

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Thomssen)

**Einfluss von Biopsie-, Aufarbeitungs- und Asservierungsbedingungen auf  
den Nachweis von urokinase type plasminogen activator (uPA)  
und plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) beim Mammakarzinom**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Doktor med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ursula Katharina Bauerfeind, geb. Beau  
geboren am 01.01.1976 in Lutherstadt Wittenberg

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Jürgen Dittmer  
Prof. Dr. rer. nat. habil. Matthias Dürst (Jena)

Eröffnung: 28.10.2008

Verteidigung: 02.07.2009

**Für meine Eltern**

## **Referat und bibliographische Beschreibung**

Das Mammakarzinom ist eines der häufigsten Karzinome der Frauen. Allein in Deutschland gibt es jährlich mehr als 55.000 Neuerkrankungen. Bezüglich der Mortalität ist das Mammakarzinom in Deutschland die häufigste Krebstodesursache bei Frauen.

Bedeutend für die Verhinderung von Mammakarzinom-Rezidiven und -Todesfällen ist vor allem die adjuvante systemische Therapie.

Die Festlegung der adjuvanten systemischen Therapie einer Mammakarzinompatientin erfolgt im Rahmen einer individualisierten Risikoeinstufung. Mit Hilfe prognostischer Faktoren kann eine Vorhersage des Krankheitsverlaufes und somit die Abschätzung des individuellen Rezidiv- und Sterberisikos einer Patientin erfolgen.

Neben den traditionellen Prognosefaktoren werden neue tumorbiologische Prognosefaktoren, die Serinproteasen urokinase type plasminogen activator (uPA) und plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), für die Entscheidung der adjuvanten systemischen Therapie hinzugezogen.

Derzeitiger Standard ist die Messung der Serinproteasen uPA und PAI-1 mittels ELISA. Faktoren, die während der Aufarbeitung und Lagerung das Tumorgewebe beeinflussen, verändern unter Umständen das ELISA-Messergebnis.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, welchen Einfluss unterschiedliche Biopsie-, Aufarbeitungs- und Asservierungsbedingungen, im Vergleich zum Standardprotokoll, auf den Nachweis der Proteine uPA und PAI-1 mittels ELISA haben.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse der jeweiligen Untersuchung und die Bedeutung für den klinischen Alltag werden hier diskutiert.

Bauerfeind, Ursula:

Einfluss von Biopsie-, Aufarbeitungs- und Asservierungsbedingungen auf den Nachweis von urokinase type plasminogen activator (uPA) und plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) beim Mammakarzinom

Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2008

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1.	Epidemiologie des Mammakarzinoms .....	1
1.2.	Histologie des invasiven Mammakarzinoms.....	2
1.3.	Prognoseparameter; Risikoeinschätzung, prädiktive Faktoren .....	3
1.4.	Risikoeinstufung nach St. Gallen Kriterien.....	4
1.5.	Klinisch relevante Prognose- und prädiktive Faktoren .....	5
1.5.1.	Regionäre Lymphknoten (N) .....	5
1.5.3.	Grading (G) .....	6
1.5.4.	Hormonrezeptorstatus .....	6
1.5.5.	Alter.....	7
1.5.6.	Fernmetastasen M .....	7
1.5.7.	HER-2.....	8
1.6.	Metastasierung und “neue” tumorbiologische Prognosefaktoren .....	8
1.6.1.	Invasion und Metastasierung.....	9
1.6.2.	Plasminogenaktivatorsystem.....	10
2.	Zielsetzung und Fragestellungen.....	13
2.1.	Zielsetzung .....	13
2.2.	Fragestellungen .....	14
3.	Patienten, Material und Methoden .....	16
3.1.	Patienten .....	16
3.2.	Material .....	16
3.3.	Methoden.....	18
3.3.1.	Standardprotokoll: Probenasservierung, -vorbereitung, Proteinbestimmung und uPA/PAI-1 ELISA Testdurchführung.....	18
3.3.2.	Probenasservierung und -vorbereitung gemäß Zielsetzung und Fragestellung .....	21
3.3.3.	Methoden der Auswertung und der Statistik.....	25
4.	Ergebnisse .....	26
4.1.	Asservierungsbedingungen (Frage 1 und 2).....	26
4.2.	Aufarbeitungsbedingungen (Frage 3 und 4).....	46
4.2.1.	Zentrifugation: Ultrazentrifuge versus Tischzentrifuge (Frage 3) .....	46
4.2.2.	Gewebezerkleinerung: Pulverisierung vs. Kryoschnittaufarbeitung (Frage 4).....	50
4.3.	Biopsiebedingungen (Frage 5 und 6) .....	52

4.3.1. Vergleich von in vivo Stanzen mit in vivo OP-Exzidat und Vergleich von ex vivo Stanzen mit ex vivo Exzidat (Frage 5) .....	52
4.3.2. Vergleich von OP-Exzidaten mit und ohne Stanzkanal (Frage 6) .....	55
4.3.3. Tumorhomogenität und Tumorheterogenität (Frage 7) .....	56
5. Diskussion .....	59
5.1. Asservierungsbedingungen .....	61
5.1.1. Lagerungstemperatur und Aufarbeitungszeitpunkt .....	61
5.2. Aufarbeitungsbedingungen .....	62
5.2.1. Zentrifugation .....	62
5.2.2. Gewebezerkleinerung .....	63
5.3. Biopsiebedingungen .....	63
5.3.1. Vergleich ex vivo Stanzen mit ex vivo OP-Exzidat und in vivo Stanzen mit in vivo OP-Exzidaten .....	63
5.3.2. Referenzgewebe und Gewebe mit Stanzkanal .....	65
5.4. Homogenität/Heterogenität .....	65
5.5. Schlussfolgerung .....	68
6. Zusammenfassung .....	69
7. Ausblick .....	70
8. Literaturverzeichnis .....	71
9. Thesen .....	80

tabellarischer Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

Danksagungen

## Abkürzungsverzeichnis

ADH	Atypische Duktale Hyperplasie
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie E.V.
ALH	Atypische Lobuläre Hyperplasie
ACC	Adenoid zystisches Karzinom
BM	Basalmembran
BSA	Bovine Serum Albumin
BRCA1-Gen	Tumorsuppressorgen 1 verantwortlich für eine geordnete DNA-Replikation und DNA-Reparatur
BRCA2-Gen	Tumorsuppressorgen 2 verantwortlich für eine geordnete DNA-Replikation und DNA-Reparatur
cDNA	complementary DNA
CLIS	Carcinoma Lobulare In Situ
DCIS	Duktales Carcinoma In Situ
DFS	Disease Free Survival
DH	Duktale Hyperplasie
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
ECM	Extrazelluläre Matrix
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FU	Follow Up
G	Grading
GR	Grades of Recommendation
HER-2	Protoonkogen ERB-B2
HR	Hormonrezeptorstatus (umfasst ER und PR)
IHC	Immunhistochemie
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LK	Lymphknoten
LOE	Oxford Level of Evidence
M	Metastase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
N	Nodalstatus
NOS	Not otherwise specified

nd	nicht bestimmbar
OP	Operation
OT	Objektträger
PA	plasminogen activator
PAI-1	plasminogen activator inhibitor - 1
PBS	Phosphate-buffered saline
PR	Progesteronrezeptor
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real time (quantitative) Polymerasekettenreaktion
SLNE	Sentinellymphnode Exzision
T	Tumor
TDLE	Terminale Duktulolobuläre Einheit
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Triton-X	(Triton X-100) ein p-tert-Octylphenol-Derivat mit einer Polyethylenglykol-Seitenkette, aus 9-10 Ethylenoxid-Einheiten
tPA	tissue-type plasminogen activator
TZ	Tischzentrifuge
uPA	urokinase type plasminogen activator
uPA-R	urokinase type plasminogen activator -Rezeptor
UZ	Ultrazentrifuge
WR	Working Reagenz

## 1. Einleitung

### 1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist das bei weitem häufigste Karzinom bei Frauen überhaupt. Es tritt besonders häufig in der weißen Bevölkerung der USA, in England, Skandinavien und Deutschland auf, selten dagegen in Japan, den romanischen Ländern und Südamerika. Jedes Jahr erkranken über 1 Million Frauen neu am Mammakarzinom, allein in Deutschland sind es 55.689 Neuerkrankungen im Jahr von denen etwa ein Drittel tödlich verläuft. Bezüglich der Mortalität ist das Mammakarzinom in Deutschland die häufigste Krebstodesursache bei Frauen (vor Kolonkarzinom, Bronchialkarzinom, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und Ovarialkarzinom). Etwa ein Viertel aller malignen Tumoren der Frau entstehen in der Brust. Bei etwa 5 % der Betroffenen sind sogar beide Mammae beteiligt. Mit höherem Lebensalter steigt auch die Inzidenz des Mammakarzinoms. Das mittlere Erkrankungsalter liegt derzeit zwischen dem 44. und dem 79. Lebensjahr (Median 63,9). (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister, 2004; Robert-Koch-Institut 2005 )

Durch die Screeningmammographie wird die Erkennung invasiver Mammakarzinome in früheren und prognostisch günstigeren Stadien (d.h. vor der Generalisation) ermöglicht. Außerdem ermöglicht wird die Erkennung von in-situ-Karzinomen, die zwar selbst (noch) nicht Ausgangsort von Metastasierung sind und damit prognostisch einem Karzinom nicht gleichzusetzen sind, die aber mit einem deutlich erhöhten Risiko für die spätere Entstehung eines invasiven Karzinoms verbunden sind. Die Entdeckung der Krebsvorstufen, bzw. der Karzinome in günstigerem Stadium sind mit einer Mortalitätsreduktion verbunden. (S3-Leitlinie 2002, Schulz et al. 2001; Heywang-Köbrunner et al. 2003)

Bedeutend für die Verhinderung von Mammakarzinom-Rezidiven und -Todesfällen ist die adjuvante Therapie des Mammakarzinoms. Seit ihrer Einführung haben sich die adjuvante Hormon- und die adjuvante Chemotherapie über die ca. letzten 25 Jahre zu einem integralen und unverzichtbaren Bestandteil in der Therapie des Mammakarzinoms entwickelt. Die Wirksamkeit beider Therapieformen wurde in einer großen Anzahl von randomisierten Studien untersucht und immer wieder bestätigt. (EBCTC, 2005)

Epidemiologische Unterschiede hängen höchstwahrscheinlich mehr von den Ernährungsgewohnheiten und der Fertilität als von rassischen Unterschieden ab. Für die Bedeutung endokriner Faktoren in der Ätiologie des Mammakarzinoms sprechen u. a. das geringere Risiko bei Frauen mit einer Erstschwangerschaft vor dem 20. Lebensjahr, vielen Kindern und langer Laktation. Demzufolge haben Frauen mit einer Erstschwangerschaft nach dem 35. Lebensjahr, einer Menarche vor dem 12. Lebensjahr und Menopause nach dem 55. Lebensjahr, ein



erhöhtes Risiko in ihrem Leben an einem Mammakarzinom zu erkranken. Weitere Risikofaktoren sind vorangegangene Brustdrüsenerkrankungen, wie z. B. die duktale Hyperplasie, eine sklerosierende Adenose, die atypische duktale Hyperplasie (ADH)/ atypische lobuläre Hyperplasie (ALH) oder ein duktales bzw. lobuläres Carcinoma in situ (DCIS/LCIS). DCIS und LCIS werden auch Vorläuferläsionen des Mammakarzinoms genannt.

Bei einem Teil der Mammakarzinompatientinnen liegen Veränderungen im p53-Tumorsuppressorgen vor. Ebenfalls verantwortlich für die Entstehung des Mammakarzinoms (3% der Fälle) sind Mutationen im BRCA-1-Gen (Chromosom 17q) oder im BRCA-2-Gen (Chromosom 13q12-13). Beide Gene kodieren Proteine, die bei der DNA-Reparatur mitwirken. Das kumulative Risiko für Trägerinnen mit BRCA-1-Gen-Defekt, bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei 80%, für BRCA-2-Gen-Defekt-Trägerinnen bei 70%. Bei diesen Genträgerinnen ist das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken ebenfalls erhöht. (Böcker et al, 2004)

## **1.2. Histologie des invasiven Mammakarzinoms**

Invasive Mammakarzinome sind infiltrativ wachsende, maligne, epitheliale Tumoren, die ihren Ausgang von in situ Karzinomen nehmen. Im Allgemeinen werden die invasiven Mammakarzinome wie folgt eingeteilt:

- Invasiv lobuläres Mammakarzinom (10-20%)

Das invasive lobuläre Mammakarzinom zeichnet sich durch dissoziiertes Wachstum aus. Genetische und immunhistochemische Untersuchungen zeigen Mutationen in vielen verschiedenen Genen (z.B. im E-Cadherin-Gen mit Verlust der Expression des Adhäsionsmoleküls).

- Invasiv duktales Mammakarzinom

Das invasive duktales Mammakarzinom zeichnet sich durch unregelmäßige, unterschiedlich breite, kohäsiv wachsende Tumorzellkomplexe aus, welche durch unterschiedliche glanduläre Differenzierung gekennzeichnet sind. Diese Differenzierungen lassen auf ihren Namen schließen. (Böcker et al, 2004)

nicht weiter spezifiziert (NOS) (~ 80 %)

medulläres Karzinom (< 1 %)

muzinöses Karzinom (2 %)

tubuläres Karzinom (1-2 %)

papilläres Karzinom (< 1 %)

Morbus Paget der Mamille mit invasivem duktalem Anteil

Medulläres Karzinom, muzinöses Karzinom, tubuläres Karzinom und das papilläre Karzinom (histologische Subtypen des invasiv duktalem Mammakarzinoms) sind mit einem geringeren metastatischen Potenzial und mit einer eher guten Prognose verbunden. (Harbeck et al, 2002; Ellis et al, 1992)

### **1.3. Prognoseparameter; Risikoeinschätzung, prädiktive Faktoren**

“Prognostische Faktoren erlauben eine Vorhersage des Krankheitsverlaufes und somit die Abschätzung des individuellen Rezidiv- und Sterberisikos einer Patientin. Bei Patientinnen ohne adjuvante Systemtherapie spiegelt die Korrelation zwischen Prognosefaktor und Krankheitsverlauf (bis zum Rezidiv) den direkten Einfluss des Faktors auf die Tumoraggressivität wieder. Bei Patientinnen mit adjuvanter Systemtherapie wird die Korrelation zwischen Prognosefaktor und aggressivem Krankheitsverlauf unter Umständen durch den Einfluss des Faktors auf das Therapieansprechen beeinflusst. So kann z. B. eine fehlende Korrelation zwischen Prognosefaktor und aggressivem Krankheitsverlauf durch ein gutes Ansprechen der “Hochrisikopatientinnen” auf die verabreichte adjuvante Therapie bedingt sein, der gleiche Faktor aber bei unbehandelten Patientinnen sehr stark mit einer schlechten Prognose korrelieren. Prädiktive Faktoren bezeichnen Merkmale der Tumorerkrankung, die helfen, die Wahrscheinlichkeit des Therapieerfolgs vorherzusagen und damit zu einer selektiven Therapiewahl beitragen. Im Wesentlichen sind es drei Gründe, die die Verwendung von prognostischen und prädiktiven Faktoren für die Therapieplanung beim Mammakarzinom klinisch sinnvoll erscheinen lassen. Diese Faktoren sollen helfen

- Patientinnen mit sehr guter Prognose zu identifizieren, die aufgrund ihres sehr geringen Rezidivrisikos nach der lokoregionären Behandlung, in Anbetracht der damit verbundenen Nebenwirkungen, nicht von einer adjuvanten systemischen Therapie (vor allem Chemotherapie) profitieren;
- Patientinnen mit einer schlechteren Prognose zu erkennen, die unbedingt eine adjuvante systemische (Chemo-) Therapie, ggf. auch eine aggressive Therapie, benötigen; festzustellen, welche Patientin von welcher Therapie profitiert und eine Vorhersage über Ansprechen oder Resistenz für bestimmte Therapeutika zu ermöglichen.” (Zitat: Harbeck et al, 2002)

### **Die klinisch relevanten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom sind:**

- Alter
- Lymphknotenstatus
- Tumorgröße
- Histologischer Typ
- Grading
- Steroidhormonrezeptor-Status
- uPA / PAI-1
- HER-2/neu
- Tumorzellnachweis im Knochenmark
- Proliferationsfaktoren

### **Die klinisch relevanten prädiktiven Faktoren beim Mammakarzinom sind:**

- Steroidhormonrezeptorstatus
- Menopausenstatus
- HER-2/-Status

Bis dato erfolgt die Festlegung der adjuvanten Therapie für eine Patientin mit Mammakarzinom nach einer individualisierten Risikoeinstufung nach den St. Gallen-Empfehlungen (Expertenkonsens). Berücksichtigt werden neben der Tumorgröße und des Lymphknotenstatus (Anzahl befallener Lymphknoten) auch Grading, Hormonrezeptorstatus, HER-2/-Status, Menopausenstatus und Alter der Patientin. (Goldhirsch et al, 2005) Weiterhin wurde bereits im Jahr 2005 auf der „Internationalen Mammakarzinom – Konferenz“ in St. Gallen die Stellung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 ausgiebig diskutiert und die zunehmende praktische Bedeutung der Serinproteasen uPA und PAI-1 hervorgehoben. (Goldhirsch et al, 2005)

Die praktische Bedeutung von uPA und PAI-1, vor allem für die Beurteilung der Krankheitsprognose der nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen, wurde außerdem durch die ASCO-guidelines im Jahr 2007 betont. ([www.asco.org/guidelines/breasttm.](http://www.asco.org/guidelines/breasttm))

#### **1.4. Risikoeinstufung nach St. Gallen Kriterien**

##### **a) Niedriges Risiko (low risk)**

Tab. 1: Risikoeinstufung low risk nach St. Gallen Kriterien

Nodalnegatives Mammakarzinom UND alle der folgenden Merkmale
pT ≤ 2 cm UND

Malignitätsgrad 1 UND
Keine peritumorale Gefäßinvasion UND
Keine HER-2/neu Genexpression UND
Lebensalter $\geq 35$ Jahre

## b) Mittleres Risiko

Tab. 2: Risikoeinstufung intermediate risk nach St. Gallen Kriterien

Nodalnegatives Mammakarzinom UND mindestens eins der folgenden Merkmale
pT >2 cm ODER
Malignitätsgrad 2–3 ODER
Vorhandensein von peritumorale Gefäßinvasion ODER
HER-2/neu Genüberexpression
Lebensalter <35 Jahre
Nodalpositives Mammakarzinom (1–3 Lymphknoten) UND
keine HER-2/neu Genexpression

## c) Hohes Risiko (high risk)

Tab. 3: Risikoeinstufung high risk nach St. Gallen Kriterien

Nodalpositives Mammakarzinom (1–3 Lymphknoten) UND
HER-2/neu Genüberexpression
Nodalpositives Mammakarzinom (4 oder mehr Lymphknoten)

## 1.5. Klinisch relevante Prognose- und prädiktive Faktoren

### 1.5.1. Regionäre Lymphknoten (N)

Der axilläre Nodalstatus ist nach wie vor der stärkste Prognosefaktor beim Mammakarzinom. Hierbei korreliert das Rezidivrisiko signifikant mit der Anzahl der durch Tumorzellen befallenen Lymphknoten. Dies spiegelt sich in dem Prozentsatz der geheilten Patienten mit (25%) oder ohne (70%) Lymphknotenbefall wider. (Harbeck et al, 2002; Carter et al, 1989)

### 1.5.2. Primärtumorgröße (T)

Ebenfalls ein wichtiger Prognosefaktor ist die Größe des Primärtumors. Es gibt eine Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors und der Rezidivwahrscheinlichkeit beim Mammakarzinom. Beim nodalnegativen Mammakarzinom haben die Tumoren welche unter einer

Tumorgröße von 1 cm liegen in den meisten Fällen eine gute Prognose. Anders bei den nodalpositiven Mammakarzinomen: hier spielt die Größe des Primärtumors nur eine untergeordnete prognostische Bedeutung. (Harbeck et al, 2002; Carter et al, 1989; Clark et al, 2000)

### 1.5.3. Grading (G)

Alle Mammakarzinome werden hinsichtlich ihres Malignitätsgrades eingestuft. Hierbei spielen histologische und zytologische Kriterien, wie Kernatypien, Mitosezahl und Differenzierung eine Rolle.

- **G1** gut differenziert – gute Prognose
- **G3** schlecht differenziert – schlechtere Prognose

Nur bei etwa 20-30% der Patientinnen finden sich die Differenzierungen G1 und G3.

Ca. 70% der Patientinnen haben einen mittelgradig differenzierten Tumor **G2**. Hier gilt es andere prognostische Kriterien heranzuziehen. (Harbeck et al, 2002)

### 1.5.4. Hormonrezeptorstatus

Der Östrogenrezeptor (ER) ist ein wichtiger diagnostischer Marker beim Mammakarzinom. Er wird durch Östrogen aktiviert und kann über so genannte genomische und nicht-genomische Wirkungsweise das Wachstum von Mammakarzinomzellen stimulieren. Es existieren zwei Unterformen des Östrogenrezeptors: ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Der ER $\alpha$  wird routinemäßig bestimmt und er wird für die Therapieentscheidung herangezogen.

