

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Campus Innenstadt)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

Deskriptive Verlaufsanalyse der Wachstumsfaktoren *Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF A)* und *Vascular Endothelial Growth Factor 165b (VEGF 165b)* bei Brustkrebspatientinnen unter Berücksichtigung ihrer Wertigkeit als Prognosefaktoren

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

vorgelegt von

Angela Julia Rademacher

aus München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Brigitte Rack

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. vet. Robert Kammerer
Priv.-Doz. Dr. med. Beyhan Ataseven

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Maria Karsten

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2016

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und gesellschaftliche Bedeutung	1
1.1.2	Prognostische Faktoren.....	2
1.1.3	Prädiktive Faktoren	3
1.2	<i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF A).....	4
1.2.1	Struktureller Aufbau und Rezeptorbindung	4
1.2.2	VEGF A und Tumorangiogenese.....	7
1.3	Die antiangiogenetische Spleißvariante VEGF 165b	9
1.3.1	Strukturelle und funktionelle Unterschiede zu VEGF 165	9
1.3.2	Biologische Funktion	11
1.4	Antiangiogenetische Therapieansätze.....	12
1.4.1	Kontroversen in der Anwendung beim Mammakarzinom.....	12
1.4.2	Bedeutung prädiktiver Marker für Bevacizumab (Avastin®).....	15
1.5	Fragestellung	16
1.5.1	Überblick	16
1.5.2	Spezielle Fragestellung	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Das Untersuchungskollektiv	18
2.1.1	Das Patientenkollektiv	18
2.1.2	Gesundes Vergleichskollektiv	20
2.2	Material	21
2.2.1	Reagenzien	21
2.2.2	Puffer und Verdünnungen	21
2.2.3	Geräte und sonstige Materialien	22
2.3	Methoden	23
2.3.1	Gewinnung und Verarbeitung der Serum- und Plasmaproben des gesunden Vergleichskollektivs.....	23
2.3.2	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	24
2.4	Statistische Analyse	28

3	Ergebnisse	29
3.1	Morphologische Daten	29
3.2	Deskriptive Statistik	30
3.3	Vergleich der Wachstumsfaktorkonzentrationen zwischen Patientenkollektiv und Kontrollgruppe	31
3.3.1	VEGF A	31
3.3.2	VEGF 165b	33
3.4	Unterschiede zwischen Serum- und Plasmaproben innerhalb des Untersuchungskollektives	34
3.4.1	VEGF A	34
3.4.2	VEGF 165b	36
3.5	Verlauf der Wachstumsfaktorkonzentrationen innerhalb des Untersuchungszeitraums der Mammakarzinompatientinnen	38
3.5.1	VEGF A	38
3.5.2	VEGF 165b	39
3.6	Korrelation mit klinisch-pathologischen Charakteristika	40
3.7	Korrelation mit Überlebensraten	41
3.7.1	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von VEGF A	41
3.7.2	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von VEGF A	44
3.7.3	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von VEGF 165b	46
3.7.4	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von VEGF 165b	49
4	Diskussion	52
4.1	Fragestellung der Arbeit	52
4.2	Methodendiskussion	54
4.2.1	Auswahl der Mammakarzinompatientinnen und ihrer Kontrollgruppe	54
4.2.2	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	55
4.3	Interpretation der Messung von VEGF A	57
4.4	Interpretation der Messung von VEGF 165b	62
4.5	Prognostische Relevanz von VEGF A und VEGF 165b	64
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	70

7	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	81
8	Abbildungsverzeichnis.....	83
9	Tabellenverzeichnis.....	84
10	Anhang	85
10.1	Serum- und Plasma-Konzentrationen von VEGF A.....	85
10.2	Serum- und Plasmakonzentrationen von VEGF 165b	86
10.3	Regressionsanalysen	87
11	Danksagung	91
12	Lebenslauf.....	92

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und gesellschaftliche Bedeutung

Das Mammakarzinom ist mit 29% aller Krebsneuerkrankungen mit Abstand das häufigste Malignom der Frau in den westlichen Ländern. Jede achte Frau wird im Laufe ihres Lebens an invasivem Brustkrebs erkranken. Dies entspricht etwa 70.000 neuen Erkrankungsfällen pro Jahr in Deutschland (Husmann and Robert-Koch-Institut, 2010, Kreienberg et al., 2010, Robert-Koch-Institut, 2013). Die Inzidenzkurve steigt vom 20. - 40. Lebensjahr kontinuierlich an und erreicht dann ein Plateau. Ein zweiter Anstieg erfolgt in der postmenopausalen Phase. Jede zehnte Frau ist bei Diagnosestellung unter 45 Jahre alt. Jüngere Patientinnen weisen eine deutlich ungünstigere Prognose auf als Frauen in einer höheren Altersgruppe (Goerke, 2008, Robert-Koch-Institut, 2013).

Auch bezüglich Mortalität nimmt das Mammakarzinom eine Spitzenposition in Deutschland ein: Noch vor kolorektalem Karzinom und Bronchialkarzinom stellt es mit etwa 17.000 Todesfällen jährlich die häufigste Krebstodesursache der Frau dar (Janni and Dannecker, 2008, Robert-Koch-Institut, 2013).

Die Diagnose Krebs stellt für den oder die Betroffene einen tiefgreifenden Einschnitt in sein bisheriges Leben dar, verbunden mit enormen Existenz- und Zukunftsängsten. Gesamtgesellschaftlich sind Krebserkrankungen eine Herausforderung, die es gilt, durch intensivierete Früherkennung und verbesserte adjuvante Therapien in ihrer Mortalität zu senken und die Lebensqualität der palliativen Patienten zu verbessern. Erfreulicherweise ist die Brustkrebsmortalität trotz steigender Inzidenz der Erkrankung seit Mitte der 90er Jahre rückläufig. Dies ist vor allem auf flächendeckende Screeningprogramme und damit Diagnostik immer früherer Krankheitsstadien, sowie auf Fortschritte in der adjuvanten Therapie zurückzuführen (Mettlin, 1999). Klinische Daten aus dem Tumorregister München zeigen einen Anstieg der Fünf-Jahres-Überlebensrate bei pT1 Tumoren um 5,2%, für pT2-Tumore um 6,8% und bei pT3/4 von 8,2% im Zeitraum von 1988 bis 2006 (Kreienberg et al., 2010). Brustkrebs stellt jedoch ein sehr heterogenes Krankheitsbild mit großen interindividuellen Unterschieden bezüglich der Krankheitsmorphologie dar. Ein zukünftiges Ziel wird es sein, die Therapie weiter zu individualisieren und damit dem Patienten eine größtmögliche Heilungschance und Lebensqualität zu bieten.

1.1.2 Prognostische Faktoren

Die Prognose einer an Brustkrebs erkrankten Patientin hängt entscheidend von dem Zusammenspiel der frühzeitigen Diagnose, den histopathologischen und immunhistochemischen Parametern des Tumors sowie von einer adäquaten und stadiengerechten Therapie ab. Grundlage für die Therapieentscheidung ist die Beurteilung des Rezidivrisikos. Dies kann durch die Bestimmung von Prognosefaktoren erfolgen, die helfen, das genaue Tumorstadium sowie die Tumorbiologie zu charakterisieren und mit dem Krankheitsverlauf korrelieren (Kaufmann et al., 2013). Prognostische Faktoren werden hauptsächlich durch histopathologische und immunhistochemische Parameter des Tumors definiert.

Die Anzahl der betroffenen Lymphknoten stellt einen wichtigen prognostischen Einzelfaktor dar. Carter konnte 1989 in einer großen Metaanalyse an 24.740 Brustkrebspatientinnen zeigen, dass Lymphknotenbefall einen unabhängigen prognostischen Parameter in Bezug auf rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben darstellt (Carter et al., 1989). Seit der Konsensuskonferenz von St. Gallen im Jahre 2003 und 2005 gelten folgende zusätzliche Prognosefaktoren als etabliert: Tumorgröße, Differenzierungsgrad, histologischer Subtyp, Alter bei Diagnose, Hormonrezeptorstatus, Gefäßinvasion, Her2/neu-Rezeptorstatus (*human epidermal growth factor receptor 2*, erb-B2) (Senn et al., 2003, Goldhirsch et al., 2005). In den letzten Jahren sind neue potentielle Prognosefaktoren identifiziert worden, unter ihnen Ki-67, ein Marker für Zellproliferation, das Verhältnis der Proteolysefaktoren uPA/PAI (Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ und sein Inhibitor PAI-1) und Multigensignaturen (Jung et al., 2009, Harbeck et al., 2013, Venat-Bouvet et al., 2014).

Auch die Tumorangio-genese und daran beteiligte Wachstumsfaktoren stehen im Interesse der Forschung. So konnte bereits 1992 nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Neovaskularisation innerhalb des Tumors mit einem schlechten Gesamtüberleben korreliert (Weidner et al., 1992). Als proangiogenetische Regulatoren gelten Wachstumsfaktoren wie der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) mit seinen Spleißvarianten. Seine Rolle als Prognosefaktor wird seit einigen Jahren untersucht. 1997 hat Gasparini Tumorgewebeproben von Patientinnen mit primären Brustkrebs und negativen Lymphknotenstatus mittels immunometrischer Bestimmung auf ihren Gehalt an zytosolischem VEGF A untersucht. Die Höhe der VEGF A-Konzentration war prognostisch richtungsweisend in Bezug auf rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben (Gasparini et al., 1997). Im Laufe der Jahre konnten mehrere Studien eine Abhängigkeit zwischen einer erhöhten Gewebsexpression von

VEGF A und erniedrigten Überlebensraten beim primären Mammakarzinom zeigen (Toi et al., 1994, Linderholm et al., 1998, Gasparini et al., 1999, Linderholm et al., 2000, Toi et al., 2001, Foekens et al., 2001, Manders et al., 2002, Berns et al., 2003). Bisher konnten sich endotheliale Wachstumsfaktoren jedoch nicht als anerkannte Prognosefaktoren in der klinischen Praxis durchsetzen.

1.1.3 Prädiktive Faktoren

(Neo-)adjuvante systemische Therapien können potentielle Nebenwirkungen für die Patienten haben oder sogar toxisch wirken. Es ist daher essentiell, eine Therapie für den Patienten zu finden, von der er am meisten profitieren wird und die am besten auf seine individuellen Tumormerkmale abgestimmt ist. Prädiktive Faktoren bieten als messbare Parameter die Möglichkeit, das Ansprechen auf eine spezifische Therapie in gewissem Maße vorherzusagen. Die Therapieoptionen der Patientinnen mit Mammakarzinom orientieren sich bisher vornehmlich an immunhistochemischen Markern des Tumors.

Bereits schon länger etablierte prädiktive Faktoren stellen der Östrogen- und Progesteronrezeptor, sowie die Amplifikation/Überexpression des Her2/neu-Onkogens auf Krebszellen dar (Cianfrocca and Goldstein, 2004). 1998 konnte an einem Kollektiv von 37.000 Patienten gezeigt werden, dass Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus von einer adjuvanten Therapie mit Tamoxifen hinsichtlich verminderter Rezidivneigung und Mortalität profitieren (1998).

Die Amplifikation des Her2/neu-Onkogens ist mit früher Rezidivneigung sowie erhöhter Tumoraggressivität und Mortalität bei nodal-positiven Mammakarzinomen verbunden (Borg et al., 1990). Etwa 25% der Mammakarzinome exprimieren Her2/neu. Im Jahre 2000 wurde in der europäischen Union ein Medikament zur Therapie des Her2/neu-positiven Mammakarzinoms zugelassen. Bei Trastuzumab (Herceptin[®]) handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu (Diedrich et al., 2007). Der Nachweis von Her2/neu stellt einen hoch prädiktiven Marker für das Ansprechen des Tumors auf die Antikörpertherapie dar.

1.2 **Vascular endothelial growth factor A (VEGF A)**

1.2.1 **Struktureller Aufbau und Rezeptorbindung**

Bereits im späten 19. Jahrhundert hat Rudolf Virchow entdeckt, dass viele menschliche Tumore stark vaskularisiert sind (Ferrara, 2002). Jedoch erst knapp ein Jahrhundert später gelang es Forschergruppen angiogene Faktoren als Ursache einer verstärkten Vaskularisierung zu identifizieren.

Im Jahre 1983 wurde VEGF A erstmals von Senger als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) beschrieben, nachdem intraperitoneale Injektionen von Leberzellkarzinomzellen in Meerschweinchen (*guinea pigs*) zu einer starken Permeabilitätszunahme der Peritonealgefäße und zu Aszites führten (Senger et al., 1983). Der genaue molekulare Aufbau dieses Proteins blieb zu jener Zeit noch unbekannt und erst im Nachhinein konnte festgestellt werden, dass VPF und VEGF A identische Moleküle sind.

Der Begriff VEGF wurde erstmals 1989 geprägt. Ferrara und Kollegen stießen bei ihren Untersuchungen an follikulären Rinderepiphysen auf einen heparinbindenden Wachstumsfaktor, der spezifisch vaskuläre Endothelzellen stimulierte. Eine NH₂-terminale Aminosäuresequenzierung dieses Proteins zeigte, dass es sich von bereits bekannten angiogenetischen Faktoren wie aFGF (*acid fibroblast growth factor*) oder bFGF (*basic fibroblast growth factor*) unterschied (Ferrara and Henzel, 1989).

Heutzutage ist bekannt, dass es sich bei VEGF nicht um einen einzelnen Faktor handelt, sondern um eine Wachstumsfaktorfamilie, bestehend aus strukturverwandten Proteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Sieben verschiedene Glykoproteine sind bisher identifiziert worden, die als VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, VEGF E, VEGF F und PlGF (*placental growth factor*) bezeichnet werden (Rennel et al., 2009). VEGF C und VEGF D spielen hauptsächlich eine Rolle im Rahmen der lymphatischen Angiogenese, während es sich bei VEGF E um ein virales Homolog und bei VEGF F um einen im Schlangengift vorkommenden Wachstumsfaktor handelt (Rennel et al., 2009, Sugiura et al., 2009).

VEGF A ist der bisher am besten untersuchte Faktor und der wichtigste Mediator für Neovaskularisation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, während VEGF B eher eine Rolle in der Aufrechterhaltung neugebildeter Blutgefäße zuzukommen scheint (Zhang et al., 2009).

Bei VEGF A handelt es sich um ein homodimeres durch Disulfidbrücken verbundenes heparinbindendes Glykoprotein, mit einer Maßeinheit von etwa 45kDa, das oft auch nur als VEGF bezeichnet wird. Das codierende Gen befindet sich auf Chromosom 6p21.3 (Vincenti et al., 1996) und besteht aus acht Exons, getrennt durch sieben Introns (Tischer et al., 1991). Alternatives Spleißen der VEGF A prä-mRNA (prä-messenger ribonucleic acid) am Exon sechs und sieben, sowie an der proximalen Spleißstelle des Exons 8a, ermöglicht es, verschiedene proangiogenetische Isoformen von unterschiedlicher Länge hervorzubringen. Bisher sind neun proangiogenetische Varianten bekannt: VEGF 111, VEGF 121, VEGF 145, VEGF 148, VEGF 162, VEGF 165, VEGF 183, VEGF 189 und VEGF 206 (Woolard et al., 2009). Der Zahlenwert entspricht der vorhandenen Aminosäuren-Anzahl.

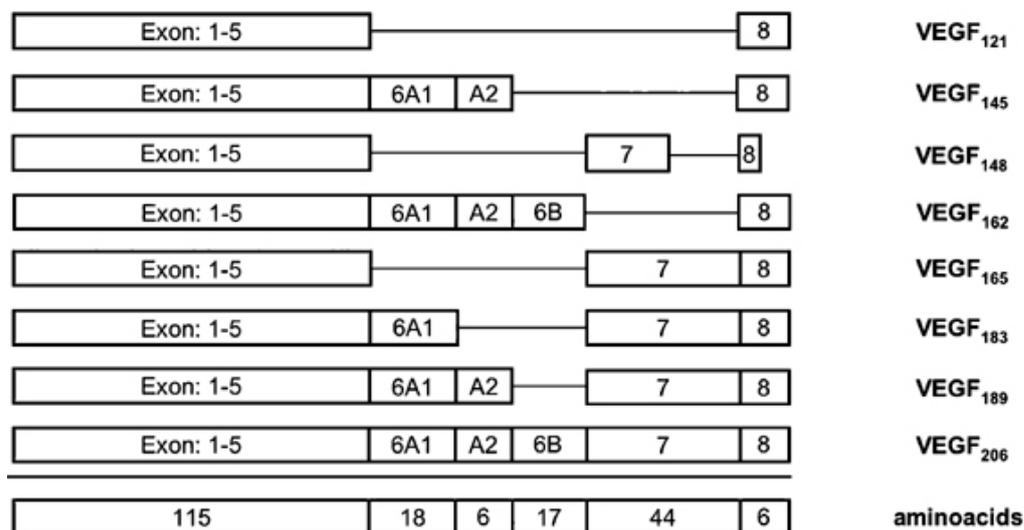


Abbildung 1 aus Eming und Krieg, 2006: Struktur verschiedener VEGF A-Isoformen (Eming and Krieg, 2006). Die Exons 2-5 enthalten Bindungsstellen für den VEGFR-1 und VEGFR-2. Die Exons 6 und 7 enthalten Bindungsstellen für Heparin.

Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich Vorkommen, Ladung, Heparinbindungsdomäne und Rezeptorbindungsaffinität. VEGF 165 ist die vorherrschende Isoform und hat intermediäre Eigenschaften bezüglich Ladung und Vorkommen, während beispielsweise VEGF 121 als saures nicht-heparinbindendes Protein frei löslich vorkommt. Längere Isoformen, wie VEGF 189 und VEGF 206, sind als basische Proteine hauptsächlich an die extrazelluläre Matrix (ECM) gebunden (Park et al., 1993). Die gebundenen Isoformen scheinen eine wichtige Rolle als lokal verfügbare Mediatoren der Angiogenese zu spielen (Pepper, 2001).

VEGF A vermittelt seine zelluläre Wirkung hauptsächlich über zwei strukturverwandte transmembranöse Rezeptor-Tyrosinkinase, den VEGFR-1 (VEGF-Rezeptor 1, *fms-like tyrosine kinase*, FLT-1) und VEGFR-2 (*fetal liver kinase-1*, KDR/FLK-1). Beide

Rezeptoren besitzen sieben extrazelluläre Immunglobulindomänen, eine transmembranöse und juxtamembranöse Domäne, sowie eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne. Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne führt zu Rezeptordimerisierung und Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste mit nachfolgender Aktivierung verschiedener Signalmoleküle und Signaltransduktionswege über SH-2- (*Src homology-2*) und PTB- (*phosphotyrosine-binding*) Domänen (Stuttfeld and Ballmer-Hofer, 2009). Die Rezeptoren werden hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert, konnten mittlerweile aber auch auf einer Vielzahl anderer Zellen nachgewiesen werden, beispielsweise auf Monozyten/Makrophagen (Shen et al., 1993), hämatopoetischen Stammzellen (Ziegler et al., 1999), kardialen Myofibroblasten (Chintalgattu et al., 2003) und renalen Mesangiumzellen (Takahashi et al., 1995). Auch diverse Tumorzellen exprimieren VEGF-Rezeptoren. Unter ihnen solide Tumore wie das Mammakarzinom und Kolonkarzinom aber auch hämatologisch-onkologische Tumore, wie Non-Hodgkin-Lymphome (Stewart et al., 2003).

VEGF A bindet den VEGFR-1 mit hoher Affinität, erhöht seine Rezeptor-Kinaseaktivität aber nur gering. Der VEGFR-2 wird von VEGF A mit deutlich niedriger Affinität gebunden, scheint jedoch der primäre Vermittler der biologischen Effekte zu sein (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Mäuseembryos mit defektem VEGFR-2 Gen sterben zwischen Tag 8,5 und 9,5, da die Endothelzellen frühzeitig in ihrer Entwicklung beeinträchtigt werden und keine Blutgefäße ausbilden können (Shalaby et al., 1995). Die Funktion des VEGFR-1 ist weniger gut definiert. Eine homozygote Mutation im VEGFR-1 Gen führte bei Mäuseembryos zu einer exzessiven Vermehrung von Angioblasten und abnormal geformten Blutgefäßen. Der VEGFR-1 scheint zumindest während der Vaskulogenese die Wirkung von VEGF A negativ zu regulieren (Fong et al., 1995).

In den letzten Jahren wurden mehrere Korezeptoren entdeckt, die zur Aktivierung von VEGF-Rezeptoren beitragen können. Neuropilin-1 (NP-1) ist ein Korezeptor ohne intrazelluläre Enzymaktivität, er fördert spezifisch die Bindung von VEGF 165 an den VEGFR-2 und steigert dessen Signaltransduktion (Ferrara, 2004b), während Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) die Interaktion von VEGF A mit dem VEGFR-2 und Neuropilin modulieren (Chiodelli et al., 2011).

1.2.2 VEGF A und Tumorangiogenese

Angiogenese stellt eine wesentliche Voraussetzung für Tumorwachstum und Metastasierung dar. Die Tumorzelle unterzieht sich auf ihrem Weg zu maligner Progression mehrerer zellulärer Transformationen. Neben Onkogen-Aktivierung und Tumorsuppressorgen-Inaktivierung ist die Induktion der Angiogenese ein wichtiger Meilenstein (Hanahan and Weinberg, 2000).

Tumore, die eine Größe von über ein bis zwei Millimeter erreicht haben, können nicht mehr per Diffusion über bereits bestehende Gefäße mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden, sondern benötigen ein eigenes Gefäßbett, um weiter wachsen und metastasieren zu können (Folkman et al., 1966). In soliden Tumoren ermöglicht die Neovaskularisation den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen zu erlangen und die Möglichkeit proliferativer Autonomie.

Die Angiogenese im Tumor erfolgt über Wachstumsfaktoren, unter anderem über eine Hochregulierung von VEGF A (Ferrara, 2004a). Starke Tumolvaskularisation und Expression von proangiogenen Faktoren ist mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose in einer Vielzahl von Tumoren assoziiert (Hicklin and Ellis, 2005). In Studien konnte gezeigt werden, dass VEGF A mRNA in einem Großteil der Tumoren, unter anderem auch im Mammakarzinom, überexprimiert ist (Berger et al., 1995).

VEGF A kann in vielen parenchymalen Zellen produziert werden und wird unter bestimmten Bedingungen auch in Tumorzellen gebildet. Ein wichtiger Regulator der VEGF-Expression ist die Tumorphypoxie. 1992 hat Shweiki et al. bei Studien zum Glioblastoma multiforme herausgefunden, dass die VEGF A mRNA-Konzentration in stark ischämischen Bereichen am höchsten ist (Shweiki et al., 1992). Unter normoxischen Bedingungen wird der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 α (HIF-1 α) durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Bei vorherrschender Hypoxie dimerisiert HIF-1 α mit HIF-1 β , bindet an den VEGF-Promoter und führt zu erhöhter mRNA-Transkription (Hicklin and Ellis, 2005).

In vielen Tumorarten konnten jedoch auch erhöhte VEGF A-Konzentrationen in der Peripherie des Tumors gemessen werden, die normalerweise nicht von Hypoxie betroffen ist. Alternative Regulatoren der VEGF-Expression werden dafür verantwortlich gemacht. Viele Onkogene, Tumorsuppressorgene, Hormone und Wachstumsfaktoren wurden mittlerweile als ursächlich entdeckt. Die Aktivierung des

EGF-Rezeptorsystems (EGFR/ErbB1, Her2/neu/ErbB2) sowie eine Cyclooxygenase-2- (COX-2) Überexpression führen zu einer Hochregulation der VEGF-Expression im Mammakarzinom (Kumar and Yarmand-Bagheri, 2001, Yang et al., 2002, Costa et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen der aktivierte Tumorsuppressor p53 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 interagiert und so die Aktivierung des VEGF Promoters in Brustkrebszellen verhindern kann (Olofsson et al., 1998).

Die VEGF-Interaktion im Tumorgewebe erfolgt durch das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und Rezeptoren und ist anhand folgender Abbildung (Abbildung 2) vereinfacht dargestellt.

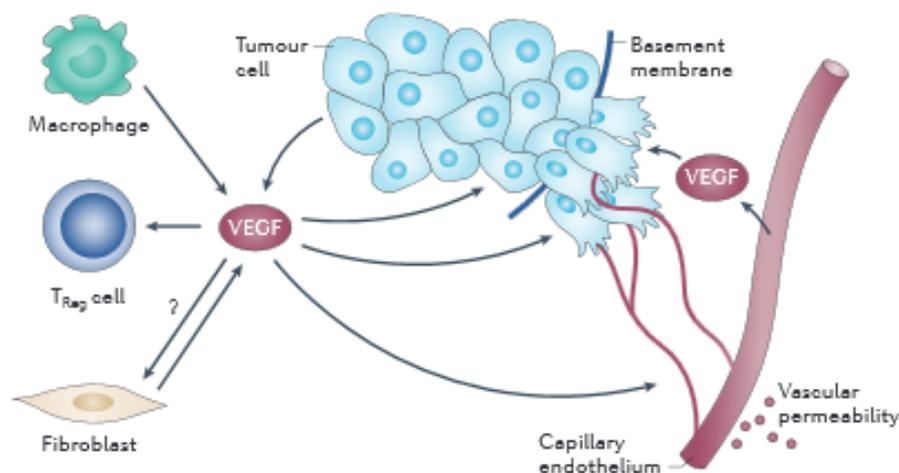


Abbildung 2 aus Goel und Mercurio, 2013: VEGF-Interaktion in Tumoren (Goel and Mercurio, 2013). VEGF A wird von Tumor- und Stromazellen, einschließlich Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten produziert. Das sezernierte VEGF stimuliert VEGF-Rezeptoren, die auf verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Von Tumorzellen produziertes VEGF bewirkt eine parakrine Aktivierung von Endothelzellen und wirkt autokrin auf Tumorzellen selbst. VEGF kann auch als chemotaktisches Lockmittel fungieren und regulatorische T-Zellen (T_{Reg} cell) rekrutieren, die Neuropilin-1 exprimieren und eine antitumorale Immunantwort unterdrücken.

Die parakrine Wirkung von VEGF A auf Endothelzellen beschränkt sich nicht nur auf seine Rolle als Hauptmediator der Angiogenese. VEGF A ist auch ein wichtiger Überlebensfaktor für Endothelzellen. *In vitro* verhindert es die Apoptose von Endothelzellen durch Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt) Signalwegs am VEGFR-2 und induziert die Bildung antiapoptotischer Proteine, wie Bcl-2 (Gerber et al., 1998).

Seine autokrine Wirkung auf Tumorzellen ist noch nicht endgültig geklärt, scheint aber vor allem in aggressiven Tumoren eine Rolle zu spielen. Bisher konnte eine gesteigerte Invasivität, eine verminderte Apoptoserate und eine verstärkte Tumorentdifferenzierung nachgewiesen werden (Hicklin and Ellis, 2005, Goel and Mercurio, 2013). Die meisten

bekannten Brustkrebszelllinien exprimieren den VEGFR-1, den VEGFR-2, sowie NP-1 und NP-2 (Weigand et al., 2005). Eine autokrine VEGF/VEGFR-1 Signalschleife ist vermutlich der Hauptvermittler der intratumoralen Wirkung (Lee et al., 2007).

Außerdem scheint VEGF A dem Tumor zu helfen, sich einer adäquaten Immunantwort des Wirtes zu entziehen. Kontinuierlich hohe Konzentrationen von VEGF im Blut beeinträchtigen die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen. Gabrilovich untersuchte in einem *in vivo*-Maus-Modell den Einfluss von VEGF auf die Entwicklung dendritischer Zellen, die normalerweise als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Schlüsselrolle in der Aktivierung der spezifischen Immunabwehr einnehmen. Nach kontinuierlicher Infusion einer hohen Testdosis von VEGF waren dendritische Zellen deutlich weniger stimulierbar und nahmen zahlenmäßig ab (Gabrilovich et al., 1998).

1.3 Die antiangiogenetische Spleißvariante VEGF 165b

1.3.1 Strukturelle und funktionelle Unterschiede zu VEGF 165

VEGF 165b wurde das erste Mal von der Arbeitsgruppe um Bates im Jahre 2002 beschrieben. Mittels Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und nachfolgender Sequenzierung von VEGF-mRNA in Nierenzellkarzinomgewebeproben wurde eine neuartige VEGF A-Spleißvariante entdeckt, die hinsichtlich Struktur und biologischer Wirkung von bereits bekannten Isoformen abweicht (Bates et al., 2002).

Die neue Spleißvariante VEGF 165b unterscheidet sich von VEGF 165 nur durch eine kurze Domäne von sechs Aminosäuren am carboxy-terminalen 3' Ende. VEGF 165b wird durch eine distale Spleißstelle am Exon 8b geformt, 66 Basenpaare (bp) von der proximalen Spleißstelle am Exon 8a entfernt. Dies führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz bei gleicher Aminosäureanzahl im translatierten Protein und zu veränderten Bindungseigenschaften am VEGF-Rezeptor. Abbildung 3 zeigt die Exon-Struktur von VEGF 165 und VEGF 165b und die Unterschiede in den Sequenzen der mRNA am Exon 8.

1.3.2 Biologische Funktion

VEGF 165b ist die erste antiangiogenetische Isoform, die beschrieben wurde und die bisher am besten untersucht wurde. VEGF 165b kommt ubiquitär in menschlichem Organismus vor und macht unter physiologischen Bedingungen den Hauptanteil des exprimierten VEGF in vielen Gewebearten aus. Während antiangiogenetische Isoformen im Pankreas, Colon, Glaskörper, Niere, Lunge und Prostata über 50% des Gesamt-VEGF darstellen, beträgt der Anteil in angiogenen Geweben wie der Plazenta unter 2% (Bates et al., 2006, Qiu et al., 2009).

