, M30 und in Plasmaproben gemessenen Nukleosomen gezeigt werden. In Plasmaproben gemessene Nukleosomen zeigten als einziger Marker einen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden für die Früherkennung des Mammakarzinoms sehr wichtigen Gruppen.

Nur wenige Studien verglichen bisher zirkulierende Zelltodmarker zwischen Patientinnen mit gutartigen Brusterkrankungen und mit Mammakarzinom. Zwei Studien bestätigten die hier vorliegenden Ergebnisse für sFAS. Allerdings wurden auch in diesen Studien nur sehr kleine Kollektive untersucht (Sheen-Chen et. al., 2003; Abbasova et. al., 2009). Ein etwas größeres Kollektiv wurde in zwei Studien zu sICAM untersucht, die signifikant niedrigere Werte bei Patientinnen mit gutartigen Brusterkrankungen als bei solchen mit lokal begrenztem (Altomonte et. al., 1999; O'Hanlon et. al., 2002) und metastasiertem Mammakarzinom (O'Hanlon et. al., 2002) erbrachten. Huang et al. bestimmten die Konzentration zirkulierender DNA im Plasma mittels Polymerase-Kettenreaktion bei 61 Patientinnen mit Mammakarzinom und 31 Patientinnen mit gutartigen Brusterkrankungen. Die Patientinnen mit Karzinom zeigten dabei signifikant höhere Werte (Huang et. al., 2006).

Die bekannten Tumormarker CA 15-3 und CEA zeigten bei den Patientinnen mit benigner Brusterkrankung niedrigere Werte als bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nur zu den Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Es ist bekannt, dass sich auch bei einigen gutartigen Erkrankungen erhöhte Konzentrationen von CA 15-3 und CEA finden (Al-azawi et. al., 2006).

Wertigkeit zur Differenzierung der verschiedenen Kollektive

Anhand von ROC-Kurven wurde die Wertigkeit der Marker zur Differenzierung der verschiedenen Kollektive beziehungsweise zur Diagnostik des Mammakarzinoms genauer beleuchtet. Zunächst wurden alle Patientinnen mit Mammakarzinom mit den gesunden Frauen verglichen. Hierbei zeigten in Plasmaproben gemessene Nukleosomen mit einer AUC von 0,87 das beste Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil. Auch MIF und sFAS zeigten mit einer AUC von jeweils 0,8 eine gute Differenzierung zwischen diesen beiden Gruppen. Da bei einem Marker zur Diagnostik des Mammakarzinoms die Abgrenzung gegenüber gutartigen Brustveränderungen besonders wichtig ist, wurden auch ROC-Kurven für den Vergleich gegenüber diesem Kollektiv erstellt. Hierbei zeigten alle Marker, wie zu erwarten war, deutlich schlechtere Ergebnisse. Das beste Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil zeigte CEA mit einer AUC von 0,77. Aufgrund der sehr kleinen Patientenzahl in diesem Kollektiv konnte diesem Ergebnis jedoch nur wenig Bedeutung gegeben werden und die weiteren statistischen Untersuchungen wurden auf die Patientinnen mit Mammakarzinom und die gesunden Frauen begrenzt. Der Vergleich der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom gegenüber den gesunden Frauen ergab für fast alle Marker eine sehr gute Differenzierungsfähigkeit. MIF und sFAS wiesen AUCs von größer 0,93 und 0,90 auf, während CA 15-3 und CEA mit 0,89 und 0,88 etwa vergleichbare Ergebnisse lieferten. Bei der für die Frühdiagnose des Mammakarzinoms wichtigen Differenzierung der Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom gegenüber gesunden Frauen ergaben in Plasmaproben gemessene Nukleosomen das beste Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil mit einer AUC von 0,88 und hoher Sensitivität (größer 40%) bei 100% Spezifität. CA 15-3 und CEA zeigten hierbei nur AUCs von 0,6. Trotz dieses vielversprechenden Ergebnisses scheinen Nukleosomen jedoch alleine nicht als diagnostischer Marker geeignet, weil ihnen eine hohe Spezifität für ein bestimmtes Organ- beziehungsweise einen bestimmten Tumor fehlt. Erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden Nukleosomen wurden auch beim Bronchialkarzinom, kolorektalen Karzinom, Nierenzellkarzinom, weiteren gynäkologischen und nasopharyngealen Malignomen sowie Lymphomen beschrieben (Maebo, 1990; Kuroi et. al., 2001; Holdenrieder et. al., 2001b; Holdenrieder und Stieber, 2004a). Darüber hinaus können auch viele benigne Erkrankungen wie beispielsweise schwere bakterielle Infektionen mit erhöhten Nukleosomenkonzentrationen einhergehen (Holdenrieder et. al., 1999; Holdenrieder et. al., 2001a). Zirkulierende Nukleinsäuren sind dennoch vielversprechende Biomarker. Mit dem Nachweis qualitativer Merkmale an den Nukleosomen kann die Tumor- und die Organspezifität deutlich verbessert werden. Hierzu bietet sich der Nachweis genetischer Mutationen, epigenetischer Merkmale wie Methylierungsmuster

von Tumorsuppressorgen oder Histonmodifikationen und Mikrosatelliteninstabilität an (Maebo, 1990; Kuroi et. al., 2001; Holdenrieder et. al., 2008a).

Korrelation der Biomarker untereinander

Es wurde untersucht, ob die Biomarker in unterschiedlichen Patientenkollektiven miteinander korrelierten. Es war zu beobachten, dass sich die Korrelationen der Marker in den Kollektiven deutlich unterschieden. Während sich bei den Frauen mit benigner Brusterkrankung keine signifikanten Korrelationen zeigten, fanden sich bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom die meisten signifikanten Korrelationen. Hierbei war einschränkend zu beachten, dass nur eine kleine Anzahl von Frauen mit benigner Brusterkrankung untersucht werden konnte. Darüber hinaus zeigten sich bei den meisten der Marker in fortgeschrittenem Krankheitsstadium deutlich höhere Markerkonzentrationen. Besonders interessant war bei den Korrelationen der Marker untereinander, dass die etablierten Marker CEA und CA 15-3 eine starke Korrelation untereinander sowie zu anderen Markern zeigten.

Vorhersage des Therapieansprechens

Um die Wertigkeit der Marker zur Vorhersage des Ansprechens auf eine neoadjuvante Chemotherapie zu untersuchen, wurden die Konzentrationen prätherapeutisch gemessen. In Variante I war die Bestimmung der Nukleosomenkonzentration im Serum wertvoll. Patientinnen ohne Remission zeigten signifikant höhere Werte. Ein Marker, der es erlaubt, Patientinnen herauszufiltern, die nicht von einer Chemotherapie profitieren, erscheint besonders wertvoll. Mithilfe eines solchen Markers könnte man diesen Patientinnen die Nebenwirkungen einer Chemotherapie ersparen. Die Relevanz zirkulierender Nukleosomen zur Vorhersage des Nichtansprechens auf eine neoadjuvante Chemotherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom wurde bisher in keiner anderen Studie gezeigt. Ähnliche Ergebnisse fanden sich jedoch bei Untersuchungen von Holdenrieder et al. bei 212 Patienten mit inoperablem nichtkleinzelligem und 128 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom, die eine primäre Chemotherapie erhielten. Patienten ohne Remission hatten hier ebenfalls höhere prätherapeutische Nukleosomenkonzentrationen (Holdenrieder et. al., 2004; Holdenrieder et. al., 2008c). Höhere prätherapeutische Werte bei Patienten mit schlechtem Therapieansprechen könnten dadurch erklärbar sein, dass in aggressiveren Tumoren mehr Zellumsatz stattfindet und somit mehr Nukleosomen ins Blut übertreten. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass in diesen Tumoren die DNA-Reparaturmechanismen gestört sind und DNA-Schädigungen häufiger zum Zelltod führen. Des Weiteren könnte in diesen aggressiveren Tumoren die Blutversorgung besser und gleichzeitig die Elimination von Apoptoseprodukten insuffizienter sein (Holdenrieder et. al., 2004; Mueller et. al., 2006).

In der vorliegenden Studie war MIF ebenfalls ein wertvoller Marker zur Vorhersage des Therapieansprechens in Variante I. Patientinnen ohne Remission hatten nahezu signifikant höhere prätherapeutische Werte. In einer vergleichbaren Studie zu MIF zeigte sich im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen kein deutlicher Unterschied der prätherapeutischen Werte zwischen Patientinnen mit gutem und schlechtem Therapieansprechen. In der Studie wurden MIF und 54 andere Marker mit bead-basierten Multiplexassays in Serumproben von 44 Brustkrebspatientinnen (UICC-Stadium IIB und III) analysiert. Die Patientinnen erhielten neoadjuvant vier Zyklen Doxorubicin und Paclitaxel in Kombination mit einer Hyperthermie-Behandlung der Brust. Es wurde untersucht, ob die Markerkonzentrationen vor jedem Zyklus und vor der Operation mit dem histopathologischen Therapieansprechen korrelierten (Nolen et. al., 2008). Es ist bekannt, dass die MIF-Expression in Mammakarzinomzellen oft hoch reguliert ist und dass MIF eine wichtige Rolle bei der Entstehung sowie Ausbreitung des Mammakarzinoms spielt. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unklar (Verjans et. al., 2009). Unter anderem gibt es Hinweise, dass durch MIF eine Inhibierung von p53 erfolgen kann und geschädigte Zellen auf diesem Wege der Apoptose entgehen können (Bach et. al., 2008). Darüber hinaus kann MIF über eine Herunterregulation von NKG2D die antitumorale Aktivität von Natürlichen Killerzellen hemmen (Häusler, 2011). Dies könnte ein schlechtes Chemotherapieansprechen bei Tumoren mit hoher MIF-Expression erklären, denn die Wirkung von Zytostatika beruht wesentlich auf der Induktion der Apoptose in Tumorzellen. Eine Korrelation zwischen der MIF-Konzentration im Serum und in Epithelzellen konnte gezeigt werden (He et. al., 2006), sodass auch erhöhte Serumkonzentrationen mit einer verminderten Apoptoserate einhergehen könnten.