Fuqua et al. zeigte 2003 an 242 Patientinnen, dass die Effekte der Östrogenwirkung hauptsächlich über den ER $\alpha$  vermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen von ER $\alpha$  mit dem Progesteronrezeptor (PR) assoziiert ist. In den Östrogen induzierten Mammakarzinomen scheint ER $\alpha$  ein prädominanter Regulator zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass ER $\alpha$  mit einem niedrigem Grading, Diploidie und einer niedrigen S-Phase assoziiert ist; demzufolge ein gutes prognostisches Profil besitzt.

Die Bedeutung von ER $\beta$  ist weniger geklärt. Die ER $\beta$ -mRNA lässt sich sowohl in neoplastischen, als auch in normalem Mammagewebe nachweisen. ER $\beta$  ist mit Aneuploidie assoziiert, zeigt aber keine Assoziation mit dem Tumorgrading oder der S-Phase. Andere Studien zeigen, dass beide, Östrogen und Antiöstrogen, über den ER $\beta$  wirken können. (Fuqua et al, 1999 und 2003) Interessanterweise ist der Level von ER $\beta$ -mRNA variabel unter den Brusttumoren, korreliert aber nicht mit der ER $\alpha$ -Expression, obwohl die beiden Rezeptoren im gleichen Tumor

zusammen exprimiert werden können. Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob die ER $\beta$ -Expression mit anderen bekannten Prognosefaktoren korreliert und auf deren Ansprechen auf eine endokrine Therapie. Dotzlaw et al zeigten, dass der Nachweis des ER $\beta$  ein gutes Ansprechen auf eine endokrine Therapie bedeutet. Weiterhin war der Nachweis des ER $\beta$  niedriger in PR-positiven Tumoren als in PR-negativen Tumoren. Demzufolge erscheint der ER $\beta$  niedriger in ER+/PR+ -Tumoren, als in ER+/PR- -Tumoren. (Dotzlaw et al, 1999) Zusammenfassend ist der Steroidrezeptorstatus (Estrogen-/Progesteronrezeptor) einer der evidenzbasierten prädiktiven Faktoren zur Erstellung von Therapiekonzepten beim Mammakarzinom. Gemäß AGO-Empfehlung (LOE I; GR A) ist die Bestimmung des Steroidrezeptorstatus bei allen Mammakarzinomen Standard. (www.ago-online.de) Besonders gut zugänglich für eine antihormonelle/endokrine Therapie sind hormonrezeptorpositive Mammakarzinome. Hormonrezeptornegative Patientinnen profitieren nicht von einer endokrinen Therapie. Prognostischen Wert hat ebenfalls der Menopausenstatus. Dieser ist eng mit dem Hormonrezeptorstatus verbunden. So ist die Suppression der Ovarien insbesondere für Patientinnen, bei denen ein Hormonrezeptor-positiver Tumor gefunden wurde und die dazu prämenopausal sind, eine wirksame Therapieoption. (Harbeck et al, 2002)

#### **1.5.5. Alter**

Sehr häufig haben insbesondere die jungen Patientinnen aggressive Mammakarzinome. Vor allem die Patientinnen, welche noch nicht das 35. Lebensjahr erreicht haben, sind davon betroffen. Demzufolge kommt auch dem Alter der Patientin eine prognostische Bedeutung zu. Des Weiteren spielt bei jener Patientengruppe (<35. Lj.) auch der Menopausenstatus (prädiktiver Faktor) eine wichtige Rolle (insbesondere beim hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom) hinsichtlich der Auswahl der endokrinen Therapiemöglichkeiten. (Harbeck et al, 2002)

#### **1.5.6. Fernmetastasen M**

Die adjuvante systemische Therapie erfolgt unter Berücksichtigung des individuellen Metastasierungsrisikos. Je niedriger das Metastasierungsrisiko einer Patientin mit primärem Mammakarzinom, desto notwendiger ist es, über Therapieneben- und Langzeitwirkungen nachzudenken. Für die Therapieplanung ist die möglichst realistische Abschätzung des individuellen Risikos notwendig. Nachweisbare Fernmetastasen bei der Primärdiagnose sind vom Tumorstadium abhängig. Eine „aggressive“ Therapiestrategie wird vor allem bei Frauen mit fortgeschrittener Tumorerkrankung ohne Nachweis von Fernmetastasen (M0) gewählt. Werden Fernmetastasen (M1) diagnostiziert, würden, wegen der im Regelfall gegebenen Unheil-

barkeit der Erkrankung, weniger belastende Therapien aus palliativer Indikation verwendet. (Kahlert et al, 2005)

Ergänzend zur pTNM-Klassifikation werden die Tumoren durch die Residualtumor-Klassifikation (R) eingeteilt. Hierbei steht R2 für einen positiven Resektionsrand, welcher makroskopisch sichtbar ist und R1 für einen positiven Resektionsrand welcher mikroskopisch vorliegt. Ist mikroskopisch kein Nachweis von invasiven Tumorzellen am Resektionsrand nachweisbar, liegt eine R0-Resektion vor. Eine R0-Resektion des Mammakarzinoms ist hinsichtlich der niedrigeren Rezidivwahrscheinlichkeit anzustreben. Ein erhöhtes Risiko für lokale Tumorrezidive stellt die so genannte peritumorale Lymphgefäßinvasion dar. Das Vorhandensein der Lymphgefäßinvasion wird durch L1 das Fehlen durch L0 gekennzeichnet. (UICC, 2002)

### **1.5.7. HER-2**

Zu den sowohl klinisch relevanten prognostischen, als auch prädiktiven Faktoren und mit einer ungünstigeren Prognose bei Mammakarzinompatientinnen assoziiert, gehört das Protoonkogen ERB-B2 (HER-2/neu; Wachstumsfaktor-Rezeptor) (Slamon et al, 1987; O'Reilly et al, 1991). Protoonkogene sind normale zelluläre Gene, die bei Deregulierung das Tumorstadium stimulieren. Deregulationen können z. B. Mutationen oder Genamplifikate zugrunde liegen. Der Wachstumsfaktor-Rezeptor HER-2/neu besteht aus einer extrazellulären Liganden-domäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne. Die katalytische Domäne weist eine Protein-(Tyrosin-)Kinase-Aktivität auf. Bei Überexpression von HER-2/neu durch Genamplifikation oder Expression von mutierten, konstitutiv aktiven HER-2, kommt es zu einer dauerhaften mitogenen Stimulation. (Böcker et al, 2004) HER-2/neu kann durch immunhistochemische Untersuchung (IHC) an fixierten Tumorblöcken diagnostiziert werden, ebenfalls ist eine HER-2-Genamplifikation mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an fixierten Tumorblöcken möglich. Geeignet für eine Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®; Zielmolekül: HER-2/neu- Onkoprotein) sind Mammakarzinompatientinnen mit HER-2-Überexpression (IHC 3+ oder FISH-Test positiv: wenn das Verhältnis von der Anzahl der Kopien des HER-2-Gens zur Anzahl des Chromosom 17 größer oder gleich zwei ist, oder wenn mehr als vier Kopien des HER-2-Gens pro Tumorzelle vorliegen).

## **1.6. Metastasierung und „neue“ tumorbiologische Prognosefaktoren**

In vielen Studien (z.B. NNBC-3 Europe Studie) wird derzeit die Relevanz der „neuen Prognosefaktoren“ untersucht, um eine genauere Aussage über die Prognose und den Krankheits-

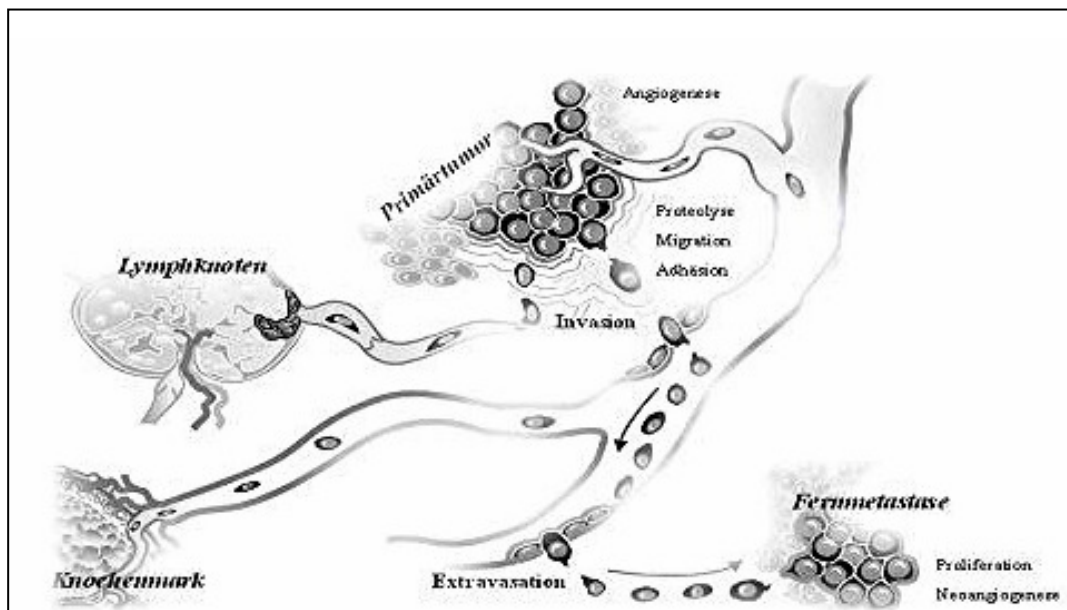
verlauf des Mammakarzinoms vorher sagen zu können; vor allem die nodalnegativen Patientinnen betreffend. Bis dato gelten in Deutschland die aktuellen internationalen Konsensusrichtlinien nach der St. Gallen Risikoabschätzung. Anhand der klinisch etablierten Prognosefaktoren wird in ca. 90% aller Mammakarzinomfälle eine adjuvante systemische Therapie empfohlen. Nur etwa 5-10 % der Patientinnen werden nach dieser Risikoabschätzung in die so genannte low risk Gruppe eingestuft. Wichtig zu wissen ist, dass nur ca. 30% der nodalnegativen Patientinnen jemals ein Rezidiv ihrer Erkrankung erleiden werden, d. h. mehr als die Hälfte aller nodalnegativen Patientinnen wird derzeit übertherapiert. Deshalb erscheinen neue und genauere Möglichkeiten zur optimalen Risikoabschätzung notwendig, um eine gezielte therapeutische Behandlung des Mammakarzinoms zu gewährleisten. Derzeit existieren ungefähr 100 biologische Faktoren, für die eine prognostische Bedeutung postuliert wird. Die Level-1-Evidence besteht lediglich für die Invasionsfaktoren uPA und PAI-1, viele der anderen Faktoren sind für den routinemäßigen Einsatz als Prognosefaktoren oft nicht geeignet. (Harbeck et al, 2002; Jänicke et al, 2001, Look et al, 2002) Im Jahr 2005 wurde die Stellung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 auf der „Internationalen Mammakarzinom – Konferenz“ in St. Gallen ausgiebig diskutiert und die zunehmende praktische und klinische Bedeutung der Serinproteasen hervorgehoben, insbesondere da der Nachweis von uPA und PAI-1 einfacher wird (z.B. micro-ELISA nach Aufarbeitung von Mammakarzinomgewebe). (Goldhirsch et al, 2005) Die Bedeutung von uPA und PAI-1 wurde außerdem durch die ASCO-guidelines im Jahr 2007 unterstrichen.

### **1.6.1. Invasion und Metastasierung**

Um Metastasen auszubilden, müssen die Tumorzellen Anschluss an das Blut- bzw. Lymphsystem finden (= Invasion / Intravasation). Das heißt, die Tumorzelle muss sich aus dem Tumorzellverband herauslösen und in die extrazelluläre Matrix eindringen. Dazu ist die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten notwendig. Die interzellulären Haftstrukturen werden vor allem durch Cadherine gesteuert. Cadherine sind Proteine, die durch homologe Interaktionen Zell-Zell-Kontakte ausbilden und fördern. Dabei unterscheidet man zwischen E-Cadherin (Epithelzelladhäsion), N-Cadherin (Neuralzelladhäsion), P-Cadherin (Plazentazelladhäsion) und Desmocollin (Desmosomenbestandteil). Kommt es z. B. bei Tumoren zur fehlenden Expression des E-Cadherin (durch Allelverlust oder E-Cadherin-Gen-Mutation), resultiert daraus eine verminderte Zelladhäsion. Des Weiteren sind Tumorzellen in der Lage, die extrazelluläre Matrix (EZM) durch degradierende Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP), Serinproteasen (Plasmin, Plasminogenaktivatoren), Cysteinproteasen (Kathepsine), Hyaloroni-



dasen und Proteoglykanasen abzubauen und in diese einzudringen. Diese degradierenden Enzyme können von den Tumorzellen sezerniert bzw. aktiviert werden. Außerdem ermöglicht das Aktinfilamentsystem die Fortbewegung der Tumorzelle in enzymatisch geöffnete Gewebsräume (= Migration / Lokomotion). Dieses wird unterstützt durch membranständige, extrazelluläre Rezeptoren der Tumorzellen (z. B. uPA-Rezeptor, Integrine), die sich an den Komponenten der Basalmembran und des Stromas (Kollagen, Fibronectin, Vitronectin) anheften. Diese Rezeptor-Liganden-Bindung transduziert außerdem Signale zum Zellkern, welche zur Induktion der Synthese und Sekretion degradierender Enzyme führt. Diese wiederum tragen zur Motilität der Tumorzellen bei.



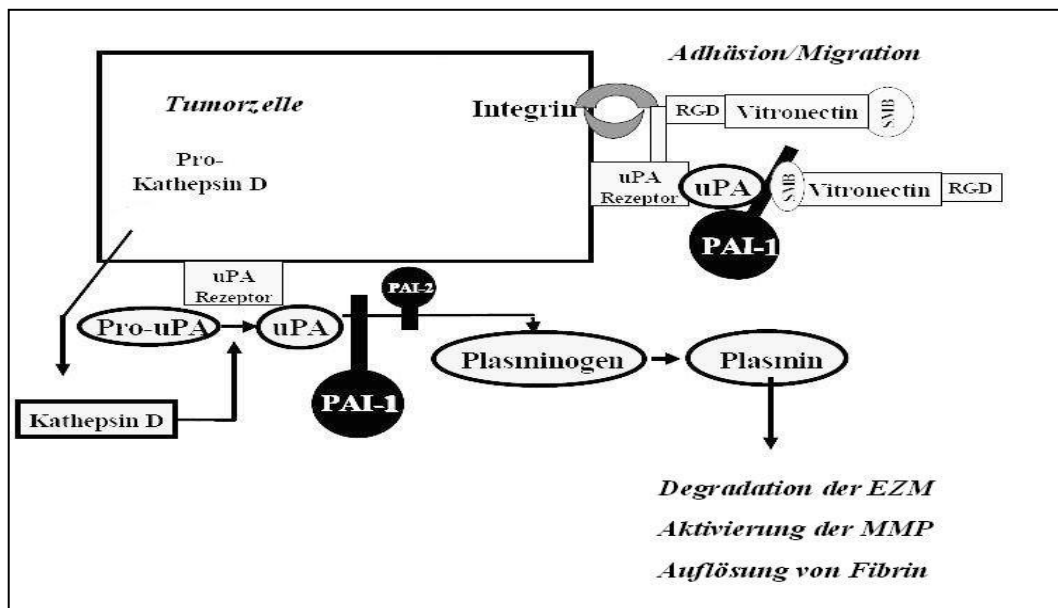
**Abb. 1:** Grundprinzipien der lokalen Tumorprogression und Metastasierung (modifiziert nach Nekarda, 2001)

Nach Invasion in das Blut bzw. Lymphgefäßsystem können sich die Tumorzellen ausbreiten und Anschluss an andere Organsysteme finden. Die Extravasation erfolgt durch Bildung sog. Tumorzellemboli, welche sich an das Gefäßendothel anheften und einen lokalen Gerinnungsprozess einleiten. Ähnlich der Invasion in das Stroma wird durch Proteolyse und adhäsive Prozesse die Gefäßwand durchwandert. Die Tumorzellen gelangen in das Zielorgan, um dort wiederum neue Tumorzellkolonien (Metastasen) auszubilden. Die Neoangiogenese, für die Ernährung der Tumorzellen notwendig, wird durch Angiogenese-Stimulatoren und – Inhibitoren induziert. (Böcker et al, 2004)

### 1.6.2. Plasminogenaktivatorsystem

Die Plasminogenaktivatoren sind hochspezifische Serinproteasen, welche die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin katalysieren. Dabei konnten zwei verschiedene Plasminogenak-

tivatoren identifiziert werden: uPA (urokinase-type) und tPA (tissue-type). Beide Plasminogenaktivatoren katalysieren die gleiche Reaktion. Am Gewebeumbau ist vorrangig uPA beteiligt. Bei der vaskulären Fibrinolyse (Thrombolyse) spielt tPA die größere Rolle. Die inaktive Vorstufe des menschlichen uPA bezeichnet man als pro-uPA; dieses wird als Glycoprotein (52 kDa) von den Tumor- und Stromazellen sezerniert. Viele verschiedene Zelltypen sezernieren pro-uPA in physiologischer Höhe, allerdings konnte ein erhöhter Spiegel an pro-uPA bei einer Vielzahl von malignen Tumorzellen aufgezeigt werden. Beide, pro-uPA und uPA, binden mit hoher Affinität an den uPA-Rezeptor (uPA-R). Sowohl uPA, als auch tPA sind in der Lage das inaktive Enzym (Zymogen) Plasminogen in die aktive Protease Plasmin umzuwandeln. (Sidenius et al, 2003) Dabei führt die Plasminaktivierung durch uPA zur Zerstörung (Degradation) der extrazellulären Gewebematrix. Mit der Zerstörung der extrazellulären Gewebematrix beginnt die Invasion der Tumorzelle. Sowohl pro-uPA als auch uPA binden mit hoher Affinität an den an der Tumorzelle befindlichen uPA-Rezeptor (uPA-R/CD87). Dieser konnte erstmal 1985 in Fibroblasten aufgezeigt werden. (Sidenius et al, 2003) Durch die Anbindung des uPA an den uPA-R ist die Tumorzelle in der Lage, die extrazelluläre Proteolyse zu fördern. Dies geschieht u. a. durch Aktivierung von degradierenden Enzymen wie Kollagenasen (z.B. MMP) und Wachstumsfaktoren (Duffy et al, 1994). Außerdem reguliert uPA/uPA-R die Zell/ECM Interaktionen als ein Adhäsionsrezeptor für Vitronektin und besitzt die Fähigkeit, die Integrin-Funktion (alpha, beta Integrin) zu modulieren. So wird u. a. von uPA/uPA-R die Zell-Migration gesteuert. (Sidenius et al, 2003) Bindet uPA/PAI-1 an den uPA-Rezeptor, ist die Zelle in der Lage, diesen Komplex durch Endozytose aufzunehmen und abzubauen. Der wieder frei werdende uPA-R kann dann erneut in der Zellmembran als Rezeptor eingebaut werden. Die Funktionalität des Rezeptors wird dabei nicht unbedingt beeinflusst. uPA wird durch die Inhibitoren PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor-1) und PAI-2 (Plasminogenaktivator-Inhibitor-2) reguliert. PAI-1 ist ein Glycoprotein (52 kDa), welches von zahlreichen Zellen sezerniert wird (Gefäßendothel, Thrombozyten, Hepatozyten, Fibroblasten und viele verschiedene Tumorzellen). PAI-1, ein Serin-Proteinase Hemmstoff mit einer reaktiven Peptid-Seitenbindung (Arg345-Met346), ist der Haupt-Inhibitor von uPA. (Lijnen et al, 1995) PAI-1 kann mit zahlreichen Proteasenliganden, einschließlich des Zell-Adhäsionsmoleküls Vitronektin interagieren. Wenn PAI-1 in der extrazellulären Matrix an Vitronektin anbindet, wird er als solches stabilisiert und aktiviert. Neben seiner Funktion als uPA-Inhibitor ist PAI-1 ein wichtiger Regulator der Fibrinolyse, wobei er dann als Hemmer von tPA fungiert. Bei Patienten mit einer venösen Thrombose, kann eine gestörte Fibrinolyse durch eine zu niedrige Konzentration von tPA oder eine gesteigerte Konzentration von PAI-1 hervorgerufen werden.