VEGF 165 und VEGF 165b scheinen im Rahmen der Angiogenese gegensätzliche physiologische Rollen zu übernehmen, jedoch bietet die Literatur teilweise unterschiedliche Auffassungen. Viele Studien kommen zu dem Schluss, dass VEGF 165b als partieller Agonist des VEGFR 2 nicht in der Lage ist, Angiogenese zu induzieren, sondern vielmehr die VEGF 165-vermittelte pathologische Gefäßneubildung *in vivo* hemmt (Bates et al., 2002, Rennel et al., 2009). Im Speziellen bedeutet dies, dass VEGF 165b nicht zu einer Stimulation der Endothelzellproliferation und -migration führt und eine endogene Überexpression sogar inhibierende Wirkung hat. Weiterhin fungiert VEGF 165b wie VEGF 165 als Überlebensfaktor für verschiedene Zelltypen einschließlich Endothelzellen, wohingegen eine dauerhafte Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität nicht beobachtet werden konnte (Woolard et al., 2004, Glass et al., 2006, Magnussen et al., 2010). Catena et al. hingegen beschreibt VEGF 165b als schwach angiogene Isoform von VEGF A im Mammakarzinom (Catena et al., 2010).

Eine Hochregulierung proangiogenetischer VEGF-Isoformen kommt in vielen verschiedenen Tumorarten vor und geht mit einem Abfall der physiologisch vorherrschenden antiangiogenetischen Variante einher. Eine Herunterregulierung von VEGF 165b konnte bisher unter anderem für das maligne Melanom (Pritchard-Jones et al., 2007), Nierenzellkarzinom (Woolard et al., 2004), kolorektale Karzinom (Diaz et al., 2008) und Neuroblastom (Peiris-Page et al., 2010) nachgewiesen werden.

1.4 Antiangiogenetische Therapieansätze

1.4.1 Kontroversen in der Anwendung beim Mammakarzinom

Bereits im Jahre 1971 hat Folkman die Hypothese aufgestellt, dass Tumorstadium abhängig von Angiogenese ist. Er propagierte die Existenz eines von Tumorzellen sezernierten Faktors als Proliferationsstimulus von Endothelzellen *in vivo* und folgerte, dass Antiangiogenese ein mögliches neues Konzept in der Krebstherapie darstellen könnte (Folkman, 1971).

Antiangiogenese bedeutet wörtlich übersetzt „gegen die Gefäßbildung gerichtet“. Man erhofft sich, durch antiangiogenetische Medikamente Mittel und Wege zu haben, die Gefäßbildung von Tumoren zu hemmen und damit das Tumorstadium zu kontrollieren. Dies spielt vor allem für metastasierte Karzinome klinisch eine wichtige Rolle. Hierbei wird besonderes Augenmerk jenen Antikörpern zuteil, die gegen VEGF selbst oder gegen die VEGF-Signaltransduktion gerichtet sind (siehe Abbildung 4).

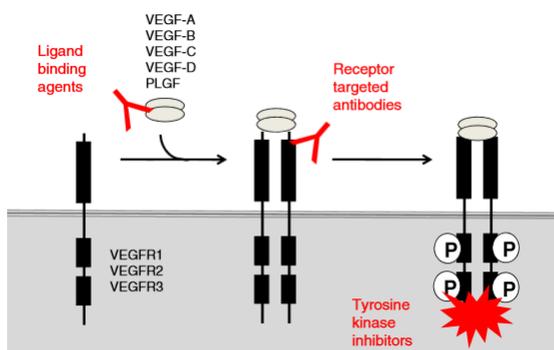


Abbildung 4 aus Vasudev und Reynolds, 2014: Therapeutische VEGF-Angriffspunkte (Vasudev und Reynolds, 2014). Ligand binding agents blockieren die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren, Bsp.: Bevacizumab bindet VEGF-A. Receptor targeted antibodies blockieren die Signaltransduktion am VEGF-Rezeptor (VEGFR), Bsp. Ramucirumab bindet an VEGFR-2. Tyrosine kinase inhibitors blockieren die Tyrosinkinaseaktivität am VEGFR 1/2/3, Bsp.: Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib.

Antiangiogenetische Medikamente sind seit einigen Jahren fester Bestandteil in der Therapie verschiedener Karzinome und sind es aktuell noch in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms in Europa. Sie werden zur Wirkungsverstärkung antineoplastischer Substanzen zumeist in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt (Jain, 2001). Zentrale Substanz in der antiangiogenen Therapie des Mammakarzinoms ist der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®). Es gibt derzeit mehrere Hypothesen bezüglich seiner Wirkungsweise (siehe Abbildung 5).

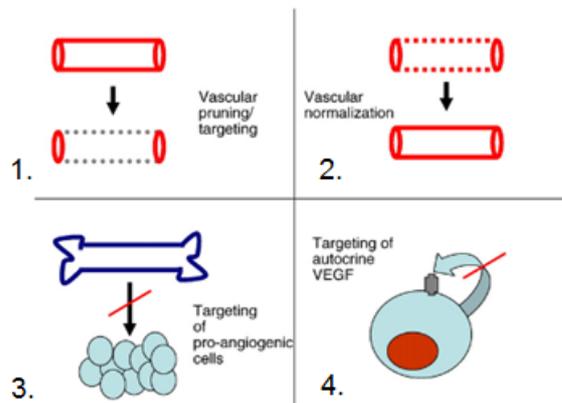


Abbildung 5 aus Bertolini et al., 2010: Hypothesen zur Wirkungsweise antiangiogener Medikamente (Bertolini et al., 2010). 1. *Vascular pruning/targeting*: Bevacizumab wirkt durch VEGF-Blockade antiendothelial und bewirkt eine Reduktion der TumorgefäÙe und somit der Tumorperfusion. 2. *Vascular normalization*: Bevacizumab reduziert die TumorgefäÙpermeabilität, senkt den interstitiellen Druck und ermöglicht so eine effektivere Wirkung von Chemotherapeutika durch höhere Konzentration am Wirkort. 3. *Targeting of pro-angiogenic cells*: Tumorwachstum ist assoziiert mit der Mobilisation proangiogener Zellen (reifer Endothelzellen und Vorläuferzellen, Monozytensubpopulationen, etc.). Antiangiogene Medikamente greifen modulierend in diesen Prozess ein. 4. *Targeting of autocrine VEGF*: VEGF übt eine autokrine Stimulation auf verschiedene Tumorarten aus. Antiangiogene Medikamente stören die autokrine Signalgebung.

Bevacizumab wurde das erste Mal im Jahre 2004 zur Therapie des fortgeschrittenen Kolonkarzinoms zugelassen. Kurz darauf folgten weitere Zulassungen für das fortgeschrittene nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, Glioblastom und Ovarialkarzinom (Eskens and Sleijfer, 2008).

Der Effekt von Bevacizumab in der Behandlung des Mammakarzinoms wurde in mehreren Studien untersucht. Als Folge der E2100-Studie, die ein verbessertes Therapieansprechen sowie ein verlängertes rezidivfreies Überleben von durchschnittlich 5,5 Monaten, jedoch keinen Vorteil im Gesamtüberleben brachte, erfolgte 2008 eine vorläufige Zulassung für Bevacizumab in Kombination mit Paclitaxel zur Therapie des metastasierten Her2/neu negativen Mammakarzinoms (Miller et al., 2007). Darauf folgende Studien wie AVADO (Miles et al., 2010), RIBBON-1 (Robert et al., 2011), AVEREL (Gianni et al., 2013) erbrachten ebenfalls nur einen Vorteil im progressionsfreien Überleben bei gravierenden bis lebensgefährlichen Nebenwirkungen wie Hypertonie, Proteinurie, Wundheilungsstörung, Darmperforation, Thrombose, Leukenzephalopathie, kardialer Toxizität und endokriner Dysfunktion. Die Food and Drug Administration (FDA) widerrief daher in den USA im Jahr 2011 die Zulassung für Bevacizumab zur Therapie des Mammakarzinoms aufgrund fraglicher Nutzen-Risiko-Relation. Bevacizumab ist jedoch in Europa weiterhin für die Behandlung des metastasierten Her2/neu negativen Brustkrebs in der Kombination mit

den Chemotherapeutika Paclitaxel und Capecitabin zugelassen (Sasich and Sukkari, 2012).

Eine der zentralen Fragen aus den Erfahrungen mit Bevacizumab bei verschiedenen Tumoren ist die Unterschiedlichkeit im biologischen Effekt: Wieso sprechen beispielsweise Patienten mit kolorektalem Karzinom im Allgemeinen gut auf eine Therapie mit Bevacizumab an und weshalb profitieren viele Patientinnen mit Mammakarzinom bisher aber nur unzureichend?

Mögliche Ursachen sind Gegenstand intensiver Forschung und bisher nur unzureichend geklärt. Eine der Theorien ist, dass verschiedene Tumorsubgruppen entweder initial oder im Verlauf der Therapie resistent gegenüber einer VEGF-Blockade werden.

Mögliche Erklärungsansätze liegen in der unterschiedlichen Gefäßbiologie der primären Karzinome und ihrer Metastasen. Eine Hochregulierung von alternativen proangiogenetischen Signalwegen einschließlich der *fibroblast growth factor* (FGF) -, *placental growth factor* (PlGF)- und Angiopoietin-Familie sowie des Notch-Signalwegs fördern eine VEGF-unabhängige Angiogenese (Koutras et al., 2010). Dies scheint vor allem in fortgeschrittenen Krankheitsstadien eine Rolle spielen (Relf et al., 1997). Therapeutisch könnte somit eine gezielte Suppression mehrerer Wachstumsfaktoren oder ihrer Signaltransduktionswege interessant sein. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch antiangiogene Medikamente die Expansion hypoxietoleranter Tumorstammzellen angeregt wird, die eine größere Invasivität und ein höheres Metastasierungsrisiko bergen (Giuliano and Pages, 2013). Auch perivaskuläre Zellen und im Besonderen Perizyten spielen als „Endothelzell-Überlebensfaktoren“ eine Rolle. Unreife Endothelzellen sind in ihrer Entwicklung stark abhängig von Wachstumsfaktoren wie VEGF, während die Herunterregulierung der VEGF-Genexpression auf reife Endothelzellen keine Auswirkung hat. Eine Ursache könnte die Abschirmung durch Perizyten vermittelt durch *platelet-derived growth factors* (PDGF) sein (Benjamin et al., 1999).

Außerdem wurden in den letzten Jahren vermehrt alternative Mechanismen der Tumervaskularisation entdeckt. Intussuszeption, glomeruloide Angiogenese, vaskulogenes Mimikry, *looping* (schlingenbildende) Angiogenese und Gefäß Kooption scheinen größtenteils VEGF-unabhängig zu sein (Dome et al., 2007, Vasudev and Reynolds, 2014).

Um in Zukunft antiangiogenetische Therapien zu verbessern, ist es essentiell, mehr über die individuelle Tumorangio-genese, exprimierte Wachstumsfaktoren und die Resistenzmechanismen abhängig von Tumortyp und -stadium zu erfahren.

1.4.2 Bedeutung prädiktiver Marker für Bevacizumab (Avastin®)

Die Therapieentscheidung für oder gegen antiangiogene Medikamente wird in Zukunft neben der Tumorart, dem Stadium der Erkrankung und potentieller Metastasierung ganz entscheidend von der Entwicklung geeigneter prädiktiver Faktoren abhängen. Diese sollten als standardisierte validierte Parameter routinemäßig die Möglichkeit bieten, jene Mammakarzinompatientinnen zu selektieren, die von einer Therapie mit Angiogenesehemmern am meisten profitieren. Dies ist auch im Hinblick auf die zum Teil gravierenden Nebenwirkungen dieser Medikamente (siehe Kapitel 1.4.1) bedeutsam. Verschiedene Gruppen von Biomarkern sind momentan Gegenstand intensiver Forschung: Hypertension, im Blut zirkulierende Marker, *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) und bildgebende Verfahren (Vasudev and Reynolds, 2014).

Die Bindung von VEGF an den VEGFR-2 führt zu vermehrter Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen, was wiederum zu Vasodilatation und erniedrigtem Blutdruck führt (Facemire et al., 2009). Hypertension ist daher eine häufige Nebenwirkung von Bevacizumab und ein möglicher Surrogatparameter für geringe VEGF-Aktivität. Hypertension wurde als potenzieller prädiktiver Marker in der E2100 Studie an 363 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs untersucht, die Bevacizumab und Paclitaxel erhielten. Patientinnen, die eine Hypertonie Grad 3 oder 4 entwickelten, wiesen ein statistisch gesteigertes Gesamtüberleben (38,7 vs. 25,3 Monate) auf, verglichen mit Patientinnen ohne Hypertonie (Schneider et al., 2008). Allerdings scheint der klinische Nutzen aufgrund fehlender Cut-off-Werte und der Tatsache, dass Hypertonie einen bedeutenden kardiovaskulären Risikofaktor darstellt, begrenzt (Jubb and Harris, 2010).

Auch die antiangiogenetische Spleißvariante VEGF 165b könnte ein möglicher Marker zur Stratifizierung von Patientinnen sein. In bisherigen Studienergebnissen hat sich gezeigt, dass eine Überexpression von VEGF 165b, sowie eine Behandlung mit rhVEGF165b das Wachstum einer Reihe von untersuchten Krebsarten und Metastasen verzögern kann und VEGF 165b somit einen interessanten Ansatzpunkt in der Krebstherapie darstellt (Peiris-Pages, 2012). Allerdings scheint die Expression von VEGF 165b den therapeutischen Effekt von Bevacizumab zu reduzieren, indem es

Bevacizumab mit der gleichen Affinität bindet wie VEGF 165 (Varey et al., 2008). Bates konnte am Modell des metastasierten Kolonkarzinoms zeigen, dass ein niedriges Expressionsverhältnis von [VEGF 165b/VEGF gesamt] die Behandlungseffektivität von Bevacizumab steigert, während Patienten mit einem hohen Quotient nicht profitieren (Bates et al., 2012). Dies lässt die Vermutung zu, dass VEGF 165b ein möglicher Marker zur Stratifizierung von Patientinnen bezüglich einer Therapie mit Bevacizumab sein könnte.

Die eben vorgestellten Studienergebnisse bieten nur eine kleine Übersicht über die gegenwärtig untersuchten Biomarker. Bisher konnten keine definitiven prädiktiven Marker in Bezug auf Therapieansprechen und Verträglichkeit von Bevacizumab für den klinischen Einsatz identifiziert werden.

1.5 Fragestellung

1.5.1 Überblick

In dieser Arbeit wurden Blutproben von Brustkrebspatientinnen mit histologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen (pN1-3) sowie mit nodal-negativem *high-risk*-Karzinom (siehe Kapitel 2.1.1.2) mehrfach auf ihre Prävalenz von VEGF A und VEGF 165b hin untersucht. Die Blutentnahmen erfolgten nach Operation und während adjuvanter Therapiemaßnahmen. Die Ergebnisse wurden mit den Werten eines gesunden Kollektivs verglichen und mit klinisch-pathologischen Charakteristika und Krankheitsverläufen der Patientinnen korreliert.

1.5.2 Spezielle Fragestellung

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt in der Verbesserung des Verständnisses über den Zusammenhang der Wachstumsfaktoren VEGF A und VEGF 165b und deren Verlauf im Rahmen einer Brustkrebserkrankung bei adjuvant therapierten Patientinnen. Dies entstand vor dem Hintergrund fehlender prädiktiver Faktoren, die der Stratifizierung von Patientinnen bezüglich einer Therapie mit Bevacizumab dienen könnten.

Mehrere Vorarbeiten haben sich bereits mit der Expression von VEGF A am Primärtumor Mammakarzinom beschäftigt. Die bisherigen Studien beschränkten sich jedoch weitgehend auf die Untersuchung präoperativ gewonnener Blutproben oder intraoperativ gewonnener Tumorgewebeproben (siehe Kapitel 4.1).

Es gibt noch wenig Wissen über die Wertigkeit von VEGF A und VEGF 165b nach erfolgter Resektion des Primärtumors.

Es ergeben sich nun folgende Fragestellungen:

- Ermittlung der Prävalenz von VEGF A und VEGF 165b in Serum- und EDTA-Plasma-Proben von Mammakarzinompatientinnen in Remission: Unterscheiden sich Mammakarzinompatientinnen in ihrer Werteverteilung von gesunden Probandinnen?
- Vergleich der Serum- und Plasmaproben untereinander: Unterscheiden sich die Konzentrationen von VEGF A und VEGF 165b in Serum, EDTA-, Citrat- und CTAD-Plasma innerhalb der Kontrollgruppe, sowie in Serum- und EDTA-Plasma innerhalb der Mammakarzinomgruppe?
- Ändern sich die Verläufe der VEGF A- und VEGF 165b-Konzentrationen der Patientinnen mit primären Mammakarzinom über die Messzeitpunkte?
- Korrelieren klinisch-pathologische Charakteristika sowie Krankheitsverläufe mit der Prävalenz von VEGF A und VEGF 165b bei Brustkrebspatientinnen?

2 Material und Methoden

2.1 Das Untersuchungskollektiv

2.1.1 Das Patientenkollektiv

2.1.1.1 Rekrutierung aus der Success-A-Studie

Das ausgewählte Patientenkollektiv wurde aus einer deutschlandweit laufenden Brustkrebsstudie mit Studienzentrale an der I. Frauenklinik Innenstadt, LMU München rekrutiert. Die Success-A-Studie ist eine multizentrisch randomisierte Studie zum Vergleich verschiedener adjuvanter Chemotherapieverfahren mit dem Ziel der Therapieoptimierung bei Brustkrebspatientinnen. 3754 Patientinnen wurden von 2005 bis März 2007 eingeschlossen. Den Patientinnen wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach brusterhaltender Therapie (BET) oder radikaler Mastektomie Blut in Form von Serum- und EDTA-Plasma-Proben entnommen:

- Erste Blutentnahme: Vor Beginn der Chemotherapie.
- Zweite Blutentnahme: Bis zu 28 Tage nach dem letzten Zyklus der Chemotherapie, jedoch vor Beginn der endokrinen Therapie.
- Dritte Blutentnahme: Zwei Jahre nach Chemotherapie.
- Vierte Blutentnahme: Fünf Jahre nach Chemotherapie.

Alle Patientinnen wurden nach dem Success-Studienprotokoll therapiert (Janni, 2005).

Aus der Success-A-Studie wurden Blutproben von 205 ausgewählten Patientinnen in dieser Arbeit näher untersucht. Bei allen ausgesuchten Patientinnen wurde eine adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluoruracil, Epirubicin und Cyclophosphamid (FEC-Schema), gefolgt von Docetaxel durchgeführt. Patientinnen nach BET (n=141) erhielten obligat Strahlentherapie, Patientinnen nach Mastektomie (n=64) nur bei zusätzlichen Risikofaktoren (siehe Kapitel 2.1.1.2). Die adjuvante Radiatio begann während oder nach Chemotherapie. Insgesamt erhielten 180 Patientinnen Bestrahlung, 20 keine und von fünf Patientinnen gab es diesbezüglich keine Informationen. Prämenopausale Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus erhielten eine endokrine Therapie in Form von Tamoxifen für fünf Jahre (n=121), postmenopausale Patientinnen Tamoxifen für zwei Jahre, gefolgt von Anastrozol für weitere drei Jahre (n=22). Die meisten Patientinnen mit positivem HER2/neu-Rezeptorstatus erhielten ein Jahr Trastuzumab (n=55). Therapiebegleitend wurden unter anderem Antiemetika, Dexamethason und Zoledronat eingesetzt.

Die individuellen klinisch-pathologischen Krankheitscharakteristika und -verläufe wurden ebenfalls den Daten aus der Success-A-Studie entnommen.

2.1.1.2 Einschlusskriterien

Die folgenden Einschlusskriterien entsprechen weitgehend den Kriterien der Success-A-Studie, wurden für diese Untersuchung jedoch leicht modifiziert:

Eingeschlossen wurden weibliche Patienten mit einem neu diagnostizierten primären epithelialen invasivem Mammakarzinom im Stadium pT1-4 nach der TNM-Klassifikation der UICC (*Union internationale contre le cancer*). Weitere Voraussetzung war der histologische Nachweis axillärer Lymphknotenmetastasen oder Zugehörigkeit zu einer *high-risk*-Gruppe [pT \geq 2 oder Grading 3 (G3) oder Alter \leq 35 oder negativer Hormonrezeptorstatus] bei nodal-negativem Status. Eine R0-Resektion des Primärtumors musste erfolgt sein. Die Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahmen in Remission. Das Mindestalter lag bei 18 Jahren. Die Patientinnen mussten schriftlich in die Studie eingewilligt haben und in gutem Allgemeinzustand sein.

2.1.1.3 Ausschlusskriterien

Patientinnen, die ein inflammatorisches Mammakarzinom oder ein Zweitkarzinom aufwiesen, durften nicht teilnehmen. Eine vorherige Behandlung in Form von zytotoxischen sowie antineoplastischen Medikamenten oder Bestrahlung musste ausgeschlossen sein. Schwangere oder stillende Patientinnen wurden nicht in die Studie aufgenommen. Bei Einschluss durfte keine Fernmetastasierung (pM1) vorliegen.

2.1.2 Gesundes Vergleichskollektiv

2.1.2.1 Allgemeines

Das gesunde Vergleichskollektiv besteht aus 107 jungen Frauen im Umkreis von München, die eingewilligt hatten, ihr Blut für diese Untersuchung zur Verfügung zu stellen. Die Blutproben (Serum, EDTA-, Citrat- und CTAD-Plasma) wurden zwischen Oktober 2010 und März 2011 gewonnen.

2.1.2.2 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden weibliche gesunde prämenopausale Probandinnen zwischen 18 und 35 Jahren.

2.1.2.3 Ausschlusskriterien

Die Probandinnen wurden über ihren Gesundheitszustand mündlich befragt. Chronisch entzündliche Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, kürzlich erlittene Traumata oder Operationen sowie Schwangerschaft führten zum Ausschluss. In der Vorgeschichte durfte keine Krebserkrankung aufgetreten sein. Akute Infektionen mussten bereits zwei Monate vor Blutentnahme auskuriert sein. Unter regelmäßiger Medikamenteneinnahme waren ausschließlich hormonelle Kontrazeptiva gestattet.

Durch den Ausschluss von Probandinnen mit oben genannten Erkrankungen sollen Beeinflussungen der VEGF-Konzentrationen minimiert werden.

2.2 Material

2.2.1 Reagenzien

Allgemeine Reagenzien für ELISA:

<i>Reagent diluent concentrate</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
<i>Color reagent A (H₂O₂)</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
<i>Color reagent B (Tetramethylbenzidine)</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
<i>Stop solution (2N H₂SO₄)</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Fa. PAA (Linz, A)
Aqua ad iniectabilia	Fa. B. Braun (Melsungen, D)
0,05% Tween ® 20	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

Spezielle Reagenzien für VEGF A:

DuoSet Human VEGF	Fa. R&D Systems, Cat. No. DY293B
<i>Capture antibody VEGF A 180 µg/ml</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
<i>Detection antibody VEGF A 18 µg/ml</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
<i>Streptavidin-horseradish-peroxidase (HRP)</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
Standard VEGF A 120 ng/ml	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)

Spezielle Reagenzien für VEGF 165b:

DuoSet Human VEGF165b	Fa. R&D Systems, Cat. No. DY3045
<i>Capture antibody VEGF 165b 360 µg/ml</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
<i>Detection antibody VEGF 165b 45 µg/ml</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
<i>Streptavidin-horseradish-peroxidase (HRP)</i>	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)
Standard VEGF 165b 120 ng/ml	Fa. R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)

2.2.2 Puffer und Verdünnungen

Waschpuffer

0,05% Tween ® 20
pH 7,2 - 7,4
in PBS

Substrate solution

Color reagent A (H₂O₂)
Color reagent B (Tetramethylbenzidine)
1:1 Mixtur

Reagent diluent

Reagent diluent concentrate
(1% *bovine serum albumine* (BSA))
pH 7,2 - 7,4
in Aqua ad iniectionabilia

Streptavidin HRP-Verdünnung

Streptavidin HRP 1,0 ml
in *reagent diluent*
Verdünnung 1:200

Capture antibody Verdünnung für VEGF A

Capture antibody 180 µg/ml
in PBS
Konzentration von 1,0 µg/ml

Capture antibody Verdünnung für VEGF 165b

Capture antibody 360 µg/ml
in PBS
Konzentration von 2,0 µg/ml

Detection antibody Verdünnung für VEGF A

Detection antibody 18 µg/ml
in *reagent diluent*
Konzentration von 100 ng/ml

Detection antibody Verdünnung für VEGF 165b

Detection antibody 45 µg/ml
in *reagent diluent*
Konzentration von 250 ng/ml

Standard für VEGF A

rhVEGF A 120 ng/ml
in *reagent diluent*
Standard ab 2000 pg/ml

Standard für VEGF 165b

rhVEGF A 165b 120 ng/ml
in *reagent diluent*
Standard ab 4000 pg/ml

2.2.3 Geräte und sonstige Materialien

ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
Vortexer MS 1 Minishaker	Fa. IKA (Staufen, D)
Magnetrührer RCT <i>basic</i>	Fa. IKA (Staufen, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Pipetten (Eppendorf <i>Research plus</i> 20, 200, 1000 µl; <i>Research</i> 8-Kanal-Pipette 30-300 µl)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen epT.I.P.S., 20-300 µl	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Parafilm „M“	Fa. Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Reaktionsgefäße 2,0 ml, farblos	Fa. Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, D)
50ml Flat-top <i>Centrifuge Tubes</i>	Fa. Biologix Group Limited (Lenexa, USA)

96-Well-Platten Nunc-Immuno™	Fa. VWR International (Pennsylvania, USA)
Computerprogramme	Dynex <i>Revelation Software</i> 4.22, Word 2010, Excel 2010, Access 2010, Statistikprogramm R

Blutentnahme-Röhrchen und Blutentnahme-Systeme wurden von der Firma BD Diagnostics (Franklin Lakes, USA), Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D) und KABE Labortechnik GmbH (Nümbrecht-Elsenroth, D) bezogen.

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung und Verarbeitung der Serum- und Plasmaproben des gesunden Vergleichskollektivs

Die Serum- und Plasmaproben des gesunden Vergleichskollektivs wurden mit sterilen Blutentnahmeröhrchen gewonnen. Die Abnahme fand an einem peripheren Venenzugang mittels Vakuümrohrchen (BD Vacutainer® System, Fa. BD Diagnostics (Franklin Lakes, USA)) und Aspirationsrohrchen (S-Monovette®, Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D)) statt. Entnommen wurden jeweils zwei Serum- und CTAD-Proben, sowie jeweils eine Citrat- und EDTA-Probe. Die Serum-, Citrat- und EDTA-Röhrchen wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt, um eine ausreichende Koagulation zu ermöglichen. Die Proben wurden daraufhin bei 3000 Umdrehungen/min zehn Minuten zentrifugiert.

Die CTAD-Röhrchen, die vier Antikoagulantien enthalten (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol), wurden direkt nach der Abnahme auf Eis gekühlt, um eine maximale Thrombozyten-Stabilisation zu gewährleisten. Die Proben wurden nach maximal 30 Minuten Kühlung bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Das gewonnene Serum und Plasma wurde in Cryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Es wurde darauf geachtet, die aufgetauten Proben nur einmal zu verwenden.

2.3.2 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

2.3.2.1 Theoretische Abhandlung

Zur Bestimmung der VEGF A- und VEGF 165b - Konzentrationen in den Serum- und Plasmaproben des Patienten- und Vergleichskollektivs wurde ein ultrasensitiver *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* durchgeführt.

Hierzu werden Wells mit einem Antigen spezifischen *Capture*-Antikörper beschichtet und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Wells in mehreren Waschschritten von nicht gebundenen Antikörpern befreit. Es erfolgt eine Inkubation mit *reagent diluent*. Das darin enthaltene *bovine serum albumine (BSA)* verhindert durch seine Oberflächenbindung, dass unspezifische Antikörperbindungen entstehen. Nach weiteren Waschschritten werden die zu untersuchenden Proben neben einer Standardreihe mit bekannter Antigenkonzentration in die Wells pipettiert. Während der darauffolgenden Inkubationszeit bindet das vorhandene Antigen an die Antikörper. Nach weiteren Waschschritten wird nun ein zweiter, biotinylierter *Detection*-Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene Antigen an einem anderen Epitop bindet. Nach einer Inkubationszeit folgen weitere Waschschrritte, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Die Signalverstärkung erlaubt den Nachweis im Pikogrammbereich. Es erfolgt eine Inkubationszeit im Dunkeln, da die gebildeten Komplexe lichtempfindlich sind. Nach Entfernung nicht gebundener Enzymkonjugate durch einen weiteren Waschschrtritt, gibt man die Substratlösung hinzu. Das zunächst farblose Substrat zeigt in Gegenwart von Peroxidasen eine enzymatische Farbreaktion ins dunkelblaue. Diese Reaktion sollte aufgrund der Lichtempfindlichkeit im Dunkeln stattfinden. Nach einer bestimmten Reaktionszeit wird das Enzym durch Zugabe einer Stopplösung, beispielsweise Schwefelsäure, denaturiert und die Reaktion somit gestoppt. Aufgrund der pH-Veränderung erfolgt ein Farbumschlag ins Gelbe.

2.3.2.2 ELISA-Protokoll für VEGF A

1. Präparation der 96-Well-Platten mit Capture-Antikörper:

Den *Capture*-Antikörper (*mouse anti-human VEGF*) mit einer Konzentration von 180 µg/ml auf eine Konzentration von 1,0 µg/ml mit PBS verdünnen. Dies entspricht 55 µl Antikörper-Lösung und 9.945 µl PBS für den Bedarf einer 96-Well-Platte. 100 µl der Verdünnung in jedes Well pipettieren und über Nacht inkubieren.