In Variante II erbrachten die prätherapeutischen Werte bei keinem der Marker einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Ansprechgruppen. Am besten geeignet zur Vorhersage des Therapieansprechens schien noch sICAM. ICAM ist ein Adhäsionsmolekül und dient der Zell-Zell-Interaktion. Es wird in vielen verschiedenen gesunden sowie entarteten Zellen exprimiert. ICAM kann von der Oberfläche der Zellen abgestoßen werden. Es wird vermutet, dass dieses sogenannte „Shedding“ Tumorzellen vor der Beseitigung durch T-Lymphozyten oder Natürliche Killerzellen schützt und zur Metastasierungsfähigkeit beiträgt. Auf der anderen Seite kann ICAM, wenn es von aktivierten Endothelzellen abgestoßen wird, die Adhäsion von Tumorzellen an Gefäßwände verhindern und somit der Metastasierung entgegenwirken (Banks et. al., 1993). Hohe Konzentrationen von zirkulierendem sICAM können demzufolge entweder darauf zurückzuführen sein, dass ein vorliegender Tumor eine hohe Metastasierungsfähigkeit besitzt oder dass sich der Organismus gegen die Tumorausbreitung zur Wehr setzt (Bewick et. al., 2004). Bei 49 Brustkrebs-Patientinnen mit bereits metastasierter Er-

krankung in einer früheren Studie korrelierten hohe sICAM-Levels signifikant mit einem schlechten Therapieansprechen sowie einem kürzeren Gesamtüberleben (Zhang und Adachi, 1999). Bei Bewick et al. war sICAM als prognostischer Marker jedoch nur bei Patientinnen wertvoll, die mit Cyclophosphamid in Kombination mit Carboplatin oder Vinblastin behandelt wurden und nicht bei Patientinnen, die mit Cyclophosphamid in Kombination mit Paclitaxel behandelt wurden (Bewick et. al., 2004). Außerdem zeigten Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom bei niedrigen Levels vor Beginn einer Chemotherapie eine signifikant höhere Ansprechrare als bei hohen Levels (Dowlati et. al., 2008). Bei den hier vorliegenden Ergebnissen hingegen fanden sich bei Patientinnen mit histopathologischer Komplettremission, die oft eine gute Prognose haben, deutlich (jedoch nicht signifikant) höhere Werte als bei den anderen Patientinnen. Die Rolle von sICAM bei der Tumorigenese des Mammakarzinoms sowie die prädiktive und prognostische Relevanz müssten genauer beleuchtet werden, um sICAM als prädiktiven Marker nutzen zu können. Da in der vorliegenden Studie Patientinnen mit niedrigen sICAM-Levels vor neoadjuvanter Chemotherapie keine Komplettremission erreichten, könnte es bei diesen Patientinnen aufgrund der schlechteren Prognose hilfreich sein, zumindest die Therapienachsorge zu intensivieren.

Die prätherapeutischen Werte von tPAI-1 waren in der vorliegenden Studie in beiden Varianten nur sehr eingeschränkt verwertbar, weil die Konzentration in vielen Proben höher als die des höchsten Standards war und somit nicht genau quantifiziert werden konnte. Bei der oben beschriebenen Studie von Nolen et al. zeigten Patientinnen mit Mammakarzinom vor neoadjuvanter Chemotherapie bei klinisch kompletter und partieller Remission signifikant niedrigere tPAI-1-Levels als ohne Remission. tPAI-1 erreichte eine Sensitivität von 75% bei einer Spezifität von 77% (Nolen et. al., 2008). In der vorliegenden Arbeit zeichnete sich in Variante I ebenfalls eine Tendenz zu niedrigeren Werten bei gutem Ansprechen ab. In früheren Studien wurde in den Zellen verschiedener Malignome eine erhöhte Expression von tPAI-1 gefunden. Darüber hinaus zählt die PAI-1-Expression in Mammakarzinomzellen zu den am besten evaluierten prognostischen Markern bei Brustkrebs. Da für die Bestimmung von uPA und PAI-1 mittels ELISA Tumorfriischgewebe oder Tumorgewebe, das unverzüglich nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff oder bei -80° C gelagert wurde, erforderlich ist (Mayr et. al., 2009), erfolgt derzeit noch keine routinemäßige Untersuchung der PAI-Expression. Hohe PAI-1-Gewebelevels gehen mit hohem Risiko einher. Die Rolle von PAI-1 bei der Apoptose scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Eine hohe Expression von PAI-1 macht die Zelle über drei verschiedene Mechanismen resistenter gegenüber Apoptose: extrazellulär über die Hemmung der Plasmin-Aktivierung und der Zelladhäsion per Vitronektin sowie intrazellulär über die Hemmung der Caspase 3 (Schneider et. al., 2008). PAI-1

spielt somit eine wichtige Rolle bei der Invasion, Metastasierung und Angiogenese von Tumoren (Harris et. al., 2007). Die Bedeutung von zirkulierendem PAI-1 bei Krebserkrankungen wurde jedoch noch nicht im Detail aufgedeckt und sollte weiter erforscht werden.

CA 15-3 und CEA sind vorwiegend als Marker zur Verlaufsbeobachtung bei Brustkrebs bekannt. Al Azawi et al. konnten für CA 15-3 zudem eine positive Korrelation hoher prätherapeutischer Level mit schlechtem klinischem und histopathologischen Ansprechen zeigen (Al-azawi et. al., 2006). Die hier vorliegenden Ergebnisse konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen.

Frühzeitige Beurteilung der Therapieeffizienz mittels Einzelwerten an Tag 8

Eine effiziente Reduktion der Tumorzellenzahl stellt die Grundlage einer erfolgreichen Krebstherapie dar. Daher lag die Vermutung nahe, dass hohe Nukleosomenlevels kurz nach Therapiebeginn mit einem guten Therapieansprechen einhergehen. In früheren Studien konnte ein deutlicher Anstieg der Nukleosomenkonzentration bereits ein bis drei Tage nach Applikation einer Chemotherapie beobachtet werden. Nach ca. einer Woche zeigte sich jedoch wieder ein Konzentrationsabfall (Holdenrieder und Stieber, 2004c). Bei 25 Patienten mit akuten myeloischen Leukämien zeigten Patienten mit kompletter Remission prätherapeutisch und an den Tagen 2 bis 4 nach Applikation der Induktionschemotherapie signifikant höhere Nukleosomenkonzentrationen im Serum (Mueller et. al., 2006). Leider konnte in der vorliegenden Arbeit dieser frühe Zeitraum nicht untersucht werden. An Tag 8 zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Nukleosomenkonzentration zwischen den verschiedenen Ansprechgruppen.

Entgegen dieser Hypothese fielen in einer Studie von Holdenrieder et al. zum Bronchialkarzinom am Tag 8 höhere Nukleosomenkonzentrationen im Serum von Patienten mit schlechtem Therapieansprechen auf (Holdenrieder et. al., 2004; Mueller et. al., 2006; Holdenrieder et. al., 2008c). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten Patientinnen ohne Remission etwas höhere Serumlevels an Tag 8 als Patientinnen mit kompletter und partieller Remission, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen.

Bei Nolen et al. zeigte MIF signifikant höhere Werte am Tag 8 bei Brustkrebs-Patientinnen mit partieller und kompletter Remission als bei Patientinnen ohne Remission nach neoadjuvanter Chemotherapie (Nolen et. al., 2008). In der vorliegenden Arbeit in Variante I zeigte diese Patientengruppe hingegen fast signifikant niedrigere Werte. Jedoch zeigten Patientinnen mit Komplettremission gegenüber Patientinnen mit partieller und ausbleibender Remission in Variante II höhere Werte, ohne Signifikanz zu

erreichen. In der vorliegenden Studie war das Gesamtkollektiv sehr klein (n=16), sodass keine definitive Aussage möglich war.

Die M30-Konzentrationen am Tag 8 waren sowohl in Variante I als auch II bei Patientinnen mit gutem Therapieansprechen höher (nicht signifikant). Das M30-Antigen ist ein Teil des Zytokeratin 18. Es entsteht beim Abbau des Zytoskeletts während der Apoptose der Zelle. Hohe M30-Levels im Serum an Tag 8 könnten somit auf eine hohe Apoptoserate hinweisen. Vergleichbare Daten anderer Studiengruppen liegen nicht vor.

Insgesamt musste bei der Bewertung der Ergebnisse von Tag 8 kritisch bedacht werden, dass das Kollektiv sehr klein war, da nur bei wenigen Patientinnen eine Kontrolluntersuchung am Tag 8 in der hämato-onkologischen Praxis stattfand. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansprechgruppen konnte bei keinem der Marker nachgewiesen werden. Zur genaueren Beurteilung der Wertigkeit der Marker an Tag 8 sind in Zukunft ausführlichere Untersuchungen notwendig.