**Abb.2:** Die Funktionen des Plasminogenaktivator-Komplexes: Perizelluläre Degradation der Matrixstrukturen durch Proteolyse und Steuerung der gerichteten Migration und Adhäsion der Zelle (modifiziert nach Nekarda, 2001)

Bei gut einem Drittel aller Patienten mit spontaner oder wiederkehrender tiefer Beinvenenthrombose liegt eine verminderte fibrinolytische Antwort auf die venösen Verschlüsse vor, was durch unzulängliche t-PA Konzentrationen (25%) und durch gesteigerte PAI-1 Konzentrationen (75%) verursacht wird. (Juhan-Vague et al, 1987) In einigen Studien konnte eine beeinträchtigte fibrinolytische Kapazität nach venösen Verschlüssen, bei Patienten mit thrombotischen Episoden, gezeigt werden. (Prins et al, 1999; Levi et al, 1991; Ridker et al, 1992) In der Physician's Health Study wurde aufgezeigt, dass die PAI-1 Konzentrationen der Patienten, welche eine tiefe Beinvenenthrombose während eines 5-Jahres FU entwickelten, nicht anders war als in der Kontrollgruppe. (Lijnen, 2005) Neue Untersuchungen zeigen, dass PAI-1 auch eine Rolle bei der Zellmigration, Adhäsion und Angiogenese spielt, die unabhängig von seiner Protease-inhibierenden Funktion zu sein scheint. (Sidenius et al, 2003) Neben der aktiven, hemmenden Form von PAI-1, welche sich spontan in eine latente Form umwandeln kann, existiert auch eine Substratform, die an der P1-P1' Seite von seinen Zielenzymen haftet, aber keine stabilen Komplexe formt. Außer seiner Funktion beim Regulieren der Hämostase, spielt PAI-1 eine Rolle in mehreren von Plasminogen-Aktivator oder Plasmin-Aktivität abhängigen biologischen Prozessen. Studien mit transgenen Mäusen haben eine funktionelle Rolle für PAI-1 bei der Wundheilung, Atherosklerose, Stoffwechselstörungen, wie Adipositas und Insulin-Resistenz, Tumorangio-genese, chronischem Stress, Knochenumbau, Asthma, rheumatoider Arthritis, Fibrose, Glomerulonephritis und Sepsis aufgezeigt. Es ist nicht immer klar, ob diese Funktionen von der antiproteolytischen Aktivität von PAI-1 abhängen, bzw. der Anbindung in der extrazellulären Matrix an Vitronectin. (Lijnen, 2005)

## 2. Zielsetzung und Fragestellungen

### 2.1. Zielsetzung

Die Festlegung der adjuvanten Therapie für eine Patientin mit Mammakarzinom erfolgt nach einer individualisierten Risikoeinstufung. Berücksichtigt werden neben der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus auch Grading, Hormonrezeptorstatus, HER-2-Status, Menopausenstatus und Alter der Patientin. Zu der Patientengruppe mit niedrigem Risiko gehören bis dato die Patientinnen, welche **alle** der folgenden Kriterien erfüllen:

Lebensalter größer oder gleich 35 Jahre

Tumordurchmesser kleiner als 2 cm

Grading 1

positiver Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorstatus

N0-Situation nach Axilladisektion, bzw. nach Sentinellymphnode Exzision

keine perivaskuläre Invasion

Nur Patientinnen, welche alle diese Kriterien erfüllen, kann nach den Konsensusrichtlinien der Internationalen Mammakarzinom – Konferenz (St. Gallen) ein Verzicht auf die adjuvante systemische Therapie empfohlen werden.

Die traditionellen Prognosefaktoren beschreiben den Charakter der Tumorbiologie nur unzureichend. Deshalb wurden neue tumorbiologische Prognosefaktoren, die Serinproteasen urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1), für die Entscheidung zur adjuvanten systemischen Therapie hinzugezogen.

Im Jahr 2005 wurde die Stellung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 auf der „Internationalen Mammakarzinom – Konferenz“ in St. Gallen ausgiebig diskutiert und die zunehmende praktische und klinische Bedeutung der Serinproteasen uPA und PAI-1 hervorgehoben. (Goldhirsch et al, 2005) Die praktische Bedeutung von uPA und PAI-1, vor allem für die Beurteilung der Krankheitsprognose der nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen, wurde außerdem durch die ASCO-guidelines im Jahr 2007 betont. ([www.asco.org/guidelines/breasttm](http://www.asco.org/guidelines/breasttm).)

Nodalnegative Mammakarzinompatientinnen, deren Tumor eine niedrige Expression der Proteasen uPA (cut off 3,0 ng/mg Gesamtprotein) und PAI-1 (cut off 14,0 ng/mg Gesamtprotein) aufweist, haben eine günstigere Prognose gegenüber denen mit erhöhten uPA und PAI-1 Werten. Jenen nodalnegativen Patientinnen wird derzeit unter kontrollierten Studienbedingungen (NNBC-3 Europe Studie) der Verzicht auf die adjuvante systemische Therapie angeboten.

Die Messung von uPA/PAI-1 erfolgt mittels ELISA. Dazu ist es nötig, dass uPA und PAI-1 als freie Moleküle in nativer Form vorliegen. Faktoren, die während der Aufarbeitung und Lagerung das Tumorgewebe beeinflussen, verändern unter Umständen das Messergebnis.

## **2.2. Fragestellungen**

Es ergibt sich aus der Zielsetzung eine Reihe von Fragestellungen; die folgenden potentiellen Einflussgrößen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

**Frage 1:** Wie verändert sich die Konzentration von uPA/PAI-1 bei unterschiedlicher **Lagerungstemperatur**?

Es wurden 17 Tumorproben nach Entnahme bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  und in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) schockgefroren.

**Frage 2:** Welchen Einfluss hat der **zeitliche Abstand** zwischen dem Tag der Gewebeasservierung und dem Tag der Gewebeaufarbeitung auf die uPA und PAI-1 Konzentrationen?

17 Tumorproben wurden entsprechend am Tag 0, Tag 15 und am Tag 30 nach Entnahme aufgearbeitet.

**Frage 3:** Welchen Einfluss hat die **Zentrifugalbeschleunigung** bei der Zentrifugation, nach Gewebhomogenisierung, auf die Extrahierung von uPA/PAI-1 und welchen Einfluss haben nicht herunter zentrifugierte Schwebeteilchen auf das Ergebnis des uPA/PAI-1 ELISAs?

33 Gewebeextrakte (nach Tris/Triton Zugabe) wurden jeweils bei  $10^5\text{g}$  und bei  $15.000\text{g}$  zentrifugiert.

**Frage 4:** Ist es notwendig, das gefrorene Tumorgewebe zu pulverisieren oder ist eine andere Art der **Tumorzerkleinerung** (z.B. Kryoschnitt) ausreichend?

7 Tumore wurden vergleichend in pulverisierter Form und in Form von Kryoschnitten aufgearbeitet.

**Frage 5:** Ist eine Aussage zur Konzentration von uPA und PAI-1 aus **kleinsten Mengen** Tumorgewebe möglich?

von 7 Tumoren wurden die uPA und PAI-1 Konzentrationen aus in vivo Tumorstanzen und aus in vivo OP-Exzidaten gemessen und miteinander verglichen. Von weiteren 3 Tumoren wurden die uPA und PAI-1 Konzentrationen aus ex vivo Tumorstanzen und aus ex vivo Exzidaten gemessen und miteinander verglichen.

**Frage 6:** Verändern sich die uPA bzw. PAI-1-Konzentrationen **nach Stanzbiopsie**?

Es konnten von 5 Tumorproben die uPA und PAI-1 Konzentrationen aus OP-Exzidaten mit und ohne Stanzkanal gemessen und miteinander verglichen werden.

**Frage 7:** Wie **homogen/heterogen** ist der Tumor hinsichtlich der uPA/PAI-1 Konzentration?

Es konnten 13 Tumorproben hinsichtlich der Tumorphomogenität bzw. Tumorpheterogenität überprüft werden.

### **3. Patienten, Material und Methoden**

#### **3.1. Patienten**

An der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde im Zeitraum von 01.04.-30.09.2005 von Patientinnen mit histologisch gesichertem primärem Mammakarzinom Tumorgewebe asserviert. Das mediane Alter der Patientinnen betrug 58 Jahre (Range 41-81). Die Asservierung erfolgte sofort nach operativer Entnahme (gemäß der Fragestellungen in flüssigem Stickstoff (-196°C), oder aber auf Trockeneis (-80°C) bzw. bei -20°C) unter der fachlichen Beurteilung eines Pathologen.

Entsprechend der Fragestellung konnten 17 Tumoren für die Frage 1 und 2 aufgearbeitet werden. Des Weiteren wurden 33 Tumoren für die Frage 3 und 7 Tumoren für die Frage 4 verwendet. Dreizehn Tumoren waren groß genug, um Tumorreferenzstücke für die Frage 7 zu asservieren.

Ebenfalls konnten von 7 dieser Patientinnen sonographisch- bzw. mamographisch-gestützte Stanzbiopsien (Frage 5 und 6) entnommen werden. Die Stanzzyylinder wurden in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Nach Beurteilung der Stanzzyylinder durch den Pathologen und der Diagnosestellung "Mammakarzinom" konnten die Stanzzyylinder der Aufarbeitung unterzogen werden.

Mit den Patientinnen wurde die Gewebeentnahme zur Bestimmung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 besprochen und deren Einverständnis eingeholt. Ebenso war ein Ethikvotum (durch die Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) im Vorfeld erteilt worden.

#### **3.2. Material**

Tumorgewebe

gefiltertes deionisiertes H<sub>2</sub>O

Einkanalpipette für den Volumenbereich 10-200 µl bzw. 100-1000 µl

Photometer für Mikrotiterplatten, Meßwellenlänge 450 nm (uPA/PAI-1 ELISA) und Messwellenlänge von 562 nm (BCA Protein Assay)

Kryogefäße - 1ml (Nunc, Wiesbaden, Germany)

Flüssiger Stickstoff

Trockeneis

Tank für flüssigen Stickstoff, -80°C und -20°C Gefrierschrank mit Aufbewahrungssystem

Ultrazentrifuge Optima™ MAX und MAX-E mit Beckmann/Counter Rotor (MLA 130)  
für max. Beschleunigung von  $10^6g$  (Rotation von 130.000 rpm)

Tischzentrifuge Biofuge stratos Heraeus/Kendro max. 50.000g (Rotation 15.000 rpm)

Ultrazentrifugenröhrchen (Fa. Hitachi Koki; Part No. S300536A 2,2ml)

Test Röhrchen 2 ml

Mikro-Dismembrator U (Sartorius AG type 8531722) zur Pulverisierung von gefrorenem Material

Dismembrator Gefäße aus PTFE (SA-8531935, 5 ml) und Wolframkugel (Wolframkarbid, SA-8547203 Ø 5 mm)

Taumel-Rollenmischer “roller mixer SRT 1”

0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Rinderserum Albumin (BSA, Sigma A-7030)

Kontrollproben (Tumorgewebeextrakte aus Nacktmäusen die Transplantate der humanen Brusttumorzelllinie-MDA-MB 231 tragen, z.B. ADI REF 899C)

**FEMTELLE™** (American Diagnostica inc.) uPA/PAI-1 Test (REF 899):

- Anti-human uPA IgG beschichtete Mikrotiterplatten
- Anti-human PAI-1 IgG beschichtete Mikrotiterplatten
- uPA Standard: 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 ng/ml (lyophilisiert)
- PAI-1 Standard: 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 ng/ml (lyophilisiert)
- uPA Detektionsantikörper, biotinyliertes anti-human uPA (lyophilisiert)
- PAI-1 Detektionsantikörper, biotinyliertes anti-human PAI-1 (lyophilisiert)
- uPA Enzym Konjugat, Streptavidin – HRP (60 µl)
- PAI-1 Enzym Konjugat, Streptavidin – HRP (60 µl)
- Enzymkonjugat Verdünner (lyophilisiert)
- Peroxidase Substrat, TMB
- Detergenz, 25% Triton X-100
- PBS Puffer (PBS), pH 7.4
- Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 8.5 (lyophilisiert)

(Lagerung und Stabilität der Reagenzien: die unbenutzten Teststreifen, sowie die flüssigen und lyophilisierten Reagenzien werden bei +2° bis +8°C gelagert. Sie sind bis zu dem auf dem Etikett befindlichen Verfallsdatum zu verwenden. Rekonstituierte Reagenzien können gelagert werden bei +2° bis +8°C, für 2 Wochen.) Vorbereitung der Reagenzien gemäß Femtelle™<sup>FM</sup> Protokoll.



**BCA™ Protein Assay Kit** (Pierce Chemical Co. - #23225; Pierce, Rockford, IL):

- Reagenz A (1000 ml Zusammensetzung: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninic-Säure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid)
- Reagenz B (25 ml, enthält 4% Kupfersulfat)
- Albumin Standard 2mg/ml (1ml-Ampulle, enthält Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin BSA) entspricht 2,0 mg/ml in 0,9% NaCl and 0,05% Natriumazid)

### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. Standardprotokoll: Probenasservierung, -vorbereitung, Proteinbestimmung und uPA/PAI-1 ELISA Testdurchführung

##### a) Probenasservierung

Unmittelbar nach Entnahme wird das entfernte Tumorgewebe histologisch beurteilt und in flüssigem Stickstoff asserviert und noch am gleichen Tag für die uPA/PAI-1 Bestimmung aufgearbeitet.

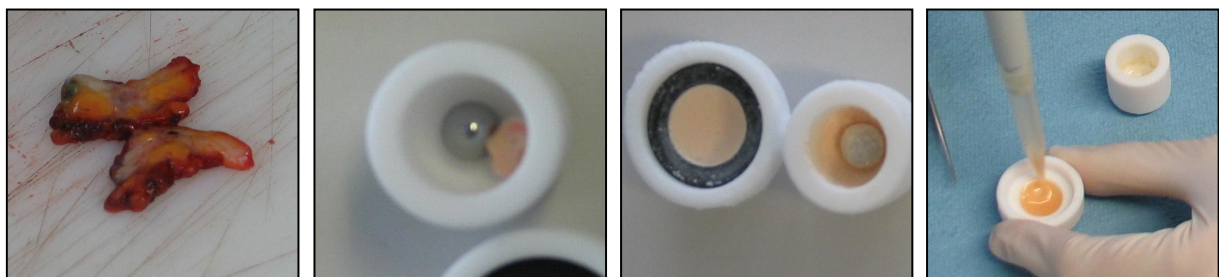
##### b) Probenvorbereitung

###### **Pulverisierung des Gewebes:**

100 mg des gefrorenen Gewebes werden in ein zuvor im flüssigen Stickstoff vorgekühltes Dismembratorgefäß überführt. Zu dem gefrorenen Gewebstück wird auch die Wolframkugel in das vorgekühlte Dismembratorgefäß gegeben. Das verschlossene Dismembratorgefäß wird in den Mikro-Dismembrator-U eingespannt, anschließend wird das Gewebe zweimal a´45 sec bei 2000 rpm im Mikro-Dismembrator-U pulverisiert. (Abb. 3a)

###### **Gewebeextraktion:**

Es werden 600 µl des kalten (4°C) TBS Puffers (pH 8.5) auf das pulverisierte Gewebe gegeben. Nach Entfernen der Wolfram-Kugel aus dem Dismembratorgefäß werden 67 µl der 10%igen Triton-X - Lösung (Lösung TBS-Triton 1%ig) hinzu pipettiert. (Abb. 3a)



**Abb. 3a:** 1. Tumorentnahme und schockgefrieren (-196°C), 2. Pulverisieren, 3. Gewebeextraktion

Die Gewebesuspension wird dann vorsichtig für 14 - 16 h bei 4°C geschüttelt (Taumel-Rollenmischer “roller mixer SRT 1”). Im Anschluss daran wird die Suspension bei 10<sup>5</sup>g für 1h bei 4°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge Optima™ MAX und MAX-E; Rotor MLA 130), um die Zelltrümmer abzutrennen. Mögliche Lipidreste, die sich am Überstand befinden, werden vorsichtig entfernt. Der klare Überstand (Cytosol) und das Pellet können dann in vorbereitete kalte (4°C) Kryoröhrchen überführt werden. Die Aliquotierung der gut durchmischten Cytosole wird in zwei ca. 250 µl Portionen vorgenommen, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Die Lagerung des Gewebeextrakts erfolgt in flüssigem Stickstoff.

### c) **Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Chemical Co. - #23225; Pierce, Rockford, IL)

- Verdünnung der Albumin-Standards gemäß Anleitung
- Vorbereitung des Working-Reagenz (50 Teile des Reagenz A plus 1 Teil des Reagenz B; pro well werden 190 µl WR benötigt, eine Mikrotiterplatte hat 96 wells)
- Verdünnung der Proben:     50 µl Probe + 50 µl TBS/Triton  
                                  20µl Probe + 80 µl TBS/Triton
- Bestückung der Mikrotiterplatte (Probe/Working-Reagenz = 1:20)

Zuerst werden 10 µl vom Standard oder von der Probe in je ein Mikrotiterplattenwell pipettiert. Danach werden 190 µl der WR in jedes “well” hinzu pipettiert und für 30 sec auf dem Schüttler gestellt. Es erfolgt eine Inkubation der Titerplatte bei 37°C für 30 min, anschließend wird diese auf Raumtemperatur abgekühlt. Hiernach können die Proben bei A<sub>562 nm</sub> (Ref. 540-590 nm) im Reader durch gemessen werden.

### d) **uPA/PAI-1 ELISA Testdurchführung**

Die uPA/PAI-1 ELISA Testdurchführung erfolgt mittels FEMTELLE™ (American Diagnostica inc.) uPA/PAI-1 Test (REF 899)

#### **Tag 1**

Als erstes werden die Gewebeextrakt-Proben verdünnt. Die Verdünnung richtet sich nach dem Ergebnis der Proteinbestimmung. (Tab. 4)

Tab. 4:        Verdünnungsreihe der Gewebeextrakte

Gesamtprotein in mg/ml	Verdünnung 1	Verdünnung 2
<0,6	1:5	1:10
<1	1:10	1:20
1-2	1:20	1:20
2-3	1:20	1:60
>3	1:60	1:60

Die benötigte Anzahl der beschichteten uPA Microtiterstreifen wird in die dafür vorgesehene Halterung eingelegt. Dann werden je 100 µl des mitgelieferten uPA Standards (s. Kitkomponenten), der Kontrollproben und der verdünnten Gewebeextrakte in die mit uPA-Antikörper beschichteten Vertiefungen der Microtiterstreifen pipettiert.

Die benötigte Anzahl der beschichteten PAI-1 Microtiterstreifen wird in die dafür vorgesehene Halterung eingelegt. Dann können je 100 µl des mitgelieferten PAI-1 Standards (s. Kitkomponenten), der Kontrollproben und der verdünnten Gewebeextrakte in die mit PAI-1-Antikörper beschichteten Vertiefungen der Microtiterstreifen pipettiert werden.

Von jeder Probe erfolgt eine Doppelwertbestimmung. Die Teststreifen werden über Nacht abgedeckt und bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

## **Tag 2**

Am folgenden Tag wird der Inhalt der Teststreifen verworfen und je 4-mal mit Waschpuffer gewaschen. Danach werden je 100 µl uPA bzw. PAI-1 Detektionsantikörper in die uPA bzw. PAI-1 beschichtete Vertiefung pipettiert. Die Teststreifen können nun abgedeckt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (20° – 25°C) werden.

Wiederum erfolgt eine 4-malige Waschung mit Waschpuffer, dann werden je 100 µl des verdünnten uPA- bzw. PAI-1 Enzymkonjugats in die entsprechenden uPA- bzw. PAI-1 Vertiefungen gegeben, danach erneutes Abdecken der Teststreifen und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur.

Der Inhalt der Teststreifen wird neuerlich verworfen und die Teststreifen werden wieder 4-mal mit Waschpuffer gewaschen. Nun werden je 100 µl TMB Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert, die Teststreifen abgedeckt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei positiver Reaktion ist eine blaue Farbentwicklung zu beobachten.

Um die Reaktion abzustoppen, werden je 50 µl 0,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in die "wells" hinzugegeben. Nach kurzem Mischen färbt sich die Lösung gelb.

Die Messung muss innerhalb von 30 min bei einer Messwellenlänge von 450 nm erfolgen. Der Mittelwert der Extinktion des Nullwerts (Standard 0 ng/ml) wird von den Standards und den Proben abgezogen. Aus den Messwerten der Standards wird die so genannte Standardkurve erstellt (Auftragen der Extinktionswerte gegen die entsprechende uPA bzw. PAI-1 Konzentration). Des Weiteren wird zur Berechnung der uPA bzw. PAI-1 Werte die entsprechende Gleichung zur Standardkurve erstellt.

Unter Verwendung des jeweiligen Extinktionsmittelwerts der verdünnten Probe können die entsprechende uPA und PAI-1 Konzentration in ng/ml berechnet werden. Um die uPA und

PAI-1 Konzentrationen des Gewebeextrakts zu erhalten, muss der Probenwert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Um die uPA und PAI-1 Konzentrationen in ng/mg Gesamtprotein zu erhalten, werden die uPA und PAI-1 Werte (ng/ml) durch die Gesamtproteinkonzentration (mg/ml) des Gewebeextrakts geteilt.