2. Zwischenschritte:

Am nächsten Morgen die Platten in vier Waschsritten mit je 300 µl Waschpuffer von überschüssigem Antikörper befreien, verbleibenden Waschpuffer durch Beklopfen entfernen. *Reagent diluent* aus *reagent diluent concentrate* und Aqua ad iniectabilia in einer 1:10 Verdünnung herstellen und 300 µl in jedes Well pipettieren. Eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Dann wiederum vier Waschschrirte durchführen. Die eingefrorenen Serum- und Plasmaproben zwischenzeitlich an der Luft auftauen.

3. Erstellung einer Standardreihe mit bekannter VEGF A-Konzentration:

RhVEGF A (*recombinant human VEGF*) Standard mit einer Konzentration von 120 ng/ml auf eine Konzentration von 2000 pg/ml mit *reagent diluent* verdünnen. Dies entspricht einer Menge von 17 µl rhVEGF A gemischt mit 983 µl *reagent diluent*. Mit der rhVEGF A-Verdünnung beginnend bei einer Konzentration von 2000 pg/ml eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 erstellen (siehe Abbildung 6).

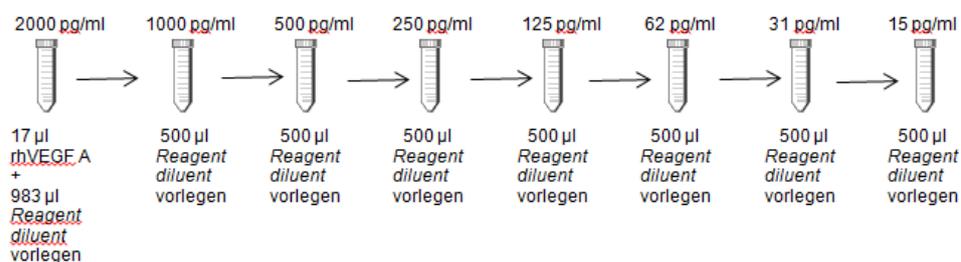


Abbildung 6: Erstellung einer Standardreihe für VEGF A. 500 µl der rhVEGF A-Verdünnung aus Gefäß eins in Gefäß zwei pipettieren. Dann 500 µl aus Gefäß zwei in Gefäß drei, usw. Es entsteht eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2.

4. Beschichtung der Wells mit der Standardreihe und den Blutproben:

Je 100 µl der Standardreihe 1-8 sowie der Serum- und Plasmaproben in die Wells pipettieren. Um genauere Messergebnisse zu erhalten, die Standardreihe und Proben jeweils in einem doppelten Ansatz auftragen. Zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.

5. Präparation der 96-Well-Platten mit *Detection*-Antikörper:

Nach der Inkubation vier Waschschriffe durchführen. Den biotinylierten *Detection*-Antikörper (*goat anti-human* VEGF) mit einer Konzentration von 18 µg/ml auf eine Konzentration von 100 ng/ml mit *reagent diluent* verdünnen. Dies entspricht 55 µl Antikörper-Lösung und 9.945 µl *reagent diluent* für den Bedarf einer 96-Well-Platte. 100 µl der Verdünnung in jedes Well pipettieren und zwei Stunden inkubieren.

6. Zugabe des Enzym-Substrat-Komplexes:

Nach der Inkubation vier Waschschriffe durchführen. Streptavidin-HRP mit *reagent diluent* im Verhältnis 1:200 verdünnen. 100 µl in jedes Well pipettieren und 20 Minuten im Dunkeln inkubieren. Zwischenzeitlich Substrat-Lösung mit *color reagent* A (H₂O₂) und B (Tetramethylbenzidine) in einer 1:1 Mixtur herstellen. Vier Waschschriffe durchführen, dann je 100 µl Substrat-Lösung pro Well pipettieren. 25 Minuten im Dunkeln inkubieren. 50 µl Stopplösung (2N H₂SO₄) pro Well, dann zügig messen.

2.3.2.3 ELISA-Protokoll für VEGF 165b

1. Präparation der 96-Well-Platten mit *Capture*-Antikörper:

Den *Capture*-Antikörper (*mouse anti-human* VEGF 165b) mit einer Konzentration von 360 µg/ml auf eine Konzentration von 2,0 µg/ml mit PBS verdünnen. Dies entspricht 55 µl Antikörper-Lösung und 9.945 µl PBS für den Bedarf einer 96-Well-Platte. 100 µl der Verdünnung in jedes Well pipettieren und über Nacht inkubieren.

2. Zwischenschritte:

Siehe „2. Zwischenschritte“ im ELISA-Protokoll für VEGF A.

3. Erstellung einer Standardreihe mit bekannter VEGF 165b-Konzentration:

RhVEGF 165b (*recombinant human* VEGF 165b) Standard mit einer Konzentration von 120 ng/ml auf eine Konzentration von 4000 pg/ml mit *reagent diluent* verdünnen. Dies entspricht einer Menge von 33 µl rhVEGF A gemischt mit 967 µl *reagent diluent*. Mit der rhVEGF A-Verdünnung beginnend bei einer Konzentration von 4000 pg/ml eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 erstellen (siehe Abbildung 7).

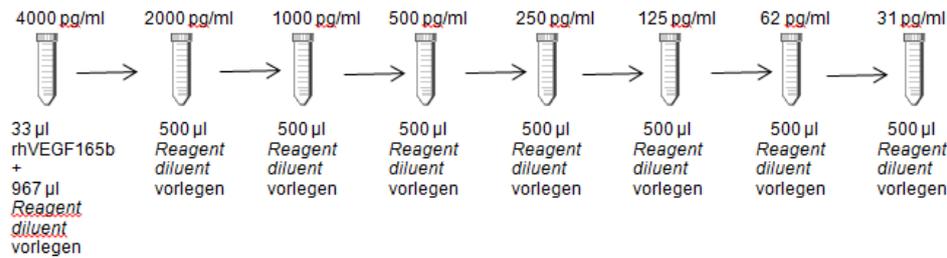


Abbildung 7: Erstellung einer Standardreihe für VEGF 165b. 500 µl der rhVEGF-Verdünnung aus Gefäß eins in Gefäß zwei pipettieren. Dann 500 µl aus Gefäß zwei in Gefäß drei, usw. Es entsteht eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2.

4. Beschichtung der Wells mit der Standardreihe und den Blutproben:

Siehe „4. Beschichtung der Wells mit der Standardreihe und den Blutproben“ im ELISA-Protokoll für VEGF A.

5. Präparation der 96-Well-Platten mit *Detection*-Antikörper:

Nach der Inkubation vier Waschschrte durchführen. Den biotinylierten *Detection*-Antikörper VEGF 165b (*mouse anti-human VEGF*) mit einer Konzentration von 45 µg/ml auf eine Konzentration von 250 ng/ml mit *reagent diluent* verdünnen. Dies entspricht 55 µl Antikörper-Lösung und 9.945 µl *reagent diluent* für den Bedarf einer 96-Well-Platte. 100 µl der Verdünnung in jedes Well pipettieren und zwei Stunden inkubieren.

6. Zugabe des Enzym-Substrat-Komplexes:

Siehe „6. Zugabe des Enzym-Substrat-Komplexes“ im ELISA-Protokoll für VEGF A.

2.3.2.4 Computergestützte Messung

Die Farbintensität (Extinktion), die proportional zur VEGF A- bzw. VEGF 165b-Konzentration der Probe ist, wird dann mittels eines ELISA-Readers ausgewertet. Der ELISA-Reader misst mit einer Testwellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 590 nm. Die kombinierte Messung mit zwei verschiedenen Wellenlängen erlaubt eine genauere Bestimmung der Konzentrationen. Die gemessenen Extinktionen der Standardreihe mit bekannter VEGF A- bzw. VEGF 165b-Konzentration ermöglichen die Erstellung einer Kalibrierungskurve und so die genaue Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Konzentrationen. Um mögliche Mess- und Pipettierfehler zu verringern, wurden die Standardreihe und die Proben jeweils im Doppelansatz aufgetragen.

2.4 Statistische Analyse

Aus den jeweils zwei ermittelten Werten für eine Serum- oder Plasmaprobe wurde ein arithmetisches Mittel gebildet. Die erhobenen Werte wurden in einer Datenbank mit Microsoft Access (Microsoft Corporation, CA, USA) verwaltet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm R, Version 2.15.1 für das Betriebssystem Windows durch das Statistikbüro „STAT-UP Intelligent Business Solutions“.

Für eine explorative Analyse wurden bei verbundenen Stichproben Friedman-Tests und bei unverbundenen Stichproben Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt, da die Daten nicht normalverteilt sind. Die Testung auf Häufigkeiten in einer Kontingenztafel erfolgte mit Exakten Fisher-Tests und Chi-Quadrat-Tests. Um die Beziehung zwischen einer abhängigen und mehrerer unabhängiger Variablen darzustellen, wurde ein multiples lineares Regressionsmodell erstellt. In dieser Arbeit soll die Abhängigkeit zwischen Tumorcharakteristika (unabhängigen Variablen, Einflussgrößen) und der VEGF A-/VEGF 165b-Werte-Verteilung (abhängige Variable) ermittelt werden. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach der Kaplan-Meier-Methode, der Vergleich mittels Log Rank-Test. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich vom Tag der Operation bis zum Zeitpunkt des Todes oder dem letzten Beobachtungsdatum. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 1999 Tage (95% Konfidenzintervall: 1973-2023 Tage). In Gesamtüberlebenskurven sind nur tumorassoziierte Todesfälle eingegangen.

Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $<0,05$ (signifikant) bzw. $p < 0,01$ (sehr signifikant) angenommen. Um eine α -Fehler Kumulierung zu vermeiden, wurden die p-Werte mit der Prozedur nach Holm adjustiert.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Daten

In diese Studie wurden insgesamt 205 Patientinnen mit primärem Brustkrebs nach erfolgter Operation eingeschlossen und 107 gesunde Probandinnen. Das Durchschnittsalter der Mammakarzinompatientinnen lag bei Aufnahme in die Success-A-Studie bei 39 (21 – 65) Jahren, das des gesunden Vergleichskollektivs bei 24 (18 – 44) Jahren zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die gesunden Probandinnen waren alle prämenopausal, die Mammakarzinompatientinnen größtenteils (180/205).

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Patientencharakteristika.

	Anzahl (%)		Anzahl (%)
Axillärer Lymphknotenbefall		Histologie[†]	
nodal-negativ (N0)	87 (42)	invasiv-duktales Karzinom	180 (88)
1-3 Lymphknotenmetastasen	84 (41)	invasiv-lobuläres Karzinom	12 (6)
4-9 Lymphknotenmetastasen	26 (13)	sonstige Karzinome	12 (6)
≥ 10 Lymphknotenmetastasen	8 (4)	Grading[†]	
Hormonrezeptorstatus		G1	5 (2)
negativ	62 (30)	G2	95 (46)
positiv	143 (70)	G3	104 (52)
Östrogenrezeptorstatus[†]		HER2/neu-Status[†]	
negativ	74 (36)	negativ	139 (68)
positiv	130 (64)	positiv	62 (32)
Progesteronrezeptorstatus[†]		Rezidivfreies Überleben	
negativ	85 (41)	kein Rezidiv	168 (82)
positiv	119 (59)	Rezidiv	37 (18)
Tumorgroße[†]		Gesamtüberleben	
pT1a-c	95 (46)	lebend	186 (91)
pT2	100 (49)	verstorben	19 (9)
pT3	8 (5)		

[†] Östrogen-, Progesteronrezeptorstatus, Histologie und Grading in einem Fall unbekannt. Tumorgroße in zwei Fällen unbekannt. Her2/neu-Status in vier Fällen unklar.

3.2 Deskriptive Statistik

Die Wachstumsfaktorkonzentrationen (VEGF A und VEGF 165b) wurden innerhalb der Mammakarzinomgruppe zu verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten in Serum und EDTA-Plasma bestimmt. Innerhalb der Kontrollgruppe fanden die Messungen einmalig in Serum, EDTA-, Citrat- und CTAD-Plasma statt.

Zu den einzelnen Messzeitpunkten war nicht immer genug Probenmaterial von allen Patientinnen vorhanden. Entweder gab es quantitativ zu wenig Serum oder Plasma für beide Messverfahren (VEGF A und VEGF 165b) oder einzelne Patientinnen sind zu einem oder mehreren Blutentnahmezeitpunkten nicht erschienen, daher kann die Probenanzahl zwischen den einzelnen Messungen variieren.

Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe:

VEGF A bzw. VEGF 165b wurde in Serum und EDTA-Plasma von Brustkrebspatientinnen zu vier bzw. drei¹ verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten gemessen und mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Vergleich verwendeter Probenmaterialien:

Ausgewertet wurden nur Probanden, deren Probenmaterialien vollständig waren (VEGF A- bzw. VEGF 165b-Werte in Serum, EDTA, Citrat und CTAD bei gesunden Probanden, sowie in Serum und EDTA bei Mammakarzinompatientinnen). Anhand verbundener Stichprobenanalysen erfolgte der Vergleich der verwendeten Probenmaterialien innerhalb der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe.

Verlaufsanalyse der Wachstumsfaktorkonzentrationen:

Die Verlaufsanalyse fand an einer Subgruppe von Patientinnen statt, die innerhalb des Untersuchungszeitraums vollständig nachbeobachtet werden konnte. Mittels verbundener Stichprobenanalysen wurden die Verläufe der VEGF A- bzw. VEGF 165b-

¹ Als die Analyse der Blutproben stattfand, war die Sammlung für den Blutentnahmezeitpunkt vier innerhalb der Success-A-Studie noch nicht abgeschlossen. Besonders die VEGF 165b-Messung weist daher nur eine sehr geringe Probenanzahl auf [n(Serum)=14, n(EDTA)=13] und konnte wegen zu geringer statistischer Aussagekraft nicht berücksichtigt werden.

Werte in Serum- und EDTA-Plasma über die ersten drei Blutentnahmezeitpunkte ausgewertet.

Korrelation mit klinisch-pathologischen Charakteristika und Überlebensraten:

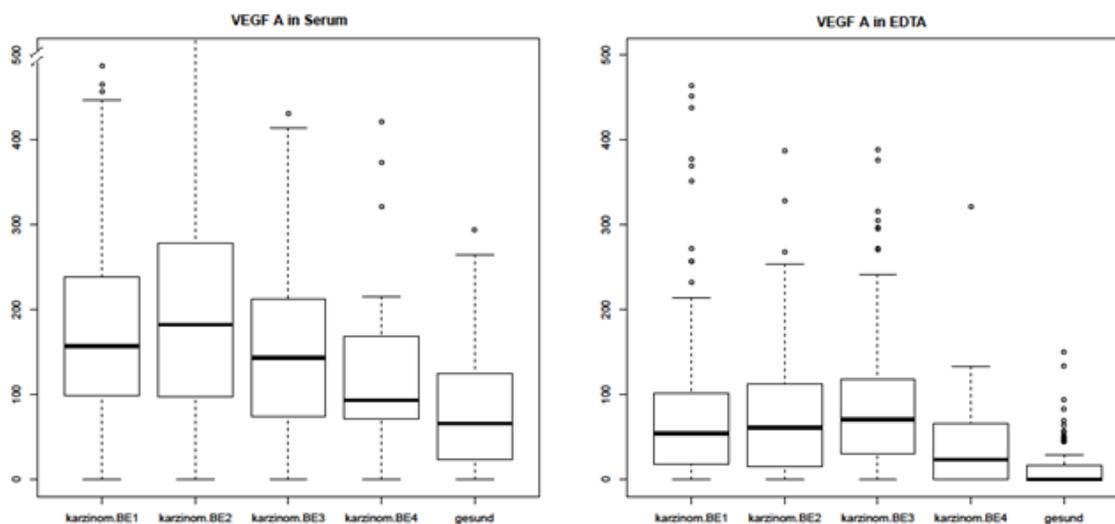
Die ermittelten Werte für VEGF A und VEGF 165b sollen in Regressionsanalysen mit etablierten Prognosefaktoren verglichen und mit Krankheitsverläufen korreliert werden.

Um mögliche Unterschiede aufzuzeigen, wurden die Ergebnisse anhand von Boxplot-Diagrammen dargestellt. Die detaillierten deskriptiven Werteverteilungen und Regressionsanalysen finden sich im Anhang. Im Ergebnisteil sollen primär wesentliche Erkenntnisse wiedergegeben werden.

3.3 Vergleich der Wachstumsfaktorkonzentrationen zwischen Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

3.3.1 VEGF A

Abbildung 8: VEGF A in Serum und EDTA-Plasma, Vergleich zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Probandinnen (y-Achse in pg/ml).



Serum (pg/ml)	Median (Q _{0,50})	Min. (%)	Max.
Karzinom.BE1	156,9	0 (1,7)	907,9
Karzinom.BE2	181,7	0 (1,8)	1640
Karzinom.BE3	143,2	0 (1,6)	1044
Karzinom.BE4	93,28	0 (8,3)	1833
Gesund	66,3	0 (13,4)	1479

EDTA (pg/ml)	Median (Q _{0,50})	Min. (%)	Max.
Karzinom.BE1	54,0	0 (3,9)	463,8
Karzinom.BE2	60,9	0 (16,6)	803,9
Karzinom.BE3	70,7	0 (14,7)	654,4
Karzinom.BE4	23,3	0 (33,3)	321,5
Gesund	0	0 (61,3)	1497

(Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3/4 der Karzinompatientinnen [Karzinom.BE1/2/3/4])

Sowohl bei den untersuchten Mammakarzinompatientinnen als auch bei den gesunden Probandinnen zeigt sich eine breite interindividuelle Streuung der Messwerte in Serum und EDTA-Plasma (siehe Abbildung 8).

Serum:

Während der ersten drei Blutentnahmezeitpunkte (BE 1-3) konnten signifikant höhere VEGF A-Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe gefunden werden ($p < 0,0001$). 5 Jahre nach Chemotherapie (BE 4) sind die Werte nur noch tendenziell erhöht und unterscheiden sich nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe ($p = 0,052$).

Gleichzeitig weisen Mammakarzinompatientinnen seltener nicht messbare Werte (0) im Serum auf (siehe Abbildung 8 [Min. (%)]). Für die Blutentnahmezeitpunkte 1-3 sind die Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe signifikant [$p(\text{BE } 1/2) < 0,0001$, $p(\text{BE } 3) = 0,006$], während sich der Blutentnahmezeitpunkt vier statistisch nicht mehr von der Kontrollgruppe unterscheidet ($p = 0,460$).

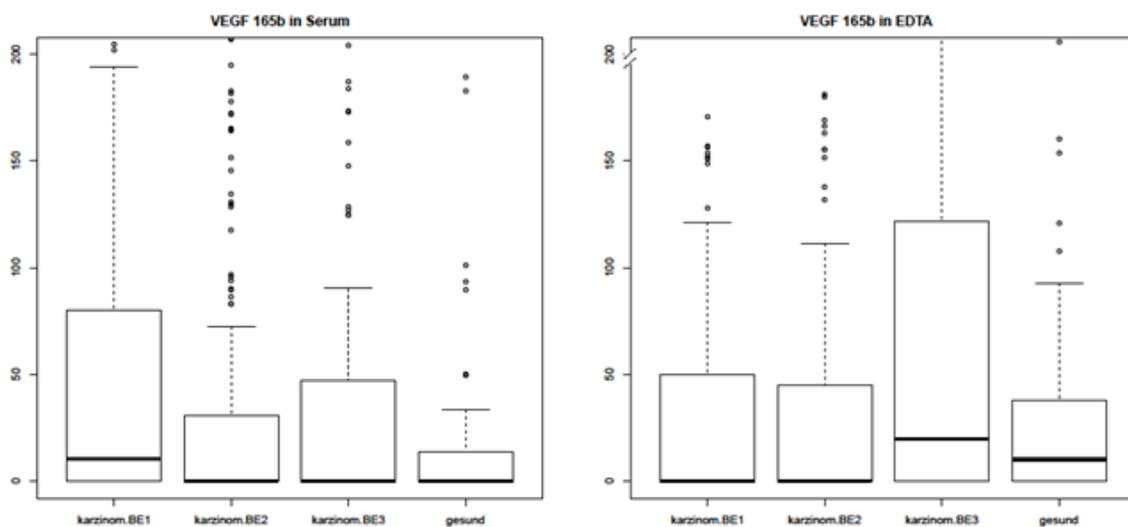
EDTA-Plasma:

Mammakarzinompatientinnen zeigen zu allen Blutentnahmezeitpunkten (BE 1-4) signifikant höhere VEGF A-Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe [$p(\text{BE } 1/2/3) < 0,0001$, $p(\text{BE } 4) = 0,007$].

Gleichzeitig weisen die untersuchten Patientinnen zu allen Blutentnahmezeitpunkten signifikant seltener nicht messbare Werte (0) auf (siehe Abbildung 8 [Min. (%)] [$p(\text{BE } 1/2/3) < 0,0001$, $p(\text{BE } 4) = 0,028$].

3.3.2 VEGF 165b

Abbildung 9: VEGF 165b in Serum und EDTA-Plasma, Vergleich zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Probandinnen (y-Achse in pg/ml).



Serum (pg/ml)	Median ($Q_{0,50}$)	Min. (%)	Max.
Karzinom.BE1	10,5	0 (33,8)	969,7
Karzinom.BE2	0	0 (62,6)	601,8
Karzinom.BE3	0	0 (61,5)	1188
Gesund	0	0 (63,0)	1439

EDTA (pg/ml)	Median	Min. (%)	Max.
Karzinom.BE1	0	0 (51,0)	510,2
Karzinom.BE2	0	0 (59,1)	657,2
Karzinom.BE3	19,5	0 (38,1)	1947
Gesund	10,1	0 (33,7)	1354

(Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3/4 der Karzinompatientinnen [Karzinom.BE1/2/3/4])

Sowohl bei den untersuchten Mammakarzinompatientinnen als auch bei den gesunden Probandinnen zeigt sich eine breite interindividuelle Streuung der Messwerte in Serum und EDTA-Plasma, vergleichbar zur VEGF A-Werteverteilung (siehe Abbildung 9).

Serum:

Die Werte der Patientinnen zum Blutentnahmezeitpunkt eins sind signifikant höher als die Werte der gesunden Probandinnen ($p < 0,0001$). Zu den Messzeitpunkten zwei und drei konnten keine statistischen Unterschiede der Verteilung in Bezug auf die Kontrollgruppe festgestellt werden ($p(\text{BE } 2/3) = 0,565$).

Ein Großteil der Messwerte liegt im niederen nicht mehr messbaren Bereich. Die untersuchten Mammakarzinompatientinnen weisen jedoch zum Blutentnahmezeitpunkt eins signifikant seltener nicht messbare Werte (0) auf (siehe Abbildung 9 [Min. (%)]) ($p < 0,0001$), während sich die Blutentnahmezeitpunkte zwei und drei statistisch nicht von der Kontrollgruppe unterscheiden ($p(\text{BE } 2/3) = 1,000$).

EDTA-Plasma:

Zwischen Patientinnen und der Kontrollgruppe lassen sich zum Blutentnahmezeitpunkt eins keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung feststellen, trotz tendenziell niedrigerer statistischer Lagemaße bei den Mammakarzinompatientinnen ($p=0,202$). Zum Blutentnahmezeitpunkt zwei weisen Patientinnen jedoch signifikant niedrigere VEGF 165b-Konzentrationen auf ($p=0,040$). Der Blutentnahmezeitpunkt drei unterscheidet sich nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe ($p=0,202$).

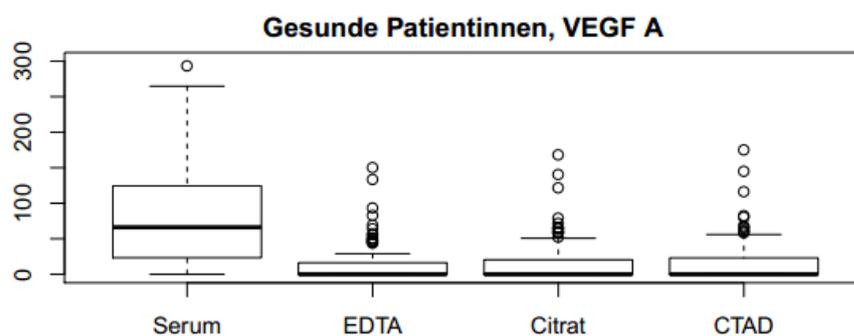
In der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen zeigen sich zu den Blutentnahmezeitpunkten eins und zwei signifikant häufiger nicht messbare Werte (0) als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 9 [Min. (%)]) [$p(\text{BE } 1)=0,030$, $p(\text{BE } 2)<0,001$]. Zum Blutentnahmezeitpunkt 3 steigt die Anzahl der Patientinnen mit messbaren Werten wieder an und unterscheidet sich nicht mehr signifikant vom Vergleichskollektiv ($p=0,567$).

3.4 Unterschiede zwischen Serum- und Plasmaproben innerhalb des Untersuchungskollektives

3.4.1 VEGF A

Gesundes Vergleichskollektiv:

Abbildung 10: VEGF A, Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien innerhalb der Kontrollgruppe (y-Achse in pg/ml).

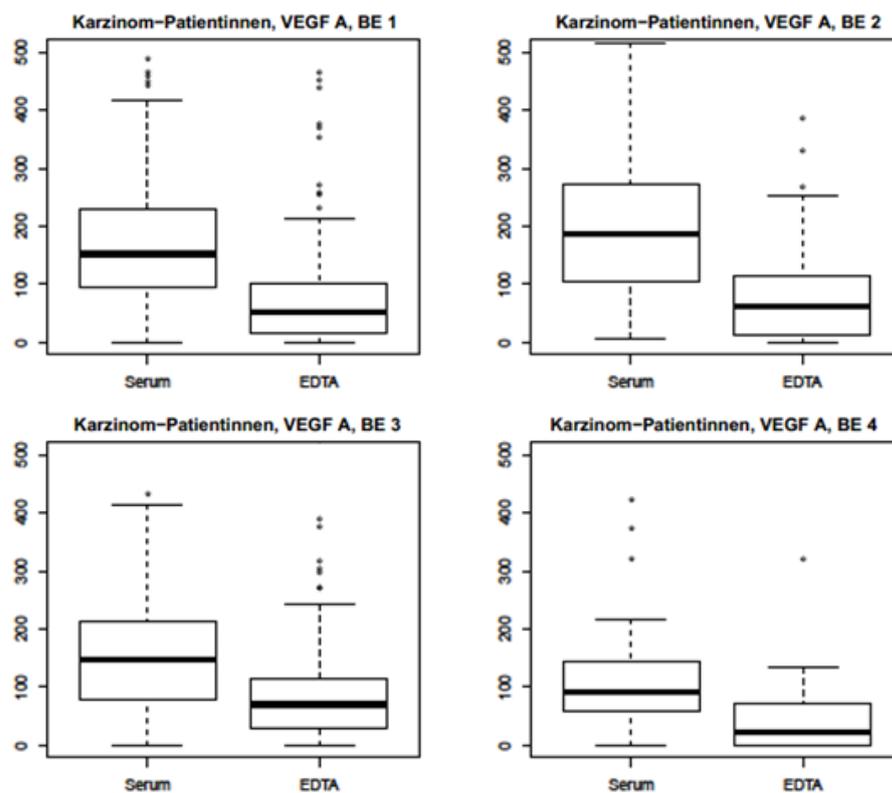


	Median (Q _{0,50})	Min. (%)	Max.
Serum	66,2	0 (13,4)	1479
EDTA	0	0 (61,3)	1497
Citrat	0	0 (65,6)	1776
CTAD	0	0 (63,3)	1812

Die gemessenen VEGF A-Konzentrationen sind im Serum signifikant höher als im EDTA-Plasma ($p < 0,0001$), Citrat-Plasma ($p < 0,0001$) und CTAD-Plasma ($p < 0,0001$). Die verschiedenen Plasmaproben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

Vergleich zu Mammakarzinompatientinnen:

Abbildung 11: VEGF A, Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien innerhalb der Mammakarzinomgruppe zu Blutentnahmezeitpunkt 1-4 [BE 1-4] (y-Achse in pg/ml).

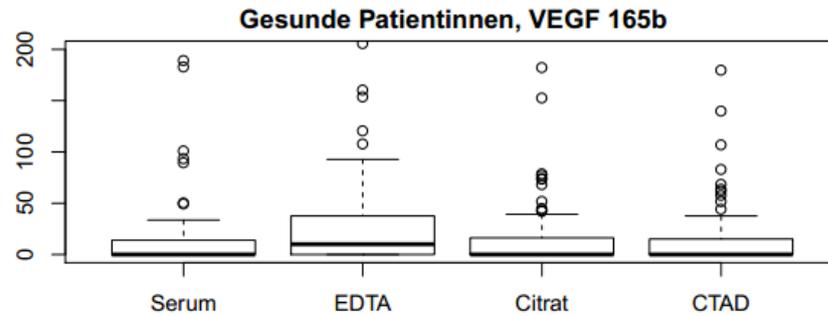


Die VEGF A-Konzentrationen liegen im Serum zu jedem Blutentnahmezeitpunkt hoch signifikant über den Werten im EDTA-Plasma ($p(\text{BE } 1/2/3/4) < 0,0001$). Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen bei gesunden Probandinnen.

3.4.2 VEGF 165b

Gesundes Vergleichskollektiv:

Abbildung 12: VEGF 165b, Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien innerhalb der Kontrollgruppe (y-Achse in pg/ml).