Frühzeitige Beurteilung der Therapieeffizienz mittels Einzelwerten kurz vor Applikation des 2. Therapiezyklus

Die Werte vor Applikation des 2. Therapiezyklus waren bei sFAS in Variante II am aussagekräftigsten, wobei die Gruppe mit gutem Ansprechen einen (nicht signifikant) höheren Median aufwies. Pichon et al. untersuchten die prognostische Wertigkeit von sFAS bei 42 Patienten mit verschiedenen Karzinomen. Während Patienten mit prätherapeutischen sFAS-Levels unterhalb des Medians eine bessere Prognose hatten, waren die sFAS-Werte während einer Chemotherapie wenig aussagekräftig (Pichon et. al., 2006). Auch bei Ueno et al. zeigte sich sFAS wertvoll als prognostischer Marker. Sie bestimmten die Konzentration von sFAS in Serumproben von 162 Patientinnen mit lokal begrenztem primärem Mammakarzinom und 71 Patientinnen mit Mammakarzinomrezidiv. Patientinnen mit Levels oberhalb des Cut-off (75. Perzentile) hatten eine signifikant schlechtere Prognose bezüglich des krankheitsfreien und Gesamtüberlebens (Ueno et. al., 1999). Klinische Studien zur prädiktiven Wertigkeit von sFAS liegen bisher nicht vor. Micheau et al. konnten zeigen, dass bestimmte Zytostatika (Cisplatin, Doxorubicin, Mitomycin, Fluorouracil, Campothecin) in Kolonkarzinomzelllinien nach 24 und 48 Stunden zu erhöhter FAS-Expression führten (Micheau et. al., 1997). Dabei könnten die Konzentration von löslichem FAS im Blut ebenfalls ansteigen und ein Hinweis auf eine erhöhte Apoptoserate darstellen. Es ist bis heute nicht eindeutig geklärt, von welchen Zellen erhöhte sFAS-Konzentrationen im Blut bei malignen Erkrankungen stammen. Die Tatsache, dass bei Vorliegen von Fernmetastasen höhere Konzentrationen gefunden wurden, legt jedoch die Vermutung nahe, dass Krebszellen selbst lösliches FAS ins Blut abgeben. Des Weiteren wird jedoch vermutet, dass periphere Lymphozyten (Knipping

et. al., 1995) oder tumorassoziiertes Stroma (Midis et. al., 1996) bei Krebserkrankungen sFAS ins Blut abgeben.

Die Nukleosomenkonzentrationen zeigten in der vorliegenden Arbeit keinen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Bei 128 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom von Holdenrieder et al. war die Bestimmung der Nukleosomenlevels vor Applikation des 2. und 3. Chemotherapiezyklus hingegen wertvoll. Patienten mit Remission wiesen signifikant niedrigere Levels auf (Holdenrieder et. al., 2008c). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom (Holdenrieder et. al., 2004).

Beurteilung der Therapieeffizienz mittels Einzelwerten gegen Ende der Chemotherapie

Interessant war in der vorliegenden Arbeit, dass die späten Werte von sICAM und CA 15-3 in Variante II signifikant zwischen den Patientinnen mit kompletter Remission und den Patientinnen mit partieller beziehungsweise ohne Remission diskriminierten. sICAM zeigte dabei höhere und CA 15-3 niedrigere Werte in der Gruppe mit kompletter Remission. Bezüglich der frühzeitigen Beurteilung des Therapieansprechens und der Frage danach, ob bei einer Patientin eine Umstellung der Therapie sinnvoll ist, ist dieses Ergebnis nicht aufschlussreich. Es ist jedoch interessant für die Frage, ob bei einer Patientin eine intensivisierte Tumornachsorge erfolgen sollte. Das Ergebnis kann ein Hinweis darauf sein, dass Patientinnen mit niedrigen sICAM- oder hohen CA 15-3-Levels nach Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie eine eher schlechte Prognose haben. Nach genauerer Beurteilung der prognostischen Wertigkeit könnten diese beiden Marker helfen, Patientinnen zu identifizieren, bei denen mindestens eine intensivisierte Nachsorge erfolgen sollte. Zur Beurteilung der Wertigkeit der Marker für diese Fragestellung sollte noch untersucht werden, ob eine Korrelation mit dem Überleben besteht. Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund einer zu kurzen Nachbeobachtungszeit nicht möglich.

Beurteilung der Therapieeffizienz anhand der Markerkinetik

Die Ergebnisse der Kinetik der Markerkonzentrationen schienen zunächst vielversprechender. Die Kinetik der Nukleosomenwerte in Serumproben von vor Beginn der Therapie bis vor dem 2. Therapiezyklus diskriminierte in Variante I signifikant zwischen den Ansprechgruppen. Die Gruppe ohne Remission zeigte stark abfallende Werte bei höheren Ausgangswerten, während die Gruppe mit kompletter beziehungsweise partieller Remission nahezu gleichbleibende Werte aufwies. Diesem Ergebnis waren jedoch die Ergebnisse mehrerer älterer Studien bei verschiedenen Malignomen gegenüberzu-

stellen. In diesen Studien zeigten Patienten mit gutem Ansprechen einheitlich einen starken Abfall der Nukleosomenkonzentration. Patienten mit schlechtem Ansprechen zeigten wenig Veränderung, einen Anstieg oder einen schwächeren Abfall der Konzentrationen (Holdenrieder et. al., 2004; Holdenrieder und Stieber, 2004c; Holdenrieder et. al., 2008c). Beim Vergleich mit diesen Studien war zu bedenken, dass die Nukleosomenwerte in der vorliegenden Arbeit insgesamt und bereits vor der Therapie sehr niedrig waren. Außerdem wurden in den anderen Studien größere Kollektive untersucht. Weitere Untersuchungen mit Mammakarzinom-Patientinnen sind abzuwarten.

Bei M30 fand sich in der vorliegenden Arbeit von Beginn der Therapie bis zum 2. Therapiezyklus beziehungsweise bis zum Therapieende ein Anstieg der Werte in der Gruppe mit kompletter Remission gegenüber einem Abfall der Werte in der Gruppe mit partieller/ohne Remission in Variante II. Demiray et al. untersuchten ebenfalls die prädiktive Relevanz von M30 bei 42 Patientinnen mit Mammakarzinom unter neoadjuvanter Chemotherapie. Bei klinisch gutem Ansprechen zeigte sich dort ein Anstieg der M30-Werte nach 24 und 48 Stunden. Bei schlechtem Ansprechen war wenig Veränderung der M30-Levels zu beobachten. Nach 24 Stunden bestand ein signifikanter Unterschied der M30-Kinetik zwischen den Ansprechgruppen (Demiray et. al., 2006). Auch bei Patientinnen mit Mammakarzinomrezidiv zeigte sich ein höherer Anstieg der M30-Werte während einer Chemotherapie (Tag 1, 3 und 6) bei Patientinnen mit gutem Ansprechen (Biven et. al., 2003). Untersuchungen an Patienten mit verschiedenen Malignomen zeigten entsprechende Ergebnisse (Pichon et. al., 2006). Ein Vergleich der Studien wird jedoch dadurch erschwert, dass unterschiedliche Zeitpunkte untersucht wurden und teilweise keine genaue Definition des Therapieansprechens angegeben wurde. In Variante I der vorliegenden Arbeit hatten sowohl Patientinnen mit gutem als auch mit schlechtem Therapieansprechen abfallende M30-Werte. Patientinnen mit Remission zeigten jedoch einen weniger starken Abfall als Patientinnen ohne Remission. Signifikanz wurde hierbei nicht erreicht.

Die Kinetik der Markerkonzentration von vor Beginn der Therapie bis vor dem 2. Therapiezyklus ergab für tPAI-1 in Variante II einen nahezu signifikanten Unterschied zwischen den beiden Ansprechgruppen. Wie bereits beschrieben, konnten die tPAI-1-Ergebnisse jedoch nur mit Vorsicht betrachtet werden, weil die Konzentration in vielen Proben über dem des höchsten Standards lag.

Multiplex-Testkit zur Messung von MIF, sFAS, sICAM und tPAI-1

Mit dem Human Sepsis/Apoptosis Lincoplex Kit konnten vier Parameter simultan in einer Blutprobe bestimmt werden. Dies ermöglichte eine Zeit- und Kostenersparnis. Es zeigten sich jedoch deutliche Schwierigkeiten bei der Messung von tPAI-1. Die tPAI-1-Konzentrationen in vielen Proben waren höher als die Konzentration des höchsten Standards, sodass sie nicht genau quantifiziert werden konnten. Zur Messung der tPAI-1-Konzentrationen mit dem Human Sepsis/Apoptosis Lincoplex Kit mussten die Proben folglich stärker verdünnt werden. Dies hätte jedoch zur Folge, dass die Konzentrationen der anderen Marker voraussichtlich zu niedrig wären. Eine simultane Messung von tPAI-1 mit den anderen drei Markern ist also nicht möglich. Die Ergebnisse der tPAI-1-Messungen in der vorliegenden Arbeit konnten nur eingeschränkt beurteilt werden.

Vergleich der Nukleosomenkonzentrationen in Serum- und Plasmaproben

Die Bestimmung der Nukleosomenkonzentrationen erfolgte anders als bei den anderen Markern nicht nur in Serum-, sondern auch in Plasmaproben. Wenn genug Material vorhanden war, wurde in der vorliegenden Arbeit für die Messung der Nukleosomen mit EDTA behandeltes Serum verwendet, welches als besonders stabil gilt (Holdenrieder et. al., 2001b). In früheren Studien hatten sich deutliche höhere Nukleosomenkonzentrationen im Serum als im Plasma gezeigt. Die vorliegende Arbeit konnte dies bestätigen. Höhere Nukleosomenkonzentrationen im Serum können unter anderem dadurch erklärt werden, dass die Zellen während der Gerinnungsvorgänge vor der Zentrifugation zusätzlichem Stress ausgesetzt werden. Außerdem liegen im Plasma Chelatoren vor, die die Aktivität von calcium- und magnesiumabhängigen Endonukleasen hemmen können. Das Vorhandensein von Nukleosomen könnte zudem durch Plasmaproteine, die mit den Nukleosomen reagieren, maskiert werden (Holdenrieder et. al., 2001b). Interessanterweise waren die Nukleosomenwerte im Serum hier nicht mit den Nukleosomenwerten im Plasma korreliert. Aufgrund dieser bereits vor Studienbeginn erwarteten Unterschiede wurden die Nukleosomen im Serum beziehungsweise im Plasma in der vorliegenden Arbeit wie unterschiedliche Marker behandelt.