Auswertung: Für uPA wird der cut-off Wert in Extrakten aus Brustkrebsgewebe bei 3 ng/mg Gesamtprotein gesetzt, für PAI-1 bei 14 ng/mg Gesamtprotein.

Zur Vermeidung systematischer Fehler muss streng darauf geachtet werden, dass für die Auswertung zusammengehörige Proben immer im selben Proteinassay und im selben ELISA-Test durch gemessen wurden.

### **3.3.2. Probenasservierung und -vorbereitung gemäß Zielsetzung und Fragestellung**

Noch während des operativen Eingriffes wurde das entfernte Tumorgewebe im Schnellschnittlabor der Pathologie histologisch beurteilt. Das Mammakarzinomgewebe wurde vor Ort asserviert und im Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sofort oder aber entsprechend der Zielsetzung/Fragestellung (siehe im Folgenden) gelagert und zum definierten Zeitpunkt aufgearbeitet.

#### **Zu Frage 1 und 2 in der Zielsetzung/Fragestellung:**

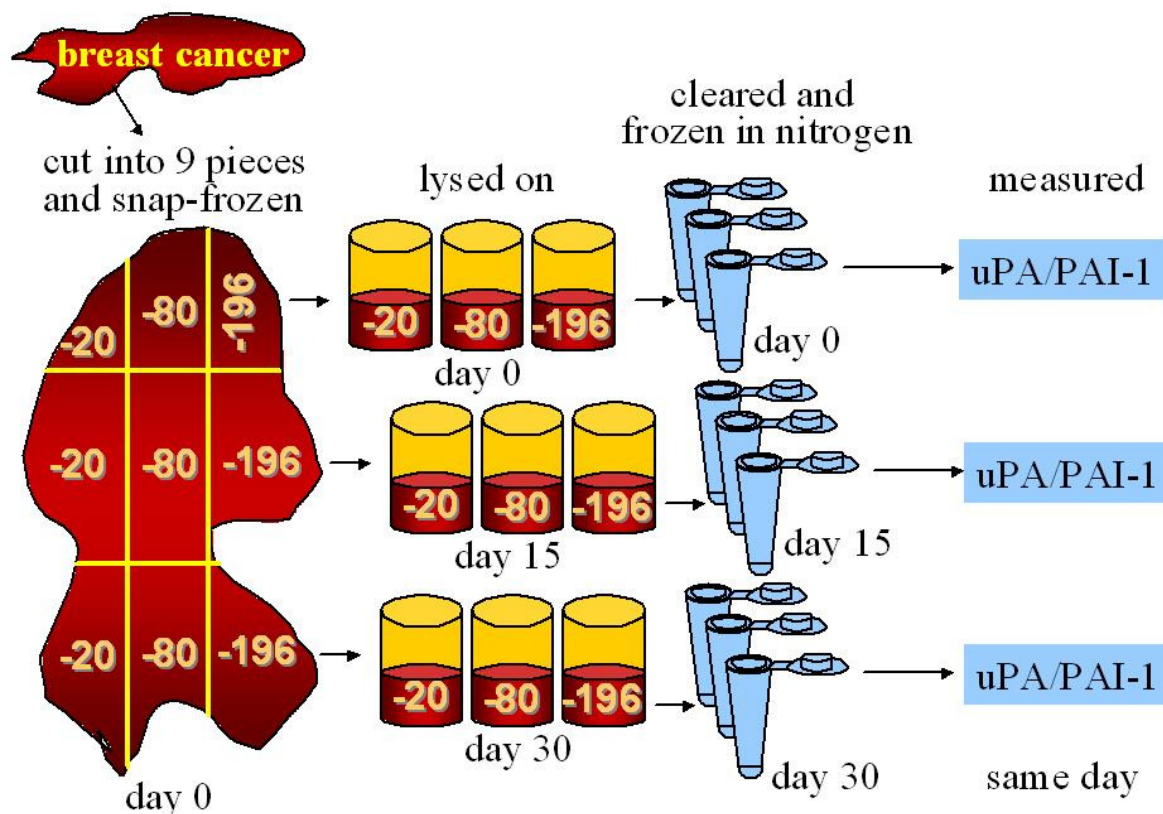
Wie verändert sich die Konzentration von uPA/PAI-1 bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur? Es wurden 17 Tumorproben bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  und in flüssigem Stickstoff archiviert. (Frage 1) Welchen Einfluss hat der zeitliche Abstand zwischen dem Tag der Gewebeasservierung und dem Tag der Gewebeaufarbeitung? 17 Tumorproben wurden entsprechend am Tag 0, Tag 15 und am Tag 30 nach Entnahme aufgearbeitet. (Frage2)

Hintergrund dieser Fragestellung ist, dass die im Standardprotokoll geforderte Asservierung der Mammatumoren von  $-196^{\circ}\text{C}$  in vielen Kliniken nicht gewährleistet werden kann. Das würde bedeuten, dass Patientinnen aus diesen Kliniken, keine adäquate Prognoseabschätzung des Mammakarzinoms zuteil werden könnte. Um diesen Kliniken die Möglichkeit zu eröffnen, Tumorgewebe zur Bestimmung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 an Zentren (etablierte Labors) zu versenden, stellt sich die Frage der Stabilität der Proteine uPA und PAI-1 bei anderen Lagerungstemperaturen und Aufarbeitung zu einem späteren Zeitpunkt.

Das Tumorgewebestück wurde im Schnellschnittlabor entsprechend aufgeteilt und jeweils 3 Tumor- Teilstückchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , 3 Tumor- Teilstückchen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und 3 Tumor- Teilstück-

chen im flüssigen Stickstoff (-196°C) asserviert. (s. Abb. 3b) Es wurde zudem ein Referenzgewebsstück asserviert, welches nach den oben beschriebenen Standards aufgearbeitet wurde. Die Tumor- Teilstückchen hatten dabei ein Gewicht von ca. 30-150 mg.

Entsprechend der jeweiligen Temperaturlagerung (-20°C, -80°C, -196°C) wurde jeweils ein Tumor- Teilstückchen jeder Temperaturkategorie noch am Operationstag (Tag 0), am 15. Tag post operationem (Tag 15) und am 30. Tag post operationem (Tag 30) aufgearbeitet. Bei der Asservierung wurde streng darauf geachtet, dass die jeweils zu vergleichenden Tumor- Teilstückchen unmittelbar beieinander lagen. Die weitere Aufarbeitung der Tumorproben erfolgte nach der oben beschriebenen Asservierung gemäß Standardprotokoll.



**Abb. 3b:** 1. Zerteilen der Tumorscheibe in 9 Teile und schock gefrieren bei -20°C, bei -80°C oder bei -196°C; Aufarbeitung am Entnahmetag (d0) oder am 15. (d15) bzw. 30. (d30) Tag nach Entnahme; 2. Pulverisierung und Gewebeextraktion; 3. Ultrazentrifugation der Suspension und Aliquotierung des Cytosols und Lagerung in flüssigen Stickstoff; 4. uPA/PAI-1 ELISA (Dittmer, 2006)

### Zu Frage 3 in der Zielsetzung:

Welchen Einfluss hat die gewählte Zentrifugalbeschleunigung, nach Homogenisierung des Tumorgewebes, auf die Extrahierung von uPA und PAI-1? Gibt es Unterschiede in der uPA bzw. PAI-1-Konzentration? Welchen Einfluss haben nicht herunter zentrifugierte Schwebeteilchen auf den uPA/PAI-1 ELISA?

Es wurden 33 Tumorproben für den Zentrifugenvergleich in flüssigen Stickstoff schockgefroren und am Entnahmetag aufgearbeitet. Die jeweils gut gemischten Suspensionen wurden nach dem Homogenisieren auf jeweils ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (Tischzentrifuge Biofuge stratos Haraeus/Kendro) und ein Ultrazentrifugenröhrchen aufgeteilt. Die Gewebeextrakte (nach Tris/Triton Zugabe) wurden entsprechend jeweils (über 1h bei 4°C) bei 100.000 g; Ultrazentrifuge; Standardprotokoll) und bei 15.000 g; Tischzentrifuge) zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen.

Der klare Überstand (Cytosol) und das Pellet wurden dann in vorbereitete kalte (4°C) Kryoröhrchen überführt. Die Aliquotierung der gut durchmischten Cytosole erfolgte in zwei ca. 250-µl-Portionen, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Die Lagerung des Gewebeextrakts wurde in flüssigem Stickstoff durchgeführt.

#### **Zu Frage 4 in der Zielsetzung:**

Ist es notwendig, das gefrorene Tumorgewebe zu pulverisieren? Oder ist eine andere Art der Tumorzerkleinerung (z.B. Kryoschnitt) ausreichend? 7 Tumore wurden vergleichend in pulverisierter Form und aus den Kryoschnitten aufgearbeitet.

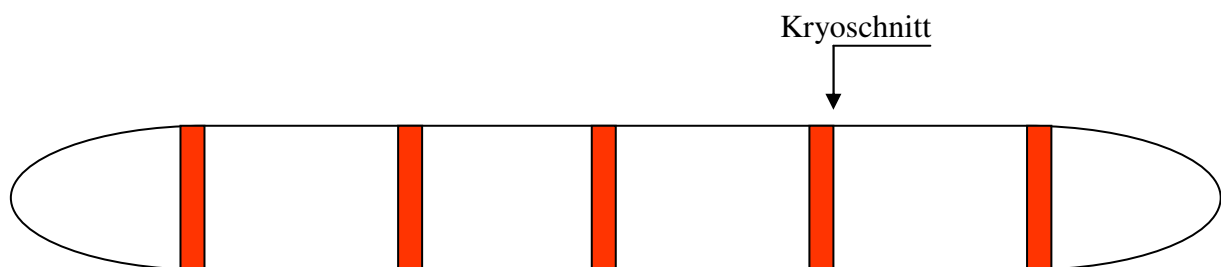
Hierzu wurden 7 Tumorproben halbiert und jeweils die eine Hälfte in Form von Kryoschnitten a´10 µm asserviert und die andere Hälfte als Tumorböckchen. Nach dem Asservieren wurden diese Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend verarbeitet. Das Kryoschnitt-Tumorgewebe wurde unmittelbar nach dem Auftauen bei 4°C mit der 1%igen TBS-Triton Lösung versetzt, das andere Tumorgewebe wurde entsprechend dem standardisierten Protokoll pulverisiert. Die übrige Verarbeitung des Tumors erfolgte gemäß Standardprotokoll.

#### **Zu Frage 5 in der Zielsetzung:**

Ist eine Aussage zur Konzentration von uPA/PAI-1 aus kleinsten Mengen Tumorgewebe möglich? Von 7 Tumoren wurden die uPA und PAI-1 Konzentrationen aus in vivo Tumorstanzen und aus in vivo OP-Exzidat gemessen und miteinander verglichen. Von 3 weiteren Tumoren konnten aus ex vivo Tumorstanzen und aus ex vivo Exzidaten die uPA und PAI-1 Konzentrationen gemessen und miteinander verglichen werden. (Frage 5)

Hierzu wurden die in vivo Tumorstanzen ca. 1 Woche vor der geplanten Tumoroperation entnommen und in flüssigem Stickstoff asserviert. Bevor die Tumorstanzen aufgetaut und gemäß Standardprotokoll aufgearbeitet wurden, wurden aus 4-5 verschiedenen Regionen der Stanze ein ca. 10 µm dicker Kryoschnitt entnommen und ein Objektträger angefertigt (s. Abb. 4). Dieser Kryoschnitt wurde den Pathologen zur Begutachtung übergeben, um sicherzustellen

len, dass sich Mammakarzinomzellen in der Stanze befinden. Die in vivo OP-Exzidate wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigen Stickstoff asserviert, unter der fachlichen Beurteilung eines Pathologen. Die Aufarbeitung erfolgte am Entnahmetag, laut Standardprotokoll. Die ex vivo Tumorstanzen und ex vivo Exzidate wurden aus dem Tumor zeitgleich im Pathologielabor entnommen, in flüssigen Stickstoff asserviert und am Entnahmetag gemäß Standardprotokoll aufgearbeitet. Das Gesamtgewicht der Tumorstanzen betrug im Durchschnitt 30-50 mg. Es konnte die im Standardprotokoll geforderte Tumormenge von 100-300 mg Gewebe mit der kleineren Tumormenge von 30-50 mg (Stanzbiopsie) verglichen werden.



**Abb. 4:** schematische Darstellung: Zerteilen des Stanzzyinders zur Kryoschnitt-Anfertigung

**Zu Frage 6 in der Zielsetzung:**

Verändern sich die uPA bzw. PAI-1-Konzentrationen nach Stanzbiopsie? Es konnten aus 5 Tumoren Proben mit und ohne Stanzkanaltumor gemessen verglichen werden.

Von 5 Tumorproben wurden OP-Exzidate mit und ohne Stanzkanal entnommen, in flüssigem Stickstoff asserviert gemäß dem Standardprotokoll aufgearbeitet. Die Cytosole wurden in flüssigen Stickstoff gelagert.

**Zu Frage 7 in der Zielsetzung:**

Wie homogen bzw. heterogen ist das Tumorgewebe und wie ähnlich sind die uPA und PAI-1 Konzentrationen im gleichen Tumor? Es konnten 13 Tumorproben hinsichtlich der Tumorphomogenität bzw. -heterogenität überprüft werden.

Das heißt von 13 Tumoren konnten mindestens 2 Proben entnommen werden. Der Umfang der Probenentnahme (2-5 Tumorstücke) war abhängig von der Tumorgesamtgröße.

Die Aufarbeitung erfolgte gemäß Standardprotokoll. Die uPA und PAI-1 Konzentrationen wurden gemessen und miteinander verglichen. Anschließend erfolgte eine Aussage hinsichtlich Tumorphomogenität und Tumorphomogenität.

### 3.3.3. Methoden der Auswertung und der Statistik

Für die statistischen Auswertungen und graphischen Darstellungen wurde das SPSS-Software Paket (für Windows, Fa. SPSS inc. Chicago, IL, USA, Vers. 11.5.1) verwendet.

Für die mathematische Bewertung aus Frage 1 und 2 (Lagerungstemperatur, Dauer der Gewebelagerung) erfolgte in allen Versuchsreihen vorab die Umrechnung der absoluten uPA und PAI-1-Ergebnisse in relative uPA und PAI-1-Ergebnisse (bezogen auf die entsprechenden Standardbedingungen, nitro = 1,0; Tag 0 = 1,0). Von diesen relativen uPA und PAI-1 Ergebnissen wurde der Median angegeben.

Die Berechnung des Signifikanzniveaus aus Frage 1 und 2 (Lagerungstemperatur, Dauer der Gewebelagerung) erfolgte mittels „T-Test bei gepaarten Stichproben“. Des Weiteren wurden zur graphischen Darstellung der einzelnen Tumore Boxplots (s. Anhang) verwendet. Ebenso erfolgte eine graphische Darstellung mit Hilfe von Säulendiagrammen.

Für die mathematische Bewertung aus Frage 3 (Zentrifugalbeschleunigung) erfolgte die Umrechnung der absoluten uPA und PAI-1-Ergebnisse in relative uPA und PAI-1-Ergebnisse (bezogen auf die entsprechenden Standardbedingungen, Ultrazentrifuge = 1,0). Von diesen relativen uPA und PAI-1 Ergebnissen wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median angegeben. Außerdem wurde ein „T – Test bei gepaarten Stichproben“ angewendet. Zugleich erfolgte eine graphische Darstellung mit Hilfe von Säulendiagrammen.

In den übrigen Fragen der Zielsetzung wurden die absoluten und relativen uPA und PAI-1 Ergebnissen graphisch gegenübergestellt, bzw. der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median angegeben.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Asservierungsbedingungen (Frage 1 und 2)

Um mögliche Änderungen im Proteinlevel von uPA bzw. PAI-1 bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur und modifizierter Lagerungszeit zu bestimmen, wurden wie im Methodeteil beschrieben 17 Tumorproben in jeweils 9 Tumorteilstückchen unterteilt und entsprechend aufgearbeitet und untersucht.

Für die statistische Auswertung wurde ein so genannter T-Test bei gepaarten Stichproben durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die Umrechnung der absoluten uPA/PAI-1-Ergebnisse in relative uPA/PAI-1-Ergebnisse ( $uPA_{\text{relativ}}$  bzw.  $PAI-1_{\text{relativ}}$ ). Das heißt: Standardbedingungen wie Temperaturabhängigkeit (Stickstofflagerung) und Aufarbeitungstag-Abhängigkeit (Tag 0) erhielten den Referenzwert 1,0. Median und Signifikanzniveau dieser Ergebnisse werden in den zusammenfassenden Tabellen (Tab. 8-9 PAI-1 und Tab. 13-14 uPA) aufgezeigt.

Die Tabellen 5 (PAI-1) und 10 (uPA) zeigen die absoluten Daten der einzelnen Tumoren, getrennt nach PAI-1 in ng/mg Protein bzw. uPA in ng/mg Protein. Diese Daten wurden auch in Säulendiagrammen (Abb. 5-21) dargestellt. Alle relativen uPA und PAI-1 Ergebnisse zeigen die Tab. 5-7 (PAI-1) und Tab. 11-12 (uPA). Diese Ergebnisse wurden in Boxplots dargestellt (Abb. 22-23)

Von 3 Tumorproben (#23 d0/-20°C, #23 d30/-80°C und #24 d30/-80°C) konnten keine Daten angegeben werden.

Tab. 5: PAI-1 in ng/mg Protein, Asservierungsbedingungen, alle Daten

Lagerungstemperatur	Tumor	Tag 0	Tag 15	Tag 30
nitro	#15	17,18	34,41	40,61
-80°C		55,74	12,25	35,50
-20°C		31,56	23,73	17,00
nitro	#16	11,28	13,22	18,47
-80°C		13,15	13,68	15,93
-20°C		12,63	10,20	9,11
nitro	#17	4,84	6,85	2,32
-80°C		8,56	21,43	21,08
-20°C		8,27	9,85	28,55
nitro	#19	31,80	33,70	29,20
-80°C		27,30	28,40	23,10
-20°C		16,90	13,30	19,30
nitro	#20	16,24	25,16	9,35
-80°C		14,42	8,46	12,54
-20°C		7,28	21,54	7,12
nitro	#21	2,99	2,78	4,30
-80°C		1,48	3,93	3,40
-20°C		5,28	4,81	2,37
nitro	#22	27,54	30,99	25,00
-80°C		13,27	22,16	18,01
-20°C		32,13	29,12	13,78
nitro	#23	13,19	8,28	18,47
-80°C		9,68	14,66	lost
-20°C		lost	10,77	9,43
nitro	#24	7,85	10,21	2,37
-80°C		0,68	14,16	lost
-20°C		1,91	3,58	1,21
nitro	#25	11,91	8,56	7,07
-80°C		37,03	21,03	25,23
-20°C		48,64	22,78	22,05
nitro	#29	15,16	0,30	0,80
-80°C		9,08	27,19	2,85
-20°C		13,16	12,59	4,66
nitro	#34	20,07	30,13	29,83
-80°C		16,39	20,86	32,98
-20°C		27,84	24,75	46,12
nitro	#37	4,69	15,79	11,87
-80°C		8,59	13,25	9,53
-20°C		13,39	14,37	12,70
nitro	#38	17,67	11,04	7,32
-80°C		17,14	17,58	6,97
-20°C		25,06	22,55	9,25
nitro	#39	7,71	4,28	26,22
-80°C		7,32	18,58	15,15
-20°C		12,59	5,19	20,38
nitro	#40	3,57	8,76	18,59
-80°C		5,48	0,60	17,05
-20°C		20,35	3,46	11,93
nitro	#41	84,60	18,90	17,10
-80°C		116,90	25,00	19,70
-20°C		21,30	13,10	15,60

Tab. 6: **Temperatur-abhängige Änderungen von PAI-1 (Standard nitro = 1,0), alle Daten**

<b>PAI-1 Tumor</b>	<b>Tag-Temp d0 nitro</b>	<b>Tag-Temp d15 nitro</b>	<b>Tag-Temp d30 nitro</b>
15	1	1	1
16	1	1	1
17	1	1	1
19	1	1	1
20	1	1	1
21	1	1	1
22	1	1	1
23	1	1	1
24	1	1	1
25	1	1	1
29	1	1	1
34	1	1	1
37	1	1	1
38	1	1	1
39	1	1	1
40	1	1	1
41	1	1	1
Median	1	1	1
	<b>d0 -80</b>	<b>d15 -80</b>	<b>d30 -80</b>
15	3,24	0,36	0,87
16	1,17	1,03	0,86
17	1,77	3,13	9,09
19	0,86	0,84	0,79
20	0,89	0,34	1,34
21	0,49	1,41	0,79
22	0,48	0,72	0,72
23	0,73	1,77	lost
24	0,09	1,39	lost
25	3,11	2,46	3,57
29	0,60	90,63	3,56
34	0,82	0,69	1,11
37	1,83	0,84	0,80
38	0,97	1,59	0,95
39	0,95	4,34	0,58
40	1,54	0,07	0,92
41	1,38	1,33	1,15
Median	0,95	1,33	0,92
	<b>d0 -20</b>	<b>d15 -20</b>	<b>d30 -20</b>
15	1,84	0,69	0,42
16	1,12	0,77	0,49
17	1,71	1,44	12,31
19	0,53	0,39	0,66
20	0,45	0,86	0,76
21	1,77	1,73	0,55
22	1,17	0,94	0,55
23	lost	1,30	0,51
24	0,24	0,35	0,51
25	4,08	2,66	3,12
29	0,87	41,97	5,83
34	1,39	0,82	1,55
37	2,86	0,91	1,07
38	1,42	2,04	1,26
39	1,63	1,21	0,78
40	5,70	0,39	0,64
41	0,25	0,70	0,91
Median	1,40	0,91	0,76