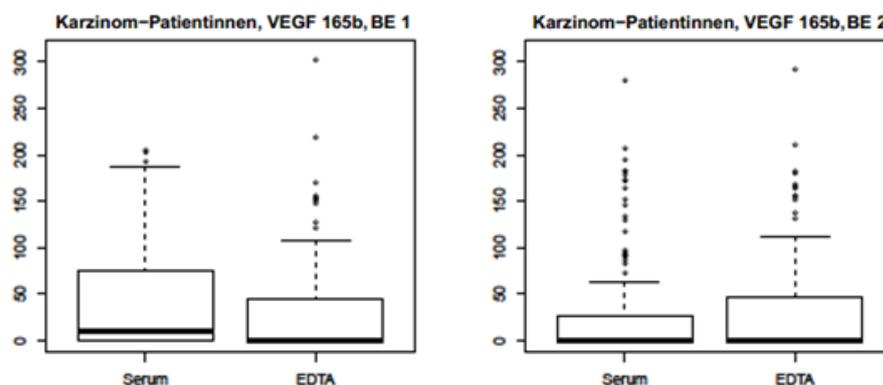


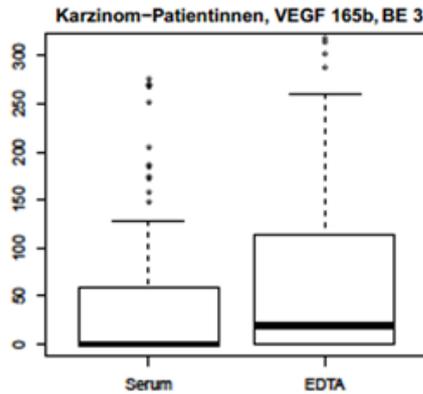
	Median ($Q_{0,50}$)	Min. (%)	Max.
Serum	0	0 (63,0)	1439
EDTA	10,1	0 (33,7)	1354
Citrat	0	0 (59,4)	1300
CTAD	0	0 (59,2)	1313

Die gemessenen VEGF 165b Konzentrationen sind im EDTA-Plasma signifikant höher im Vergleich zu Serum ($p < 0,0001$), Citrat-Plasma ($p < 0,0001$) und CTAD-Plasma ($p < 0,0001$). Die Werte in Serum, Citrat- und CTAD-Plasma weichen nicht statistisch signifikant voneinander ab ($p > 0,05$).

Vergleich zu Mammakarzinompatientinnen:

Abbildung 13: VEGF 165b, Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien innerhalb der Mammakarzinomgruppe zu Blutentnahmezeitpunkt 1-3 [BE 1-3] (y-Achse in pg/ml).



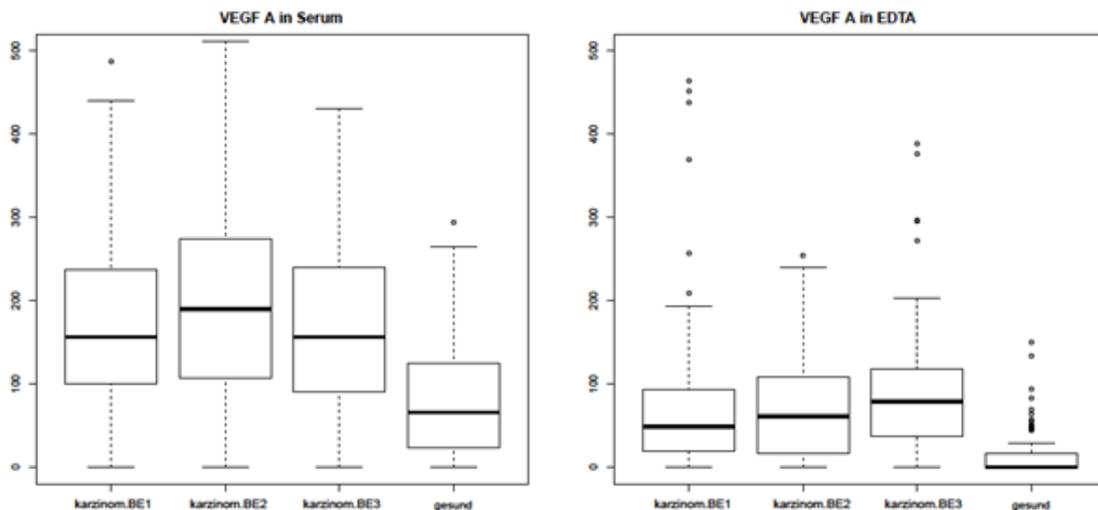


Überraschenderweise sind die VEGF 165b-Konzentrationen im Serum zum ersten Blutentnahmezeitpunkt signifikant höher als im EDTA-Plasma ($p < 0,0001$). Die Ergebnisse der zweiten und dritten Blutentnahme entsprechen eher den Beobachtungen bei gesunden Probandinnen. Der Blutentnahmezeitpunkt zwei zeigt tendenziell höhere Werte im EDTA-Plasma. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p = 0,195$). Zum dritten Blutentnahmezeitpunkt liegen die VEGF 165b-Konzentrationen im EDTA-Plasma hoch signifikant über den Werten im Serum ($p < 0,0001$).

3.5 Verlauf der Wachstumsfaktorkonzentrationen innerhalb des Untersuchungszeitraums der Mammakarzinompatientinnen

3.5.1 VEGF A

Abbildung 14: Konzentrationsverlauf von VEGF A in Serum (n=84) und EDTA-Plasma (n=54) innerhalb des Untersuchungszeitraums der Mammakarzinompatientinnen.



(Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3 der Karzinompatientinnen [Karzinom.BE1/2/3]; y-Achse in pg/ml)

Sowohl in Serum als auch im EDTA-Plasma liegen die Werte im Verlauf stets über dem Niveau der Kontrollgruppe (siehe Kapitel 3.3).

Serum:

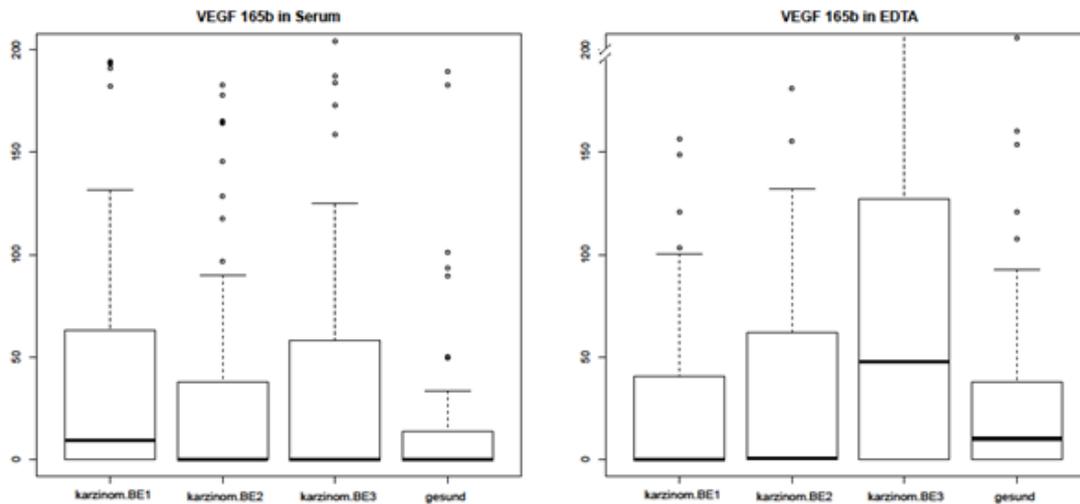
Im Serum finden sich zum Blutentnahmezeitpunkt zwei (Median: 189,8 pg/ml, IQR (*interquartile range*) 109,6-271,3) signifikant höhere VEGF A-Konzentrationen im Vergleich zur ersten Messung vor Chemotherapie (Median: 156,2 pg/ml, IQR 100,7-237,0) ($p=0,002$) und dritten Messung zwei Jahre nach Chemotherapie (Median: 156,6 pg/ml, IQR 92,8-239,0) ($p=0,005$). Die Blutentnahmezeitpunkte eins und drei grenzen sich nicht signifikant voneinander ab ($p=0,319$).

EDTA-Plasma:

Im EDTA-Plasma finden sich vor (BE 1) (Median: 48,5 pg/ml, IQR 19,3-92,2) und nach Chemotherapie (BE 2) (Median: 61,1 pg/ml, IQR 16,0-106,2) keine signifikanten Unterschiede der Verteilung ($p=1,000$). Zwei Jahre nach Chemotherapie (BE 3) (Median: 78,7 pg/ml, IQR 37,5-118,1) sind die Werte leicht angestiegen und unterscheiden sich signifikant vom ersten Messzeitpunkt ($p=0,027$), jedoch nicht vom zweiten ($p=1,000$).

3.5.2 VEGF 165b

Abbildung 15: Konzentrationsverlauf von VEGF 165b in Serum (n=80) und EDTA-Plasma (n=46) innerhalb des Untersuchungszeitraums der Mammakarzinompatientinnen.



(Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3 der Karzinompatientinnen [Karzinom.BE1/2/3]; y-Achse in pg/ml)

Serum:

Im Serum finden sich vor Chemotherapie zum Blutentnahmezeitpunkt eins (Median: 9,1 pg/ml, IQR 0-61,1) signifikant höhere VEGF 165b-Konzentrationen im Vergleich zur Messung kurz nach Chemotherapie (BE 2) (Median: 0 pg/ml, IQR 0-37,5) ($p < 0,0001$). In Bezug auf die dritte Blutentnahme zwei Jahre nach Chemotherapie (BE 3) (Median: 0 pg/ml, IQR 0-57,8) konnte kein statistischer Unterschied in der Verteilung mehr festgestellt werden ($p = 0,286$). Die Blutentnahmezeitpunkte zwei und drei grenzen sich nicht signifikant voneinander ab ($p = 0,286$).

EDTA-Plasma:

Im EDTA-Plasma finden sich vor (BE 1) (Median: 0,1 pg/ml, IQR 0-39,6) und nach Chemotherapie (BE 2) (Median: 0,4 pg/ml, IQR 0-59,1) keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,330$). Zwei Jahre nach Chemotherapie (BE 3) (Median: 47,5 pg/ml, IQR 0-125,8) kommt es zu einem starken Anstieg in der VEGF 165b-Werteverteilung. Dieser weist signifikant höhere Konzentrationen auf als zum Blutentnahmezeitpunkt eins und zwei ($p < 0,0001$).

3.6 Korrelation mit klinisch-pathologischen Charakteristika

In dieser Fragestellung wurde untersucht, ob sich Mammakarzinompatientinnen mit sehr hohen oder niedrigen VEGF A- bzw. VEGF 165b-Werten bezüglich bestimmter histopathologischer Tumorcharakteristika unterscheiden. Der Blutentnahmezeitpunkt vier konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl nicht berücksichtigt werden.

In einem multiplen linearen Regressionsmodell wurde nun ermittelt, ob das Vorhandensein bestimmter Tumorcharakteristika einen Einfluss auf die postoperative VEGF-Werteverteilung zu den ersten drei Blutentnahmezeitpunkten hat. In Relation zu den bekannten etablierten Prognoseparametern axillärer Lymphknotenbefall, Hormonrezeptorstatus und im Speziellen Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Tumorgroße, histologischer Subtyp, histopathologisches Grading und HER2/neu-Rezeptorstatus ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen in Bezug auf VEGF A und VEGF 165b (p-Wert immer $> 0,05$).

Die detaillierten Regressionsanalysen finden sich im Anhang (siehe Tabelle 10-13).

3.7 Korrelation mit Überlebensraten

Die VEGF A- und VEGF 165b-Werte der Patientinnen wurden zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt in drei Gruppen eingeteilt:

- Patientinnen mit **niedrigen** Werten:
≤ 25. Quantil ($Q_{0,25}$) für VEGF A und 0 für VEGF 165b.
- Patientinnen mit **mittleren** Werten:
25. Quantil- 75. Quantil ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) für VEGF A und >0- 75. Quantil (0- $Q_{0,75}$) für VEGF 165b.
- Patientinnen mit **hohen** Werten:
> 75. Quantil ($Q_{0,75}$) für VEGF A und VEGF 165b.

3.7.1 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von VEGF A

Tabelle 2: Korrelation von Rezidivereignissen mit niedrigen ($\leq Q_{0,25}$), mittleren ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) und hohen ($>Q_{0,75}$) VEGF A-Werten in Serum und EDTA-Plasma zu Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3 (BE 1/2/3).

VEGF A in Serum (BE 1)*				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p- Wert
Kein Rezidiv (%)	38 (86)	74 (82)	34 (76)	
Rezidiv (%)	6 (14)	16 (18)	11 (24)	0,411

* $Q_{0,25} = 99\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 238\text{pg/ml}$

VEGF A in EDTA (BE 1)†				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p- Wert
Kein Rezidiv (%)	27 (87)	52 (83)	23 (72)	
Rezidiv (%)	4 (13)	11 (17)	9 (28)	0,276

† $Q_{0,25} = 18\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 102\text{pg/ml}$

VEGF A in Serum (BE 2)*				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p- Wert
Kein Rezidiv (%)	33 (80)	69 (84)	31 (74)	
Rezidiv (%)	8 (20)	13 (16)	11 (26)	0,387

* $Q_{0,25} = 98\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 278\text{pg/ml}$

VEGF A in EDTA (BE 2)†				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p- Wert
Kein Rezidiv (%)	29 (81)	61 (85)	27 (75)	
Rezidiv (%)	7 (19)	11 (15)	9 (25)	0,471

† $Q_{0,25} = 14\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 113\text{pg/ml}$

VEGF A in Serum (BE 3)*				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p- Wert
Kein Rezidiv (%)	29 (91)	56 (90)	24 (77)	
Rezidiv (%)	3 (9)	6 (10)	7 (28)	0,171

* $Q_{0,25} = 74\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 212\text{pg/ml}$

VEGF A in EDTA (BE 3)†				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p- Wert
Kein Rezidiv (%)	27 (93)	51 (88)	23 (79)	
Rezidiv (%)	2 (7)	7 (12)	6 (21)	0,283

† $Q_{0,25} = 32\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 117\text{pg/ml}$

Patientinnen mit hohen VEGF A-Werten in Serum und EDTA wiesen zu keinem Blutentnahmezeitpunkt eine signifikant höhere Rezidivrate auf (siehe Tabelle 2).

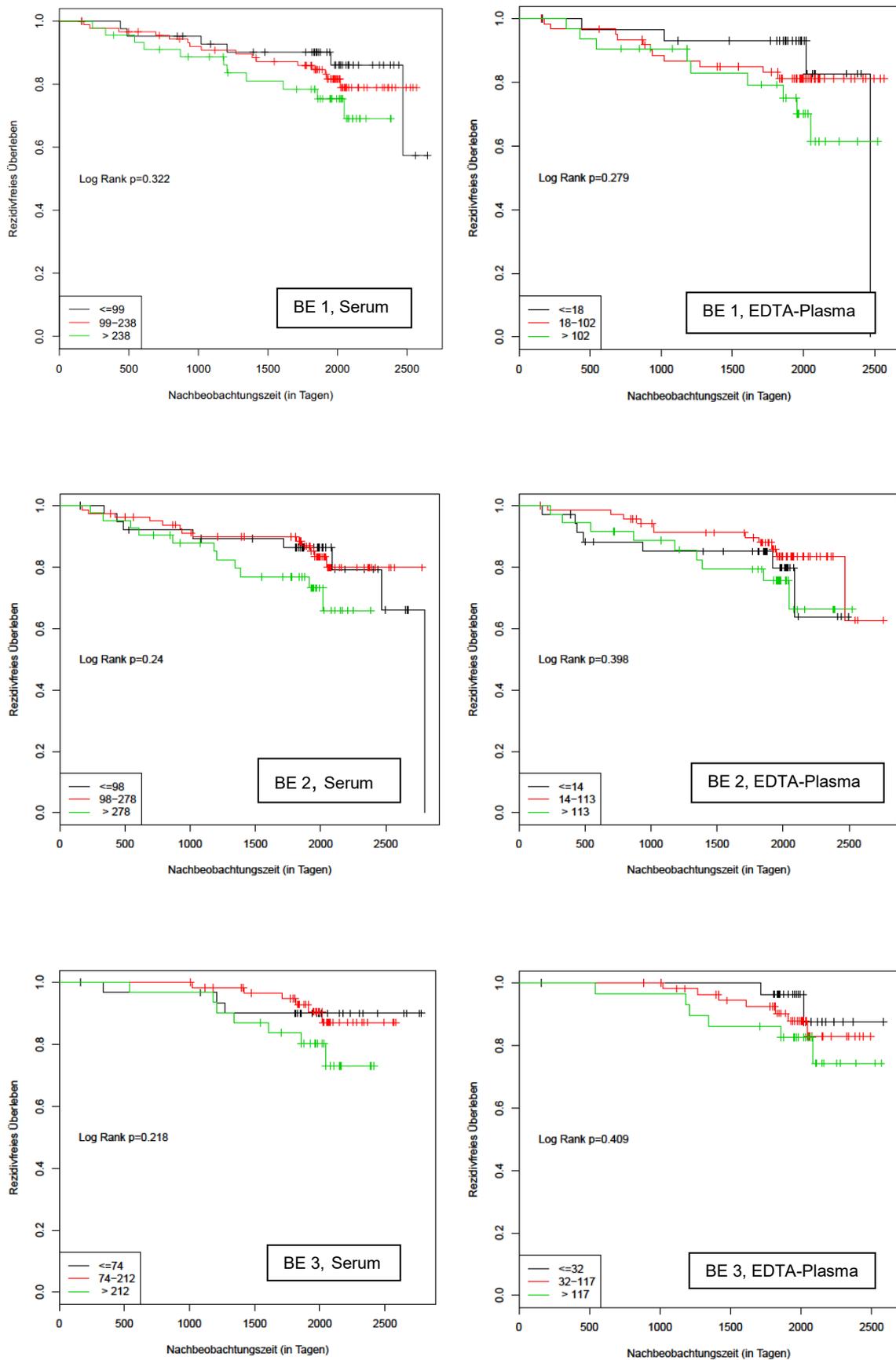
Blutentnahmezeitpunkt eins: 24% (11/45) der Patientinnen mit hohen Serumwerten hatten im Verlauf ein Rezidiv, gegenüber 18% (16/90) mit mittleren und 14% (6/44) mit niedrigen Werten ($p=0,411$). Im EDTA-Plasma entwickelten 28% (9/32) mit hohen Werten ein Rezidiv, gegenüber 17% (11/63) mit mittleren und 13% (4/31) mit niedrigen Werten ($p=0,276$).

Blutentnahmezeitpunkt zwei: 26% (11/42) der Patientinnen mit hohen Serumwerten bekamen im Verlauf ein Rezidiv. In der Gruppe mit mittleren Serumwerten waren es 16% (13/82) und in der Gruppe mit niedrigen Werten 20% (8/41) ($p=0,387$). Im EDTA-Plasma bekamen 25% (9/36) mit hohen Werten ein Rezidiv, gegenüber 15% (11/72) mit mittleren und 19% (7/36) mit niedrigen Werten ($p=0,471$).

Blutentnahmezeitpunkt drei: 28% (7/31) der Patientinnen mit hohen Serumwerten erlitten ein Rezidiv, sowie 10% (6/62) mit mittleren und 9% (3/32) mit niedrigen Werten ($p=0,171$). Im EDTA-Plasma waren es korrespondierend 21% (6/29) mit hohen, 12% (7/58) mit mittleren und 7% (2/29) mit niedrigen Werten ($p=0,283$).

In Abbildung 16 sind die Überlebenskurven für das rezidivfreie Überleben bei Patientinnen mit hohen, mittleren und niedrigen VEGF A-Werten in Serum und EDTA-Plasma dargestellt. Es konnte zu keinem Blutentnahmezeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ($p>0,05$, Log Rank-Test).

Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit.



3.7.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von VEGF A

Tabelle 3: Korrelation des Gesamtüberlebens mit niedrigen ($\leq Q_{0,25}$), mittleren ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$) und hohen ($>Q_{0,75}$) VEGF A-Werten in Serum und EDTA-Plasma zu Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3 (BE 1/2/3).

VEGF A in Serum (BE 1)*				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	$> Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	42 (95)	82 (91)	39 (87)	
Verstorben (%)	2 (5)	8 (9)	6 (13)	0,348

* $Q_{0,25} = 99\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 238\text{pg/ml}$

VEGF A in EDTA (BE 1) [†]				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	$> Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	30 (97)	55 (87)	28 (88)	
Verstorben (%)	1 (3)	8 (13)	4 (12)	0,327

[†] $Q_{0,25} = 18\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 102\text{pg/ml}$

VEGF A in Serum (BE 2)*				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	$> Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	39 (95)	74 (90)	36 (86)	
Verstorben (%)	2 (5)	8 (10)	6 (14)	0,350

* $Q_{0,25} = 98\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 278\text{pg/ml}$

VEGF A in EDTA (BE 2) [†]				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	$> Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	31 (86)	67 (93)	32 (89)	
Verstorben (%)	5 (14)	5 (7)	4 (11)	0,491

[†] $Q_{0,25} = 14\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 113\text{pg/ml}$

VEGF A in Serum (BE 3)*				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	$> Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	32 (100)	62 (100)	29 (94)	
Verstorben (%)	0 (0)	0 (0)	2 (6)	0,046

* $Q_{0,25} = 74\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 212\text{pg/ml}$

VEGF A in EDTA (BE 3) [†]				
	$\leq Q_{0,25}$	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	$> Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	29 (100)	58 (100)	27 (93)	
Verstorben (%)	0 (0)	0 (0)	2 (7)	0,047

[†] $Q_{0,25} = 32\text{pg/ml}$, $Q_{0,75} = 117\text{pg/ml}$

Patientinnen mit hohen VEGF A-Werten in Serum und EDTA wiesen nur zu Blutentnahmezeitpunkt drei eine signifikant höhere Sterberate auf (siehe Tabelle 3).

Blutentnahmezeitpunkt eins: 13% (6/45) der Patientinnen mit hohen Serumwerten sind im Verlauf verstorben, gegenüber 9% (8/90) mit mittleren und 5% (2/44) mit niedrigen Werten ($p=0,348$). Im EDTA-Plasma starben 12% (4/32) mit hohen Werten, gegenüber 13% (8/63) mit mittleren und 3% (1/31) mit niedrigen Werten ($p=0,327$).

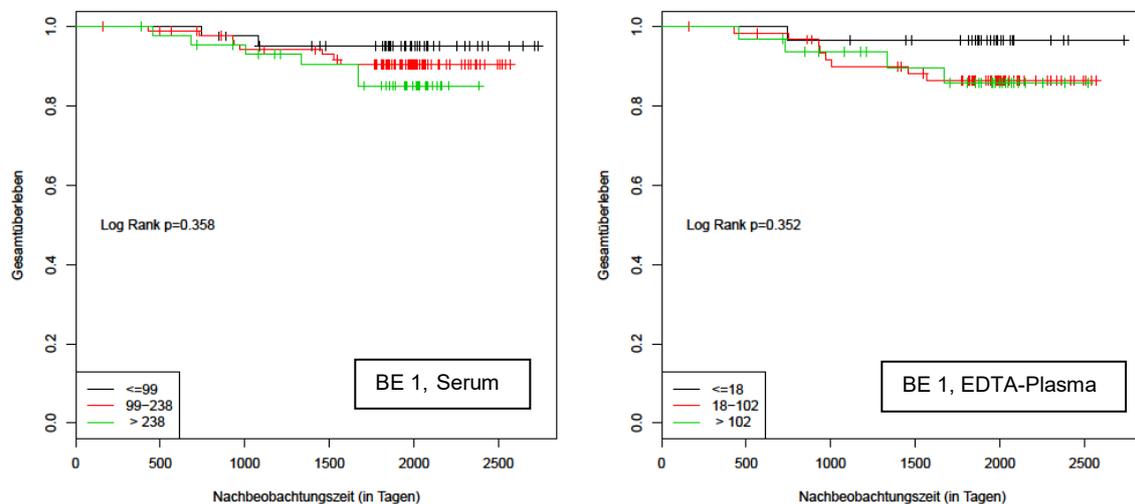
Blutentnahmezeitpunkt zwei: 14% (6/42) der Patientinnen mit hohen Serumwerten verstarben im Verlauf. In der Gruppe mit mittleren Serumwerten waren es 10% (8/82) und in der Gruppe mit niedrigen Werten 5% (2/41) ($p=0,350$). Im EDTA-Plasma sind

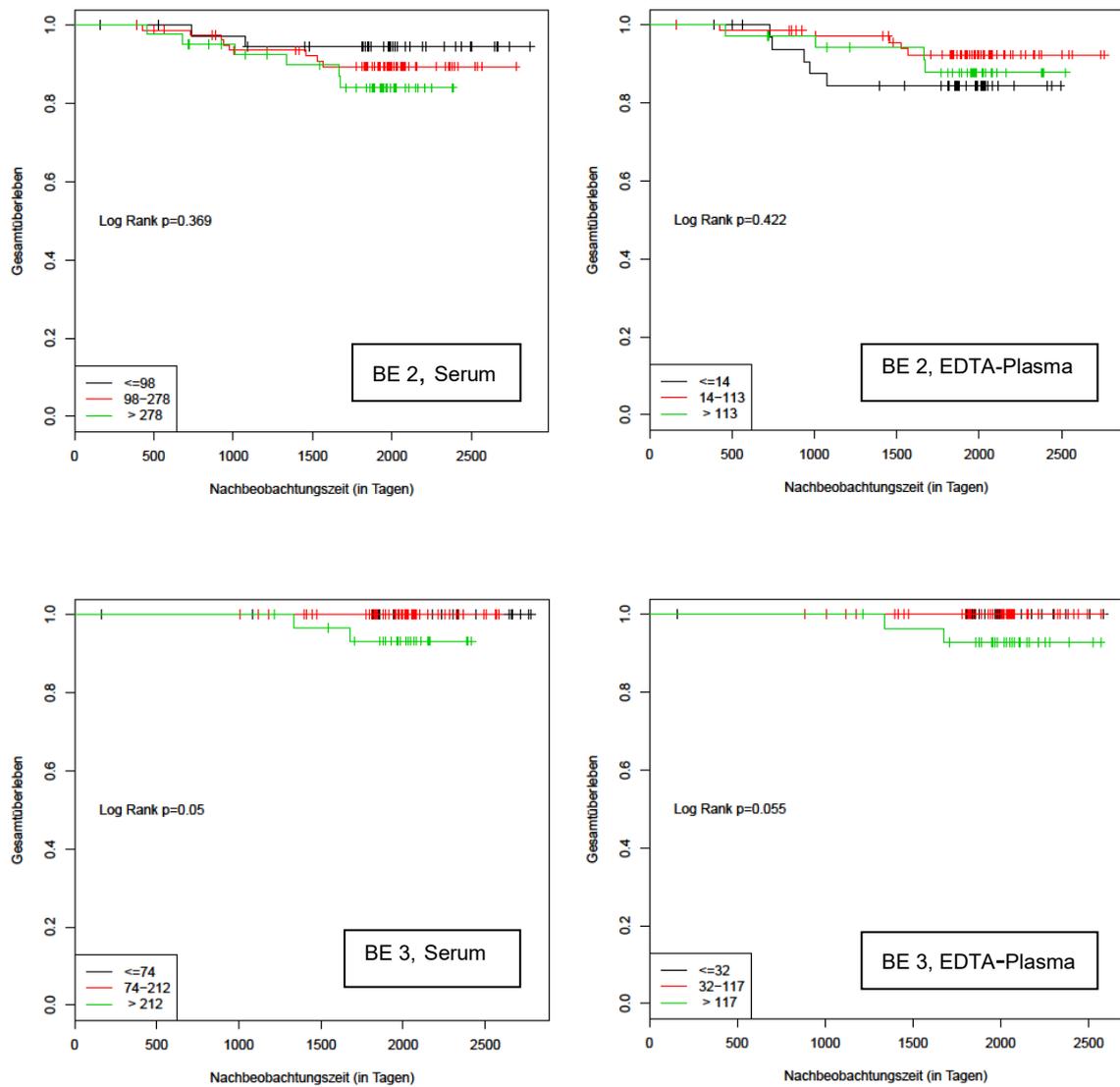
11% (4/36) mit hohen Werten gestorben, gegenüber 7% (5/72) mit mittleren und 14% (5/36) mit niedrigen Werten ($p=0,491$).

Blutentnahmezeitpunkt drei: 6% (2/31) der Patientinnen mit hohen Serumwerten, sowie 0% (0/62) mit mittleren und 0% (0/32) mit niedrigen Werten sind verstorben. Im EDTA-Plasma waren es korrespondierend 7% (2/29) mit hohen, 0% (0/58) mit mittleren und 0% (0/29) mit niedrigen Werten. Trotz der geringen Sterberate ($n=2$) waren diese Unterschiede signifikant ($p=0,046$ und $p=0,047$).

In Abbildung 17 sind die Überlebenskurven für das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit hohen, mittleren und niedrigen VEGF A-Werten in Serum und EDTA-Plasma dargestellt. Zum Blutentnahmezeitpunkt eins und zwei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ($p>0,05$, Log Rank-Test). Zum Blutentnahmezeitpunkt drei ergab sich für Serum ein signifikanter ($p=0,05$) und für EDTA-Plasma ein tendenzieller ($p=0,055$) Unterschied in den Überlebenskurven.

Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit.





3.7.3 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von VEGF 165b

Tabelle 4: Korrelation von Rezidivereignissen mit niedrigen (0), mittleren (0- $Q_{0,75}$) und hohen ($>Q_{0,75}$) VEGF 165b-Werten in Serum und EDTA-Plasma zu Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3 (BE 1/2/3).

VEGF 165b in Serum (BE 1)*				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Kein Rezidiv	47	63	36	0,481
(%)	(78)	(86)	(82)	
Rezidiv	13	10	8	0,481
(%)	(22)	(14)	(18)	

* $Q_{0,75}$ = 80pg/ml

VEGF 165b in EDTA (BE 1)†				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Kein Rezidiv	40	20	22	0,663
(%)	(77)	(83)	(85)	
Rezidiv	12	4	4	0,663
(%)	(23)	(17)	(15)	

† $Q_{0,75}$ = 49pg/ml

VEGF 165b in Serum (BE 2)*				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Kein Rezidiv	76	17	31	

VEGF 165b in EDTA (BE 2)†				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Kein Rezidiv	66	17	27	

(%)	(78)	(89)	(81)	
Rezidiv	21	2	7	0,525
(%)	(22)	(11)	(19)	

* $Q_{0,75} = 31\text{pg/ml}$

(%)	(81)	(77)	(81)	
Rezidiv	15	5	6	0,895
(%)	(19)	(23)	(19)	

† $Q_{0,75} = 45\text{pg/ml}$

VEGF 165b in Serum (BE 3)*				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Kein Rezidiv	67	14	26	
(%)	(89)	(88)	(84)	
Rezidiv	8	2	5	0,738
(%)	(11)	(12)	(16)	

* $Q_{0,75} = 47\text{pg/ml}$

VEGF 165b in EDTA (BE 3)†				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Kein Rezidiv	41	38	24	
(%)	(91)	(88)	(80)	
Rezidiv	4	5	6	0,355
(%)	(9)	(12)	(20)	

† $Q_{0,75} = 120\text{pg/ml}$

Patientinnen mit niedrigen, mittleren und hohen VEGF 165b-Werten in Serum und EDTA-Plasma unterschieden sich zu keinem Blutentnahmezeitpunkt signifikant in ihrer Rezidivrate (Tabelle 4).