Limitationen der Studie

Zusammengefasst weist die vorliegende Studie einige Punkte auf, welche bei folgenden Untersuchungen verbessert werden können. Die Patientenzahl insgesamt schien ausreichend für eine hypothesengenerierende Studie. Zur weiteren Beurteilung der Biomarker sind jedoch unbedingt größere Patientenzahlen erforderlich. Des Weiteren sollte bei multiplen Testungen eine Bonferroni-Korrektur erfolgen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war insbesondere die Beurteilung der Wertigkeit der Marker zur Vorhersage und zur frühzeitigen Abschätzung des Therapieansprechens. Es war nicht Ziel der Arbeit, die Marker bezüglich der Frühdiagnostik des Mammakarzinoms zu bewerten. Bei folgenden Studien diesbezüglich scheint neben größeren Patientenzahlen auch eine genauere Definition der gesunden Frauen (mit Untersuchung der Brust zum Ausschluss von benignen und malignen Veränderungen) und insbesondere der Patientinnen mit benignen Brustveränderungen (weitere Einteilung nach Art der benignen Brustveränderungen) erforderlich.

Wie bei der Diskussion der Wertigkeit der Biomarker zur frühzeitigen Abschätzung der Therapieeffizienz und dem Vergleich zu früheren Studien deutlich wurde, sollten bei folgenden Untersuchungen möglichst noch mehr Zeitpunkte erfasst werden. Insbesondere die ersten ein bis drei Tage nach Applikation eines Chemotherapiezyklus können wertvolle Informationen über den therapeutischen Erfolg liefern. Aus den bereits beschriebenen Gründen war eine Untersuchung dieses Zeitraums in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Darüber hinaus konnten in der vorliegenden Studie nur wenige Patientinnen in die Untersuchungen an Tag 8 miteinbezogen werden und es war daher keine definitive Aussage zur Wertigkeit der Marker an Tag 8 möglich.

Bezüglich der Methodik sollte der Einsatz des hier verwendeten Multiplex-Assays verbessert werden. Eine kombinierte Bestimmung von tPAI-1 mit den anderen untersuchten Apoptosemarkern erwies sich als ungeeignet, da für tPAI-1 eine andere Verdünnung der Serumproben erforderlich gewesen wäre.

Weiteres Verbesserungspotential bietet der kombinierte Nachweis von Nukleosomen und bestimmten tumorspezifischen genetischen oder epigenetischen Veränderungen.

Stärken der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde eine hypothesengenerierende Studie vorgestellt, deren Ergebnisse in folgenden größeren Studien genauer validiert werden sollten. Die Studie war prospektiv angelegt und es erfolgte bereits vor Beginn der Studie eine genaue Definition des Studiendesigns. Im Vergleich zu ähnlichen Studien ist insbesondere hervorzuheben, dass in der vorliegenden Arbeit eine eindeutige Definition und gewissenhafte Beurteilung des Therapieansprechens vorlag. Des Weiteren wurde besonderer Wert auf eine sorgfältige Durchführung sowohl der Präanalytik als auch der Analytik gelegt. Die klinischen Daten wurden äußerst sorgfältig durch mich persönlich dokumentiert. Durch eine sehr gute Betreuung der Patientinnen durch erfahrene Onkologen sowie durch die Rekrutierung und Betreuung der gesunden Frauen durch mich persönlich konnte eine hohe Compliance erreicht werden. Ein weiterer Vorzug war die unabhängig erfolgte

statistische Auswertung. Bezüglich der untersuchten Marker ist hervorzuheben, dass hier ein Vergleich der neuen Marker mit den etablierten Markern CA 15-3 und CEA in die Studie integriert wurde. Alle Marker können wenig invasiv, einfach und kostengünstig gemessen werden. Zusammengefasst ist die vorliegende Studie die erste, bei der engmaschig mehrere Apoptosemarker in Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom während neoadjuvanter Chemotherapie untersucht wurden.

Schlussfolgerung und Ausblick

Alle Marker, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, können wenig invasiv, schnell, einfach und kostengünstig gemessen werden. Ebenso wie die gut erforschten Marker CA 15-3 und CEA schienen auch Zelltodmarker nicht für die Früherkennung des Mammakarzinoms geeignet zu sein, weil sie keine klare Abgrenzung zwischen gut- und bösartigen Veränderungen der Brust zuließen. Nukleosomen bieten dennoch Potential als diagnostischer Marker, weil sie in Zukunft durch den Nachweis bestimmter Veränderungen an DNA oder Histonen eine größere Tumorspezifität gewinnen können. Hierzu sollte genauer erforscht werden, welche genetischen und epigenetischen Modifikationen Mammakarzinomzellen charakterisieren. Da die Zelltodmarker insgesamt eine gute Diskriminierungsfähigkeit zwischen gesunden Frauen, Patientinnen mit Mammakarzinom in frühen Stadien und Patientinnen mit metastasiertem Karzinom aufwiesen, könnten sie zudem wertvoll für die Verlaufsbeobachtung nach der Therapie sein. Bezüglich der Prädiktion des Ansprechens auf eine neoadjuvante Chemotherapie zeigten sich einige der Zelltodmarker viel versprechend. Dennoch konnte nur für wenige Marker statistische Signifikanz bewiesen werden. Dies dürfte auf die verhältnismäßig kleinen Fallzahlen zurückzuführen sein. Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch, dass die Wertigkeit von Zelltodmarkern zur Beurteilung des Ansprechens auf eine Chemotherapie weiter erforscht werden sollte und zumindest teilweise den etablierten Tumormarkern CA 15-3 und CEA überlegen sein kann. Weitere Studien, in die noch mehr Patientinnen eingeschlossen werden können, sollten daher insbesondere mit Nukleosomen, eventuell mit zusätzlichem Nachweis tumorspezifischer Modifikationen, MIF sowie M30 zur weiteren Validierung erfolgen. Darüber hinaus müssen die Prozesse, die zur Freisetzung der Zelltodmarker ins Blut führen, genauer aufgedeckt werden.

7 Zusammenfassung

Derzeit gibt es keinen Parameter, der die Effizienz einer neoadjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom sicher vorhersagen kann. Das Therapieansprechen kann erst nach Applikation mehrerer Chemotherapiezyklen anhand der Klinik und bildgebender Verfahren beurteilt werden. Eine präzise Beurteilung der biochemischen Reaktionen des Tumors auf die Therapie ist so nicht möglich.

Aus diesem Grund sollte in dieser prospektiv angelegten Studie die Wertigkeit verschiedener zirkulierender Biomarker zur Vorhersage und frühzeitigen Beurteilung der Effizienz einer neoadjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht werden. Mit MIF, sFAS, sICAM, tPAI-1, M30 und Nukleosomen wurden Biomarker ausgewählt, die apoptoseabhängig im Serum nachgewiesen werden können. Da die Apoptoserate bei malignen Erkrankungen dereguliert ist und durch Zytostatika gezielt beeinflusst wird, erschienen diese Apoptosemarker vielversprechend. Zum Vergleich wurden, wie von der European Group on Tumor Markers empfohlen, auch die etablierten Tumormarker CA 15-3 und CEA in die Studie integriert.

Die Bestimmung der Marker erfolgte in Serum- und bei den Nukleosomen zusätzlich in Plasmaproben. Die Quantifizierung der Marker erfolgte mit immunchemischen Methoden, die auf Antigen-Antikörper-Reaktionen basieren.

Die Konzentrationen aller Marker wurden in Blutproben von 31 gesunden Frauen, 13 Patientinnen mit gutartigen Brustveränderungen, 28 Patientinnen mit metastasiertem und 51 Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom analysiert. Die Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom erhielten eine neoadjuvante Chemotherapie. Die Markerkonzentrationen wurden vor und während der Therapie bestimmt. Das Therapieansprechen wurde anhand des postoperativ erhobenen histopathologischen Befunds in Anlehnung an die RECIST-Kriterien beurteilt. Während in Variante I sowohl eine komplette als auch eine partielle Remission als gutes Therapieansprechen definiert wurden, wurde in Variante II nur eine Komplettremission als gutes Ansprechen bewertet.

Von den 51 Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten, hatten 9 Patientinnen eine Komplettremission, 29 Patientinnen eine partielle Remission und 13 Patientinnen keine Remission.

Der Vergleich der verschiedenen Patientengruppen ergab deutliche Unterschiede der Markerkonzentrationen zwischen den Patientinnen mit Mammakarzinom und den gesunden Frauen. Auch zwischen den Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

und den Patientinnen mit lokal begrenztem Mammakarzinom zeigte sich eine gute Diskriminierungsfähigkeit der Marker.

Nukleosomen im Serum zeigten die besten Ergebnisse zur prätherapeutischen Vorhersage des Therapieansprechens. Patientinnen ohne Remission hatten signifikant höhere prätherapeutische Nukleosomenkonzentrationen im Serum als Patientinnen mit partieller oder kompletter Remission.

Bezüglich der frühzeitigen Beurteilung der Therapieeffizienz zeigten ebenfalls Nukleosomen im Serum die besten Ergebnisse. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied der Markerkinetik vom prätherapeutischen Basiswert zum zweiten Therapiezyklus. Patientinnen ohne Remission zeigten einen deutlichen Abfall der Nukleosomenkonzentration im Serum in diesem Zeitraum.

Die etablierten Marker CEA und CA 15-3 waren weder zur prätherapeutischen Vorhersage noch zur frühzeitigen Beurteilung der Therapieeffizienz hilfreich.