Beachte: **nd:** nicht bestimmbar; **lost:** Probe ging im Rahmen der Aufarbeitung verloren

Tab. 7: **Lagerungszeit-abhängige Änderungen von PAI-1 (Standard d0 = 1,0), alle Daten**

<b>PAI-1 Tumor</b>	<b>Tag-Temp d0 nitro</b>	<b>Tag-Temp d0 -80</b>	<b>Tag-Temp d0 -20</b>
15	1	1	1
16	1	1	1
17	1	1	1
19	1	1	1
20	1	1	1
21	1	1	1
22	1	1	1
23	1	1	
24	1	1	1
25	1	1	1
29	1	1	1
34	1	1	1
37	1	1	1
38	1	1	1
39	1	1	1
40	1	1	1
41	1	1	1
Median	1	1	1
	<b>d15 nitro</b>	<b>d15 -80</b>	<b>d15 -20</b>
15	2,00	0,22	0,75
16	1,17	1,04	0,81
17	1,42	2,50	1,19
19	1,06	1,05	0,79
20	1,55	0,59	2,96
21	0,93	2,66	0,91
22	1,13	1,67	0,91
23	0,63	1,51	nd
24	1,30	20,69	1,88
25	0,72	0,57	0,47
29	0,02	2,99	0,96
34	1,50	1,27	0,89
37	3,37	1,54	1,07
38	0,62	1,03	0,90
39	0,56	2,54	0,41
40	2,45	0,11	0,17
41	0,22	0,22	0,62
Median	1,13	1,27	0,89
	<b>d30 nitro</b>	<b>d30 -80</b>	<b>d30 -20</b>
15	2,36	0,64	0,54
16	1,64	1,21	0,72
17	0,48	2,46	3,45
19	0,92	0,85	1,14
20	0,58	0,87	0,98
21	1,44	2,30	0,45
22	0,91	1,36	0,43
23	1,40	lost	nd
24	0,30	lost	0,63
25	0,59	0,68	0,45
29	0,05	0,31	0,35
34	1,49	2,01	1,66
37	2,53	1,11	0,95
38	0,41	0,41	0,37
39	3,40	2,07	1,62
40	5,21	3,11	0,59
41	0,20	0,17	0,73
Median	0,92	1,11	0,68

Beachte: **nd:** nicht bestimmbar; **lost:** Probe ging im Rahmen der Aufarbeitung verloren

Tab.8: Zusammenfassung: PAI-1<sub>relativ</sub> – Änderungen Lagerungstemperatur- und Lagerungszeitabhängigkeit; Median

a) Temperaturabhängigkeit

Tumor	Inkubationszeit (Tag)	-20 °C	-80 °C	nitro
Alle N = 17	0	1,40	0,96	1,0
	15	0,91	1,33	1,0
	30	0,76	0,92	1,0

b) Lagerungszeitabhängigkeit

Tumor	Inkubationszeit (Tag)	-20°C	-80°C	nitro
alle N = 17	0	1,0	1,0	1,0
	15	0,89	1,27	1,13
	30	0,68	1,11	0,92

Tab. 9: Zusammenfassung: PAI-1 Lagerungstemperatur- und -zeitabhängigkeit; T-Test bei gepaarten Stichproben

		95% Konfidenzintervall der Differenz		Signifikanz (p)
		Untere	Obere	
Lagertemperatur abh.	D0-196 - D0-20	-11,8564	10,2077	0,876
Lagertemperatur abh.	D0-196 - D0-80	-11,1453	3,6253	0,296
Lagertemperatur abh.	D15-196 - D15-20	-3,3762	5,4550	0,625
Lagertemperatur abh.	D15-196 - D15-80	-7,5244	5,1879	0,702
Lagertemperatur abh.	D30-196 - D30-20	-4,9764	7,1328	0,711
Lagertemperatur abh.	D30-196 - D30-80	-5,3045	3,8418	0,737
Lagerzeit abh.	D0-20 - D15-20	-0,6853	8,6065	0,089
Lagerzeit abh.	D0-20 - D30-20	-3,0414	10,1864	0,268
Lagerzeit abh.	D0-80 - D15-80	-8,9814	18,2743	0,480
Lagerzeit abh.	D0-80 - D30-80	-8,7939	21,1712	0,391
Lagerzeit abh.	D0-196 - D15-196	-7,2262	11,3356	0,645
Lagerzeit abh.	D0-196 - D30-196	-8,4604	11,9193	0,724

Tab. 10: uPA in ng/mg Protein, Asservierungsbedingungen, alle Daten

Lagerungstemperatur	Tumor	Tag 0	Tag 15	Tag 30
nitro	#15	9,01	16,98	16,03
-80°C		17,28	7,00	18,14
-20°C		16,59	11,64	11,28
nitro	#16	0,49	2,63	3,59
-80°C		2,28	3,37	2,11
-20°C		1,83	2,71	2,94
nitro	#17	0,22	0,22	0,14
-80°C		0,50	3,55	1,32
-20°C		0,39	0,72	3,46
nitro	#19	5,80	3,10	5,50
-80°C		3,90	3,60	5,60
-20°C		4,90	2,30	5,60
nitro	#20	0,33	0,37	0,10
-80°C		0,91	0,83	0,16
-20°C		0,61	0,97	0,35
nitro	#21	0,53	0,51	0,58
-80°C		0,28	0,28	0,80
-20°C		0,54	0,65	0,61
nitro	#22	0,85	4,64	0,81
-80°C		6,20	4,40	3,33
-20°C		1,91	0,55	0,45
nitro	#23	2,87	2,71	2,94
-80°C		2,14	3,69	lost
-20°C		lost	2,29	1,68
nitro	#24	1,24	1,18	0,77
-80°C		0,68	1,19	lost
-20°C		0,93	0,52	0,42
nitro	#25	0,50	0,92	0,55
-80°C		2,23	0,39	0,76
-20°C		2,39	0,36	0,45
nitro	#29	5,45	0,35	0,10
-80°C		2,75	3,69	0,50
-20°C		3,34	3,31	1,05
nitro	#34	14,38	10,83	10,50
-80°C		9,96	4,06	5,04
-20°C		15,93	6,73	15,21
nitro	#37	1,10	3,23	2,31
-80°C		2,28	3,28	1,43
-20°C		2,74	3,10	1,96
nitro	#38	0,52	0,68	0,43
-80°C		0,70	0,98	0,93
-20°C		0,77	1,44	0,89
nitro	#39	2,52	2,43	3,61
-80°C		3,32	2,70	2,03
-20°C		4,52	1,27	3,30
nitro	#40	2,21	2,91	3,70
-80°C		2,90	1,24	4,51
-20°C		3,61	1,13	4,06
nitro	#41	6,20	6,50	4,90
-80°C		6,00	5,30	6,60
-20°C		5,10	3,50	6,70

Tab. 11: **Temperatur-abhängige Änderungen von uPA (Standard nitro =1,0), alle Daten**

<b>uPA Tumor</b>	<b>Tag-Temp d0 nitro</b>	<b>Tag-Temp d15 nitro</b>	<b>Tag-Temp d30 nitro</b>
15	1	1	1
16	1	1	1
17	1	1	1
19	1	1	1
20	1	1	1
21	1	1	1
22	1	1	1
23	1	1	1
24	1	1	1
25	1	1	1
29	1	1	1
34	1	1	1
37	1	1	1
38	1	1	1
39	1	1	1
40	1	1	1
Median	1	1	1
	<b>d0 -80</b>	<b>d15 -80</b>	<b>d30 -80</b>
15	1,92	0,41	1,13
16	4,64	1,28	0,59
17	2,27	16,14	9,43
19	0,66	1,16	1,03
20	2,77	2,23	1,62
21	0,53	0,55	1,38
22	7,26	0,95	4,11
23	0,75	1,36	lost
24	0,55	1,00	lost
25	4,43	0,43	1,40
29	0,50	10,54	5,00
34	0,69	0,37	0,48
37	2,07	1,02	0,62
38	1,34	1,45	2,16
39	1,32	1,11	0,56
40	1,31	0,43	1,22
41	0,96	0,82	1,36
Median	1,32	1,02	1,36
	<b>d0 -20</b>	<b>d15 -20</b>	<b>d30 -20</b>
15	1,84	0,69	0,70
16	3,73	1,03	0,82
17	1,77	3,27	24,71
19	0,84	0,72	1,03
20	1,86	2,59	3,44
21	1,02	1,27	1,05
22	2,24	0,12	0,55
23	lost	0,85	0,57
24	0,75	0,44	0,55
25	4,75	0,39	0,82
29	0,61	9,46	10,50
34	1,11	0,62	1,45
37	2,49	0,96	0,85
38	1,47	2,12	2,08
39	1,79	0,52	0,91
40	1,63	0,39	1,10
41	0,82	0,54	1,38
Median	1,70	0,72	1,03

Beachte: **nd:** nicht bestimmbar; **lost:** Probe ging im Rahmen der Aufarbeitung verloren

Tab.12: Lagerungszeit-abhängige Änderungen v. uPA (Standard d0 = 1,0), alle Daten

uPA Tumor	Tag-Temp d0 nitro	Tag-Temp d0 -80	Tag-Temp d0 -20
15	1	1	1
16	1	1	1
17	1	1	1
19	1	1	1
20	1	1	1
21	1	1	1
22	1	1	1
23	1	1	
24	1	1	1
25	1	1	1
29	1	1	1
34	1	1	1
37	1	1	1
38	1	1	1
39	1	1	1
40	1	1	1
Median	1	1	1
	d15 nitro	d15 -80	d15 -20
15	1,88	0,41	0,70
16	5,35	1,48	1,48
17	1,00	7,10	1,85
19	0,54	0,94	0,46
20	1,13	0,91	1,59
21	0,96	1,00	1,20
22	5,44	0,71	0,29
23	0,94	1,72	nd
24	0,95	1,74	0,56
25	1,83	0,18	0,15
29	0,06	1,34	0,99
34	0,75	0,41	0,42
37	2,93	1,44	1,13
38	1,29	1,40	1,87
39	0,97	0,82	0,28
40	1,32	0,43	0,31
41	1,05	0,89	0,68
Median	1,05	0,94	0,69
	d30 nitro	d30 -80	d30 -20
15	1,78	1,05	0,68
16	7,31	0,92	1,61
17	0,64	2,64	8,87
19	0,94	1,45	1,15
20	0,31	0,18	0,57
21	1,09	2,86	1,13
22	0,95	0,54	0,23
23	1,02	lost	nd
24	0,62	lost	0,46
25	1,09	0,34	0,19
29	0,02	0,18	0,31
34	0,73	0,51	0,95
37	2,10	0,63	0,72
38	0,82	1,32	1,16
39	1,44	0,61	0,73
40	1,67	1,56	1,12
41	0,79	1,11	1,32
Median	0,95	0,92	0,84

Beachte: **nd:** nicht bestimmbar; **lost:** Probe ging im Rahmen der Aufarbeitung verloren



Tab.13: Zusammenfassung: uPA<sub>relativ</sub> – Änderungen Lagerungstemperatur- und -zeitabhängigkeit; Median

a) Temperaturabhängigkeit

Tumor	Inkubationszeit (Tag)	-20°C	-80 °C	nitro
alle N = 17	0	1,7	1,32	1,0
	15	0,72	1,02	1,0
	30	1,03	1,36	1,0

b) Lagerungszeitabhängigkeit

Tumor	Inkubationszeit (Tag)	-20 °C	-80 °C	nitro
alle N = 17	0	1,0	1,0	1,0
	15	0,69	0,94	1,05
	30	0,84	0,92	0,95

Tab. 14: Zusammenfassung: uPA Lagerungstemperatur- und -zeitabhängigkeit, T-Test bei gepaarten Stichproben

		95% Konfidenzintervall der Differenz		Signifikanz (p)
		Untere	Obere	
Lagertemperatur abh.	D0-196 - D0-20	-2,0576	0,2138	0,104
Lagertemperatur abh.	D0-196 - D0-80	-2,0679	0,8808	0,406
Lagertemperatur abh.	D15-196 - D15-20	-0,0764	2,0764	0,066
Lagertemperatur abh.	D15-196 - D15-80	-1,0390	2,2908	0,437
Lagertemperatur abh.	D30-196 - D30-20	-1,2381	0,7852	0,642
Lagertemperatur abh.	D30-196 - D30-80	-1,0897	1,0350	0,957
Lagerzeit abh.	D0-20 - D15-20	0,1771	2,9729	<b>0,030</b>
Lagerzeit abh.	D0-20 - D30-20	-0,5392	1,4605	0,342
Lagerzeit abh.	D0-80 - D15-80	-0,7224	2,4589	0,264
Lagerzeit abh.	D0-80 - D30-80	-0,4519	1,5493	0,259
Lagerzeit abh.	D0-196 - D15-196	-1,8259	1,1235	0,621
Lagerzeit abh.	D0-196 - D30-196	-1,4808	1,2055	0,831