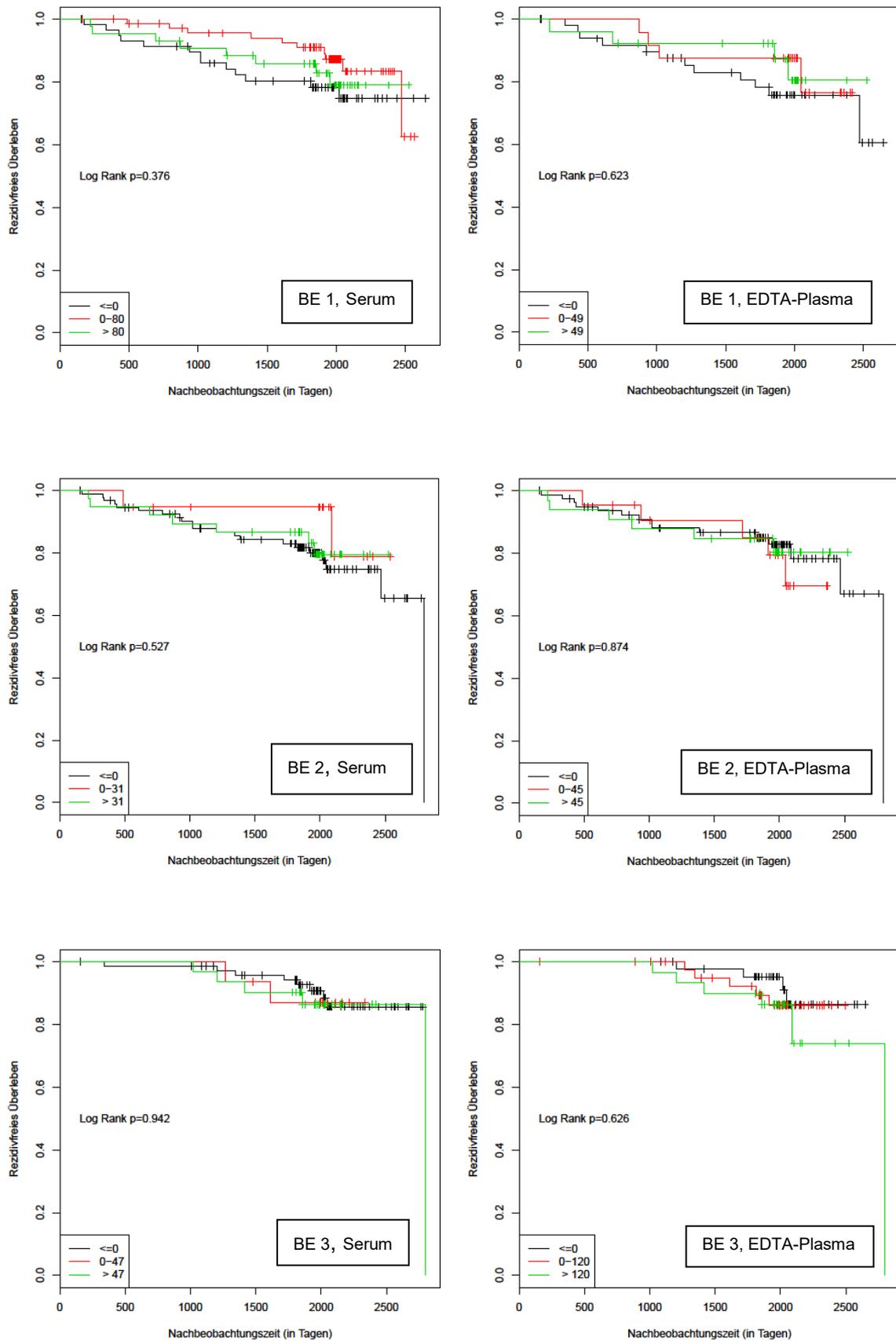
Blutentnahmezeitpunkt eins: 22% (13/60) der Patientinnen mit niedrigen Serumwerten hatten im Verlauf ein Rezidiv, gegenüber 14% (10/73) mit mittleren und 18% (8/44) mit hohen Werten ($p=0,481$). Im EDTA-Plasma entwickelten 23% (12/52) mit niedrigen Werten ein Rezidiv, gegenüber 17% (4/24) mit mittleren und 15% (4/26) mit hohen Werten ($p=0,663$).

Blutentnahmezeitpunkt zwei: 22% (21/97) der Patientinnen mit niedrigen Serumwerten bekamen im Verlauf ein Rezidiv. In der Gruppe mit mittleren Serumwerten waren es 11% (2/19) und in der Gruppe mit hohen Werten 19% (7/38) ($p=0,525$). Im EDTA-Plasma bekamen 19% (15/81) mit niedrigen Werten ein Rezidiv, gegenüber 23% (5/22) mit mittleren und 19% (6/33) mit hohen Werten ($p=0,895$).

Blutentnahmezeitpunkt drei: 11% (8/75) der Patientinnen mit niedrigen Serumwerten erlitten ein Rezidiv, sowie 12% (2/16) mit mittleren und 16% (5/31) mit hohen Werten ($p=0,738$). Im EDTA-Plasma waren es korrespondierend 9% (4/45) mit niedrigen, 12% (5/43) mit mittleren und 20% (6/30) mit hohen Werten ($p=0,355$).

In Abbildung 18 sind die Überlebenskurven für das rezidivfreie Überleben bei Patientinnen mit niedrigen, mittleren und hohen VEGF 165b-Werten in Serum und EDTA-Plasma dargestellt. Es konnte zu keinem Blutentnahmezeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ($p>0,05$, Log Rank-Test).

Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit.



3.7.4 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von VEGF 165b

Tabelle 5: Korrelation des Gesamtüberlebens mit niedrigen (0), mittleren (0- $Q_{0,75}$) und hohen ($>Q_{0,75}$) VEGF 165b-Werten in Serum und EDTA-Plasma zu Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3 (BE 1/2/3).

VEGF 165b in Serum (BE 1)*				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	53 (88)	70 (96)	39 (89)	
Verstorben (%)	7 (12)	3 (4)	5 (11)	0,217

* $Q_{0,75} = 80\text{pg/ml}$

VEGF 165b in EDTA (BE 1)†				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	46 (88)	22 (92)	24 (92)	
Verstorben (%)	6 (12)	2 (8)	2 (8)	0,833

† $Q_{0,75} = 49\text{pg/ml}$

VEGF 165b in Serum (BE 2)*				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	88 (91)	18 (95)	33 (87)	
Verstorben (%)	9 (9)	1 (5)	5 (13)	0,618

* $Q_{0,75} = 31\text{pg/ml}$

VEGF 165b in EDTA (BE 2)†				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	73 (90)	20 (91)	29 (88)	
Verstorben (%)	8 (10)	2 (9)	4 (12)	0,919

† $Q_{0,75} = 45\text{pg/ml}$

VEGF 165b in Serum (BE 3)*				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	75 (100)	16 (100)	30 (97)	
Verstorben (%)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0,228

* $Q_{0,75} = 47\text{pg/ml}$

VEGF 165b in EDTA (BE 3)†				
	0	0 - $Q_{0,75}$	$>Q_{0,75}$	p-Wert
Lebend (%)	45 (100)	43 (100)	29 (97)	
Verstorben (%)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0,228

† $Q_{0,75} = 120\text{pg/ml}$

Patientinnen mit niedrigen, mittleren und hohen VEGF 165b-Werten in Serum und EDTA unterschieden sich zu keinem Blutentnahmezeitpunkt signifikant in ihrer Sterberate (Tabelle 5).

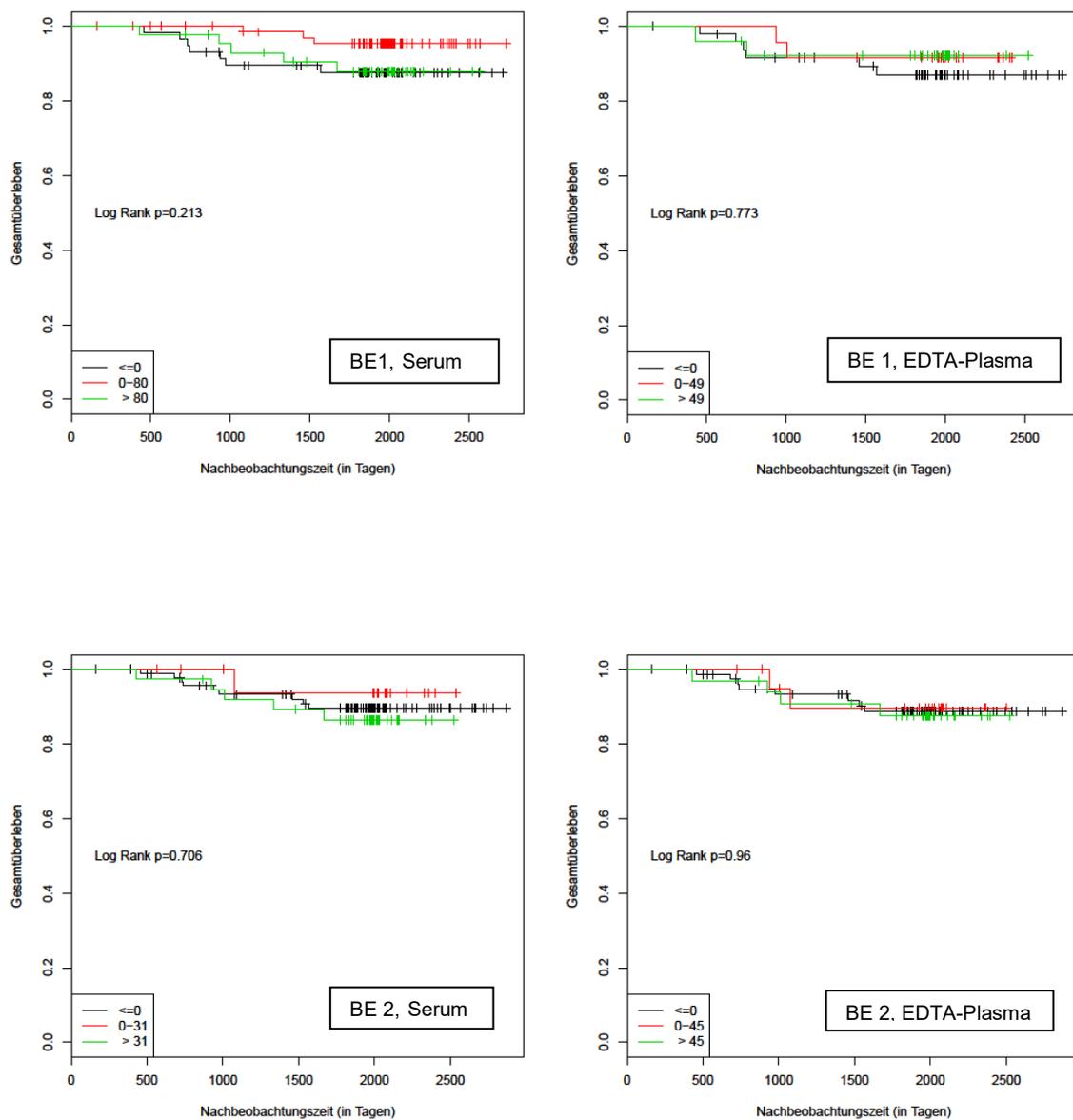
Blutentnahmezeitpunkt eins: 12% (7/60) der Patientinnen mit niedrigen Serumwerten sind im Verlauf verstorben, gegenüber 4% (3/73) mit mittleren und 11% (5/44) mit hohen Werten ($p=0,217$). Im EDTA-Plasma starben 12% (6/52) mit niedrigen Werten, gegenüber 8% (2/24) mit mittleren und 8% (2/26) mit hohen Werten ($p=0,833$).

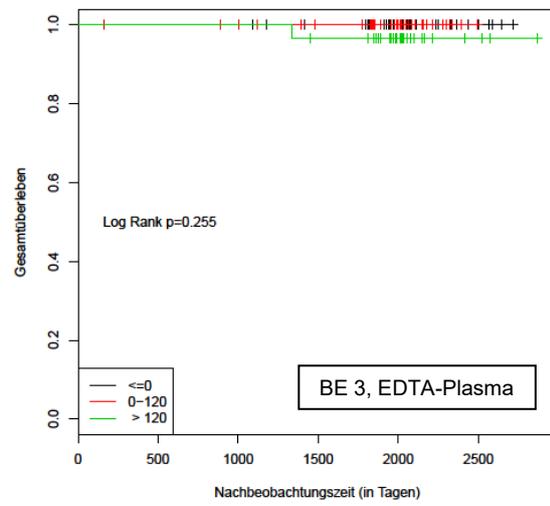
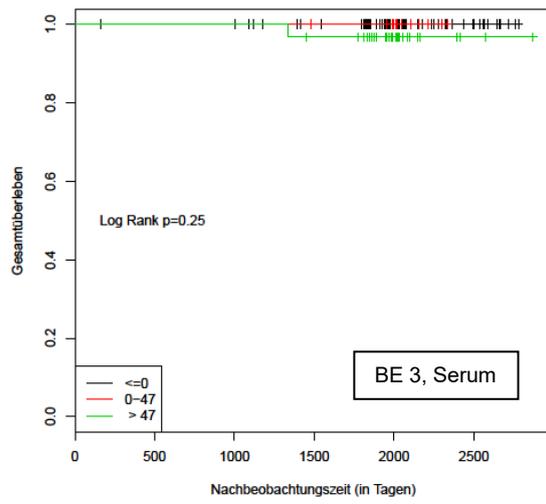
Blutentnahmezeitpunkt zwei: 9% (9/97) der Patientinnen mit niedrigen Serumwerten verstarben im Verlauf. In der Gruppe mit mittleren Serumwerten waren es 5% (1/19) und in der Gruppe mit hohen Werten 13% (5/38) ($p=0,618$). Im EDTA-Plasma sind 10% (8/81) mit niedrigen Werten gestorben, gegenüber 9% (2/22) mit mittleren und 12% (4/33) mit hohen Werten ($p=0,919$).

Blutentnahmezeitpunkt drei: 0% (0/75) der Patientinnen mit niedrigen Serumwerten, sowie 0% (0/16) mit mittleren und 3% (1/30) mit hohen Werten sind verstorben ($p=0,228$). Im EDTA-Plasma waren es korrespondierend 0% (0/45) mit niedrigen, 0% (0/43) mit mittleren und 3% (1/30) mit hohen Werten ($p=0,228$).

In Abbildung 19 sind die Überlebenskurven für das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit niedrigen, mittleren und hohen VEGF 165b-Werten in Serum und EDTA-Plasma dargestellt. Es konnte zu keinem Blutentnahmezeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ($p>0,05$, Log Rank-Test).

Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit.





4 Diskussion

4.1 Fragestellung der Arbeit

Brustkrebs ist in Deutschland das häufigste Malignom und die häufigste Krebstodesursache der Frau. Eine wichtige Voraussetzung für Tumorwachstum und Metastasierung ist die Tumorangiogenese. Die Regulation erfolgt über eine komplexe Interaktion aus stimulierenden und inhibierenden Faktoren. VEGF A gehört zu den fördernden Mediatoren, während VEGF 165b als potentiell antiangiogenetische Spleißvariante angesehen wird (siehe Kapitel 1.2 und 1.3). Beide Faktoren können quantitativ mittels *Sandwich*-ELISA in Blutproben bestimmt werden.

Mehrere experimentelle Arbeiten haben sich bereits mit der Veränderung der VEGF-Expression bei malignen Erkrankungen und insbesondere auch beim Mammakarzinom auseinandergesetzt.

Ein Großteil der erhobenen Messwerte wurde jedoch an Brustkrebspatientinnen vor operativer und adjuvanter Therapie ermittelt.

In den meisten Studien konnten erhöhte VEGF A-Konzentrationen in präoperativen Serum- oder Plasmaproben bei Patientinnen mit primärem Brustkrebs im Vergleich zu gesunden Probandinnen nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1996, Salven et al., 1999b, Adams et al., 2000, Heer et al., 2001, Nishimura et al., 2003, Zhao et al., 2004, Li et al., 2007, Byrne et al., 2007, Konukoglu et al., 2007, Iovino et al., 2008, Berezov et al., 2009, Thielemann et al., 2013). Innerhalb der Karzinomgruppe zeigten Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom signifikant höhere Werte als Patientinnen mit lokoregionalem Brustkrebs (Salven et al., 1997, Kraft et al., 1999, Salven et al., 1999b, Adams et al., 2000, Coskun et al., 2003, Taha et al., 2009, Ali et al., 2011).

Mehrere Hypothesen werden als Ursache dieser Erhöhung diskutiert. Salven, Lowery und Abdel-Mageed propagieren eine hypoxieinduzierte Ausschüttung von VEGF A aus Tumorzellen, tumor-infiltrierenden Zellen und tumorassoziiertem Stroma in die Zirkulation (Salven et al., 1997, Lowery et al., 2008, Abdel-Mageed et al., 2013). Während jedoch eine starke intratumorale VEGF-Expression mit hoher intratumoraler Gefäßdichte und einer schlechten Prognose assoziiert ist (Toi et al., 1995, Byrne et al., 2007), korreliert zirkulierendes VEGF in vielen Studien weder mit intratumoralem VEGF noch mit histopathologischen Tumorcharakteristika (Salven et al., 1999b, Adams et al.,

2000, Byrne and Bundred, 2000, Teh et al., 2004, Byrne et al., 2007, Lowery et al., 2008, Garvin and Dabrosin, 2008, Hodorowicz-Zaniewska et al., 2012). Kut und Stefanini entwickelten mittels eines computergestützten Modells die Theorie, dass ein Großteil des plasmatischen VEGFs bei Tumorpatienten neben den additiven Effekten einer gesteigerten Tumorsekretion und -gefäßpermeabilität durch eine erhöhte Permeabilität gesunder Gewebe als Hauptspeicher intrakorporalem VEGFs bedingt ist (Kut et al., 2007, Stefanini et al., 2008).

Die antiangiogenetische Spleißvariante VEGF 165b wurde das erste Mal von der Arbeitsgruppe um Bates im Jahre 2002 beschrieben (Bates, 2002). Die Studienlage beschränkt sich weitestgehend auf die Untersuchung der Gewebsexpression von VEGF 165b. VEGF 165b wurde als die vorherrschende Isoform in gesundem Gewebe identifiziert, während die Tumorentstehung mit einem Switch zur proangiogenen Isoform einherzugehen scheint (Bates, 2002; Rennel, 2008; Varey, 2008). Bezüglich einer Messung in Blutproben bietet die bisherige Literatur jedoch kaum Informationen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit der Prävalenz von VEGF A und VEGF 165b in Serum- und Plasmaproben von Brustkrebspatientinnen mit histologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen (pN1-3) oder nodal-negativem *high-risk*-Karzinom (siehe Kapitel 2.1.1.2) im postoperativen Verlauf.

Es wurde untersucht, ob sich Patientinnen in Remission in der Verteilung der gemessenen Werte von einem gesunden Vergleichskollektiv unterscheiden. Weiterhin wurde ermittelt, ob sich die Konzentrationen von VEGF A und VEGF 165b während unterschiedlicher Phasen adjuvanter Therapiemaßnahmen verändern. Dafür wurden die Werte nach Operation, nach Chemotherapie, während und gegen Ende endokriner Therapien verglichen. Die unterschiedlichen Blutentnahmezeitpunkte wurden jeweils mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika korreliert, um ihren möglichen Einfluss auf die VEGF-Werteverteilung zu ermitteln.

Bezüglich der Bedeutung von VEGF A als Prognosefaktor bietet die Studienlage teils gegensätzliche Auffassungen. Während Quaranta keine Korrelation zwischen präoperativen Serumspiegeln und der Krankheitsprogression feststellen konnte, waren bei Zhao erhöhte präoperative Werte mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert, bei Ali sogar mit verkürztem Gesamtüberleben (Zhao et al., 2004, Quaranta et al., 2007, Ali et al., 2011).

Diese Arbeit soll zeigen, ob auch erhöhte postoperative VEGF A- und erniedrigte VEGF 165b-Werte als Prognosefaktoren in Bezug auf das rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben geeignet sein könnten.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Auswahl der Mammakarzinompatientinnen und ihrer Kontrollgruppe

Gemessen an anderen VEGF-Studien zum Mammakarzinom weist diese Arbeit eine vergleichbar hohe Fallzahl an Patientinnen (n=205) und gesunden Kontrollen (n=107) auf. Allerdings standen nicht immer alle Patientinnen für die verschiedenen Auswertungen zur Verfügung, da quantitativ nicht immer genug Probenmaterial vorhanden war oder Blutentnahmetermine nicht wahrgenommen wurden. Aufgrund verbundener Stichprobenanalysen für den ermittelten VEGF-Werteverlauf über die Zeit reduziert sich der Datensatz dort nochmals. Die Probensammlung für den Blutentnahmezeitpunkt vier war bei Analyse der Werte noch nicht abgeschlossen. Dieser weist daher nur eine geringe Fallzahl auf und konnte in verbundenen Stichprobenanalysen nicht berücksichtigt werden.

Sowohl die untersuchten Mammakarzinompatientinnen als auch das gesunde Vergleichskollektiv weisen eine ähnliche Altersverteilung auf, obwohl zwischen Serum-VEGF A-Konzentrationen und Alter keine direkte Korrelation zu bestehen scheint (Kraft et al., 1999).

Chung und Byrne fanden jedoch erhöhte VEGF A-Werte in Blutproben von postmenopausalen Frauen, während Thielemann dies nicht bestätigen konnte (Chung et al., 1998, Byrne et al., 2007, Thielemann et al., 2013). Um mögliche Beeinflussungen durch den Menopausenstatus zu minimieren, waren alle Kontrollen in dieser Arbeit prämenopausal, die Mammakarzinompatientinnen größtenteils (180/205). Die Blutentnahme zu verschiedenen Zykluszeitpunkten scheint keinen relevanten Einfluss auf den VEGF A-Gehalt von prämenopausalen Frauen zu haben (Chung et al., 1998, Kraft et al., 1999, McIlhenny et al., 2002, Byrne et al., 2007). Der Zykluszeitpunkt wurde daher nicht beachtet.

Bei allen Patientinnen konnte eine R0-Resektion des Primärtumors erfolgreich durchgeführt werden, Fernmetastasen lagen nicht vor. Befallene axilläre Lymphknoten wurden reseziert oder die Patientinnen wurden durch eine Sentinel-Lymphknoten-

Biopsie für nodal-negativ erklärt. In diesem Fall kann davon ausgegangen werden, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% auch keine nachfolgenden Lymphknoten betroffen sind (Hsueh et al., 1999). Zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten befanden sich somit alle Patientinnen in kompletter Remission ohne mikroskopisch nachweisbare Tumorreste. Eine direkte Beeinflussung der VEGF-Werte durch verbliebene Tumorreste soll so minimiert werden.

Gesteigerte Angiogenese ist mit einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse im menschlichen Körper assoziiert. Insbesondere Schwangerschaft und Wundheilung, sowie chronisch-entzündliche Erkrankungen und Tumore gehen mit einer Überexpression an VEGF A einher (Detmar et al., 1994, Fava et al., 1994, Evans et al., 1997, Kerbel, 2000, Bates and Jones, 2003). Auch die Spleißvariante VEGF 165b scheint bei schwangeren Frauen hochreguliert zu sein (Bills et al., 2009).

Klar definierte Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Kapitel 2.1) sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe sollen den Einfluss dieser Faktoren auf ein Minimum beschränken. Unter regelmäßiger Medikamenteneinnahme waren ausschließlich orale Kontrazeptiva in der Kontrollgruppe gestattet. Macpherson berichtet über eine reduzierte VEGF-Immunoreaktivität im Endometrium durch orale Kontrazeptiva, während Maia keinen Unterschied in der VEGF-Expression nachweisen konnte (Macpherson et al., 1999, Maia et al., 2014). Ob zirkulierendes VEGF durch hormonelle Empfängnisverhütung beeinflusst wird, ist bisher nicht bekannt.

4.2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der *Sandwich*-ELISA stellt ein häufig angewendetes Verfahren zum quantitativen Nachweis von Zytokinen dar. Als kostengünstige und nur gering invasive Methode ist es insbesondere für Routineuntersuchungen geeignet und ermöglicht eine weniger subjektive Auswertung im Vergleich zur immunhistochemischen Bestimmung der VEGF-Expression oder mikroskopischen Beurteilung der Gefäßdichte in Tumoren.

VEGF A und VEGF 165b kann in verschiedenen Kompartimenten mittels ELISA quantifiziert werden. Die Messung im Tumorzytosol bietet den Vorteil einer genauen Kenntnis über die Herkunft des exprimierten VEGF, hat jedoch den Nachteil einer großen Invasivität. Außerdem können die Konzentrationen nur einmalig zum Zeitpunkt der Operation bestimmt werden.

Die Messung in Serum- und Plasmaproben hat den Nachteil, dass die Quelle zirkulierenden VEGFs oft vielfältig ist, da neben Tumoren auch weitere Zellen wie Leukozyten, Mastzellen, Monozyten und Muskelzellen VEGF synthetisieren (Barbera-Guillem et al., 2002, Kut et al., 2007). Allerdings wird die Möglichkeit geboten, den VEGF-Werteverlauf über einen bestimmten Zeitraum zu analysieren und mit möglichen Einflussfaktoren in Zusammenhang zu bringen. Da in dieser Arbeit der Fokus auf den postoperativen Werteverlauf in Relation zu adjuvanten Therapiemaßnahmen gelegt wurde, wurde zirkulierendes VEGF A und VEGF 165b gemessen.

Zur Messung von zirkulierendem VEGF A wurde ein ELISA angewendet, der die löslichen Isoformen VEGF 121, VEGF 165 und VEGF 165b erkennt und keine Kreuzreaktivität oder Interferenz mit rekombinanten menschlichen PlGF, VEGF B, VEGF C und VEGF D aufweist. Die verwendeten Antikörper erkennen jeweils dasselbe Epitop der verschiedenen Isoformen. Daher ist es möglich, dass Inhibitoren, im Speziellen lösliche *Fms-like* Tyrosinkinase-1 (sFLT-1) Rezeptoren, bei hohen Konzentrationen mit dem ELISA interferieren und geringere Messwerte angezeigt werden im Vergleich zu alternativen Messmethoden (Qiu et al., 2009). Varey und Kollegen haben dies näher untersucht und konnten zeigen, dass dieser Effekt zumindest bis zu einer VEGF A-Konzentration von 2000 pg/ml vernachlässigbar ist (Varey et al., 2008). Weiterhin wurde festgestellt, dass der ELISA eine geringere Affinität für VEGF 165b als für VEGF 165 aufweist (Varey et al., 2008, Qiu et al., 2009). Da jedoch sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe der gleiche ELISA-Kit verwendet wurde und somit in beiden Gruppen gleiche Bedingungen und Einflussfaktoren wirkten, wurden diese Umstände nicht weiter berücksichtigt.

Zur Detektion von zirkulierendem VEGF 165b wurde ein ELISA angewendet, der keine Kreuzreaktivität oder Interferenz mit rekombinanten menschlichen VEGF 121, VEGF 162 und VEGF 165 zeigt. Da dieser ELISA verschiedene Epitope desselben Proteins erkennt, ist das Risiko stöchiometrischer Interferenzen gering (Qiu et al., 2009).

Sowohl in der VEGF A- als auch in der VEGF 165b-Messreihe wurde die Validität der erhobenen Werte durch jeweilige Doppelbestimmungen erhöht.

4.3 Interpretation der Messung von VEGF A

Die Konzentrationen von VEGF A und seiner Spleißvariante VEGF 165b wurden sowohl in Serum- als auch in Plasmaproben bestimmt. Innerhalb der Kontrollgruppe wurde jeweils die Verteilung der Werte in Serum, EDTA-, Citrat- und CTAD-Plasma betrachtet, während für die Mammakarzinomgruppe nur Serum und EDTA-Plasma zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten zur Verfügung stand.

Als Blutserum bezeichnet man den klaren Überstand nach abgeschlossener Blutgerinnung und Zentrifugation, das gerinnungsbedingte Veränderungen der Blutzusammensetzung aufweist, beispielsweise durch Freisetzung von Bestandteilen aus Thrombozyten. Die Antikoagulation durch EDTA und Citrat in Plasmaproben ist über die Komplexierung von Kalzium vermittelt, die Thrombozytenaktivierung wird dadurch weitestgehend gehemmt. CTAD-Plasma gewährleistet eine maximale Thrombozytenstabilisierung durch Zugabe von vier Antikoagulantien (Guder and Nolte, 2009, Gressner and Arndt, 2013).

Bereits 1997 hat Mohle in Zellkulturversuchen nachgewiesen, dass Thrombin-aktivierte Thrombozyten VEGF A freisetzen (Mohle et al., 1997). Banks entdeckte deutlich höhere VEGF A-Konzentrationen im Serum verglichen mit Citrat-Plasma bei gesunden Probanden (Banks et al., 1998). Er konnte zeigen, dass dieser Unterschied darauf beruht, dass VEGF A verstärkt aus aktivierten Thrombozyten während des Gerinnungsvorgangs im Serum freigesetzt wird. Verheul konnte dies auch für Krebspatienten nachweisen (Verheul et al., 1997).