Posttherapeutisch zeigten sICAM und der etablierte Marker CA 15-3 signifikante Unterschiede zwischen den besonders hinsichtlich der Prognose interessanten Gruppen, Patientinnen mit kompletter Remission versus Patientinnen mit nur partieller/ohne Remission.

Apoptosemarker sind vielversprechende, wenig invasiv und wenig zeitaufwendig zu analysierende Biomarker. Zusammengefasst konnte mit der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass insbesondere Nukleosomen, eventuell in Kombination mit dem Nachweis tumorspezifischer genetischer oder epigenetischer Veränderungen, in Zukunft zur Vorhersage und frühzeitigen Beurteilung der Effizienz einer neoadjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom genutzt werden könnten. Dadurch könnten vielen Patientinnen die teilweise äußerst toxischen Nebenwirkungen einer nicht erfolgreichen Therapie erspart und effizientere Therapieregimes mit daraus resultierender Verbesserung der Prognose eingesetzt werden.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adriamycin
APC-Gen	Adenomatöse Polyposis Coli Gen
AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome = Erworbenes Immundefektsyndrom
ABTS	2,2' -Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-Sulfonat)
AIF	Apoptoseinduzierender Faktor
Apaf-1	Apoptoseproteasenaktivierender Faktor 1
ASCO	American Society of Oncology = Amerikanische Gesellschaft für Onkologie
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Units
AUC	Fläche unter der Kurve
Bcl	Antiapoptotisches Onkogen, das durch t(14;18) in B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird
C	Cyclophosphamid
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CA 15-3	Krebsantigen 15-3
CaCl₂	Kalziumchlorid
CAD	Caspasenaktivierte DNase
CEA	Karzinomembryonales Antigen
Ced	Cell Death-Gen = Zelltod-Gen
CMF	Cyclophosphamid Methotrexat Fluorouracil
CR	Complete Remission = Komplettremission
cTNM	Klinisches TNM-Stadium

DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DISC	Death Inducing Signaling Complex = Todinduzierender Signalkomplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doce	Docetaxel
E	Epirubicin
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egl-1	Egg laying defense, proapoptotisch wirkendes Gen des Organismus von <i>Caenorhabditis elegans</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay = Enzymgekoppelter Immunchemischer Test
F	Fluorouracil
FASL	Ligand von FASR
FASR	Todesrezeptor auf der Zelloberfläche, wird auch CD 95 oder Apo-1 genannt
FCS	Fetales Kälberserum
FEC	Fluorouracil Epirubicin Cyclophosphamid
G	Grading = histopathologischer Malignitätsgrad eines Tumors
g	Gramm
H₂O	Wasser
H₂SO₄	Dihydrogensulfat
Her2neu	Human Epidermal Growth Receptor Factor 2 = Menschlicher Epidermaler Wachstumsrezeptor Faktor 2
Her2neu-ECD	Extrazelluläre Domäne von Her2neu
IAP	Apoptoseproteininhibitor
ICAD	Inhibitorische Untereinheit der Caspasen aktivierten DNase

KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOF	Körperoberfläche
M	Fernmetastasierung
M	Mol
m²	Quadratmeter
M30	M30-Antigen; Spaltprodukt des Zytokeratin 18
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase = Mitogenaktivierte Protein-kinase
MDR	Multi Drug Resistant - Gen
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Makrophagen Migration Inhibierungs - Faktor
ml	Milliliter
mM	mMol
MRT	Magnetresonanztomografie
myc	Gen, das den Transkriptionsfaktor c-myc kodiert
N	Nodalstatus
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NC	No Change = keine Remission
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant

NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
p53	Tumorsuppressorgen/-protein
Pac	Paclitaxel
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphatpuffer
Pd	Prednisolon
pg	Picogramm
PR	Partial Remission = Partielle Remission
pTNM	Postoperatives TNM-Stadium
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors = Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens solider Tumore
ROC	Receiver Operator Characteristic
s	signifikant
sFAS	Soluble FAS = löslicher Todesrezeptor
sICAM	Soluble ICAM = lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül
T	Tumorgröße
TAC	Docetaxel Doxorubicin Cyclophosphamid
Tis	Carcinoma in situ
TMB	3,3',5,5' -Tetramethylbenzidin
tPA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator
tPAI-1	Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
U/l	Einheiten pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Einheiten pro Milliliter
UICC	Union for International Cancer Control

uPA	Plasminogen Aktivator vom Urokinasetyp
uPAR	Membrangebundener Plasminogen Aktivator Rezeptor
V	Vincristin
XAF 1	Apoptoseproteininhibitor assoziierter Faktor 1
yTNM	TNM-Stadium nach neoadjuvanter Therapie
µg/l	Mikrogramm pro Liter
µl	Mikroliter

Literaturverzeichnis

1. **Abbasova, S.G., Vysotskii, M.M., Ovchinnikova, L.K., Obusheva, M.N., Digaeva, M.A., Britvin, T.A., Bahoeva, K.A., Karabekova, Z.K., Kazantzeva, I.A., Mamedov, U.R., Manuchin, I.B. und Davidov, M.I., 2009**
Cancer and soluble FAS.
Bull. Exp Biol. Med. 148[4]: 638-642.
2. **Abendstein, B., Daxenbichler, G., Windbichler, G., Zeimet, A.G., Geurts, A., Sweep, F. und Marth, C., 2000**
Predictive value of uPA, PAI-1, HER-2 and VEGF in the serum of ovarian cancer patients.
Anticancer Res 20[1B]: 569-572.
3. **Al-azawi, D., Kelly, G., Myers, E., McDermott, E.W., Hill, A.D., Duffy, M.J. und Higgins, N.O., 2006**
CA 15-3 is predictive of response and disease recurrence following treatment in locally advanced breast cancer.
BMC. Cancer 6: 220.
4. **Altomonte, M., Fonsatti, E., Lamaj, E., Cattarossi, I., Cattelan, A. und Maio, M., 1999**
Differential levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in early breast cancer and benign breast lesions.
Breast Cancer Res Treat. 58[1]: 19-23.
5. **Aotake, T., Lu, C.D., Chiba, Y., Muraoka, R. und Tanigawa, N., 1999**
Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis.
Clin. Cancer Res. 5[1]: 135-142.
6. **Bach, J.P., Rinn, B., Meyer, B., Dodel, R. und Bacher, M., 2008**
Role of MIF in inflammation and tumorigenesis.
Oncology 75[3-4]: 127-133.
7. **Banks, R.E., Gearing, A.J., Hemingway, I.K., Norfolk, D.R., Perren, T.J. und Selby, P.J., 1993**
Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies.
Br. J Cancer 68[1]: 122-124.
8. **Bauerfeind, I., Abenhardt, T. und Beinert, T., 2007**
Primär systemische Therapie.

In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 128-137.

9. **Beachy, S.H. und Repasky, E.A., 2008**
Using extracellular biomarkers for monitoring efficacy of therapeutics in cancer patients: an update.
Cancer Immunol. Immunother. 57[6]: 759-775.
10. **Bellamy, C.O., Malcomson, R.D., Harrison, D.J. und Wyllie, A.H., 1995**
Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis.
Semin. Cancer Biol. 6[1]: 3-16.
11. **Bewick, M., Conlon, M., Lee, H., Parissenti, A.M., Zhang, L., Gluck, S. und LaFrenie, R.M., 2004**
Evaluation of sICAM-1, sVCAM-1, and sE-Selectin levels in patients with metastatic breast cancer receiving high-dose chemotherapy.
Stem Cells Dev. 13[3]: 281-294.
12. **Binder, B.R., Christ, G., Gruber, F., Grubic, N., Hufnagl, P., Krebs, M., Mihaly, J. und Prager, G.W., 2002**
Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles.
News Physiol Sci. 17: 56-61.
13. **Biven, K., Erdal, H., Hagg, M., Ueno, T., Zhou, R., Lynch, M., Rowley, B., Wood, J., Zhang, C., Toi, M., Shoshan, M.C. und Linder, S., 2003**
A novel assay for discovery and characterization of pro-apoptotic drugs and for monitoring apoptosis in patient sera.
Apoptosis. 8[3]: 263-268.
14. **Böcker, Denk, Heitz und Moch, 2008**
Pathologie.
Elsevier, Urban & Fischer.
15. **Boroumand-Noughabi, S., Sima, H.R., Ghaffarzadehgan, K., Jafarzadeh, M., Raziee, H.R., Hosseinneshad, H., Moaven, O., Rajabi-Mashhadi, M.T., Azarian, A.A., Mashhadinejad, M. und Tavakkol-Afshari, J., 2010**
Soluble Fas might serve as a diagnostic tool for gastric adenocarcinoma.
BMC. Cancer 10: 275.
16. **Bruhn, H.D., Fölsch, U.R. und Schäfer H., 2008**
Labormedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte. Pathophysiologie und Klinik.
Schattauer.