Asservierungsbedingungen uPA/PAI-1 in ng/mg Protein – alle Säulendiagramme

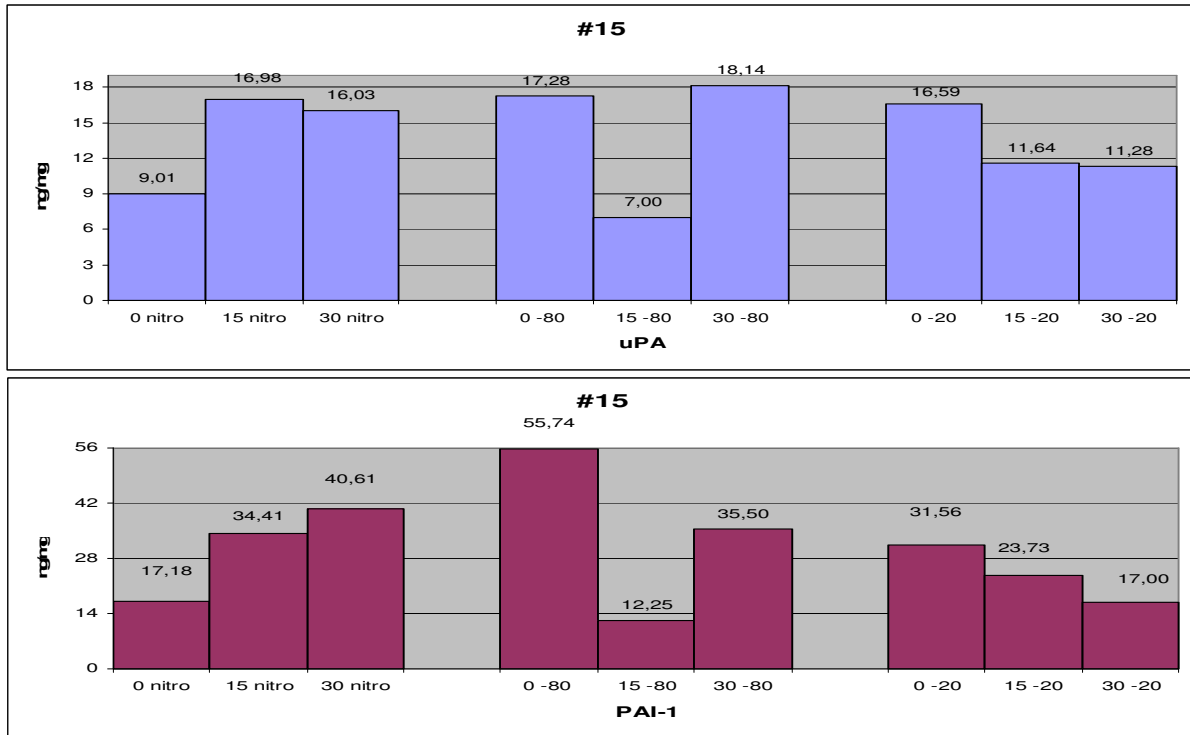


Abb. 5: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 15

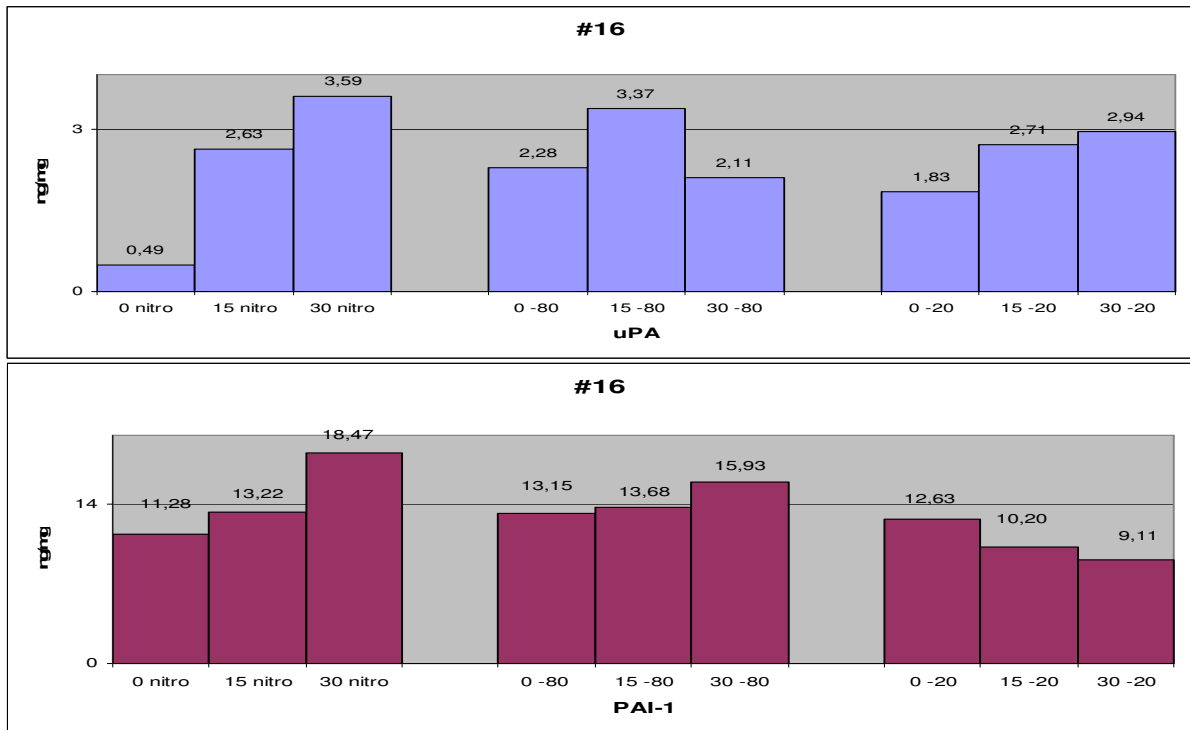


Abb. 6: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 16

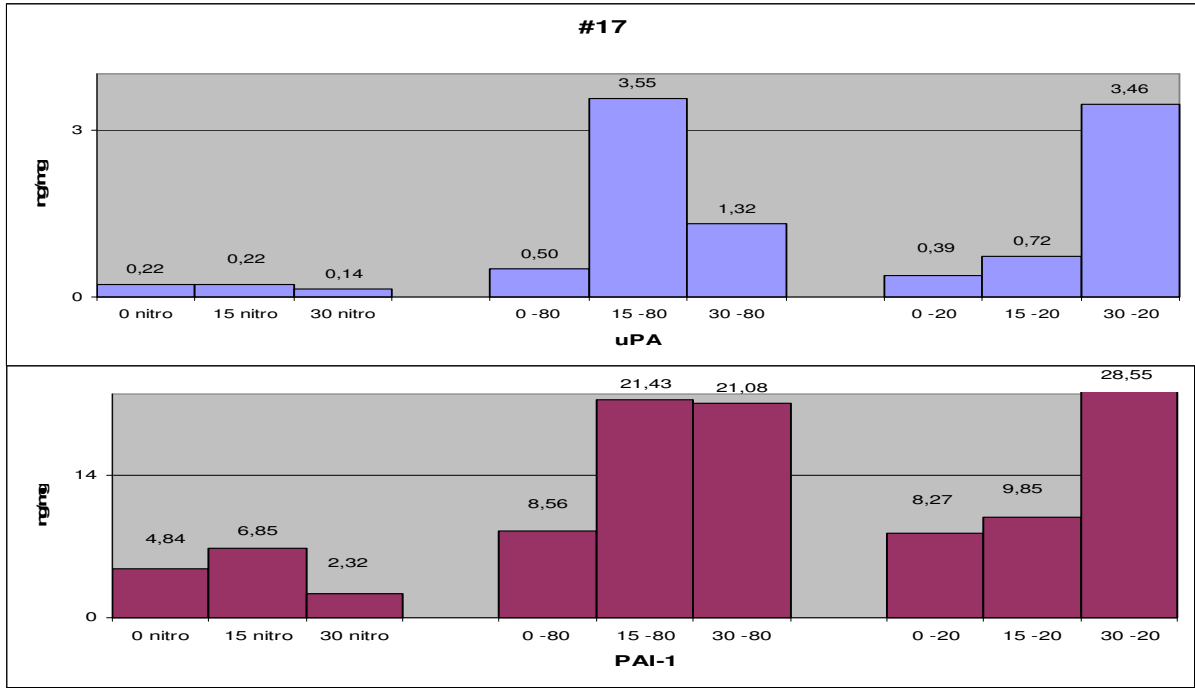


Abb. 7: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 17

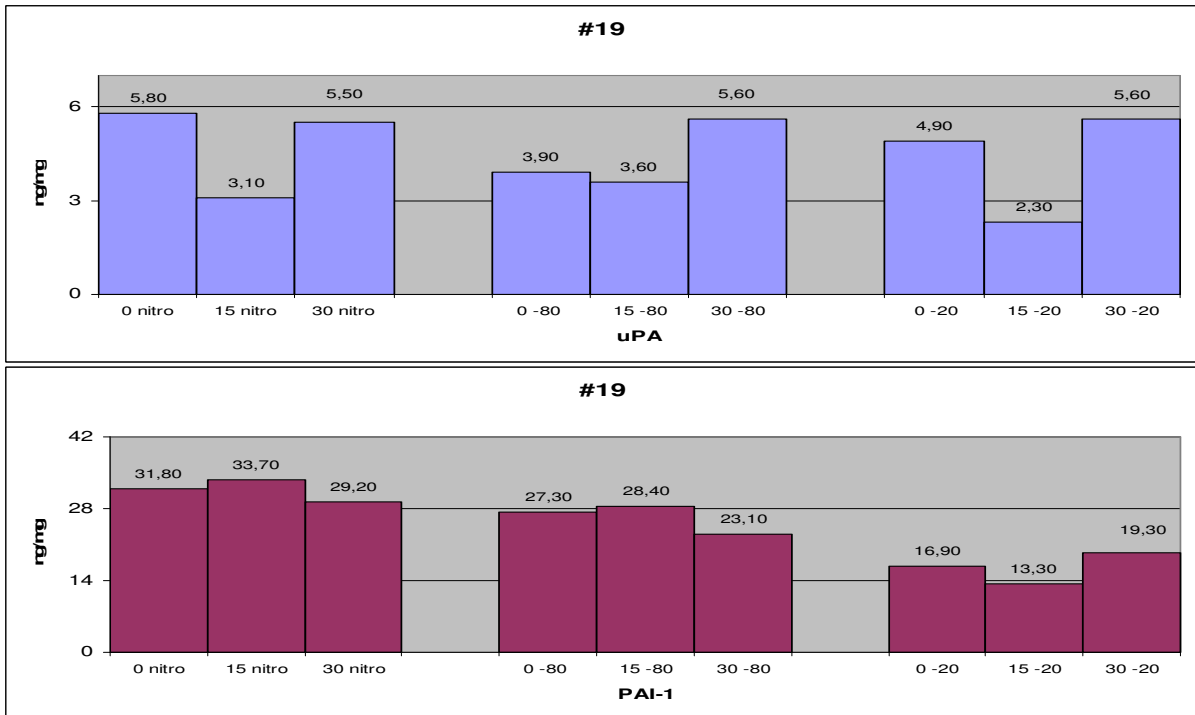


Abb. 8: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 19

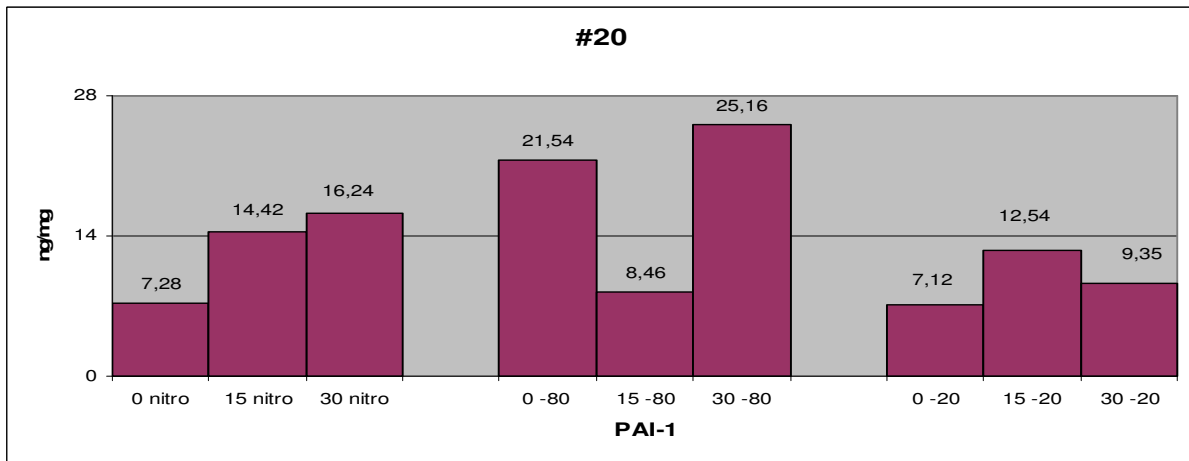
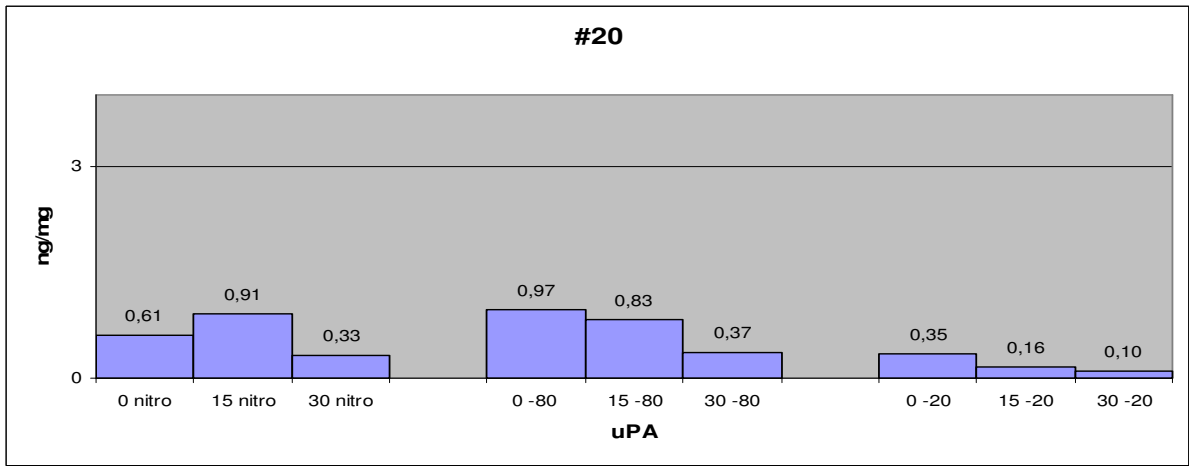


Abb. 9: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 20

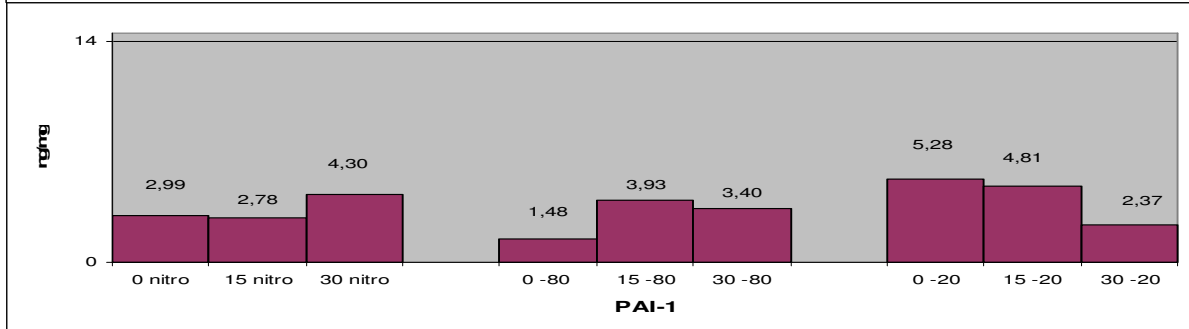
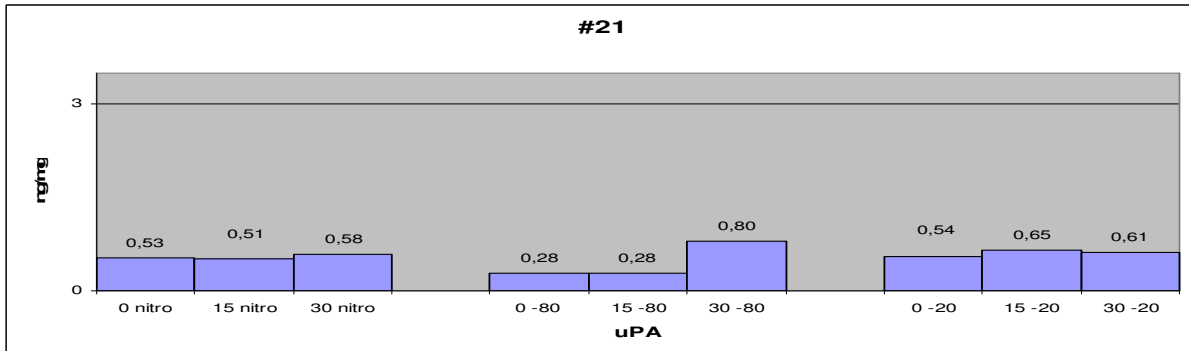


Abb. 10: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 21

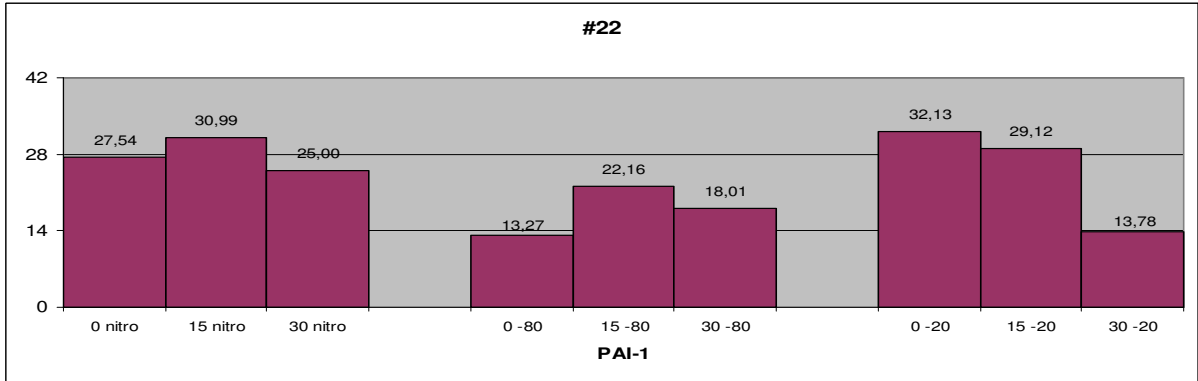
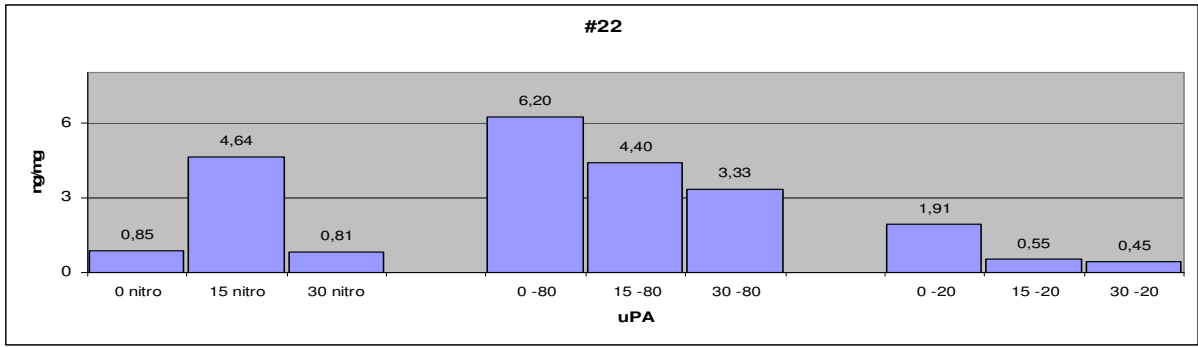


Abb. 11: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 22

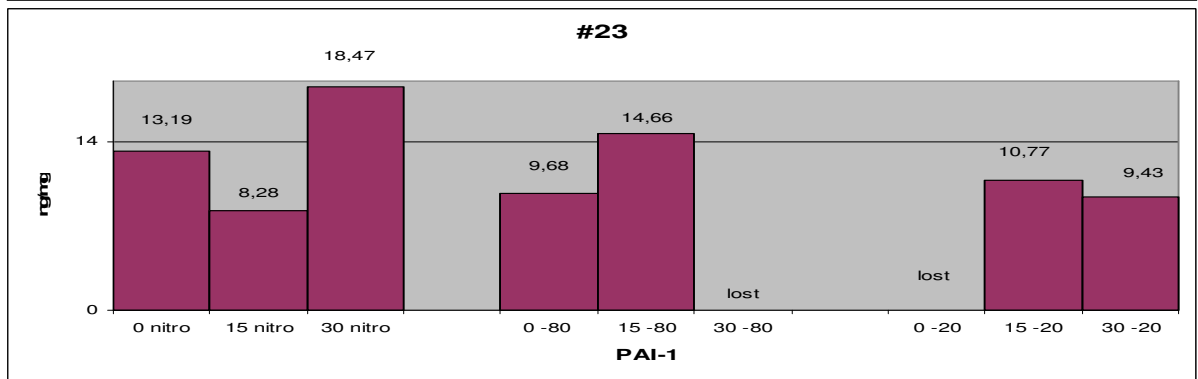
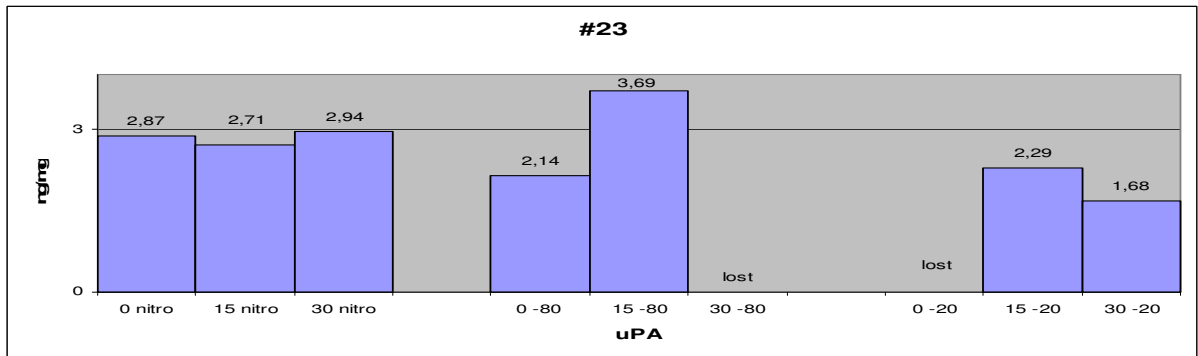