Auch in dieser Arbeit fanden sich deutliche Unterschiede in der VEGF A-Werte Verteilung zwischen Serum- und Plasmaproben. Sowohl gesunde Probandinnen als auch Mammakarzinompatientinnen wiesen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten signifikant höhere VEGF A-Konzentrationen im Serum auf und bestätigen damit frühere Ergebnisse. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Werte Verteilung zwischen EDTA-, Citrat- und CTAD- Plasmaproben innerhalb der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dies steht den Ergebnissen zweier anderer Arbeiten entgegen, die im CTAD-Plasma deutlich niedrigere Konzentrationen an VEGF A nachweisen konnten im Vergleich zu Citrat-Plasma, bedingt durch unterschiedlich ausgeprägte Thrombozytenaktivierung während der Probenaufbereitung (Wynendaele et al., 1999, Dittadi et al., 2001). Der fehlende Unterschied zwischen CTAD-Plasma und den anderen Plasmaproben in dieser Arbeit könnte dadurch erklärt werden, dass viele Probandinnen bereits im EDTA- und Citrat-Plasma Messkonzentrationen im niedrigen

nicht mehr quantifizierbaren Bereich aufwiesen. In EDTA- und Citrat-Plasma ist jedoch eine etwa gleich starke Thrombozytenstabilisation gewährleistet und es kann von einer gleichartigen VEGF A-Werte-Verteilung ausgegangen werden.

Bisher konnte trotz zahlreicher Studien noch nicht geklärt werden, welches Probenmedium das optimalste zur Bestimmung der VEGF A-Werte ist und die beste prognostische Information unter Widerspiegelung der tumorbedingten Veränderungen im Körper wiedergibt. Während im Plasma hauptsächlich das frei zirkulierende VEGF A gemessen wird, enthält Serum sowohl frei zirkulierendes VEGF A als auch VEGF A aus Thrombozyten (Kut et al., 2007). Da VEGF A im Serum in hohem Maße während des Gerinnungsprozesses freigesetzt wird und mit der Höhe der Thrombozytenanzahl korreliert (Verheul et al., 1997, Salven et al., 1999a, Dittadi et al., 2001, Benoy et al., 2002, Caine et al., 2004), wurde Serum von einigen Autoren als ungeeignet betrachtet (Verheul et al., 1997, Wynendaele et al., 1999).

Allerdings konnte in vielen durchgeführten Studien dennoch nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit primärem Mammakarzinom erhöhte Serum-VEGF A-Werte aufweisen im Vergleich zu gesunden Probanden (siehe Kapitel 4.1). In dieser Arbeit konnte dies auch für den postoperativen Verlauf gezeigt werden, wo sich erst fünf Jahre nach Primärdiagnose die Werte-Verteilung im Serum wieder der Kontrollgruppe angleich. Dies ist wohl nicht allein durch die Thrombozytenanzahl zu erklären. Denn mehrere Autoren fanden zudem erhöhte VEGF A-Level pro Thrombozyt bei Krebspatienten und postulierten, dass auch Serum-VEGF A-Level die Tumorbiologie widerspiegeln (Salven et al., 1999a, Lee et al., 2000, Caine et al., 2004). In dieser Arbeit hatten Mammakarzinompatientinnen neben signifikant höheren Serumwerten auch erhöhte EDTA-Plasmawerte im postoperativen Verlauf, sowie zu allen weiteren Blutentnahmezeitpunkten. Vermutlich setzen sich die erhöhten Serumwerte aus der Summe von erhöhtem frei zirkulierendem VEGF A im Plasma und einer erhöhten Ausschüttung pro Thrombozyt in Abhängigkeit der Thrombozytenzahl zusammen.

Trotz der bestehenden Unterschiede in der VEGF A-Werte-Verteilung zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Probandinnen grenzen sich beide Gruppen nicht vollständig voneinander ab. Ursächlich ist eine breite Streuung der individuellen Werte in beiden Gruppen, die auch in nahezu allen bisherigen VEGF-Studien beobachtet werden konnte. Auffällig ist, dass auch einige gesunde Probandinnen sehr hohe VEGF A-Werte aufwiesen. Inwieweit diese Werte eine

Normvariante darstellen oder durch pathologische Prozesse, wie beispielsweise einer Thrombozytose beeinflusst wurden, ist unklar. Auch Interaktionen zwischen dem ELISA und Blutbestandteilen können nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit der VEGF A-Werteverlauf an einer verbundenen Stichprobe von Mammakarzinompatientinnen zu verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten nach kurativer Operation in Serum und EDTA-Plasmaproben bestimmt.

Bereits die Ergebnisse an einem unverbundenen Stichprobenkollektiv zeigten, dass die VEGF A-Werte der Patientinnen in Remission sowohl in Serum- als auch in Plasmaproben gegenüber der Kontrollgruppe über die ersten drei Blutentnahmezeitpunkte erhöht waren. Fünf Jahre nach Chemotherapie waren die Werte gesunken, im Plasma jedoch noch immer signifikant, im Serum nur noch tendenziell erhöht.

Mehrere Studien konnten anhand von Serumproben zeigen, dass postoperative VEGF A-Werte von Mammakarzinompatientinnen signifikant gegenüber präoperativen absinken (Yamamoto et al., 1996, Zhao et al., 2004, Konukoglu et al., 2007). Teh und Abdel-Mageed konnten dies auch für Plasma belegen (Teh et al., 2004, Abdel-Mageed et al., 2013). Im Vergleich zu gesunden Probandinnen waren die Werte jedoch immer noch erhöht, was auch in dieser Arbeit festgestellt wurde. Die Blutproben der oben genannten Studien wurden in einem engen Zeitraum, drei bis vier Wochen nach Operation, vor adjuvanter Therapie gewonnen. In dieser Arbeit erfolgte die erste Blutentnahme in einem weiter gefassten Zeitraum kurz nach Operation bis vor Beginn der Chemotherapie, sodass nicht ganz auszuschließen ist, dass vor allem die Werte kurz nach Operation durch Wundheilungsprozesse beeinflusst wurden (Hornbrey et al., 2003, Karayiannakis et al., 2003, Curigliano et al., 2005, Bao et al., 2009).

Die zweite Blutentnahme fand nach abgeschlossener Chemotherapie (FEC-Schema) in einem Zeitraum bis zu 28 Tage nach dem letzten Chemotherapiezyklus und vor Beginn endokriner Therapiemaßnahmen statt. Im Vergleich zur Messung vor Chemotherapie änderte sich die VEGF A-Werteverteilung im EDTA-Plasma nicht, während die Werte im Serum signifikant angestiegen waren. Verheul konnte an einem Kollektiv von Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Brustkrebs beobachten, dass die Serum-VEGF A-Level wenige Tage nach Beginn eines jeden adjuvanten Chemotherapiezyklus abgefallen waren, um am Tag 15-20 signifikant gegenüber den

Ausgangswerten anzusteigen. Die VEGF A-Werte änderten sich koinzident mit der Thrombozytenanzahl (Verheul et al., 1997). Möglicherweise sind die angestiegenen Serumwerte in dieser Arbeit Ausdruck einer reaktiven Thrombozytose nach initialem Abfall während der Chemotherapie. Da sich im Plasma keine signifikanten Änderungen in der Werteverteilung nach der Chemotherapie ergaben, ist dies womöglich das genauere und geeignetere Probenmedium. Auch Kirwan erhielt ähnliche Resultate. Allerdings stiegen die Serum-VEGF-A Level nach initialem Abfall kurz nach Chemotherapie nur tendenziell gegenüber den Ausgangswerten an (Kirwan et al., 2009).

Bezüglich möglicher Auswirkungen der Chemotherapie auf die VEGF A-Werteverteilung im Plasma gibt es unterschiedliche Autorenmeinungen. Abdel-Mageed konnte an einem Kollektiv von Patientinnen mit duktalem Mammakarzinom im Stadium II zeigen, dass die VEGF A-Werte im Plasma vier Wochen nach Radiochemotherapie signifikant gegenüber postoperativen Werten gesunken waren (Abdel-Mageed et al., 2013). Kirwan hingegen fand erhöhte Werte acht Tage und 3 Monate nach Chemotherapie bei Patientinnen mit frühem Mammakarzinom (Kirwan et al., 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen am ehesten den Beobachtungen von Kummel, der auch keine Änderung in der Werteverteilung nodal-positiver Patientinnen vor und nach Chemotherapie feststellen konnte (Kummel et al., 2006). Aufgrund der wenigen und unterschiedlichen Studienergebnisse wären weitere Untersuchungen mit einheitlicheren Ein- und Ausschlusskriterien sowie vergleichbareren Blutentnahmezeitpunkten wünschenswert.

Zwei Jahre nach Chemotherapie, zum Zeitpunkt drei der Blutentnahme, sind die durchschnittlichen VEGF A-Werte im Serum gefallen und befanden sich wieder auf dem Niveau kurz nach Operation, während sich in der Werteverteilung im Plasma kaum Änderungen ergaben. Tendenziell waren die Werte jedoch leicht gegenüber der ersten Blutentnahme erhöht. Möglicherweise ist diese anhaltende Werteerhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe Ausdruck immer noch bestehender krankheitsbedingter Veränderungen in der Expression oder Freisetzung von zirkulierendem VEGF A.

Allerdings ist zu beachten, dass in einigen Studien auch das Antiöstrogen Tamoxifen einen Einfluss auf die VEGF A-Werte im Blutkompartiment zu haben scheint. Sowohl unter neoadjuvanten als auch unter adjuvanten Bedingungen wiesen Patientinnen mit Tamoxifen signifikant höhere VEGF A-Werte im Serum auf im Vergleich zu ihren Vorwerten oder Patientinnen ohne Tamoxifen (Adams et al., 2000, Banerjee et al., 2008, Holmes et al., 2008). Als Ursache kommt eine gesteigerte Freisetzung aus

Thrombozyten in Betracht. Adams fand erhöhte Werte auch im Plasma, während Holmes dies nicht bestätigen konnte (Adams et al., 2000, Holmes et al., 2008). In dieser Arbeit erhielten alle hormonrezeptorpositiven Patientinnen Tamoxifen zum Zeitpunkt drei der Blutentnahme, sodass eine Beeinflussung der Werte nicht auszuschließen ist. Aromataseinhibitoren scheinen jedoch keinen relevanten Einfluss auf zirkulierendes VEGF A auszuüben (Banerjee et al., 2008, Holmes et al., 2008).

Zum Zeitpunkt vier der Blutentnahme, fünf Jahre nach Chemotherapie, waren die endokrinen Therapiemaßnahmen weitestgehend abgeschlossen und die VEGF A-Werte waren gesunken. Im Plasma fand sich noch eine signifikante Erhöhung gegenüber dem Normalkollektiv, im Serum nur noch tendenziell. Stathopoulos konnte feststellen, dass sich die Plasmawerte von Patientinnen, die sich seit 5-20 Jahren in Remission befinden, nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden (Stathopoulos et al., 2010).

Die postoperativen Verlaufsbeobachtungen in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sich die VEGF A-Werte wohl erst langsam über einen längeren Zeitraum wieder normalisieren. Mögliche Beeinflussungen durch adjuvante Therapiemaßnahmen müssen jedoch in Betracht gezogen werden.

Die genauen Ursachen der postoperativen Abweichungen von zirkulierendem VEGF A und VEGF 165b gegenüber der gesunden Kontrollgruppe sind noch weitgehend unbekannt. Eine direkte Beeinflussung postoperativer Werte durch das resezierte Tumorgewebe selbst ist unwahrscheinlich, da die Halbwertszeit zirkulierenden VEGF's im Minutenbereich liegt (Yang et al., 1998, Kut et al., 2007). Endogenes VEGF im Blutkreislauf ist somit höchst wahrscheinlich das Resultat kontinuierlicher Synthese und Freisetzung. Weiterhin ist seit längerem bekannt, dass es sich bei Brustkrebs nicht allein um ein lokoregionales Geschehen handelt, sondern vielmehr auch um eine systemisch determinierte Erkrankung im Sinne der Fisher-Doktrin (Travis, 2005). Bisher unbekannte molekulare Mechanismen könnten möglicherweise für die veränderte Expression verantwortlich sein.

4.4 Interpretation der Messung von VEGF 165b

Die Spleißvariante VEGF 165b wird als antiangiogenetisch angesehen, da sie die VEGF 165- induzierte Angiogenese im Tiermodell inhibieren kann (Woolard et al., 2009). Die Hochregulation proangiogener Isoformen in Tumoren geht mit einem Verlust der Balance zwischen den Isoformen einher. Die Gewebsexpression von VEGF 165b ist daher in vielen epithelialen Tumoren herunterreguliert (Peiris-Pages, 2012). Entgegen dieser weit verbreiteten These steht die Studie von Catena, der VEGF 165b als schwach angiogene Isoform beschreibt und eine gesteigerte Gewebsexpression von VEGF 165b im infiltrierenden duktalem Mammakarzinom zeigen konnte (Catena et al., 2010).

Bezüglich einer Messung von zirkulierendem VEGF 165b gibt es bisher kaum Studien, da erst seit kurzem ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit der Firma R&D zur Verfügung steht. In dieser Arbeit wurde erstmals die VEGF-165b Werteverteilung bei Mammakarzinompatientinnen in Blutproben analysiert. In der Literatur findet sich eine Studie, in der VEGF 165b in 23 Blutproben gesunder Individuen gemessen wurde (Woolard et al., 2004) und eine Studie zu VEGF 165b bei Präeklampsiepatientinnen (Bills et al., 2009). Beide Studien beziehen sich nur auf die Messung in EDTA-Plasma. Die Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit wird sich ebenfalls vorwiegend mit der Messung im EDTA-Plasma beschäftigen, da einige Anhaltspunkte bestehen, dass Serum, Citrat- und CTAD-Plasma ungeeignet sein könnten.

Innerhalb der Kontrollgruppe liegt die VEGF 165b- Werteverteilung im EDTA-Plasma signifikant über den Messwerten in anderen Probenmedien, in denen viele Probandinnen überhaupt keine messbaren Werte (0) aufwiesen [Häufigkeit nicht messbarer Werte: 63% im Serum, 59% in Citrat, 59% in CTAD vs. 34% in EDTA, siehe Kapitel 3.4.2]. Auch innerhalb der Mammakarzinomgruppe haben Patientinnen zum Blutentnahmezeitpunkt zwei und drei tendenziell bzw. signifikant höhere Messwerte im EDTA-Plasma, während im Serum wiederum viele Personen keine messbaren Werte aufwiesen [Häufigkeit nicht messbarer Werte im Serum: 63% bei Blutentnahme zwei, 62% bei Blutentnahme drei, siehe Kapitel 3.3.2]. Völlig anders stellen sich die Ergebnisse zum Zeitpunkt eins der Blutentnahme dar. Überraschenderweise waren dort die Serumwerte signifikant höher, obwohl zwischen Blutentnahmezeitpunkt eins und zwei im EDTA-Plasma keine signifikanten Unterschiede in der Werteverteilung bestanden. Aufgrund der fehlenden Literatur zu Messungen im Serum und der widersprüchlichen Ergebnisse, die eine Kontamination der Serumproben zum Zeitpunkt eins der Blutentnahme oder eine generelle Interaktion des ELISAs mit

Serumbestandteilen nicht ausschließen, wurde der weitere Schwerpunkt auf EDTA-Plasma gelegt.

Auch die Ergebnisse der VEGF 165b-Messung zeigen eine ausgeprägte interindividuelle Streuung der Messwerte sowohl in der Mammakarzinom- als auch in der Kontrollgruppe. Von den 95 untersuchten gesunden Probandinnen wiesen 34% (32/95) keine messbaren Werte im EDTA-Plasma auf, während es bei Woolard sogar 48% (11/23) waren (Woolard et al., 2004). Dies ist insofern erstaunlich, da VEGF 165b als die vorherrschende Isoform in gesundem Gewebe identifiziert wurde (Qiu et al., 2009). Möglicherweise spielt VEGF 165b eher eine Rolle als lokal verfügbarer Mediator. Als Ursache muss jedoch auch eine niedrige Sensitivität des ELISAs in Betracht gezogen werden. Die Konzentrationsmaxima erstreckten sich bei Woolard bis in den dreistelligen Bereich (Max. 452 pg/ml), in dieser Arbeit sogar bis in den vierstelligen Bereich (Max. 1354 pg/ml). Drei gesunde Probandinnen und fünf Mammakarzinompatientinnen wiesen so hohe Messwerte auf, dass sie mittels ELISA-Reader nicht mehr quantifizierbar waren.

Trotz der breiten Streuung der individuellen Messwerte konnten Unterschiede zwischen Mammakarzinompatientinnen in Remission und gesunden Probandinnen gefunden werden. Während Mammakarzinompatientinnen zum Zeitpunkt eins der Blutentnahme signifikant häufiger einen Wert von 0 im EDTA-Plasma aufwiesen, bestand zum Zeitpunkt zwei sogar ein signifikanter Unterschied in der generellen Verteilung der Messwerte: Mammakarzinompatientinnen hatten durchschnittlich niedrigere Werte als die Kontrollgruppe. Im Vergleich der beiden Blutentnahmezeitpunkte untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede in der Werteverteilung festgestellt werden.

Erst zwei Jahre nach Operation, zum Zeitpunkt drei der Blutentnahme, waren die Werte der Patientinnen dann signifikant gegenüber den ersten beiden Blutentnahmezeitpunkten angestiegen und unterschieden sich in ihrer Verteilung nicht mehr von der Kontrollgruppe. Interessanterweise lag das 75%-Quantil der Messwerte der Mammakarzinompatientinnen nun sogar deutlich über dem der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse dieser Arbeit äußern den Verdacht, dass es vor allem im frühen postoperativen Verlauf, trotz großer individueller Streuungen der Messwerte, Unterschiede zwischen gesunden Probandinnen und Mammakarzinompatientinnen gibt. Inwiefern supprimierte Werte Ausdruck der Erkrankung sind oder durch

Wundheilung und Chemotherapie beeinflusst wurden, ist bisher nicht bekannt, sollte aber in weiterführenden Studien untersucht werden. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu stützen, sollte weiterhin die VEGF 165b-Werteverteilung von Mammakarzinompatientinnen anhand präoperativer Plasmaproben bestimmt werden. Dies ist besonders unter dem Gesichtspunkt interessant, dass die Expression von VEGF 165b in vielen Tumorgewebearten herunterreguliert ist (Woolard et al., 2004, Pritchard-Jones et al., 2007, Diaz et al., 2008, Peiris-Pages et al., 2010).

Die Identifizierung geeigneter prädiktiver Marker für eine Therapie mit Angiogenesehemmern stellt ein weiteres zukünftiges Forschungsziel dar. Bates konnte bereits am Modell des metastasierten Kolonkarzinoms zeigen, dass ein niedriges Expressionsverhältnis von [VEGF 165b/VEGF gesamt] die Behandlungseffektivität von Bevacizumab steigert (Bates et al., 2012). Ob sich zirkulierendes VEGF 165b als Surrogatmarker für die Stratifizierung von Patientinnen bezüglich eines Therapieansprechens auf Bevacizumab eignet, müssen zukünftige Studien zeigen.

4.5 Prognostische Relevanz von VEGF A und VEGF 165b

Die histopathologischen Tumorcharakteristika axillärer Lymphknotenbefall, Hormonrezeptorstatus, Tumorgröße, histologischer Subtyp, Grading und Her2/neu-Rezeptorstatus stellen etablierte Prognosefaktoren dar (Goldhirsch et al., 2005).

In den meisten durchgeführten VEGF-Studien korrelierten präoperativ gemessene VEGF A-Werte von Mammakarzinompatientinnen nicht mit diesen histopathologischen Tumorcharakteristika (Salven et al., 1999b, Adams et al., 2000, Byrne and Bundred, 2000, Lantzsch et al., 2002, Teh et al., 2004, Byrne et al., 2007, Quaranta et al., 2007, Lowery et al., 2008, Hodorowicz-Zaniewska et al., 2012). Yamamoto fand hingegen höhere VEGF A-Serumwerte bei Tumoren > 2 cm im Vergleich zu Tumoren < 2 cm (Yamamoto et al., 1996). Bei Berezov korrelierten erhöhte Serumwerte invers mit dem Differenzierungsgrad des Tumors, jedoch nicht mit dem Hormonrezeptorstatus und bei Ali waren erhöhte Serumwerte mit niedrigem Differenzierungsgrad, großen Tumoren, positivem Lymphknotenstatus und negativem Hormonrezeptorstatus assoziiert (Berezov et al., 2009, Ali et al., 2011). Aggressive Her-2/neu- überexprimierende Tumore weisen eine gesteigerte intratumorale VEGF-Expression auf im Vergleich zu Her2/neu-negativen Tumoren (Konecny et al., 2004), jedoch keine signifikant höheren Werte in der Blutzirkulation (Hodorowicz-Zaniewska et al., 2012). Salven und Heer fanden höhere VEGF A-Werte bei Patientinnen mit duktalem Mammakarzinom im

Vergleich zu Patientinnen mit lobulärem Karzinom, bei Berezov war es jedoch genau umgekehrt (Salven et al., 1999b, Heer et al., 2001, Berezov et al., 2009).

Im Einklang mit den meisten präoperativen Studien korrelieren auch postoperativ bestimmte VEGF A-Werte nicht mit klinisch-pathologischen Charakteristika. Bei Sancak bestand keine Assoziation zwischen VEGF A-Serumwerten von Patientinnen vier Wochen nach Chemotherapie und der ehemaligen TumorgroÙe, dem Differenzierungsgrad, dem Hormonrezeptorstatus oder dem Krankheitsstadium (Sancak et al., 2004). Auch in dieser Arbeit konnte anhand eines multiplen linearen Regressionsmodells ermittelt werden, dass weder die TumorgroÙe, noch der axilläre Lymphknotenbefall, der Hormonrezeptorstatus, der histologische Subtyp, der Differenzierungsgrad oder der Her2/neu-Rezeptorstatus einen Einfluss auf die postoperative VEGF A- und VEGF 165b-Werteverteilung von Patientinnen in Remission haben.

Eine erhöhte VEGF A-Expression im Tumorgewebe von Mammakarzinompatientinnen ist in mehreren Studien mit einer verkürzten rezidivfreien Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit sowie mit einer reduzierten Ansprache auf adjuvante Therapiemaßnahmen assoziiert (Toi et al., 1994, Gasparini et al., 1997, Linderholm et al., 1998, Gasparini et al., 1999, Linderholm et al., 2000, Toi et al., 2001, Foekens et al., 2001, Manders et al., 2002, Berns et al., 2003). In multivariaten Analysen zeigte sich die VEGF A-Expression als ein unabhängiger Prognosefaktor für rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben in nodal-negativen und -positiven Tumoren.

Wenige Studien haben bisher den Stellenwert von zirkulierendem VEGF A als Prognoseparameter untersucht und kamen zu teils unterschiedlichen Auffassungen. Während bei Berezov Patientinnen mit einem späteren Rezidivgeschehen signifikant höhere präoperative Serumwerte hatten als Patientinnen ohne Rezidiv, so konnte bei Quaranta kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Quaranta et al., 2007, Berezov et al., 2009). Ali und Kollegen konnten zeigen, dass Patientinnen mit nicht-metastasiertem Brustkrebs und hohen präoperativen VEGF A-Werten im Serum eine verkürzte rezidivfreie Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit sowohl in univariaten, als auch in multivariaten Analysen aufwiesen (Ali et al., 2011). Nishimura fand eine verkürzte rezidivfreie Überlebensrate hingegen nur bei postmenopausalen Patientinnen (Nishimura et al., 2003).

Bei Zhao waren nicht nur erhöhte präoperative Serumwerte mit verkürzter rezidivfreier Überlebenszeit assoziiert, sondern auch erhöhte postoperative Werte, drei Wochen nach Operation. In multivariaten Analysen stellte VEGF A jedoch zu keinem der beiden Blutentnahmezeitpunkte einen unabhängigen Prognosefaktor dar (Zhao et al., 2004). Auch Wu und Kollegen untersuchten die Korrelation von zirkulierendem VEGF A mit Überlebensraten im postoperativen Rahmen, allerdings kurz vor Abschluss adjuvanter Therapiemaßnahmen. An einem Patientenkollektiv afroamerikanischer Patientinnen zeigte sich Plasma-VEGF A in univariaten Analysen als signifikanter Prädiktor für das Gesamtüberleben, in multivariaten Analysen als unabhängiger Prognosefaktor sowohl für rezidivfreies Überleben als auch für das Gesamtüberleben (Wu et al., 2002).

Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Hier unterschieden sich Patientinnen mit hohen, mittleren und niedrigen VEGF A-Werten in Serum- und Plasmaproben weder kurz nach der Operation, noch nach Abschluss der Chemotherapie in ihrer rezidivfreien Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit. Allerdings wiesen Patientinnen mit hohen Serum- und Plasmawerten zwei Jahre nach Operation eine tendenziell kürzere Gesamtüberlebenszeit auf. Es bestand jedoch keine Korrelation mit der rezidivfreien Überlebenszeit in univariaten Analysen. Möglicherweise wurden die Werte durch Wundheilung oder adjuvante Therapiemaßnahmen beeinflusst. Allerdings ist der Vergleich mit den Ergebnissen von Wu, 2002 und Zhao, 2004 aufgrund unterschiedlich gewählter Patientenkollektive, Blutentnahmezeitpunkte und verschieden definierter Cut off-Werte schwierig. Als Ergebnis dieser Untersuchung ist postoperativ gemessenes VEGF A unter den definierten Bedingungen dieser Arbeit eher nicht als Prognosefaktor geeignet.

Über die Bedeutung von zirkulierendem VEGF 165b als Prognosefaktor gibt es bisher keine veröffentlichten Studien. Über die Gewebsexpression von VEGF 165b ist bekannt, dass sie in vielen unterschiedlichen Tumorarten herunterreguliert ist (Pritchard-Jones et al., 2007, Varey et al., 2008, Bills et al., 2009). Einige Tumore weisen jedoch immer noch eine starke Expression von VEGF 165b auf (Qiu et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Tumore, die VEGF 165b überexprimieren, langsamer wachsen und somit eine bessere Prognose aufweisen (Peiris-Pages, 2012).

In dieser Untersuchung stellte sich nun die Frage, ob Patientinnen ohne nachweisbares VEGF 165b im Blut eine schlechtere Prognose aufweisen als Patientinnen mit mittlerem oder hohem Gehalt an VEGF 165b. In einer univariaten Analyse konnte keine Korrelation zwischen postoperativen VEGF 165b-Werten und der

rezidivfreien Überlebenszeit oder Gesamtüberlebenszeit gefunden werden. Da jedoch Patientinnen, die zum Blutentnahmezeitpunkt drei eine Blutprobe abgegeben hatten, im Verlauf eine nur sehr geringe Sterberate aufwiesen, wäre dort auch ein möglicherweise bestehender Zusammenhang nicht aufgedeckt worden. Auch ist nicht bekannt, ob adjuvante Therapiemaßnahmen Einfluss auf die VEGF 165b-Werteverteilung genommen haben und so eventuell bestehende Zusammenhänge verschleiert wurden. Weitere Studien an einem größeren Patientenkollektiv müssen zeigen, ob zirkulierendes VEGF 165b generell als Prognosefaktor ungeeignet ist oder ob lediglich die Blutentnahmezeitpunkte nicht optimal gewählt wurden.

5 Zusammenfassung

Das primäre Mammakarzinom ist das häufigste Malignom der Frau in den westlichen Ländern. Eine wichtige Grundlage für invasives Tumorwachstum ist die Bildung neuer Blutgefäße im Rahmen der Tumorangiogenese. Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) gelten als weitgehend endothelspezifische Mitogene und als Hauptmediatoren im komplexen Prozess der Neoangiogenese. Während VEGF A zu den fördernden Faktoren zählt, wird VEGF 165b als potentiell antiangiogenetische Spleißvariante angesehen.

Die Mehrheit der bisher durchgeführten VEGF-Studien konnte erhöhte VEGF A- Werte in Serum- und Plasmaproben von Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv nachweisen. Die Blutentnahmezeitpunkte wurden allerdings zumeist präoperativ gewählt. Die Wertigkeit von zirkulierendem VEGF A als Prognosefaktor wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Die Studienlage zur Spleißvariante VEGF 165b beschränkt sich bisher weitestgehend auf die Untersuchung der Gewebsexpression. VEGF 165b wurde als die vorherrschende Isoform in gesundem Gewebe identifiziert, während die Expression in vielen epithelialen Tumoren herunterreguliert ist.

Die vorliegende Arbeit befasst sich nun mit der postoperativen Verlaufsanalyse der Wachstumsfaktoren VEGF A und VEGF 165b an Patientinnen mit lokoregionalem Brustkrebs in Relation zu adjuvanten Therapiemaßnahmen. Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz wurden die ermittelten Werte mit klinisch-pathologischen Tumorcharakteristika und Krankheitsverläufen der Patientinnen korreliert.

Dafür wurden Serum- und Plasmaproben von insgesamt 205 Patientinnen in Remission zu verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten (BE) nach operativer Therapie mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untersucht [BE 1: vor Chemotherapie (CTx); BE 2: bis zu 28 Tage nach CTx; BE 3: 2 Jahre nach CTx; BE 4: 5 Jahre nach CTx]. Als Kontrollgruppe diente ein Kollektiv gesunder Probandinnen.

Sowohl innerhalb der Mammakarzinom- als auch innerhalb der Kontrollgruppe konnte eine starke interindividuelle Streubreite der ermittelten Werte für VEGF A und VEGF 165b in den Serum- und Plasmaproben festgestellt werden. Trotzdem wurden Unterschiede in der Werteverteilung gefunden.