17. **Calandra, T. und Roger, T., 2003**
Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity.
Nat. Rev. Immunol. 3[10]: 791-800.
18. **Clarke, P.G. und Clarke, S., 1996**
Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena.
Anat. Embryol. (Berl) 193[2]: 81-99.
19. **Cleator, S., Parton, M. und Dowsett, M., 2002**
The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer.
Endocr. Relat Cancer 9[3]: 183-195.
20. **Cotter, T.G., 2009**
Apoptosis and cancer: the genesis of a research field.
Nat. Rev. Cancer 9[7]: 501-507.
21. **Danial, N.N. und Korsmeyer, S.J., 2004**
Cell death: critical control points.
Cell 116[2]: 205-219.
22. **Demiray, M., Ulukaya, E.E., Arslan, M., Gokgoz, S., Saraydaroglu, O., Ercan, I., Evrensel, T. und Manavoglu, O., 2006**
Response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer could be predictable by measuring a novel serum apoptosis product, caspase-cleaved cytokeratin 18: a prospective pilot study.
Cancer Invest 24[7]: 669-676.
23. **Di Gioia, D., Heinemann, V., Nagel, D., Untch, M., Kahlert, S., Bauerfeind, I., Koehnke, T. und Stieber, P., 2011**
Kinetics of CEA and CA15-3 correlate with treatment response in patients undergoing chemotherapy for metastatic breast cancer (MBC).
Tumour. Biol. 32[4]: 777-785.
24. **Diamantis, A., Magiorkinis, E., Sakorafas, G.H. und Androutsos, G., 2008**
A brief history of apoptosis: from ancient to modern times.
Onkologie. 31[12]: 702-706.
25. **Dive, C., Smith, R.A., Garner, E., Ward, T., George-Smith, S.S., Campbell, F., Greenhalf, W., Ghaneh, P. und Neoptolemos, J.P., 2010**
Considerations for the use of plasma cytokeratin 18 as a biomarker in pancreatic cancer.
Br. J. Cancer 102[3]: 577-582.

26. **Dowlati, A., Gray, R., Sandler, A.B., Schiller, J.H. und Johnson, D.H., 2008**
Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab--an Eastern Cooperative Oncology Group Study.
 Clin Cancer Res 14[5]: 1407-1412.
27. **Duffy, M.J., 2006**
Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value?
 Clin Chem. 52[3]: 345-351.
28. **Duffy, M.J. und Crown, J., 2008**
A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help.
 Clin Chem. 54[11]: 1770-1779.
29. **Eggeman, H., Stoblen, F., Thill, M., Korlach, S., Schmid, P., Luftner, D., Elling, D., Taran, F.A., Kummel, S. und Landt, S., 2011**
Influence of a dose-dense adjuvant chemotherapy on sVCAM-1/sICAM-1 serum levels in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes.
 Anticancer Res. 31[8]: 2617-2622.
30. **Eiermann, W., Bauerfeind, I., Hanusch, C.A., Hasmüller, S., Kahlert, S., Kaiser, C., Keim, S., Mosner, M., Oberlechner, E., Paepke, S., Raab, G. und Salat, C., 2009**
Primär systemische Therapie.
 In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 143-152.
31. **Elmore, S., 2007**
Apoptosis: a review of programmed cell death.
 Toxicol. Pathol. 35[4]: 495-516.
32. **Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Nagata, S., 1998**
A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.
 Nature 391[6662]: 43-50.
33. **Engel, J., Beinert, T. und Delius, M., 2007**
Epidemiologie.
 In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 1-11.
34. **Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. und Hancock, D.C., 1992**

Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein.
Cell 69[1]: 119-128.

35. **Fadeel, B. und Orrenius, S., 2005**
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease.
J. Intern. Med. 258[6]: 479-517.
36. **Gerhard, I. und Kiechle, M., 2006**
Gynäkologie integrativ: konventionelle und komplementäre Therapie.
Urban und Fischer.
37. **Gewies, A., 2003**
Introduction to Apoptosis.
<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>.
38. **Gießelmann, B., Kimmig, R. und Hermelink, K., 2004**
Hormonelle Substitution und Mammakarzinom. Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms - State of the Art -, W. Zuckschwerdt Verlag, 31.
39. **Gogali, A., Charalabopoulos, K., Zampira, I., Konstantinidis, A.K., Tachmazoglou, F., Daskalopoulos, G., Constantopoulos, S.H. und Dalavanga, Y., 2010**
Soluble adhesion molecules E-cadherin, ICAM-1 and E-selectin as lung cancer biomarkers.
Chest.
40. **Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. und Ferguson, T.A., 1995**
Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.
Science 270[5239]: 1189-1192.
41. **Hanahan, D. und Weinberg, R.A., 2000**
The hallmarks of cancer.
Cell 100[1]: 57-70.
42. **Hanusch, C.A., Bauerfeind, I., Eiermann, W. und Hasmüller, S., 2011**
Primär systemische Therapie.
In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 144-153.
43. **Harbeck, N., Anthuber, C., Ataseven A., Bauerfeind, I., Beinert, T., Eiermann, W., Kahlert, S., Lutz, L., Michl, G., Oberlechner, E., Petrides, P.E., Pihusch, R., Rack, B., Salat, C., Sattler, D., Sommer, H., Walther, J. und Wolf, C., 2007**
Adjuvante Systemtherapie.

In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 138-163.

44. **Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F. und Bast, R.C., Jr., 2007**
American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer.
J Clin. Oncol. 25[33]: 5287-5312.
45. **Häusler, S., 2011**
Krebszellen entkommen dem Immunsystem.
Fokus Gynäkologische Onkologie 2: 22-27.
46. **Havrilesky, L.J., Whitehead, C.M., Rubatt, J.M., Cheek, R.L., Groelke, J., He, Q., Malinowski, D.P., Fischer, T.J. und Berchuck, A., 2008**
Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence.
Gynecol. Oncol. 110[3]: 374-382.
47. **He, X.X., Yang, J., Ding, Y.W., Liu, W., Shen, Q.Y. und Xia, H.H., 2006**
Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis.
Gut 55[6]: 797-802.
48. **Heinemann, V., Ataseven, B., Beinert, T. und Di Gioia, D., 2007**
Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms.
In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 251-269.
49. **Hengartner, M.O., 2000**
The biochemistry of apoptosis.
Nature 407[6805]: 770-776.
50. **Herszenyi, L., Farinati, F., Cardin, R., Istvan, G., Molnar, L.D., Hritz, I., De, P.M., Plebani, M. und Tulassay, Z., 2008**
Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer.
BMC. Cancer 8: 194.
51. **Holdenrieder, S., Kolligs, F.T. und Stieber, P., 2008a**
New horizons for diagnostic applications of circulating nucleosomes in blood?
Clin Chem. 54[7]: 1104-1106.

52. **Holdenrieder, S., Nagel, D., Schalhorn, A., Heinemann, V., Wilkowski, R., Von, P.J., Raith, H., Feldmann, K., Kremer, A.E., Muller, S., Geiger, S., Hamann, G.F., Seidel, D. und Stieber, P., 2008b**
Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1137: 180-189.
53. **Holdenrieder, S. und Stieber, P., 2004a**
Apoptotic markers in cancer.
Clin. Biochem. 37[7]: 605-617.
54. **Holdenrieder, S. und Stieber, P., 2004b**
The potential of apoptotic markers in diagnostic oncology.
Clinical Laboratory International: Analyte of the month.
55. **Holdenrieder, S. und Stieber, P., 2004c**
Therapy control in oncology by circulating nucleosomes.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1022: 211-216.
56. **Holdenrieder, S., Stieber, P., Bodenmuller, H., Busch, M., Fertig, G., Furst, H., Schalhorn, A., Schmeller, N., Untch, M. und Seidel, D., 2001a**
Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases.
Int. J Cancer 95[2]: 114-120.
57. **Holdenrieder, S., Stieber, P., Bodenmuller, H., Fertig, G., Furst, H., Schmeller, N., Untch, M. und Seidel, D., 2001b**
Nucleosomes in serum as a marker for cell death.
Clin. Chem. Lab Med. 39[7]: 596-605.
58. **Holdenrieder, S., Stieber, P., Forg, T., Kuhl, M., Schulz, L., Busch, M., Schalhorn, A. und Seidel, D., 1999**
Apoptosis in serum of patients with solid tumours.
Anticancer Res 19[4A]: 2721-2724.
59. **Holdenrieder, S., Stieber, P., von Pawel, J., Raith, H., Nagel, D., Feldmann, K. und Seidel, D., 2004**
Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer.
Clin Cancer Res 10[18 Pt 1]: 5981-5987.
60. **Holdenrieder, S., von Pawel, J., Dankelmann, E., Duell, T., Faderl, B., Markus, A., Siakavara, M., Wagner, H., Feldmann, K., Hoffmann, H., Raith, H., Nagel, D. und Stieber, P., 2008c**
Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line che-

motherapy of small cell lung cancer.
Clin Cancer Res 14[23]: 7813-7821.

61. **Holdenrieder, S., von Pawel, J., Schalhorn, A. und Stieber, P., 2005**
Diagnostische Bedeutung zirkulierender DNA-Fragmente in der Onkologie.
J Lab Med 29[2]: 113-129.
62. **Huang, Z.H., Li, L.H. und Hua, D., 2006**
Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients.
Cancer Lett. 243[1]: 64-70.
63. **Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J. und Beach, D.H., 1999**
A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity.
J Exp Med. 190[10]: 1375-1382.
64. **Iwadate, Y., Hayama, M., Adachi, A., Matsutani, T., Nagai, Y., Hiwasa, T. und Saeki, N., 2008**
High serum level of plasminogen activator inhibitor-1 predicts histological grade of intracerebral gliomas.
Anticancer Res 28[1B]: 415-418.
65. **Jesneck, J.L., Mukherjee, S., Yurkovetsky, Z., Clyde, M., Marks, J.R., Lokshin, A.E. und Lo, J.Y., 2009**
Do serum biomarkers really measure breast cancer?
BMC. Cancer 9: 164.
66. **Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. und Yagita, H., 1995**
Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand.
J. Exp. Med. 182[6]: 1777-1783.
67. **Kerr, J.F., 1971**
Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death.
J. Pathol. 105[1]: 13-20.
68. **Kerr, J.F., 2002**
History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept.
Toxicology 181-182: 471-474.
69. **Kerr, J.F., Winterford, C.M. und Harmon, B.V., 1994**
Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.
Cancer 73[8]: 2013-2026.