Abb. 12: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 23

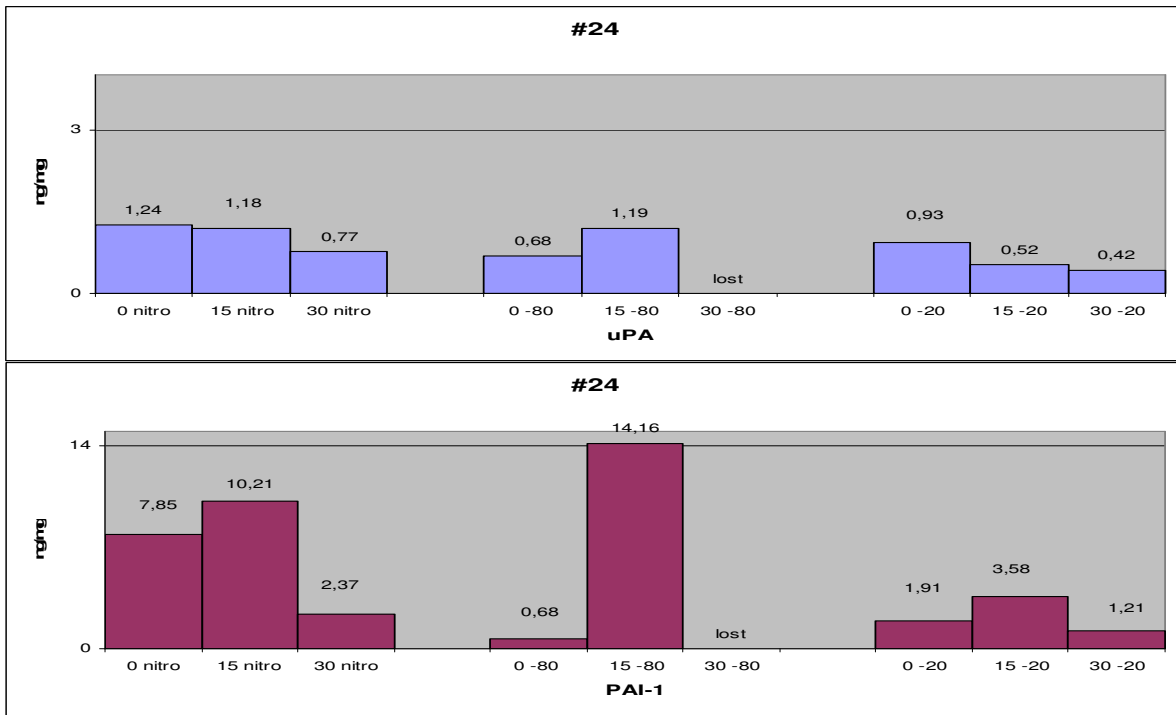


Abb. 13: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 24

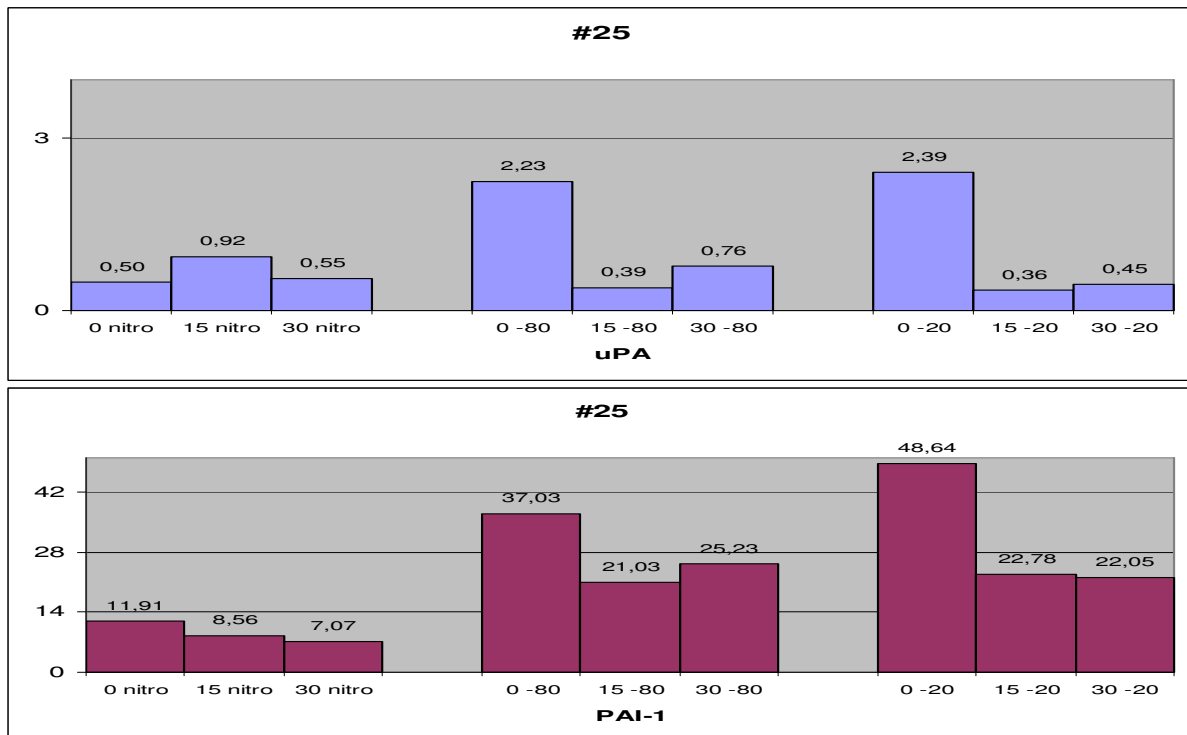


Abb. 14: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 25

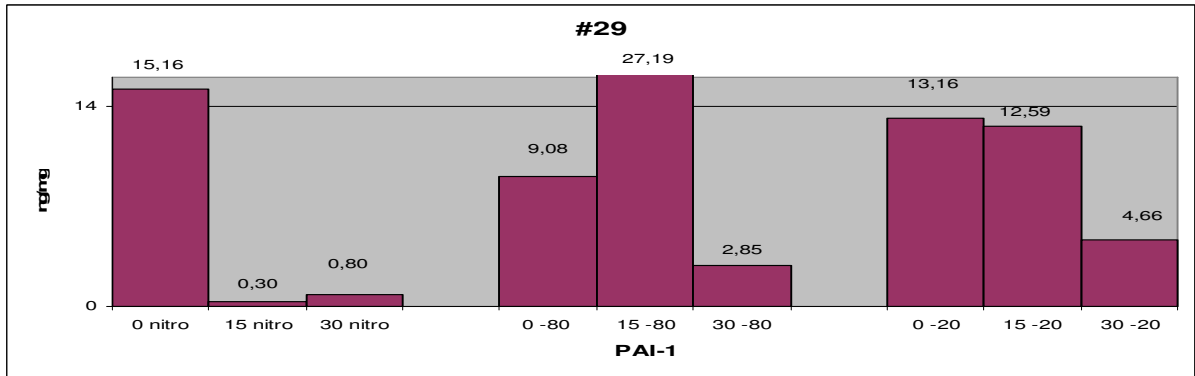
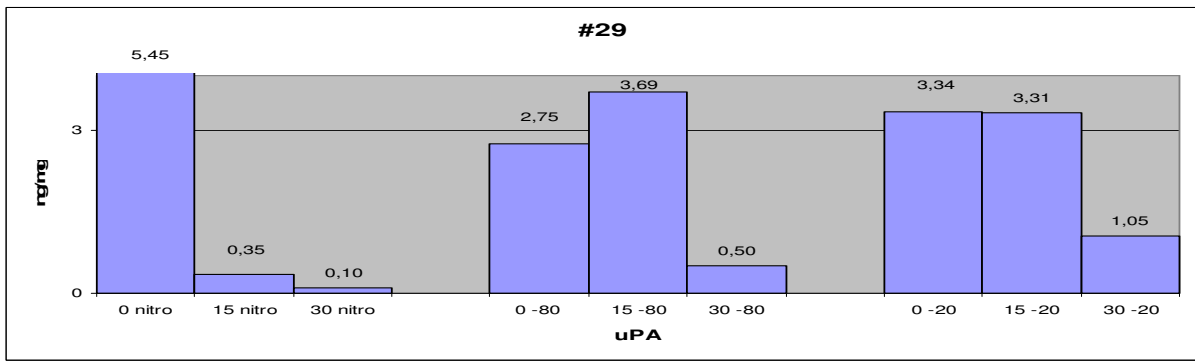


Abb. 15: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 29

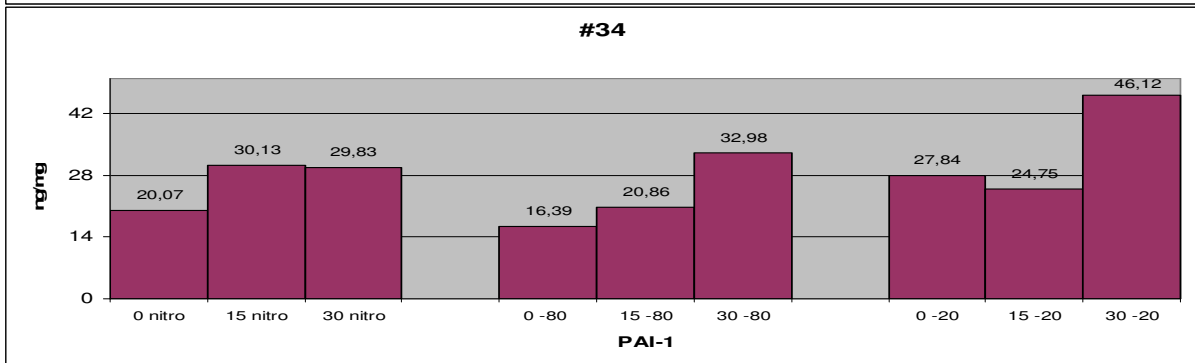
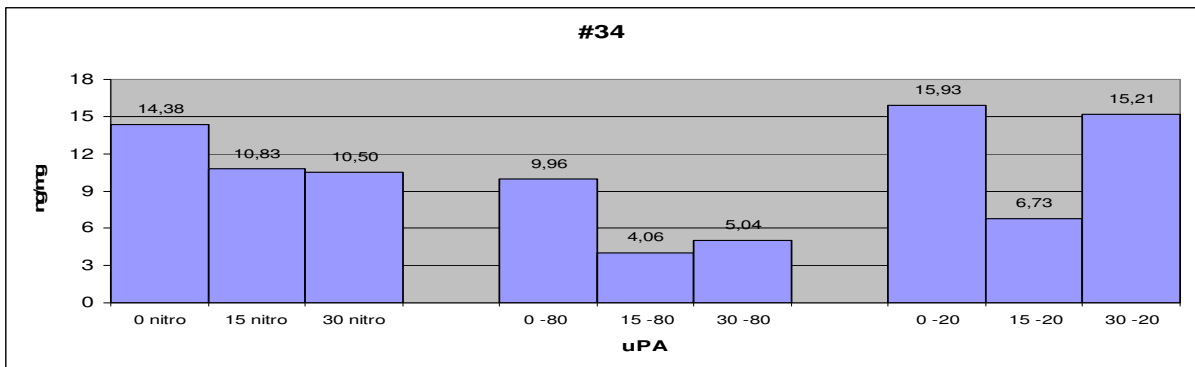


Abb. 16: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 34

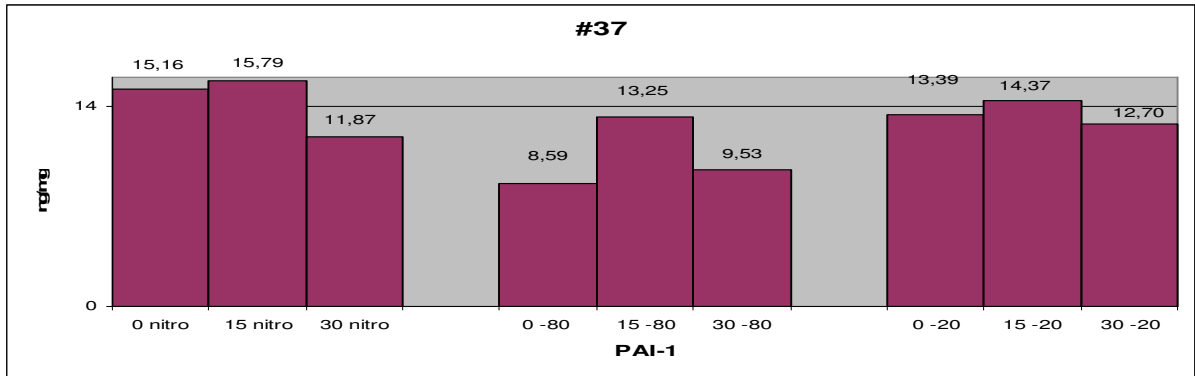
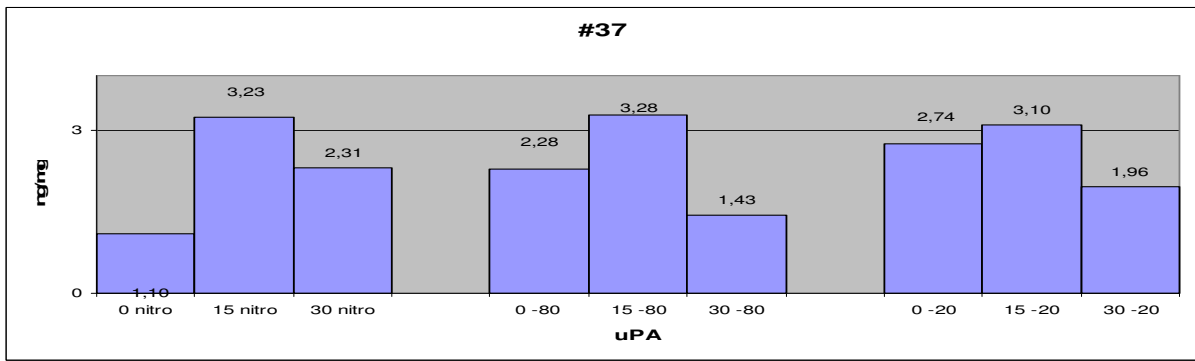


Abb. 17: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 37

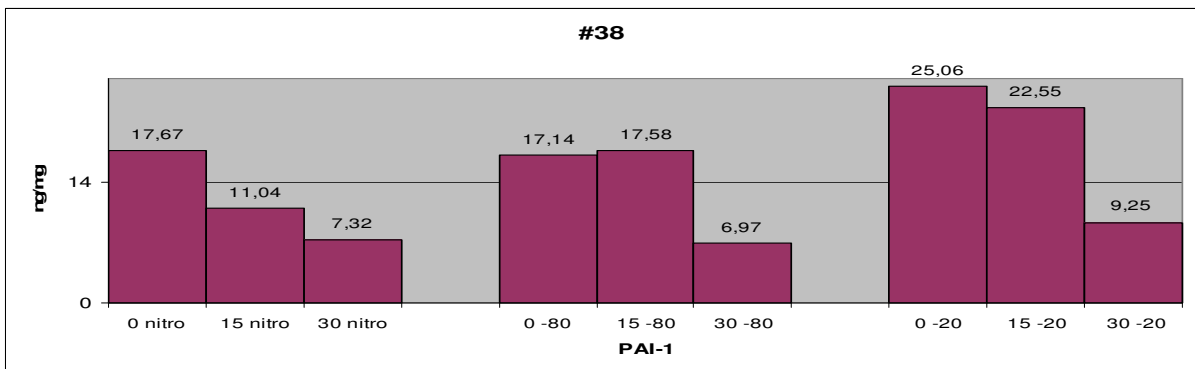
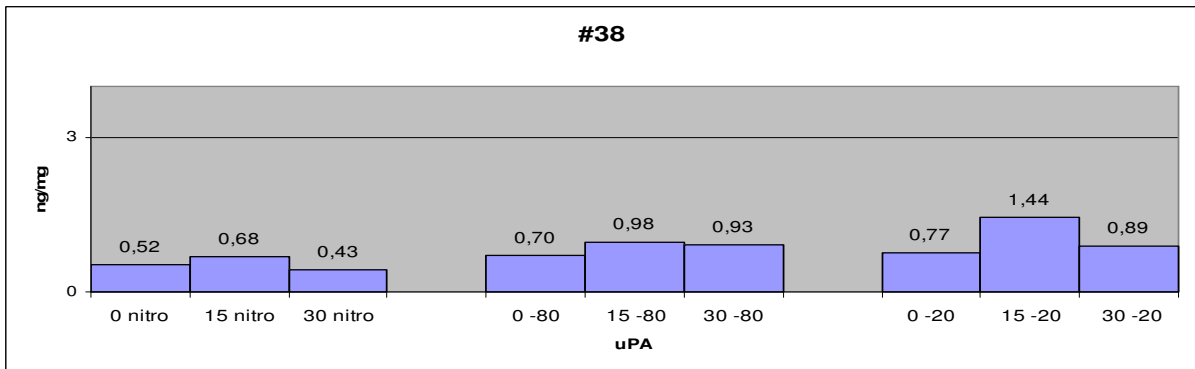


Abb. 18: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 38



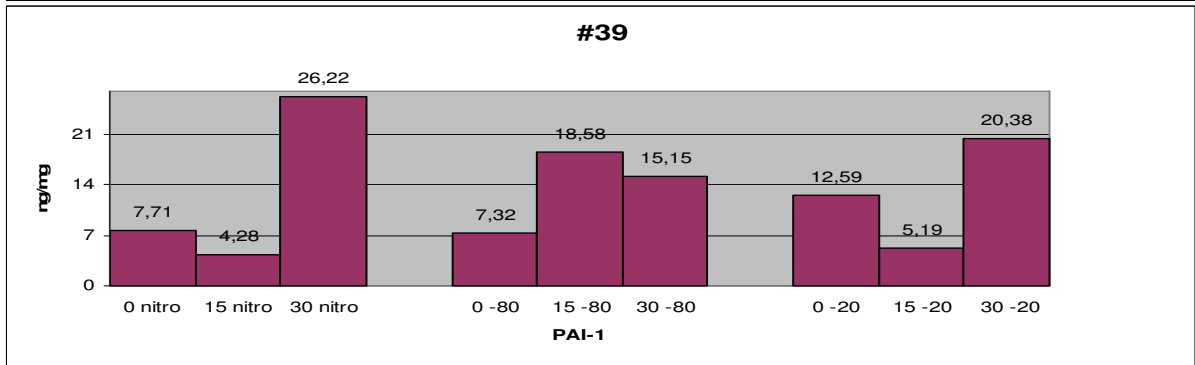
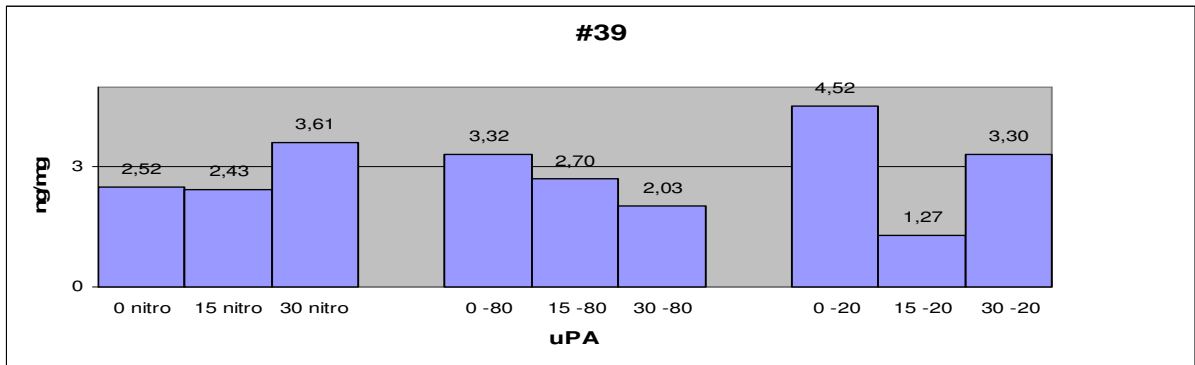


Abb. 19: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 39

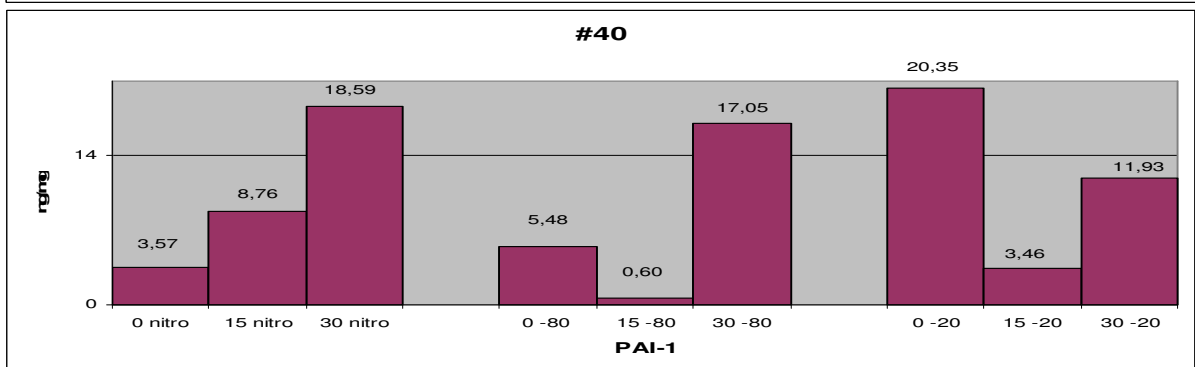
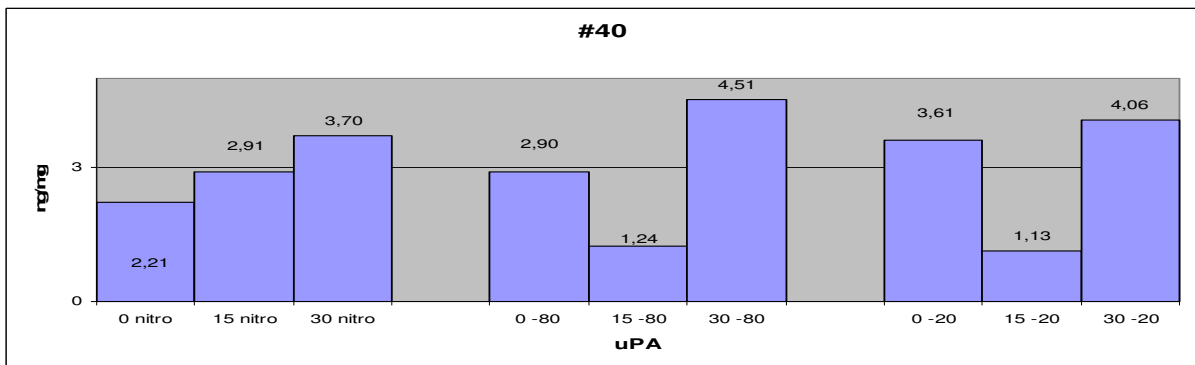