Die untersuchten Brustkrebspatientinnen wiesen zu den ersten drei Blutentnahmezeitpunkten signifikant höhere VEGF A-Konzentrationen im Serum und EDTA-Plasma auf im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,0001$ für die Blutentnahmezeitpunkte 1-3 in Serum und EDTA-Plasma). Nach fünf Jahren (BE 4) haben sich ihre Werte denen der Kontrollgruppe angenähert, sind im Plasma jedoch immer noch signifikant ($p = 0,007$), im Serum nur noch tendenziell erhöht ($p = 0,052$). Die Serumkonzentrationen waren dabei zu allen Blutentnahmezeitpunkten signifikant höher als die korrespondierenden Plasmawerte ($p < 0,0001$ in der Mammakarzinomgruppe für Blutentnahmezeitpunkt 1-4 und $p < 0,0001$ in der Kontrollgruppe). In der Verlaufsanalyse fanden sich im Serum kurz nach Chemotherapie (BE 2) erhöhte VEGF A-Werte gegenüber Blutentnahmezeitpunkt eins ($p = 0,002$) und drei ($p = 0,005$).

Für die VEGF 165b-Messung bestehen Anhaltspunkte, dass EDTA-Plasma als Medium besser geeignet ist als Serum. Zum Blutentnahmezeitpunkt eins bestand kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Plasmawerte zwischen der Mammakarzinom- und der Kontrollgruppe ($p = 0,202$), jedoch wiesen deutlich mehr Patientinnen einen nicht messbaren Wert (0) auf ($p = 0,030$). Der Blutentnahmezeitpunkt zwei zeigte dann allgemein niedrigere Werte in der Karzinomgruppe ($p = 0,040$). Bereits zwei Jahre nach Chemotherapie (BE 3) sind die VEGF 165b-Werte signifikant gegenüber den Vorwerten angestiegen ($p < 0,0001$) und unterschieden sich in ihrer Verteilung nicht mehr von der Kontrollgruppe ($p = 0,202$).

Weder die gemessenen VEGF A- noch die VEGF 165b-Werte korrelierten mit histopathologischen Tumorcharakteristika (axillärer Lymphknotenbefall, Hormonrezeptorstatus, Tumorgröße, histologischer Subtyp, Differenzierungsgrad, HER2/neu-Rezeptorstatus) in Regressionsanalysen ($p > 0,05$). Auch unterschieden sich Patientinnen mit hohen, mittleren und niedrigen VEGF A- bzw. VEGF 165b-Werten zu keinem Blutentnahmezeitpunkt relevant in ihrem rezidivfreien Überleben oder Gesamtüberleben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Wachstumsfaktorkonzentrationen nach Resektion des Primärtumors erst über einen längeren Zeitraum wieder der Werteverteilung eines Normalkollektives nähern. Die Unterschiede waren in der VEGF A-Messung stärker ausgeprägt als in der VEGF 165b-Messung, weswegen insbesondere für VEGF 165b weitere Untersuchungen unter Berücksichtigung adjuvanter Therapieeinflüsse wünschenswert wären. Als Prognosefaktoren scheinen postoperativ gemessene VEGF A- und VEGF-165b-Werte wenig aussagekräftig zu sein.

6 Literaturverzeichnis

1998. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*, 351, 1451-67.
- ABDEL-MAGEED, K. A., ABDEL-AZEZ, M. A., ABDEL-BASET, H. A., MOHAMMED, O. A., BAKHEET, M. Y., MOHAMMED, E. F., ABDEL-HAFEEZ, H. A., ABDEL-AAL, A. M. & HAMED, A. M. 2013. Value of Vascular Endothelial Growth Factor, Nitric Oxide and Endostatin Measurement in Follow up of Cancer Breast Patients. *Life Sci J*, 10, 371-8.
- ADAMS, J., CARDER, P. J., DOWNEY, S., FORBES, M. A., MACLENNAN, K., ALLGAR, V., KAUFMAN, S., HALLAM, S., BICKNELL, R., WALKER, J. J., CAIRNDUFF, F., SELBY, P. J., PERREN, T. J., LANSDOWN, M. & BANKS, R. E. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res*, 60, 2898-905.
- ALI, E. M., SHETA, M. & EL MOHSEN, M. A. 2011. Elevated serum and tissue VEGF associated with poor outcome in breast cancer patients. *AJM*, 47, 217-24.
- BANERJEE, S., PANCHOLI, S., A'HERN, R., GHAZOU, Z., SMITH, I. E., DOWSETT, M. & MARTIN, L. A. 2008. The effects of neoadjuvant anastrozole and tamoxifen on circulating vascular endothelial growth factor and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 2656-63.
- BANKS, R. E., FORBES, M. A., KINSEY, S. E., STANLEY, A., INGHAM, E., WALTERS, C. & SELBY, P. J. 1998. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer*, 77, 956-64.
- BAO, P., KODRA, A., TOMIC-CANIC, M., GOLINKO, M. S., EHRLICH, H. P. & BREM, H. 2009. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*, 153, 347-58.
- BARBERA-GUILLEM, E., NYHUS, J. K., WOLFORD, C. C., FRIECE, C. R. & SAMPSEL, J. W. 2002. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res*, 62, 7042-9.
- BATES, D. O., CATALANO, P. J., SYMONDS, K. E., VAREY, A. H., RAMANI, P., O'DWYER, P. J., GIANTONIO, B. J., MEROPOL, N. J., BENSON, A. B. & HARPER, S. J. 2012. Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Clin Cancer Res*, 18, 6384-91.
- BATES, D. O., CUI, T. G., DOUGHTY, J. M., WINKLER, M., SUGIONO, M., SHIELDS, J. D., PEAT, D., GILLATT, D. & HARPER, S. J. 2002. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 62, 4123-31.
- BATES, D. O. & JONES, R. O. 2003. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, 2, 107-20.
- BATES, D. O., MACMILLAN, P. P., MANJALY, J. G., QIU, Y., HUDSON, S. J., BEVAN, H. S., HUNTER, A. J., SOOTHILL, P. W., READ, M., DONALDSON, L. F. & HARPER, S. J. 2006. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxx, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (Lond)*, 110, 575-85.
- BENJAMIN, L. E., GOLIJANIN, D., ITIN, A., PODE, D. & KESHET, E. 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest*, 103, 159-65.
- BENOY, I., SALGADO, R., COLPAERT, C., WEYJTJENS, R., VERMEULEN, P. B. & DIRIX, L. Y. 2002. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*, 2, 311-5.

- BEREZOV, T. T., OVCHINNIKOVA, L. K., KUZNETSOVA, O. M., KARABEKOVA, Z. K., VOROTNIKOV, I. K., TULEUOVA, A. A., KATUNINA, A. I. & DVOROVA, E. K. 2009. Vascular endothelial growth factor in the serum of breast cancer patients. *Bull Exp Biol Med*, 148, 419-24.
- BERGER, D. P., HERBSTTRITT, L., DENGLER, W. A., MARME, D., MERTELSMANN, R. & FIEBIG, H. H. 1995. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies. *Ann Oncol*, 6, 817-25.
- BERNS, E. M., KLIJN, J. G., LOOK, M. P., GREBENCHTCHIKOV, N., VOSSSEN, R., PETERS, H., GEURTS-MOESPOT, A., PORTENGEN, H., VAN STAVEREN, I. L., MEIJER-VAN GELDER, M. E., BAKKER, B., SWEEP, F. C. & FOEKENS, J. A. 2003. Combined vascular endothelial growth factor and TP53 status predicts poor response to tamoxifen therapy in estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*, 9, 1253-8.
- BERTOLINI, F., MARIGHETTI, P. & SHAKED, Y. 2010. Cellular and soluble markers of tumor angiogenesis: from patient selection to the identification of the most appropriate postresistance therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1806, 131-7.
- BILLS, V. L., VARET, J., MILLAR, A., HARPER, S. J., SOOTHILL, P. W. & BATES, D. O. 2009. Failure to up-regulate VEGF165b in maternal plasma is a first trimester predictive marker for pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)*, 116, 265-72.
- BORG, A., TANDON, A. K., SIGURDSSON, H., CLARK, G. M., FERNO, M., FUQUA, S. A., KILLANDER, D. & MCGUIRE, W. L. 1990. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res*, 50, 4332-7.
- BYRNE, G. J. & BUNDRED, N. J. 2000. Surrogate markers of tumoral angiogenesis. *Int J Biol Markers*, 15, 334-9.
- BYRNE, G. J., MCDOWELL, G., AGARAWAL, R., SINHA, G., KUMAR, S. & BUNDRED, N. J. 2007. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Anticancer Res*, 27, 3481-7.
- CAINE, G. J., LIP, G. Y. & BLANN, A. D. 2004. Platelet-derived VEGF, Flt-1, angiopoietin-1 and P-selectin in breast and prostate cancer: further evidence for a role of platelets in tumour angiogenesis. *Ann Med*, 36, 273-7.
- CARTER, C. L., ALLEN, C. & HENSON, D. E. 1989. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 63, 181-7.
- CATENA, R., LARZABAL, L., LARRAYOZ, M., MOLINA, E., HERMIDA, J., AGORRETA, J., MONTES, R., PIO, R., MONTUENGA, L. M. & CALVO, A. 2010. VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer*, 9, 320.
- CEBE SUAREZ, S., PIEREN, M., CARIOLATO, L., ARN, S., HOFFMANN, U., BOGUCKI, A., MANLIUS, C., WOOD, J. & BALLMER-HOFER, K. 2006. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2067-77.
- CHINTALGATTU, V., NAIR, D. M. & KATWA, L. C. 2003. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 277-86.
- CHIODELLI, P., MITOLA, S., RAVELLI, C., ORESTE, P., RUSNATI, M. & PRESTA, M. 2011. Heparan sulfate proteoglycans mediate the angiogenic activity of the vascular endothelial growth factor receptor-2 agonist gremlin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, e116-27.
- CHUNG, H. C., RHA, S. Y., AHN, J. B., SHIM, K. Y., YOO, N. C., KIM, J. H., ROH, J. K., LEE, K. S., MIN, J. S., KIM, B. S. & KIM, J. J. 1998. Menstrual state should be considered in determining sero-positivity of soluble angiogenic factors in breast cancer. *Int J Mol Med*, 2, 465-70.
- CIANFROCCA, M. & GOLDSTEIN, L. J. 2004. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*, 9, 606-16.
- COSKUN, U., GUNEL, N., TORUNER, F. B., SANCAK, B., ONUK, E., BAYRAM, O., CENGIZ, O., YILMAZ, E., ELBEG, S. & OZKAN, S. 2003. Serum leptin,

- prolactin and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with breast cancer. *Neoplasma*, 50, 41-6.
- COSTA, C., SOARES, R., REIS-FILHO, J. S., LEITAO, D., AMENDOEIRA, I. & SCHMITT, F. C. 2002. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol*, 55, 429-34.
- CURIGLIANO, G., PETIT, J. Y., BERTOLINI, F., COLLEONI, M., PERUZZOTTI, G., DE BRAUD, F., GANDINI, S., GIRALDO, A., MARTELLA, S., ORLANDO, L., MUNZONE, E., PIETRI, E., LUINI, A. & GOLDBIRSCHE, A. 2005. Systemic effects of surgery: quantitative analysis of circulating basic fibroblast growth factor (bFGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in patients with breast cancer who underwent limited or extended surgery. *Breast Cancer Res Treat*, 93, 35-40.
- DETMAR, M., BROWN, L. F., CLAFFEY, K. P., YEO, K. T., KOCHER, O., JACKMAN, R. W., BERSE, B. & DVORAK, H. F. 1994. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med*, 180, 1141-6.
- DIAZ, R., PENA, C., SILVA, J., LORENZO, Y., GARCIA, V., GARCIA, J. M., SANCHEZ, A., ESPINOSA, P., YUSTE, R., BONILLA, F. & DOMINGUEZ, G. 2008. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Cancer*, 123, 1060-7.
- DIEDRICH, K., HOLZGREVE, W., JONAT, W., SCHNEIDER, K.-T. M., SCHULTZEMOSGAU, A. & WEISS, J. M. 2007. Gynäkologie und Geburtshilfe. *Springer-Lehrbuch*. 2., völlig neu bearbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 267-90.
- DITTADI, R., MEO, S., FABRIS, F., GASPARINI, G., CONTRI, D., MEDICI, M. & GION, M. 2001. Validation of blood collection procedures for the determination of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) in different blood compartments. *Int J Biol Markers*, 16, 87-96.
- DOME, B., HENDRIX, M. J., PAKU, S., TOVARI, J. & TIMAR, J. 2007. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170, 1-15.
- EMING, S. A. & KRIEG, T. 2006. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 11, 79-86.
- ESKENS, F. A. & SLEIJFER, S. 2008. The use of bevacizumab in colorectal, lung, breast, renal and ovarian cancer: where does it fit? *Eur J Cancer*, 44, 2350-6.
- EVANS, P., WHEELER, T., ANTHONY, F. & OSMOND, C. 1997. Maternal serum vascular endothelial growth factor during early pregnancy. *Clin Sci (Lond)*, 92, 567-71.
- FACEMIRE, C. S., NIXON, A. B., GRIFFITHS, R., HURWITZ, H. & COFFMAN, T. M. 2009. Vascular endothelial growth factor receptor 2 controls blood pressure by regulating nitric oxide synthase expression. *Hypertension*, 54, 652-8.
- FAVA, R. A., OLSEN, N. J., SPENCER-GREEN, G., YEO, K. T., YEO, T. K., BERSE, B., JACKMAN, R. W., SENGER, D. R., DVORAK, H. F. & BROWN, L. F. 1994. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med*, 180, 341-6.
- FERRARA, N. 2002. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 2, 795-803.
- FERRARA, N. 2004a. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*, 9 Suppl 1, 2-10.
- FERRARA, N. 2004b. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611.

- FERRARA, N. & HENZEL, W. J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 851-8.
- FOEKENS, J. A., PETERS, H. A., GREBENCHTCHIKOV, N., LOOK, M. P., MEIJER-VAN GELDER, M. E., GEURTS-MOESPOT, A., VAN DER KWAST, T. H., SWEEP, C. G. & KLIJN, J. G. 2001. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res*, 61, 5407-14.
- FOLKMAN, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, 1182-6.
- FOLKMAN, J., COLE, P. & ZIMMERMAN, S. 1966. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg*, 164, 491-502.
- FONG, G. H., ROSSANT, J., GERTSENSTEIN, M. & BREITMAN, M. L. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376, 66-70.
- GABRILOVICH, D., ISHIDA, T., OYAMA, T., RAN, S., KRAVTSOV, V., NADAF, S. & CARBONE, D. P. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*, 92, 4150-66.
- GARVIN, S. & DABROSIN, C. 2008. In vivo measurement of tumor estradiol and vascular endothelial growth factor in breast cancer patients. *BMC Cancer*, 8, 73.
- GASPARINI, G., TOI, M., GION, M., VERDERIO, P., DITTADI, R., HANATANI, M., MATSUBARA, I., VINANTE, O., BONOLDI, E., BORACCHI, P., GATTI, C., SUZUKI, H. & TOMINAGA, T. 1997. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 89, 139-47.
- GASPARINI, G., TOI, M., MICELI, R., VERMEULEN, P. B., DITTADI, R., BIGANZOLI, E., MORABITO, A., FANELLI, M., GATTI, C., SUZUKI, H., TOMINAGA, T., DIRIX, L. Y. & GION, M. 1999. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am*, 5, 101-11.
- GERBER, H. P., MCMURTREY, A., KOWALSKI, J., YAN, M., KEYT, B. A., DIXIT, V. & FERRARA, N. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 273, 30336-43.
- GIANNI, L., ROMIEU, G. H., LICHINITSER, M., SERRANO, S. V., MANSUTTI, M., PIVOT, X., MARIANI, P., ANDRE, F., CHAN, A., LIPATOV, O., CHAN, S., WARDLEY, A., GREIL, R., MOORE, N., PROT, S., PALLAUD, C. & SEMIGLAZOV, V. 2013. AVEREL: a randomized phase III Trial evaluating bevacizumab in combination with docetaxel and trastuzumab as first-line therapy for HER2-positive locally recurrent/metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 31, 1719-25.
- GIULIANO, S. & PAGES, G. 2013. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. *Biochimie*, 95, 1110-9.
- GLASS, C. A., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2006. The anti-angiogenic VEGF isoform VEGF165b transiently increases hydraulic conductivity, probably through VEGF receptor 1 in vivo. *J Physiol*, 572, 243-57.
- GOEL, H. L. & MERCURIO, A. M. 2013. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer*, 13, 871-82.
- GOERKE, K. 2008. *Klinikleitfaden Gynäkologie, Geburtshilfe*. 7. Aufl. ed. München [u.a.]: Elsevier, 453-5.
- GOLDHIRSCH, A., GLICK, J. H., GELBER, R. D., COATES, A. S., THURLIMANN, B., SENN, H. J. & PANEL, M. 2005. Meeting highlights: international expert

- consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*, 16, 1569-83.
- GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. 2013. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Berlin ;Heidelberg: Springer, 91-2.
- GUDER, W. G. & NOLTE, J. 2009. Das Laborbuch für Klinik und Praxis. 2. Aufl. ed. München: Elsevier, 4-9.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HARBECK, N., THOMSEN, C. & GNANT, M. 2013. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel)*, 8, 102-9.
- HEER, K., KUMAR, H., READ, J. R., FOX, J. N., MONSON, J. R. & KERIN, M. J. 2001. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: its relation with cancer type and estrogen receptor status. *Clin Cancer Res*, 7, 3491-4.
- HICKLIN, D. J. & ELLIS, L. M. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 23, 1011-27.
- HODOROWICZ-ZANIEWSKA, D., KIBIL, W., MALEK, A., SZPOR, J., KULIG, J. & SZTEFKO, K. 2012. Evaluation of serum concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer patients. *Pol J Pathol*, 63, 255-60.
- HOLMES, C. E., HUANG, J. C., PACE, T. R., HOWARD, A. B. & MUSS, H. B. 2008. Tamoxifen and aromatase inhibitors differentially affect vascular endothelial growth factor and endostatin levels in women with breast cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 3070-6.
- HORMBREY, E., HAN, C., ROBERTS, A., MCGROUTHER, D. A. & HARRIS, A. L. 2003. The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis. *Clin Cancer Res*, 9, 4332-9.
- HSUEH, E. C., TURNER, R. R., GLASS, E. C., BRENNER, R. J., BRENNAN, M. B. & GIULIANO, A. E. 1999. Sentinel node biopsy in breast cancer. *J Am Coll Surg*, 189, 207-13.
- HUSMANN, G. & ROBERT-KOCH-INSTITUT 2010. *Krebs in Deutschland 2005/2006 : Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.*, Berlin Saarbrücken, Robert Koch-Inst.
- GEKID.
- IOVINO, F., FERRARACCIO, F., ORDITURA, M., ANTONIOL, G., MORGILLO, F., CASCONI, T., DIADEMA, M. R., AURILIO, G., SANTABARBARA, G., RUGGIERO, R., BELLI, C., IRLANDESE, E., FASANO, M., CIARDIELLO, F., PROCACCINI, E., LO SCHIAVO, F., CATALANO, G. & DE VITA, F. 2008. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels correlate with tumor VEGF and p53 overexpression in endocrine positive primary breast cancer. *Cancer Invest*, 26, 250-5.
- JAIN, R. K. 2001. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*, 7, 987-9.
- JANNI, W. & DANNECKER, C. 2008. *Facharzt Gynäkologie*. 1. Aufl. ed. München [u.a.]: Elsevier.
- JANNI, W., SOMMER, H., BECKMANN, M. W., LICHTENEGGER, W. 2005. *Simultaneous Study of Gemcitabine-Docetaxel Combination adjuvant treatment, as well as Extended Bisphosphonate and Surveillance Trial*. [Online]. München. Available: http://www.success-studie.de/a/downloads/study/Studienprotokoll_Success_Version_33.pdf [Accessed 13.01.2014, 13:10.
- JUBB, A. M. & HARRIS, A. L. 2010. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol*, 11, 1172-83.
- JUNG, S. Y., HAN, W., LEE, J. W., KO, E., KIM, E., YU, J. H., MOON, H. G., PARK, I. A., OH, D. Y., IM, S. A., KIM, T. Y., HWANG, K. T., KIM, S. W. & NOH, D. Y.

2009. Ki-67 expression gives additional prognostic information on St. Gallen 2007 and Adjuvant! Online risk categories in early breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 16, 1112-21.
- KARAYIANNAKIS, A. J., ZBAR, A., POLYCHRONIDIS, A. & SIMOPOULOS, C. 2003. Serum and drainage fluid vascular endothelial growth factor levels in early surgical wounds. *Eur Surg Res*, 35, 492-6.
- KAUFMANN, M., COSTA, S. D. & SCHARL, A. 2013. Die Gynäkologie. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Berlin ;Heidelberg: Springer, 641-5.
- KAWAMURA, H., LI, X., HARPER, S. J., BATES, D. O. & CLAESSION-WELSH, L. 2008. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res*, 68, 4683-92.
- KERBEL, R. S. 2000. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 21, 505-15.
- KIRWAN, C. C., BYRNE, G. J., KUMAR, S. & MCDOWELL, G. 2009. Platelet release of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in patients undergoing chemotherapy for breast cancer. *J Angiogenes Res*, 1, 7.
- KOCH, S. & CLAESSION-WELSH, L. 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a006502.
- KONECNY, G. E., MENG, Y. G., UNTCH, M., WANG, H. J., BAUERFEIND, I., EPSTEIN, M., STIEBER, P., VERNES, J. M., GUTIERREZ, J., HONG, K., BERYT, M., HEPP, H., SLAMON, D. J. & PEGRAM, M. D. 2004. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 10, 1706-16.
- KONUKOGLU, D., TURHAN, M. S., CELIK, V. & TURNA, H. 2007. Relation of serum vascular endothelial growth factor as an angiogenesis biomarker with nitric oxide & urokinase-type plasminogen activator in breast cancer patients. *Indian J Med Res*, 125, 747-51.
- KOUTRAS, A. K., FOUNTZILAS, G., MAKATSORIS, T., PEROUKIDES, S. & KALOFONOS, H. P. 2010. Bevacizumab in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 36, 75-82.
- KRAFT, A., WEINDEL, K., OCHS, A., MARTH, C., ZMIJA, J., SCHUMACHER, P., UNGER, C., MARME, D. & GASTL, G. 1999. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer*, 85, 178-87.
- KREIENBERG, R., MÖBUS, V. & JONAT, W. 2010. Mammakarzinom Interdisziplinär. 4. Aufl. ed. [s.l.]: Springer-Verlag, 3-9.
- KUMAR, R. & YARMAND-BAGHERI, R. 2001. The role of HER2 in angiogenesis. *Semin Oncol*, 28, 27-32.
- KUMMEL, S., EGGEMANN, H., LUFTNER, D., THOMAS, A., JESCHKE, S., ZERFEL, N., HEILMANN, V., EMONS, G., ZEISER, T., ULM, K., KOBL, M., KORLACH, S., SCHMID, P., SEHOULI, J., ELLING, D. & BLOHMER, J. U. 2006. Changes in the circulating plasma levels of VEGF and VEGF-D after adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer and 1 to 3 positive lymph nodes. *Anticancer Res*, 26, 1719-26.
- KUT, C., MAC GABHANN, F. & POPEL, A. S. 2007. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer*, 97, 978-85.
- LANTZSCH, T., HEFLER, L., KRAUSE, U., KEHL, A., GOEPEL, C., KOELBL, H., DUNST, J. & LAMPE, D. 2002. The correlation between immunohistochemically-detected markers of angiogenesis and serum vascular endothelial growth factor in patients with breast cancer. *Anticancer Res*, 22, 1925-8.
- LEE, J. K., HONG, Y. J., HAN, C. J., HWANG, D. Y. & HONG, S. I. 2000. Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients: which is the optimal specimen? *Int J Oncol*, 17, 149-52.

- LEE, T. H., SENG, S., SEKINE, M., HINTON, C., FU, Y., AVRAHAM, H. K. & AVRAHAM, S. 2007. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med*, 4, e186.
- LI, E. X., WU, Y. Y., SHI, F., WU, Y., GUO, J. J. & DONG, D. F. 2007. [Relationship between serum VEGF level and VEGF, COX-2 and MVD expression in breast cancer tissues]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 29, 522-5.
- LINDERHOLM, B., GRANKVIST, K., WILKING, N., JOHANSSON, M., TAVELIN, B. & HENRIKSSON, R. 2000. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol*, 18, 1423-31.
- LINDERHOLM, B., TAVELIN, B., GRANKVIST, K. & HENRIKSSON, R. 1998. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 16, 3121-8.
- LOWERY, A. J., SWEENEY, K. J., MOLLOY, A. P., HENNESSY, E., CURRAN, C. & KERIN, M. J. 2008. The effect of menopause and hysterectomy on systemic vascular endothelial growth factor in women undergoing surgery for breast cancer. *BMC Cancer*, 8, 279.
- MACPHERSON, A. M., ARCHER, D. F., LESLIE, S., CHARNOCK-JONES, D. S., MAKKINK, W. K. & SMITH, S. K. 1999. The effect of etonogestrel on VEGF, oestrogen and progesterone receptor immunoreactivity and endothelial cell number in human endometrium. *Hum Reprod*, 14, 3080-7.
- MAGNUSSEN, A. L., RENNEL, E. S., HUA, J., BEVAN, H. S., BEAZLEY LONG, N., LEHRLING, C., GAMMONS, M., FLOEGE, J., HARPER, S. J., AGOSTINI, H. T., BATES, D. O. & CHURCHILL, A. J. 2010. VEGF-A165b is cytoprotective and antiangiogenic in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 4273-81.
- MAIA, H., HADDAD, C., PINHEIRO, N. & CASOY, J. 2014. The Effect of Oral Contraceptives Combined With Pycnogenol (Pinus Pinaster) On Aromatase and VEGF Expression in the Eutopic Endometrium of Endometriosis Patients. *Gynecol Obstet* 4, 1-4.
- MANDERS, P., BEEH, L. V., TJAN-HEIJNEN, V. C., GEURTS-MOESPOT, J., VAN TIENOVEN, T. H., FOEKENS, J. A. & SWEEP, C. G. 2002. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer*, 87, 772-8.
- MCILHENNY, C., GEORGE, W. D. & DOUGHTY, J. C. 2002. A comparison of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor during the menstrual cycle in healthy female volunteers. *Br J Cancer*, 86, 1786-9.
- METTLIN, C. 1999. Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin*, 49, 138-44.
- MILES, D. W., CHAN, A., DIRIX, L. Y., CORTES, J., PIVOT, X., TOMCZAK, P., DELOZIER, T., SOHN, J. H., PROVENCHER, L., PUGLISI, F., HARBECK, N., STEGER, G. G., SCHNEEWEISS, A., WARDLEY, A. M., CHLISTALLA, A. & ROMIEU, G. 2010. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 3239-47.
- MILLER, K., WANG, M., GRALOW, J., DICKLER, M., COBLEIGH, M., PEREZ, E. A., SHENKIER, T., CELLA, D. & DAVIDSON, N. E. 2007. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 357, 2666-76.
- MOHLE, R., GREEN, D., MOORE, M. A., NACHMAN, R. L. & RAFII, S. 1997. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 663-8.
- NISHIMURA, R., NAGAO, K., MIYAYAMA, H., MATSUDA, M., BABA, K., YAMASHITA, H. & FUKUDA, M. 2003. Higher plasma vascular endothelial

- growth factor levels correlate with menopause, overexpression of p53, and recurrence of breast cancer. *Breast Cancer*, 10, 120-8.
- NOWAK, D. G., WOOLARD, J., AMIN, E. M., KONOPATSKAYA, O., SALEEM, M. A., CHURCHILL, A. J., LADOMERY, M. R., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2008. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci*, 121, 3487-95.
- OLOFSSON, B., KORPELAINEN, E., PEPPER, M. S., MANDRIOTA, S. J., AASE, K., KUMAR, V., GUNJI, Y., JELTSCH, M. M., SHIBUYA, M., ALITALO, K. & ERIKSSON, U. 1998. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11709-14.
- PARK, J. E., KELLER, G. A. & FERRARA, N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4, 1317-26.
- PEIRIS-PAGES, M. 2012. The role of VEGF 165b in pathophysiology. *Cell Adh Migr*, 6, 561-8.
- PEIRIS-PAGES, M., HARPER, S. J., BATES, D. O. & RAMANI, P. 2010. Balance of pro- versus anti-angiogenic splice isoforms of vascular endothelial growth factor as a regulator of neuroblastoma growth. *J Pathol*, 222, 138-47.
- PEPPER, M. S. 2001. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost*, 86, 346-55.
- PRITCHARD-JONES, R. O., DUNN, D. B., QIU, Y., VAREY, A. H., ORLANDO, A., RIGBY, H., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2007. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer*, 97, 223-30.
- QIU, Y., HOAREAU-AVEILLA, C., OLTEAN, S., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2009. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans*, 37, 1207-13.
- QUARANTA, M., DANIELE, A., COVIELLO, M., VENNERI, M. T., ABBATE, I., CARINGELLA, M. E., DI TARDO, S., DIVELLA, R., TREROTOLI, P., DI GENNARO, M., SCHITTULLI, F., FRANSVEA, E. & GIANNELLI, G. 2007. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. *Anticancer Res*, 27, 3593-600.
- RELF, M., LEJEUNE, S., SCOTT, P. A., FOX, S., SMITH, K., LEEK, R., MOGHADDAM, A., WHITEHOUSE, R., BICKNELL, R. & HARRIS, A. L. 1997. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*, 57, 963-9.
- RENDEL, E. S., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2009. Therapeutic potential of manipulating VEGF splice isoforms in oncology. *Future Oncol*, 5, 703-12.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2013. Krebs in Deutschland 2009/2010. *Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.*, 9, 68-71.
- ROBERT, N. J., DIERAS, V., GLASPY, J., BRUFISKY, A. M., BONDARENKO, I., LIPATOV, O. N., PEREZ, E. A., YARDLEY, D. A., CHAN, S. Y., ZHOU, X., PHAN, S. C. & O'SHAUGHNESSY, J. 2011. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 29, 1252-60.
- SALVEN, P., MANPAA, H., ORPANA, A., ALITALO, K. & JOENSUU, H. 1997. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res*, 3, 647-51.