70. **Kim, B.K., Lee, J.W., Park, P.J., Shin, Y.S., Lee, W.Y., Lee, K.A., Ye, S., Hyun, H., Kang, K.N., Yeo, D., Kim, Y., Ohn, S.Y., Noh, D.Y. und Kim, C.W., 2009**
The multiplex bead array approach to identifying serum biomarkers associated with breast cancer.
Breast Cancer Res 11[2]: R22.
71. **Kirkegaard, T. und Jaattela, M., 2009**
Lysosomal involvement in cell death and cancer.
Biochim. Biophys. Acta 1793[4]: 746-754.
72. **Knipping, E., Debatin, K.M., Stricker, K., Heilig, B., Eder, A. und Krammer, P.H., 1995**
Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias.
Blood 85[6]: 1562-1569.
73. **Kornberg, R.D. und Lorch, Y., 1999**
Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome.
Cell 98[3]: 285-294.
74. **Kostler, W.J., Tomek, S., Brodowicz, T., Budinsky, A.C., Flamm, M., Hejna, M., Krainer, M., Wiltchke, C. und Zielinski, C.C., 2001**
Soluble ICAM-1 in breast cancer: clinical significance and biological implications.
Cancer Immunol Immunother. 50[9]: 483-490.
75. **Koyama, S., 1994**
Immunosuppressive effect of shedding intercellular adhesion molecule 1 antigen on cell-mediated cytotoxicity against tumor cells.
Jpn. J. Cancer Res. 85[2]: 131-134.
76. **Krammer, P.H., 2000**
Apoptose.
Deutsches Ärzteblatt 97[25]: 1752-1759.
77. **Kreienberg, R., Kopp, I. und Albert, U., 2008**
Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.
W. Zuckschwerdt Verlag.
78. **Kreienberg, R., Möbus, V., Jonat, W. und Kühn, T., 2010**
Mammakarzinom: Interdisziplinär.
Springer Berlin Heidelberg.

79. **Kuroi, K., Tanaka, C. und Toi, M., 1999**
Plasma Nucleosome Levels in Node-Negative Breast Cancer Patients.
Breast Cancer 6[4]: 361-364.
80. **Kuroi, K., Tanaka, C. und Toi, M., 2001**
Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients.
Int. J Oncol. 19[1]: 143-148.
81. **Leers, M.P., Kolgen, W., Bjorklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Bjorklund, P., Ramaekers, F.C., Bjorklund, B., Nap, M., Jornvall, H. und Schutte, B., 1999**
Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis.
J Pathol. 187[5]: 567-572.
82. **Leist, M. und Nicotera, P., 1997**
The shape of cell death.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 236[1]: 1-9.
83. **Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. und Yuan, J., 1998**
Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.
Cell 94[4]: 491-501.
84. **Liang, Q.L., Li, Z.Y., Chen, G.Q., Lai, Z.N., Wang, B.R. und Huang, J., 2010**
Prognostic value of serum soluble Fas in patients with locally advanced unresectable rectal cancer receiving concurrent chemoradiotherapy.
J. Zhejiang. Univ Sci. B 11[12]: 912-917.
85. **Lockshin, R.A. und Williams, C.M., 1964**
Programmed cell death - II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms.
J. Ins. Physiol. 10: 643-649.
86. **Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. und Bernhagen, J., 2002**
Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease.
Microbes. Infect. 4[4]: 449-460.
87. **Luger, K., 2003**
Structure and dynamic behavior of nucleosomes.
Curr. Opin. Genet. Dev. 13[2]: 127-135.

88. **Madden, S.D. und Cotter, T.G., 2008**
Cell death in brain development and degeneration: control of caspase expression may be key!
Mol. Neurobiol. 37[1]: 1-6.
89. **Maebo, A., 1990**
[Plasma DNA level as a tumor marker in primary lung cancer].
Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi 28[8]: 1085-1091.
90. **Majno, G. und Joris, I., 1995**
Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.
Am. J. Pathol. 146[1]: 3-15.
91. **Mariani, S.M., Matiba, B., Baumler, C. und Krammer, P.H., 1995**
Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases.
Eur. J. Immunol. 25[8]: 2303-2307.
92. **Mayr, D., Sotlar, K., Högel, B., Permanetter, W. und Nährig, J., 2009**
Pathologie des Mammakarzinoms.
In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 54-83.
93. **Meier, P., Finch, A. und Evan, G., 2000**
Apoptosis in development.
Nature 407[6805]: 796-801.
94. **Meyer-Siegler, K.L., Bellino, M.A. und Tannenbaum, M., 2002**
Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma.
Cancer 94[5]: 1449-1456.
95. **Micheau, O., Solary, E., Hammann, A., Martin, F. und manche-Boitrel, M.T., 1997**
Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity.
J Natl. Cancer Inst. 89[11]: 783-789.
96. **Midis, G.P., Shen, Y. und Owen-Schaub, L.B., 1996**
Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy.
Cancer Res 56[17]: 3870-3874.
97. **Mills, P.J., Parker, B., Jones, V., Adler, K.A., Perez, C.J., Johnson, S., Cohen-Zion, M., Marler, M., Sadler, G.R., Dimsdale, J.E. und ncoli-Israel, S., 2004**

The effects of standard anthracycline-based chemotherapy on soluble ICAM-1 and vascular endothelial growth factor levels in breast cancer.
Clin. Cancer Res. 10[15]: 4998-5003.

98. **Minisini, A.M., Fabbro, D., Di, L.C., Pestrin, M., Russo, S., Cardellino, G.G., Andreetta, C., Damante, G. und Puglisi, F., 2007**
Markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer.
Am. J Clin Pathol. 128[1]: 112-117.
99. **Molina, R., Barak, V., van, D.A., Duffy, M.J., Einarsson, R., Gion, M., Goike, H., Lamerz, R., Nap, M., Soletormos, G. und Stieber, P., 2005**
Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations.
Tumour. Biol. 26[6]: 281-293.
100. **Morand, E.F., Leech, M. und Bernhagen, J., 2006**
MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis.
Nat. Rev. Drug Discov. 5[5]: 399-410.
101. **Mueller, S., Holdenrieder, S., Stieber, P., Haferlach, T., Schalhorn, A., Braess, J., Nagel, D. und Seidel, D., 2006**
Early prediction of therapy response in patients with acute myeloid leukemia by nucleosomal DNA fragments.
BMC. Cancer 6: 143.
102. **Nährig, J., Högel, B. und Marlow, S., 2007**
Pathologie des Mammakarzinoms. Manual Mammakarzinome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 48-76.
103. **Nelson, S.M., Ferguson, L.R. und Denny, W.A., 2004**
DNA and the chromosome - varied targets for chemotherapy.
Cell Chromosome. 3[1]: 2.
104. **Nolen, B.M., Marks, J.R., Ta'san, S., Rand, A., Luong, T.M., Wang, Y., Blackwell, K. und Lokshin, A.E., 2008**
Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer.
Breast Cancer Res 10[3]: R45.
105. **O'Hanlon, D.M., Fitzsimons, H., Lynch, J., Tormey, S., Malone, C. und Given, H.F., 2002**
Soluble adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) in breast carcinoma.
Eur. J Cancer 38[17]: 2252-2257.

106. **Owen-Schaub, L.B., Angelo, L.S., Radinsky, R., Ware, C.F., Gesner, T.G. und Bartos, D.P., 1995**
Soluble Fas/APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis?
 Cancer Lett. 94[1]: 1-8.
107. **Parekh, D.J., Ankerst, D.P., Baillargeon, J., Higgins, B., Platz, E.A., Troyer, D., Hernandez, J., Leach, R.J., Lokshin, A. und Thompson, I.M., 2007**
Assessment of 54 biomarkers for biopsy-detectable prostate cancer.
 Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 16[10]: 1966-1972.
108. **Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. und Pisani, P., 2005**
Global cancer statistics, 2002.
 CA Cancer J Clin 55[2]: 74-108.
109. **Pichon, M.F., Labroquere, M., Rezai, K. und Lokiec, F., 2006**
Variations of soluble fas and cytokeratin 18-Asp 396 neo-epitope in different cancers during chemotherapy.
 Anticancer Res 26[3B]: 2387-2392.
110. **Plattner, H. und Hentschel, J., 1997**
Taschenlehrbuch Zellbiologie.
 Thieme Verlag, Stuttgart.
111. **Rack, B., Eiermann, W. und Engel, J., 2007**
Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom.
 In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 85-91.
112. **Renahan, A.G., Booth, C. und Potten, C.S., 2001**
What is apoptosis, and why is it important?
 BMJ 322[7301]: 1536-1538.
113. **Rich, T., Watson, C.J. und Wyllie, A., 1999**
Apoptosis: the germs of death.
 Nat. Cell Biol. 1[3]: E69-E71.
114. **Robertson, J.D., Fadeel, B. und Zhivotovsky, B., 2002**
Centennial Nobel Conference on apoptosis and human disease.
 Cell Death and Differentiation 9: 468-475.
115. **Rühl, I., Bauerfeind, I., Kahlert, S., Untch, M. und Hepp, H., 2004**
[Neoadjuvant therapy of breast cancer].
 Gynakol. Geburtshilfliche Rundsch. 44[2]: 92-101.

116. **Schaffer, P., Ataseven, B., Herbst, M., Höß, C., Lindner, K., Nikolajek, K., Riepl, M., Röper, B., Sommer, H., Stadler, P. und Wypior, H.J., 2007**
Radioonkologische Behandlung.
In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 114-127.
117. **Schaller, G., Hasmüller, S. und Jückstock, J., 2011**
Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom.
In: TZM, J.W. (Ed.), *Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 92-99.
118. **Schneider, D.J., Chen, Y. und Sobel, B.E., 2008**
The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis.
Thromb. Haemost. 100[6]: 1037-1040.
119. **Schutte B. und Henfling M., 2004**
Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis.
Exp Cell Res 297: 11-26.
120. **Sebens, S. und Schafer, H., 2011**
The Tumor Stroma as Mediator of Drug Resistance - A Potential Target to Improve Cancer Therapy?
Curr. Pharm. Biotechnol.
121. **Sheen-Chen, S.M., Chen, H.S., Eng, H.L. und Chen, W.J., 2003**
Circulating soluble Fas in patients with breast cancer.
World J Surg. 27[1]: 10-13.
122. **Silva, J.M., Silva, J., Sanchez, A., Garcia, J.M., Dominguez, G., Provencio, M., Sanfrutos, L., Jareno, E., Colas, A., Espana, P. und Bonilla, F., 2002**
Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival.
Clin Cancer Res 8[12]: 3761-3766.
123. **Sionov, R.V. und Haupt, Y., 1999**
The cellular response to p53: the decision between life and death.
Oncogene 18[45]: 6145-6157.
124. **Söletormos, G., Nielsen, D., Schioler, V., Skovsgaard, T. und Dombernowsky, P., 1996**
Tumor markers cancer antigen 15.3, carcinoembryonic antigen, and tissue polypeptide antigen for monitoring metastatic breast cancer during first-line chemotherapy and follow-up.
Clin Chem. 42[4]: 564-575.

125. **Stroun, M., Maurice, P., Vasioukhin, V., Lyautey, J., Lederrey, C., Lefort, F., Rossier, A., Chen, X.Q. und Anker, P., 2000**
The origin and mechanism of circulating DNA.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 906: 161-168.

126. **Sturgeon, C.M., Duffy, M.J., Stenman, U.H., Lilja, H., Brunner, N., Chan, D.W., Babaian, R., Bast, R.C., Jr., Dowell, B., Esteva, F.J., Haglund, C., Harbeck, N., Hayes, D.F., Holten-Andersen, M., Klee, G.G., Lamerz, R., Looijenga, L.H., Molina, R., Nielsen, H.J., Rittenhouse, H., Semjonow, A., Shih, I., Sibley, P., Soletormos, G., Stephan, C., Sokoll, L., Hoffman, B.R. und Diamandis, E.P., 2008**
National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers.
Clin. Chem. 54[12]: e11-e79.

127. **Ueno, T., Toi, M., Biven, K., Bando, H., Ogawa, T. und Linder, S., 2003**
Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients.
Eur. J Cancer 39[6]: 769-774.

128. **Ueno, T., Toi, M. und Tominaga, T., 1999**
Circulating Soluble Fas Concentration in Breast Cancer Patients.
Clinical Cancer Research 5: 3529-3533.

129. **Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, M., Yilmaztepe-Oral, A., Ari, F., Zik, B., Ursavas, A. und Tokullugil, A.H., 2010**
sFas levels increase in response to cisplatin-based chemotherapy in lung cancer patients.
Cell Biochem. Funct. 28[7]: 565-570.

130. **Untch, M., Fasching, P.A., Konecny, G.E., Hasmuller, S., Lebeau, A., Kreienberg, R., Camara, O., Muller, V., du, B.A., Kuhn, T., Stickeler, E., Harbeck, N., Hoss, C., Kahlert, S., Beck, T., Fett, W., Mehta, K.M., von, M.G. und Loibl, S., 2011**
Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups.
J. Clin. Oncol. 29[25]: 3351-3357.

131. **Untch, M., Loibl, S., Bischoff, J., Eidtmann, H., Kaufmann, M., Blohmer, J.U., Hilfrich, J., Strumberg, D., Fasching, P.A., Kreienberg, R., Tesch, H., Hanusch, C., Gerber, B., Rezai, M., Jackisch, C., Huober, J., Kuhn, T., Nekljudova, V. und von, M.G., 2012**
Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-

taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial.
Lancet Oncol. 13[2]: 135-144.

132. **Verjans, E., Noetzel, E., Bektas, N., Schutz, A.K., Lue, H., Lennartz, B., Hartmann, A., Dahl, E. und Bernhagen, J., 2009**
Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer.
BMC. Cancer 9: 230.
133. **Wagner, S., Wagner, A. und Brandner, P., 2011**
Update Mammakarzinom: Bericht vom Konsensusmeeting St. Gallen 2011 und vom Kongress der ASCO in Chicago 2011.
Frauenarzt 52: 787-791.
134. **Wolf, C., Artmann, A. und de Waal, J.C., 2007**
Mammakarzinom-Prävention. Manual Mammakarzinome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 12-29.
135. **Woods, D.B. und Vousden, K.H., 2001**
Regulation of p53 function.
Exp. Cell Res. 264[1]: 56-66.
136. **Wu, C.C., Chien, K.Y., Tsang, N.M., Chang, K.P., Hao, S.P., Tsao, C.H., Chang, Y.S. und Yu, J.S., 2005**
Cancer cell-secreted proteomes as a basis for searching potential tumor markers: nasopharyngeal carcinoma as a model.
Proteomics. 5[12]: 3173-3182.
137. **Wyllie, A.H., 1980**
Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.
Nature 284[5756]: 555-556.
138. **Xia, H.H., Yang, Y., Chu, K.M., Gu, Q., Zhang, Y.Y., He, H., Wong, W.M., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Yuen, M.F., Chan, A.O. und Wong, B.C., 2009**
Serum macrophage migration-inhibitory factor as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer.
Cancer 115[23]: 5441-5449.
139. **Yaman, E., Coskun, U., Sancak, B., Buyukberber, S., Ozturk, B. und Benekli, M., 2010**
Serum M30 levels are associated with survival in advanced gastric carcinoma patients.
Int. Immunopharmacol. 10[7]: 719-722.

140. **Yasasever, V., Camlica, H., Duranyildiz, D., Oguz, H., Tas, F. und Dalay, N., 2007**
Macrophage migration inhibitory factor in cancer.
 Cancer Invest 25[8]: 715-719.
141. **Yonehara, S., Ishii, A. und Yonehara, M., 1989**
A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.
 J. Exp. Med. 169[5]: 1747-1756.
142. **Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R. und Kwon, B.S., 1999**
A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis.
 J. Biol. Chem. 274[20]: 13733-13736.
143. **Yuan, J. und Yankner, B.A., 2000**
Apoptosis in the nervous system.
 Nature 407[6805]: 802-809.
144. **Zeiss, C.J., 2003**
The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice.
 Vet. Pathol. 40[5]: 481-495.
145. **Zernecke, A., Bernhagen, J. und Weber, C., 2008**
Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease.
 Circulation 117[12]: 1594-1602.
146. **Zhang, G.J. und Adachi, I., 1999**
Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in metastatic breast carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis.
 Int. J. Oncol. 14[1]: 71-77.
147. **Zhao, Y.M., Wang, L., Dai, Z., Wang, D.D., Hei, Z.Y., Zhang, N., Fu, X.T., Wang, X.L., Zhang, S.C., Qin, L.X., Tang, Z.Y., Zhou, J. und Fan, J., 2011**
Validity of plasma macrophage migration inhibitory factor for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma.
 Int. J. Cancer 129[10]: 2463-2472.

Danksagung

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel für die Gewährleistung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Herrn PD Dr. med. Stefan Holdenrieder für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit: die sehr gute Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe, die zahlreichen guten Ideen, die Organisation der Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen, die stetige Ermutigung, Geduld und Motivation, die intensiven fachlichen Diskussionen, das Ermöglichen der Veröffentlichung der Ergebnisse, Hilfe beim Erstellen von Postern und Publikationen sowie vieles mehr.
- Herrn Dr. med. Oliver J. Stötzer, Prof. Dr. med. Christoph Salat und dem gesamten Team der hämato-onkologischen Schwerpunktpraxis in München für die hervorragende Zusammenarbeit sowie das Ermöglichen dieser Dissertation.
- Frau Dr. rer. nat. Dorothea Nagel für die kenntnisreiche Unterstützung bei der Planung der Studie und der statistischen Auswertung sowie für die intensive Diskussion der Ergebnisse.
- Frau Barbara Siegele und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie für die Hilfsbereitschaft beim Erlernen und die tatkräftige Unterstützung bei der Aufarbeitung der Blutproben und der Messung der Biomarker sowie dem EDV-Team.
- Herrn PD Dr. med. Markus J. Schwarz und Frau Zach für die Bereitstellung von Analysegeräten, die Einführung in die Anwendung dieser sowie für die Unterstützung bei der Messung der Biomarker.
- allen Mitdoktoranden für die stets sehr gute Stimmung in der Arbeitsgruppe, die gegenseitige Hilfe, Beratung und Motivation.
- meinem Ehemann Dr.-Ing. Roland Gierlich für die konstruktiven Anregungen sowie für seine große Geduld und die liebevolle Begleitung durch Höhen und Tiefen beim Erstellen der Doktorarbeit.
- meinen Eltern Regina und Dr. phil. Albert Fersching, ohne deren Liebe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Debora Monika Irena Fersching-Gierlich, geb. Fersching

Geboren am 17.11.1983 in Freiburg im Breisgau

Bildungsweg

05/2010	Approbation als Ärztin
05/2010	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2005	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2003-05/2010	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
06/2003	Abitur am Rotteck-Gymnasium, Freiburg
1990-1994	Vigeliusgrundschule, Freiburg

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2011	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik der Helfensteinklinik Geislingen, Kliniken des Landkreises Göppingen gGmbH
12/2008-12/2009	Praktisches Jahr: <ol style="list-style-type: none">1. Tertial: Chirurgie, Maria-Theresia-Klinik, München2. Tertial: Innere Medizin, Städtisches Klinikum München-Harlaching3. Tertial: Neurologie, Städtisches Klinikum München-Harlaching
2007-2012	Praktische Tätigkeit im Rahmen der Dissertationsarbeit am Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München