- SALVEN, P., ORPANA, A. & JOENSUU, H. 1999a. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*, 5, 487-91.
- SALVEN, P., PERHONIEMI, V., TYKKA, H., MAENPAA, H. & JOENSUU, H. 1999b. Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 53, 161-6.
- SANCAK, B., COSKUN, U., GUNEL, N., ONUK, E., CIHAN, A., KARAMERCAN, A., YILDIRIM, Y. & OZKAN, S. 2004. No association between serum levels of insulin-like growth factor-I, vascular endothelial growth factor, prolactin and clinicopathological characteristics of breast carcinoma after surgery. *Intern Med J*, 34, 310-5.
- SASICH, L. D. & SUKKARI, S. R. 2012. The US FDAs withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). *Saudi Pharm J*, 20, 381-5.
- SCHNEIDER, B. P., WANG, M., RADOVICH, M., SLEDGE, G. W., BADVE, S., THOR, A., FLOCKHART, D. A., HANCOCK, B., DAVIDSON, N., GRALOW, J., DICKLER, M., PEREZ, E. A., COBLEIGH, M., SHENKIER, T., EDGERTON, S. & MILLER, K. D. 2008. Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol*, 26, 4672-8.
- SENGER, D. R., GALLI, S. J., DVORAK, A. M., PERRUZZI, C. A., HARVEY, V. S. & DVORAK, H. F. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983-5.
- SENN, H. J., THURLIMANN, B., GOLDBIRSCH, A., WOOD, W. C., GELBER, R. D. & COATES, A. S. 2003. Comments on the St. Gallen Consensus 2003 on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Breast*, 12, 569-82.
- SHALABY, F., ROSSANT, J., YAMAGUCHI, T. P., GERTSENSTEIN, M., WU, X. F., BREITMAN, M. L. & SCHUH, A. C. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376, 62-6.
- SHEN, H., CLAUSS, M., RYAN, J., SCHMIDT, A. M., TIJBURG, P., BORDEN, L., CONNOLLY, D., STERN, D. & KAO, J. 1993. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*, 81, 2767-73.
- SHWEIKI, D., ITIN, A., SOFFER, D. & KESHET, E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359, 843-5.
- STATHOPOULOS, J., ARMAKOLAS, A., STATHOPOULOS, G. P. & GOMATOS, I. P. 2010. Plasma VEGF levels in breast cancer patients with and without metastases. *Oncol Lett*, 1, 739-741.
- STEFANINI, M. O., WU, F. T., MAC GABHANN, F. & POPEL, A. S. 2008. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Syst Biol*, 2, 77.
- STEWART, M., TURLEY, H., COOK, N., PEZZELLA, F., PILLAI, G., OGILVIE, D., CARTLIDGE, S., PATERSON, D., COPLEY, C., KENDREW, J., BARNES, C., HARRIS, A. L. & GATTER, K. C. 2003. The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on phosphorylation. An immunohistochemical study. *Histopathology*, 43, 33-9.
- STUTTFELD, E. & BALLMER-HOFER, K. 2009. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*, 61, 915-22.
- SUGIURA, T., INOUE, Y., MATSUKI, R., ISHII, K., TAKAHASHI, M., ABE, M. & SHIRASUNA, K. 2009. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol*, 34, 673-80.
- TAHA, F. M., ZEENELDIN, A. A., HELAL, A. M., GABER, A. A., SALLAM, Y. A., RAMADAN, H. & MONEER, M. M. 2009. Prognostic value of serum vascular

- endothelial growth factor in Egyptian females with metastatic triple negative breast cancer. *Clin Biochem*, 42, 1420-6.
- TAKAHASHI, T., SHIRASAWA, T., MIYAKE, K., YAHAGI, Y., MARUYAMA, N., KASAHARA, N., KAWAMURA, T., MATSUMURA, O., MITARAI, T. & SAKAI, O. 1995. Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 209, 218-26.
- TEH, S. H., HILL, A. D., LEE, A. W., FOLEY, D., KENNEDY, S., YOUNG, L., MCDERMOTT, E. & O'HIGGINS, N. 2004. Raised plasma endostatin levels correlate inversely with breast cancer angiogenesis. *J Surg Res*, 116, 165-71.
- THIELEMANN, A., BASZCZUK, A., KOPCZYNSKI, Z., KOPCZYNSKI, P. & GRODECKA-GAZDECKA, S. 2013. Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer. *Ann Agric Environ Med*, 20, 293-7.
- TISCHER, E., MITCHELL, R., HARTMAN, T., SILVA, M., GOSPODAROWICZ, D., FIDDES, J. C. & ABRAHAM, J. A. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 266, 11947-54.
- TOI, M., HOSHINA, S., TAKAYANAGI, T. & TOMINAGA, T. 1994. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res*, 85, 1045-9.
- TOI, M., INADA, K., SUZUKI, H. & TOMINAGA, T. 1995. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat*, 36, 193-204.
- TOI, M., MATSUMOTO, T. & BANDO, H. 2001. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol*, 2, 667-73.
- TRAVIS, K. 2005. Bernard Fisher reflects on a half-century's worth of breast cancer research. *J Natl Cancer Inst*, 97, 1636-7.
- VAREY, A. H., RENNEL, E. S., QIU, Y., BEVAN, H. S., PERRIN, R. M., RAFFY, S., DIXON, A. R., PARASKEVA, C., ZACCHEO, O., HASSAN, A. B., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2008. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer*, 98, 1366-79.
- VASUDEV, N. S. & REYNOLDS, A. R. 2014. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*.
- VENAT-BOUVET, L., FERMEAUX, V., LEOBON, S., SAIDI, N., MONTEIL, J., MOLLARD, J., AUBARD, Y., JAMMET, I. & TUBIANA-MATHIEU, N. 2014. Adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer: UPA/PAI-1 determinations for 163 cases. *Anticancer Res*, 34, 1213-7.
- VERHEUL, H. M., HOEKMAN, K., LUYKX-DE BAKKER, S., EEKMAN, C. A., FOLMAN, C. C., BROXTERMAN, H. J. & PINEDO, H. M. 1997. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*, 3, 2187-90.
- VINCENTI, V., CASSANO, C., ROCCHI, M. & PERSICO, G. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93, 1493-5.
- WEIDNER, N., FOLKMAN, J., POZZA, F., BEVILACQUA, P., ALLRED, E. N., MOORE, D. H., MELI, S. & GASPARINI, G. 1992. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 84, 1875-87.
- WEIGAND, M., HANTEL, P., KREIENBERG, R. & WALTENBERGER, J. 2005. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis*, 8, 197-204.

- WOOLARD, J., BEVAN, H. S., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2009. Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation*, 16, 572-92.
- WOOLARD, J., WANG, W. Y., BEVAN, H. S., QIU, Y., MORBIDELLI, L., PRITCHARD-JONES, R. O., CUI, T. G., SUGIONO, M., WAINE, E., PERRIN, R., FOSTER, R., DIGBY-BELL, J., SHIELDS, J. D., WHITTLES, C. E., MUSHENS, R. E., GILLATT, D. A., ZICHE, M., HARPER, S. J. & BATES, D. O. 2004. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*, 64, 7822-35.
- WU, Y., SALDANA, L., CHILLAR, R. & VADGAMA, J. V. 2002. Plasma vascular endothelial growth factor is useful in assessing progression of breast cancer post surgery and during adjuvant treatment. *Int J Oncol*, 20, 509-16.
- WYNENDAELE, W., DERUA, R., HOYLAERTS, M. F., PAWINSKI, A., WAELKENS, E., DE BRUIJN, E. A., PARIDAENS, R., MERLEVEDE, W. & VAN OOSTEROM, A. T. 1999. Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: a key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann Oncol*, 10, 965-71.
- YAMAMOTO, Y., TOI, M., KONDO, S., MATSUMOTO, T., SUZUKI, H., KITAMURA, M., TSURUTA, K., TANIGUCHI, T., OKAMOTO, A., MORI, T., YOSHIDA, M., IKEDA, T. & TOMINAGA, T. 1996. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2, 821-6.
- YANG, R., BUNTING, S., KO, A., KEYT, B. A., MODI, N. B., ZIONCHECK, T. F., FERRARA, N. & JIN, H. 1998. Substantially attenuated hemodynamic responses to Escherichia coli-derived vascular endothelial growth factor given by intravenous infusion compared with bolus injection. *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 103-10.
- YANG, W., KLOS, K., YANG, Y., SMITH, T. L., SHI, D. & YU, D. 2002. ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma. *Cancer*, 94, 2855-61.
- ZHANG, F., TANG, Z., HOU, X., LENNARTSSON, J., LI, Y., KOCH, A. W., SCOTNEY, P., LEE, C., ARJUNAN, P., DONG, L., KUMAR, A., RISSANEN, T. T., WANG, B., NAGAI, N., FONS, P., FARISS, R., ZHANG, Y., WAWROUSEK, E., TANSEY, G., RABER, J., FONG, G. H., DING, H., GREENBERG, D. A., BECKER, K. G., HERBERT, J. M., NASH, A., YLA-HERTTUALA, S., CAO, Y., WATTS, R. J. & LI, X. 2009. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 6152-7.
- ZHAO, J., YAN, F., JU, H., TANG, J. & QIN, J. 2004. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett*, 204, 87-95.
- ZIEGLER, B. L., VALTIERI, M., PORADA, G. A., DE MARIA, R., MULLER, R., MASELLA, B., GABBIANELLI, M., CASELLA, I., PELOSI, E., BOCK, T., ZANJANI, E. D. & PESCHLE, C. 1999. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science*, 285, 1553-8.

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

BSA	<i>Bovine-serum-albumine</i>
CTAD	<i>Citrate/Theophylline/Adenosine/Dipyridamole</i>
BE	Blutentnahme(-zeitpunkt)
BET	Brusterhaltende Therapie
bp	Basenpaare
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTx	Chemotherapie
D	Deutschland
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
G	<i>Grading</i>
GB	Großbritannien
HER2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IQR	<i>Interquartile range</i>
kDa	Kilo-Dalton
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
ng	Nanogramm (= 1,0 × 10 ⁻⁹ Gramm)
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NP-1	Neuropilin-1
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
pg	Pikogramm (= 1,0 × 10 ⁻¹² Gramm)
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion
rhVEGF	<i>Recombinant human VEGF</i>

sFLT-1	<i>Soluble Fms-like Tyrosinkinase-1</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Streptavidin-HRP	<i>Streptavidin-horseradish-peroxidase</i>
SUCCESS	<i>Simultaneous Study of Gemcitabine-Docetaxel Combination adjuvant treatment, as well as Extended Bisphosphonate and Surveillance Trial</i>
TNM-Klassifikation	<i>Tumor-/Node-/Metastasis-Klassifikation</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ
UTR	Untranslatierte Region
VPF	<i>Vascular permeability Factor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	VEGF-Rezeptor

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur verschiedener VEGF A-Isoformen.....	5
Abbildung 2: VEGF-Interaktion in Tumoren.	8
Abbildung 3: A. Exon-Struktur von VEGF 165 und VEGF 165b..	10
Abbildung 4: Therapeutische VEGF-Angriffspunkte.	12
Abbildung 5: Hypothesen zur Wirkungsweise antiangiogenetischer Medikamente.....	13
Abbildung 6: Erstellung einer Standardreihe für VEGF A.	25
Abbildung 7: Erstellung einer Standardreihe für VEGF 165b.	27
Abbildung 8: VEGF A in Serum und EDTA-Plasma, Vergleich zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Probandinnen.	31
Abbildung 9: VEGF 165b in Serum und EDTA-Plasma, Vergleich zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Probandinnen.	33
Abbildung 10: VEGF A, Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien innerhalb der Kontrollgruppe.	34
Abbildung 11: VEGF A, Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien innerhalb der Mammakarzinomgruppe zu Blutentnahmezeitpunkt 1-4.....	35
Abbildung 12: VEGF 165b, Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien innerhalb der Kontrollgruppe.	36
Abbildung 13: VEGF 165b, Vergleich der verschiedenen Probenmaterialien innerhalb der Mammakarzinomgruppe zu Blutentnahmezeitpunkt 1-3.....	36
Abbildung 14: Konzentrationsverlauf von VEGF A in Serum und EDTA-Plasma innerhalb des Untersuchungszeitraums.	38
Abbildung 15: Konzentrationsverlauf von VEGF 165b in Serum und EDTA-Plasma innerhalb des Untersuchungszeitraums.....	39
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit.	43
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit.	45
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit.	48
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit.	50

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Patientencharakteristika.	29
Tabelle 2: Korrelation von Rezidivereignissen mit niedrigen, mittleren und hohen VEGF A- Werten in Serum und EDTA-Plasma zu Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3.	41
Tabelle 3: Korrelation des Gesamtüberlebens mit niedrigen, mittleren und hohen VEGF A- Werten in Serum und EDTA-Plasma zu Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3.	44
Tabelle 4: Korrelation von Rezidivereignissen mit niedrigen, mittleren und hohen VEGF 165b- Werten in Serum und EDTA-Plasma zu Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3.	46
Tabelle 5: Korrelation des Gesamtüberlebens mit niedrigen, mittleren und hohen VEGF 165b- Werten in Serum und EDTA-Plasma zu Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3.	49
Tabelle 6: VEGF A-Werteverteilung der Mammakarzinompatientinnen.	85
Tabelle 7: VEGF A-Werteverteilung der gesunden Probandinnen.	85
Tabelle 8: VEGF 165b-Werteverteilung der Mammakarzinompatientinnen.	86
Tabelle 9: VEGF 165b-Werteverteilung der gesunden Probandinnen.	86
Tabelle 10: Regressionsanalysen für VEGF A in Serum.	87
Tabelle 11: Regressionsanalysen für VEGF A in EDTA-Plasma.	88
Tabelle 12: Regressionsanalysen für VEGF 165b in Serum.	89
Tabelle 13: Regressionsanalysen für VEGF 165b in EDTA-Plasma.	90

10 Anhang

10.1 Serum- und Plasma-Konzentrationen von VEGF A

Tabelle 6: VEGF A-Werteverteilung der Mammakarzinompatientinnen.

VEGF A (pg/ml)		Min.	1. Quantil (Q _{0,25})	Median (Q _{0,50})	MW ± SE	3. Quantil (Q _{0,75})	95. Perz. (Q _{0,95})	Max.
Serum	BE 1 (n=180)	0	98,6	156,9	182,5 ± 9,5	238,4	416,8	907,9
	BE 2 (n=166)	0	98,1	181,7	213,9 ± 14,0	278,2	513,2	1640
	BE 3 (n=125)	0	74,2	143,2	168,8 ± 13,0	212,2	401,8	1044
	BE 4 (n=21)	0	71,25	93,28	208,1 ± 25,1	169,1	375,0	1833
EDTA	BE 1 (n=127)	0	17,8	54,0	82,9 ± 8,3	101,8	267,0	463,8
	BE 2 (n=145)	0	14,5	60,9	81,0 ± 8,5	112,6	237,9	803,9
	BE 3 (n=116)	0	31,6	70,7	95,3 ± 9,8	117,2	298,1	654,4
	BE 4 (n=21)	0	0	23,3	48,7 ± 15,5	66,3	133,1	321,5

(Blutentnahmezeitpunkt 1/2/3/4 der Karzinompatientinnen [BE 1/2/3/4]; Minimaler Wert [Min.]; Mittelwert ± Standardfehler [MW ± SE]; Maximaler Wert [Max.]

Tabelle 7: VEGF A-Werteverteilung der gesunden Probandinnen.

VEGF A (pg/ml)	Min.	1. Quantil (Q _{0,25})	Median (Q _{0,50})	MW ± SE	3. Quantil (Q _{0,75})	95. Perz. (Q _{0,95})	Max.
Serum (n=97)	0	23,3	66,2	94,1 ± 15,9	124,5	222,2	1479
EDTA (n=93)	0	0	0	37,3 ± 17,5	16,3	86,9	1497
Citrat (n=96)	0	0	0	46,1 ± 22,0	19,6	89,6	1776
CTAD (n=98)	0	0	0	44,7 ± 21,1	21,8	87,4	1812

10.2 Serum- und Plasmakonzentrationen von VEGF 165b

Tabelle 8: VEGF 165b-Werteverteilung der Mammakarzinompatientinnen.

VEGF 165b (pg/ml)		Min.	1.Quantil (Q _{0,25})	Median (Q _{0,50})	MW ± SE	3.Quantil (Q _{0,75})	95. Perz. (Q _{0,95})	Max.
Serum	BE 1 (n=178)	0	0	10,5	68,2 ± 10,1	79,6	302,4	969,7
	BE 2 (n=155)	0	0	0	36,0 ± 6,2	30,6	178,8	601,8
	BE 3 (n=122)	0	0	0	55,1 ± 13,2	47,3	266,8	1188
EDTA	BE 1 (n=102)	0	0	0	41,2 ± 8,1	48,7	156,7	510,2
	BE 2 (n=137)	0	0	0	34,1 ± 6,5	44,9	163,5	657,2
	BE 3 (n=118)	0	0	19,5	97,8 ± 21,0	120,1	303,4	1947

Tabelle 9: VEGF 165b-Werteverteilung der gesunden Probandinnen.

	Min.	1.Quantil (Q _{0,25})	Median (Q _{0,50})	MW ± SE	3.Quantil (Q _{0,75})	95. Perz. (Q _{0,95})	Max.
Serum (n=100)	0	0	0	53,1 ± 21,3	13,9	183,0	1439
EDTA (n=95)	0	0	10,1	66,4 ± 21,7	37,6	173,8	1354
Citrat (n=96)	0	0	0	49,8 ± 18,7	16,3	159,9	1300
CTAD (n=98)	0	0	0	49,0 ± 18,7	14,8	145,7	1313

10.3 Regressionsanalysen

Tabelle 10: Regressionsanalysen für VEGF A in Serum.

	VEGF A in Serum																	
	N			Q _{0,50} (pg/ml)			MW (pg/ml)			SE			R			p-Wert		
Blutentnahmezeitpunkt	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Lymphknotenbefall																		
nodal-negativ (N0)	80	69	58	171	191	152	195	211	174	15	17	16						
1-3 Metastasen	70	67	48	156	177	126	173	229	163	14	29	26	-17	-15	-28	0,489	0,678	0,428
4-9 Metastasen	18	18	12	152	170	152	160	185	177	27	31	42	-61	-64	-7	0,104	0,249	0,891
≥ 10 Metastasen	8	7	5	152	186	167	213	228	189	58	49	36	9	-15	13	0,855	0,839	0,860
Hormonrezeptorstatus																		
negativ	53	44	36	174	220	150	208	224	186	21	20	22						
positiv	123	117	87	154	177	146	173	214	164	11	18	16	39	-28	-153	0,513	0,751	0,075
Östrogenrezeptorstatus																		
negativ	62	53	41	176	193	143	213	219	176	19	21	21	70	-15	-92	0,132	0,828	0,195
positiv	114	108	82	152	179	146	168	215	167	10	19	17						
Progesteronrezeptorstatus																		
negativ	72	59	51	165	213	157	194	223	174	17	20	17	-15	3	-92	0,647	0,955	0,195
positiv	104	102	72	156	178	141	177	213	168	12	20	19						
Tumorgröße																		
pT1a-c	86	73	59	157	173	127	171	197	152	12	17	17						
pT2	83	82	59	162	210	162	201	237	190	16	24	20	23	41	29	0,272	0,198	0,327
pT3	7	6	5	99	160	104	142	171	161	33	37	71	-25	-24	62	0,652	0,781	0,408
Histologie																		
invasiv-duktales Karzinom	155	140	108	164	186	143	188	218	171	10	16	14						
invasiv-lobuläres Karzinom	11	10	7	151	216	146	152	239	130	42	56	39	-22	50	-59	0,615	0,460	0,338
Grading																		
G1	5	4	3	154	133	59	120	121	139	39	15	83						
G2	78	76	59	151	185	147	182	237	187	15	27	23	42	66	39	0,500	0,500	0,675
G3	93	81	61	163	186	143	189	202	156	14	12	14	33	22	-17	0,603	0,822	0,856
HER2/neu-Status																		
negativ	122	109	80	172	181	142	189	205	169	12	14	15	10	-40	-20	0,645	0,230	0,514
positiv	54	51	40	153	185	147	171	237	181	15	34	26						

(Anzahl [N], Median [Q_{0,50}], Mittelwert [MW], Standardfehler [SE], Regressionskoeffizient [R])

Tabelle 11: Regressionsanalysen für VEGF A in EDTA-Plasma.

	VEGF A in EDTA-Plasma																	
	N			Q _{0,50} (pg/ml)			MW (pg/ml)			SE			R			p-Wert		
Blutentnahmezeitpunkt	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Lymphknotenbefall																		
nodal-negativ (N0)	59	61	54	48	54	69	79	79	92	12	10	11						
1-3 Metastasen	45	60	46	58	52	66	85	74	98	15	12	17	-1	-11	10	0,955	0,620	0,698
4-9 Metastasen	13	13	11	50	64	85	93	112	110	34	59	56	5	17	21	0,871	0,633	0,587
≥ 10 Metastasen	5	7	4	76	114	91	102	133	77	28	35	28	5	35	2	0,914	0,433	0,968
Hormonrezeptorstatus																		
negativ	41	40	34	68	68	106	87	88	113	15	13	15						
positiv	81	101	81	50	55	59	82	80	88	11	11	13	45	57	-40	0,361	0,331	0,515
Östrogenrezeptorstatus																		
negativ	50	46	39	57	64	103	94	94	110	15	15	15	56	61	-4	0,121	0,180	0,943
positiv	72	95	76	54	55	61	77	77	88	10	11	13						
Progesteronrezeptorstatus																		
negativ	52	52	47	64	65	80	81	86	106	12	11	13	12	7	1	0,737	0,826	0,969
positiv	70	89	68	49	55	55	86	80	88	12	12	14						
Tumorgroße																		
pT1a-c	61	67	60	48	45	59	71	72	185	11	11	11						
pT2	57	69	51	70	72	85	100	93	107	14	14	18	24	10	10	0,203	0,592	0,639
pT3	4	5	4	51	79	58	49	74	101	12	16	57	-24	-24	38	0,231	0,665	0,535
Histologie																		
invasiv-duktales Karzinom	105	121	101	54	61	71	84	82	96	10	10	11						
invasiv-lobuläres Karzinom	8	9	5	75	88	72	118	113	75	35	36	19	48	43	-36	0,225	0,299	0,510
Grading																		
G1	4	4	3	8	34	46	19	40	48	13	13	4						
G2	56	65	56	69	61	71	101	91	109	15	17	18	69	27	31	0,196	0,639	0,637
G3	62	72	56	51	65	74	72	77	85	10	8	9	24	4	-1	0,660	0,950	0,994
HER2/neu-Status																		
negativ	84	96	75	59	54	67	90	82	97	13	11	12	22	-11	-9	0,275	0,591	0,684
positiv	38	44	37	49	78	80	70	84	100	11	12	18						

Tabelle 12: Regressionsanalysen für VEGF 165b in Serum.

	VEGF 165b in Serum																	
	N			Q _{0,50} (pg/ml)			MW (pg/ml)			SE			R			p-Wert		
Blutentnahmezeitpunkt	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Lymphknotenbefall																		
nodal-negativ (N0)	80	60	59	10	0	0	66	32	63	14	9	18						
1-3 Metastasen	68	65	45	9	0	0	65	41	56	17	12	27	-11	15	-12	0,675	0,359	0,737
4-9 Metastasen	18	18	11	29	0	7	95	28	26	42	11	12	26	5	-21	0,506	0,845	0,696
≥ 10 Metastasen	8	7	5	55	0	0	62	48	44	20	28	31	-13	21	-19	0,807	0,528	0,794
Hormonrezeptorstatus																		
negativ	53	37	36	9	0	0	66	38	81	16	13	27						
positiv	121	113	84	12	0	0	69	36	45	13	7	15	-42	41	-95	0,517	0,287	0,257
Östrogenrezeptorstatus																		
negativ	62	47	42	9	0	0	66	47	70	14	16	24	4	58	-38	0,938	0,052	0,581
positiv	112	103	78	14	0	0	70	31	48	14	6	16						
Progesteronrezeptorstatus																		
negativ	72	52	50	7	0	0	59	34	70	12	10	20	-44	-8	-36	0,227	0,716	0,428
positiv	102	98	70	14	0	0	75	38	48	15	8	18						
Tumorgröße																		
pT1a-c	86	66	58	14	0	0	72	42	51	15	12	17						
pT2	81	77	56	8	0	0	66	32	63	15	7	23	-11	-15	18	0,644	0,303	0,542
pT3	7	7	6	0	4	0	44	38	39	27	22	31	-54	-27	9	0,375	0,433	0,899
Histologie																		
invasiv-duktales Karzinom	152	130	105	10	0	0	65	39	51	10	7	14						
invasiv-lobuläres Karzinom	12	10	7	18	0	47	117	34	61	79	19	34	66	6	23	0,148	0,840	0,712
Grading																		
G1	5	3	2	15	0	29	94	0	29	68	0	29						
G2	77	71	55	8	0	0	79	37	61	19	10	26	-27	28	24	0,688	0,563	0,828
G3	92	76	63	14	0	0	58	37	52	11	8	12	-57	32	1	0,408	0,523	0,993
HER2/neu-Status																		
negativ	121	100	79	10	0	0	67	34	52	13	8	13	-11	-6	-18	0,652	0,669	0,573
positiv	52	49	38	13	0	0	74	42	67	17	9	32						

Tabelle 13: Regressionsanalysen für VEGF 165b in EDTA-Plasma.

	VEGF 165b in EDTA-Plasma																	
	N			Q _{0,50} (pg/ml)			MW (pg/ml)			SE			R			p-Wert		
Blutentnahmezeitpunkt	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Lymphknotenbefall																		
nodal-negativ (N0)	45	50	55	0	0	20	36	26	94	14	8	21						
1-3 Metastasen	37	60	47	2	0	15	46	42	47	14	13	47	2	19	23	0,932	0,288	0,697
4-9 Metastasen	12	16	11	13	0	39	38	21	15	16	10	15	-5	5	-30	0,868	0,834	0,726
≥ 10 Metastasen	4	7	4	58	57	46	60	59	40	30	23	40	18	39	-12	0,712	0,249	0,930
Hormonrezeptorstatus																		
negativ	33	33	34	0	0	46	42	35	121	18	11	32						
positiv	65	100	83	0	0	15	40	34	89	9	8	27	39	54	61	0,414	0,207	0,660
Östrogenrezeptorstatus																		
negativ	41	40	39	0	0	38	50	45	134	18	18	37	59	73	170	0,107	0,056	0,140
positiv	57	93	78	0	0	15	34	30	81	7	6	26						
Progesteronrezeptorstatus																		
negativ	45	46	49	0	0	18	37	33	84	14	9	23	-14	-4	-60	0,653	0,868	0,395
positiv	53	87	68	0	0	26	44	35	102	10	9	33						
Tumorgroße																		
pT1a-c	48	60	60	0	0	16	42	39	97	14	13	25						
pT2	46	67	52	2	0	32	39	29	102	10	7	38	-6	-13	22	0,746	0,396	0,644
pT3	4	6	5	21	37	10	49	50	73	36	23	44	1	-9	-75	0,984	0,808	0,565
Histologie																		
invasiv-duktales Karzinom	85	113	101	0	0	16	44	37	93	10	8	24						
invasiv-lobuläres Karzinom	7	10	7	4	0	96	22	37	100	12	15	43	-26	5	54	0,503	0,853	0,624
Grading																		
G1	3	3	2	0	0	67	26	0	67	26	0	67						
G2	43	61	55	4	0	13	50	39	122	16	12	42	26	25	12	0,645	0,613	0,948
G3	52	69	60	0	0	38	34	32	78	9	7	14	1	24	-44	0,984	0,633	0,807
HER2/neu-Status																		
negativ	68	90	78	0	0	19	31	0	94	11	9	20	10	-11	-17	0,629	0,499	0,737
positiv	29	42	36	0	0	26	42	5	114	9	10	54						

11 Danksagung

Frau PD Dr. Brigitte Rack möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Blutproben aus der Success-A-Studie danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Maria Karsten für ihre unermüdliche Unterstützung während der Durchführung der gesamten Forschungsarbeit. Sie stand mir mit ihrer kompetenten und warmherzigen Art in zahlreichen anregenden Gesprächen unterstützend zur Seite.

Bei den Mitarbeiterinnen des tumorimmunologischen Labors möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit während meiner Laborphase bedanken. Insbesondere Frau Leonie Majunke danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, mir stets die aktuellsten Daten aus der Success-A-Studie zur Verfügung gestellt und mit mir in vielen Stunden Arbeit die zu untersuchenden Proben kategorisiert zu haben.

Schließlich möchte ich noch meiner Familie danken, die mir stets großen Rückhalt gegeben hat.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Angela Julia Rademacher
Geburtsdatum: 14.10.1987
Geburtsort: München

Schulische Ausbildung

1998 - 2007 Gymnasium Tutzing, Abschluss: Abitur (Note 1,3)
1994 - 1998 Grundschule Tutzing

Studium

10/2007 - 10/2013 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/2013 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
09/2009 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,5)

Beruf

Seit 2014 Assistenzärztin in der Unfallchirurgie am Klinikum Dachau, akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München

Eidesstattliche Versicherung

Rademacher, Angela Julia

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Deskriptive Verlaufsanalyse der Wachstumsfaktoren *Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF A)* und *Vascular Endothelial Growth Factor 165b (VEGF 165b)* bei Brustkrebspatientinnen unter Berücksichtigung ihrer Wertigkeit als Prognosefaktoren“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und aller Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12.12.2015