Abb. 20: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 40

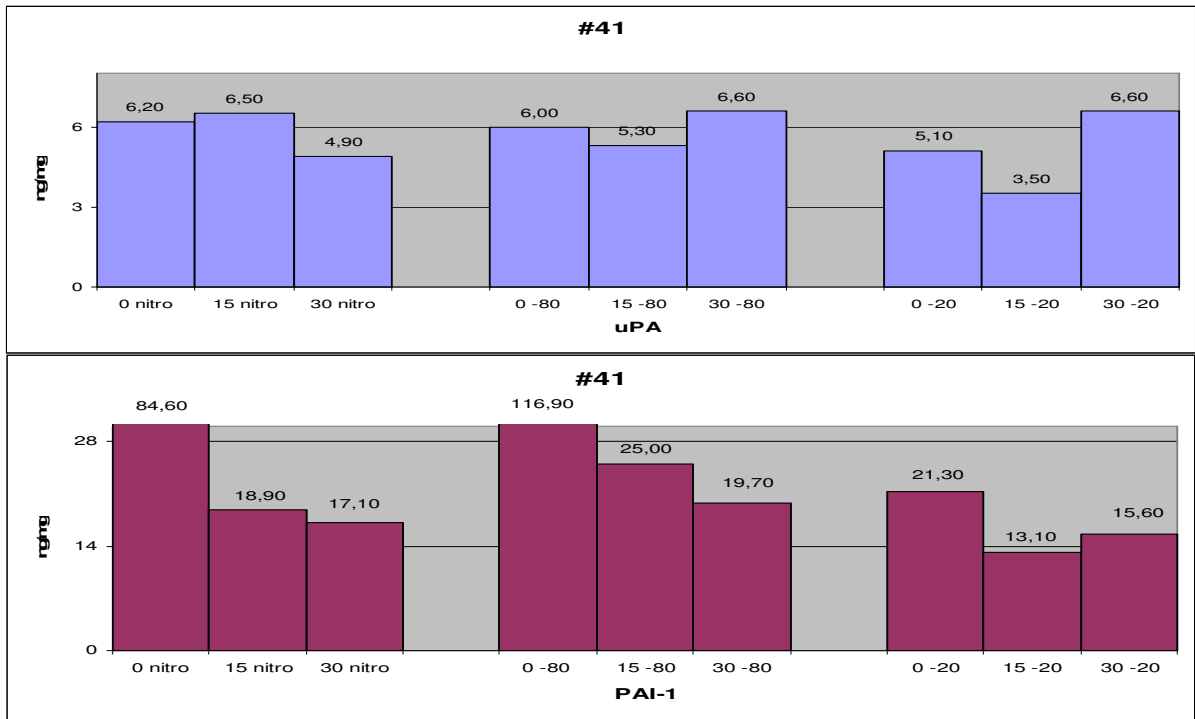
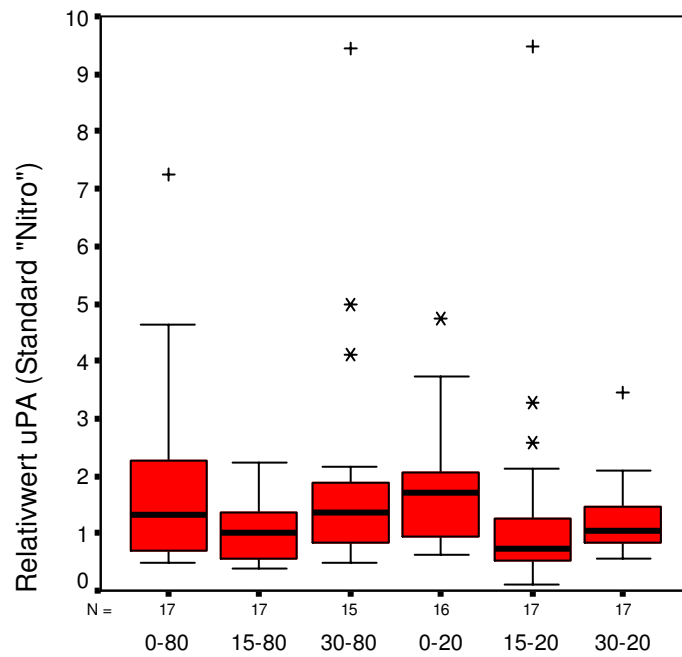
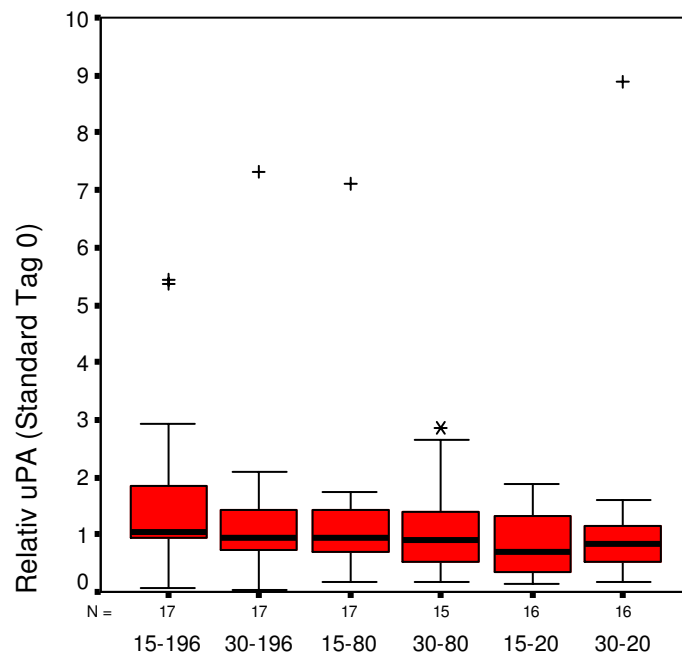


Abb. 21: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein der Tumorprobe 41

**Asservierungsbedingungen  $uPA_{\text{relativ}}$  und  $PAI-1_{\text{relativ}}$  , alle Boxplot - Darstellungen**

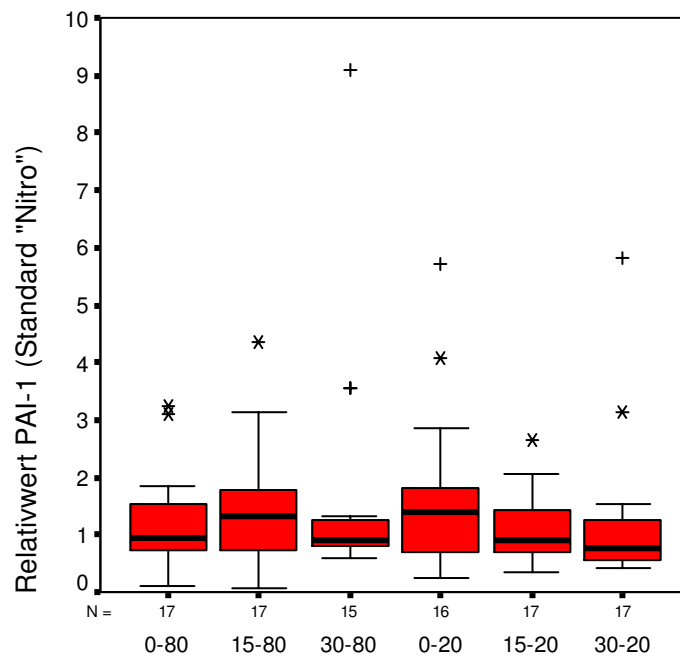


Lagerungstemp. uPA (\*Ausreißer, + Extremwerte)

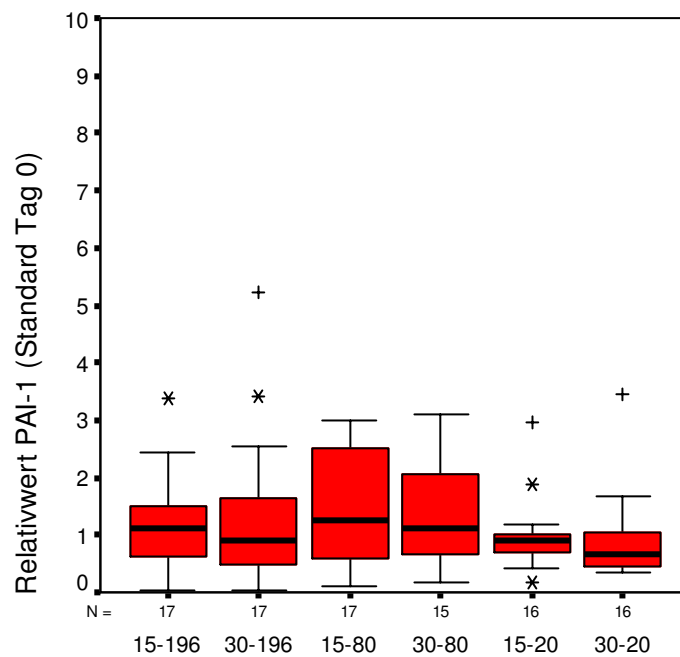


Lagerungszeit uPA (\* Ausreißer, + Extremwerte)

**Abb. 22:** **oben**  $uPA_{\text{relativ}}$  bei Änderung der Lagerungstemperatur (Standard „nitro“ = 1,0)  
**unten**  $uPA_{\text{relativ}}$  bei Änderung der Dauer der Gewebelagerung (Standard „d0“ = 1,0)



Lagerungstemp. PAI-1 (\*Ausreißer, + Extremwerte)



Lagerungszeit PAI-1 (\*Ausreißer, +Extremwerte)

**Abb. 23:** **oben** PAI-1<sub>relativ</sub> bei Änderung der Lagerungstemperatur (Standard „nitro“ = 1,0)  
**unten** PAI-1<sub>relativ</sub> bei Änderung der Dauer der Gewebelagerung (Standard „d0“ = 1,0)

In den hier untersuchten Proben und unter den oben beschriebenen Lagerungs- und Aufarbeitungsbedingungen konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich Tag 0 versus Tag 15 bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufgezeigt werden ( $p=0,03$ ). Diese Signifikanz sollte auf Tumorerheterogenität zurückzuführen sein, da es keinen signifikanten Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 30 bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gibt ( $p=0,34$ ). In den anderen Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen gefunden werden.

Das heißt, weder die Lagerungstemperaturen von  $-196^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  oder  $-20^{\circ}\text{C}$ , noch die Dauer der Lagerung der Proben (zumindest innerhalb von 30 Tagen), haben einen Einfluss auf die gemessenen uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen im Mammakarzinomgewebe.

Einen Einfluss auf die uPA bzw. PAI-1 Konzentration scheint hingegen die Tumorbiologie und die damit verbundene Tumorerheterogenität bzw. Tumorerheterogenität zu haben.

Homogenität bezeichnet die Gleichheit des Tumorgewebes, Heterogenität (auch: Inhomogenität) bezeichnet die Uneinheitlichkeit des Tumorgewebes hinsichtlich eines oder mehrerer Merkmale.

Lagen die uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen, z. B. Tumor #34, in allen untersuchten Proben oberhalb des cut-off, so differierten die uPA- Werte dennoch zwischen 4 und 15 ng/mg Protein und die PAI-1-Werte zwischen 16 und 46 ng/mg Protein. (s. auch Abb. 26 im Anhang) Anders die Tumoren #20 und #38, die sehr homogene Werte innerhalb der uPA- Konzentrationen ( $< 1,5$  ng/mg Protein), aber deutliche Schwankungen in den PAI-1- Konzentrationen aufwiesen. Eine eher homogene Tumorstruktur und damit ähnliche uPA- und PAI-1- Konzentrationen in den einzelnen Tumorstücken zeigten die Tumoren #19 und #37.

Um der Frage der Tumorerheterogenität bzw. Tumorerheterogenität genauer auf den Grund zu gehen, wurden (gemäß Frage 7 in der Zielsetzung) aus 13 Tumoren jeweils Tumorreferenzstücke entnommen und jeweils zu gleichen Bedingungen aufgearbeitet.

## **4.2. Aufarbeitungsbedingungen (Frage 3 und 4)**

### **4.2.1. Zentrifugation: Ultrazentrifuge versus Tischzentrifuge (Frage 3)**

Um mögliche Änderungen im Proteinlevel von uPA/PAI-1 bei modifizierten Aufarbeitungsbedingungen zu bestimmen, wurden, wie im Methodeteil beschrieben, 33 Tumorproben laut Standardprotokoll aufgearbeitet. Anschließend wurden die entstandenen homogenisierten Gewebesuspensionen geteilt und zum einen standardgemäß per Ultrazentrifuge (UZ)  $10^5\text{g}$ , zum anderen per Tischzentrifuge (TZ)  $15.000$  g zentrifugiert. Die gewonnenen klaren Über-

stände (Zytosole) wurden dann für den Proteinnachweis und den uPA/PAI-1 ELISA-Test wie im Methodeteil beschrieben verwendet.

Für die statistische Auswertung wurde ein so genannter T-Test bei gepaarten Stichproben durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die Umrechnung der absoluten uPA/PAI-1-Ergebnisse in relative uPA/PAI-1-Ergebnisse ( $uPA_{\text{relativ}}$  bzw.  $PAI-1_{\text{relativ}}$ ). Dabei erhielt der standardisierte Ansatz (Ultrazentrifugation) den Wert 1,0. Mittelwerte, Standardabweichung, Median und Signifikanzniveau dieser Ergebnisse werden in der Tabelle 16 aufgezeigt.

Die Tabelle 15 zeigt die absoluten (in ng/mg Protein) und relativen Daten der einzelnen Tumoren, getrennt nach uPA bzw. PAI-1. Eine graphische Darstellung erfolgte durch Säulendiagramme (Abb. 24 und Abb. 24), in welchen sowohl die absoluten, als auch relativen uPA bzw. PAI-1 Daten aufgetragen wurden.

Tab. 15: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein und  $uPA_{\text{relativ}}$  und  $PAI-1_{\text{relativ}}$  Daten (Standard: Ultrazentrifuge = 1,0) Vergleich der Zentrifugalkraft Ultrazentrifuge (UZ)  $10^5g$  vs. Tischzentrifuge (TZ) 15.000g), alle Daten

#	uPA in	uPA in	PAI-1 in	PAI-1 in	uPA	PAI-1
	ng/mg Protein	ng/mg Protein	ng/mg Protein	ng/mg Protein	relativ	relativ
	Ultra-	Tisch-	Ultra-	Tisch-	Quotient aus	Quotient aus
	zentrifuge	zentrifuge	zentrifuge	zentrifuge	TZ/UZ	TZ/UZ
1	5,63	4,24	15,00	12,70	0,75	0,85
2	4,55	3,87	12,40	12,80	0,85	1,03
3	5,72	5,48	33,00	31,80	0,96	0,96
4	5,91	5,86	34,00	31,00	0,99	0,91
5	0,26	0,25	3,50	7,10	0,96	2,03
6	0,48	0,47	6,50	8,90	0,98	1,37
7	0,30	0,31	5,10	8,00	1,03	1,57
8	4,42	5,30	15,70	19,30	1,20	1,23
9	3,70	4,35	15,30	16,70	1,18	1,09
10	4,07	4,87	16,80	17,13	1,20	1,02
11	13,48	17,18	14,38	24,29	1,27	1,69
12	23,17	14,95	14,77	8,39	0,65	0,57
13	4,57	5,60	25,66	33,62	1,23	1,31
14	5,63	6,46	30,64	28,33	1,15	0,92
15	6,63	7,88	28,56	36,83	1,19	1,29
16	9,58	9,05	45,72	37,27	0,94	0,82
17	2,38	3,36	11,81	14,27	1,41	1,21
18	2,92	2,91	29,95	25,19	1,00	0,84
19	2,85	3,42	25,47	28,71	1,20	1,13
20	3,07	3,57	31,77	31,25	1,16	0,98
21	4,20	5,31	7,30	8,89	1,26	1,22
22	4,45	5,02	7,79	10,92	1,13	1,40
23	5,68	4,67	12,85	9,77	0,82	0,76

24	4,43	3,72	11,67	10,66	0,84	0,91
25	4,57	5,05	9,64	7,12	1,11	0,74
26	4,53	5,21	23,09	24,68	1,15	1,07
27	5,43	4,48	27,00	24,45	0,83	0,91
28	4,87	5,10	25,98	25,64	1,05	0,99
29	5,39	4,83	26,03	24,51	0,90	0,94
30	3,79	3,64	26,44	26,40	0,96	1,00
31	4,21	5,54	29,72	37,78	1,32	1,27
32	3,90	3,37	27,24	25,37	0,86	0,93
33	3,09	3,72	20,15	25,51	1,20	1,27
				MW ± Stabw	1,05 ± 0,18	1,10 ± 0,29
				Median	1,05	1,02

Tab. 16: Zusammenfassung: uPA<sub>relativ</sub> / PAI-1<sub>relativ</sub> –Änderungen Ultrazentrifugation (UZ) vs. Tischzentrifugation (TZ)

a) Mittelwert, Standardabweichung, Median

Ultrazentrifuge vs. Tischzentrifuge	MW ± Stabw	Median
uPA <sub>relativ</sub>	1,05 ± 0,18	1,05
PAI-1 <sub>relativ</sub>	1,10 ± 0,29	1,02

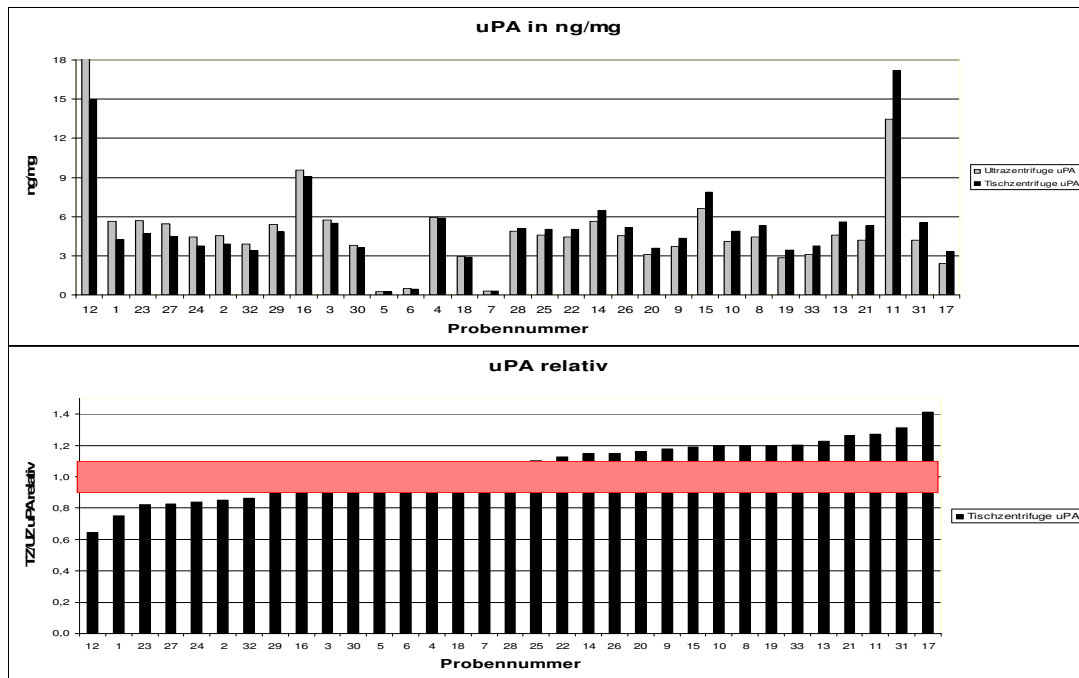
b) T-Test bei gepaarten Stichproben

	95% Konfidenzintervall der Differenz		Signifikanz (p)
	Untere	Obere	
Ultrazentrifuge vs. Tischzentrifuge uPA	-0,6568	0,5852	0,907
Ultrazentrifuge vs. Tischzentrifuge PAI-1	-2,2275	0,7518	0,321

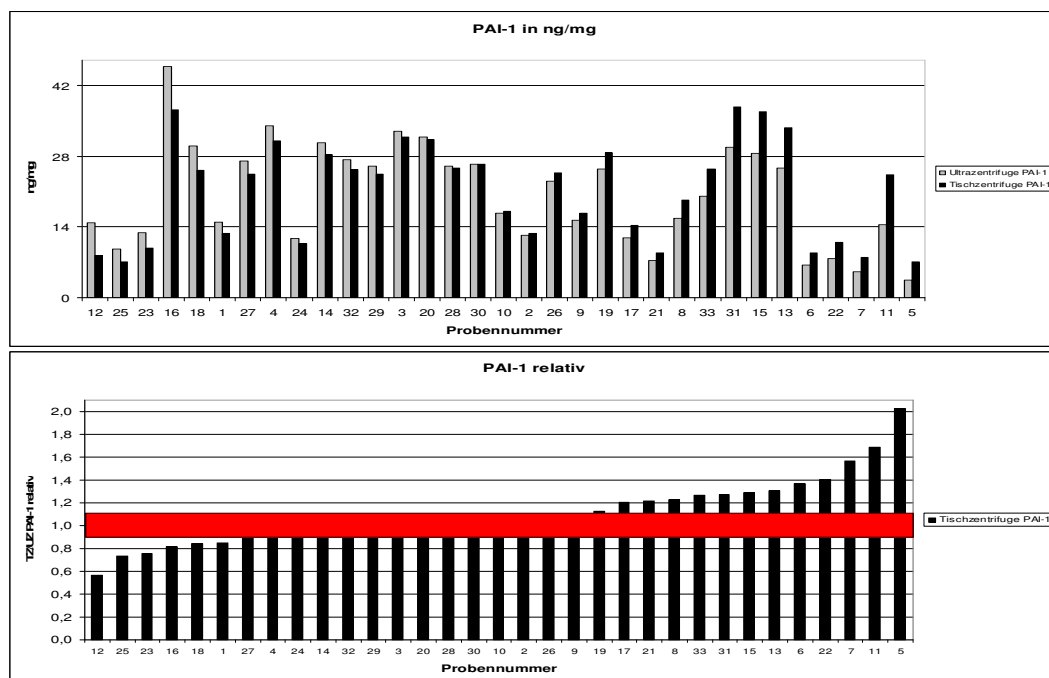
Der Median aus den Daten der Tischzentrifugation betrug hierbei 1,05 (uPA<sub>rel</sub>) und 1,02 (PAI-1<sub>rel</sub>). Die Mittelwerte und Standardabweichung können mit 1,05 ± 0,18 (uPA<sub>rel</sub>) und 1,10 ± 0,29 (PAI-1<sub>rel</sub>) angegeben werden.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der vergleichenden Aufarbeitung durch Ultrazentrifuge bzw. durch Tischzentrifuge ( $p_{uPA}=0,90$  und  $p_{PAI-1}=0,32$ ) in diesen 33 untersuchten Tumorproben.

Das heißt die homogenisierten Gewebesuspensionen können sowohl per Ultrazentrifugation, als auch per Tischzentrifugation abzentrifugiert werden. Demnach haben auch die nicht herunter zentrifugierten Schwebeteilchen (unter den beschriebenen Bedingungen) keinen Einfluss auf den uPA/PAI-1- ELISA.



**Abb. 24:** Ultrazentrifuge (UZ) vs. Tischzentrifuge (TZ) **oben:** uPA in ng/mg Protein paarweise vergleichend **unten:** relative TZ - uPA Daten (Standard = UZ = 1,0) aufsteigend sortiert, 10%-Intervall markiert



**Abb. 25:** Ultrazentrifuge (UZ) vs. Tischzentrifuge (TZ) **oben:** PAI-1 in ng/mg Protein paarweise vergleichend **unten:** relative TZ-PAI-1 Daten (Standard = UZ = 1,0) aufsteigend sortiert, 10%-Intervall markiert



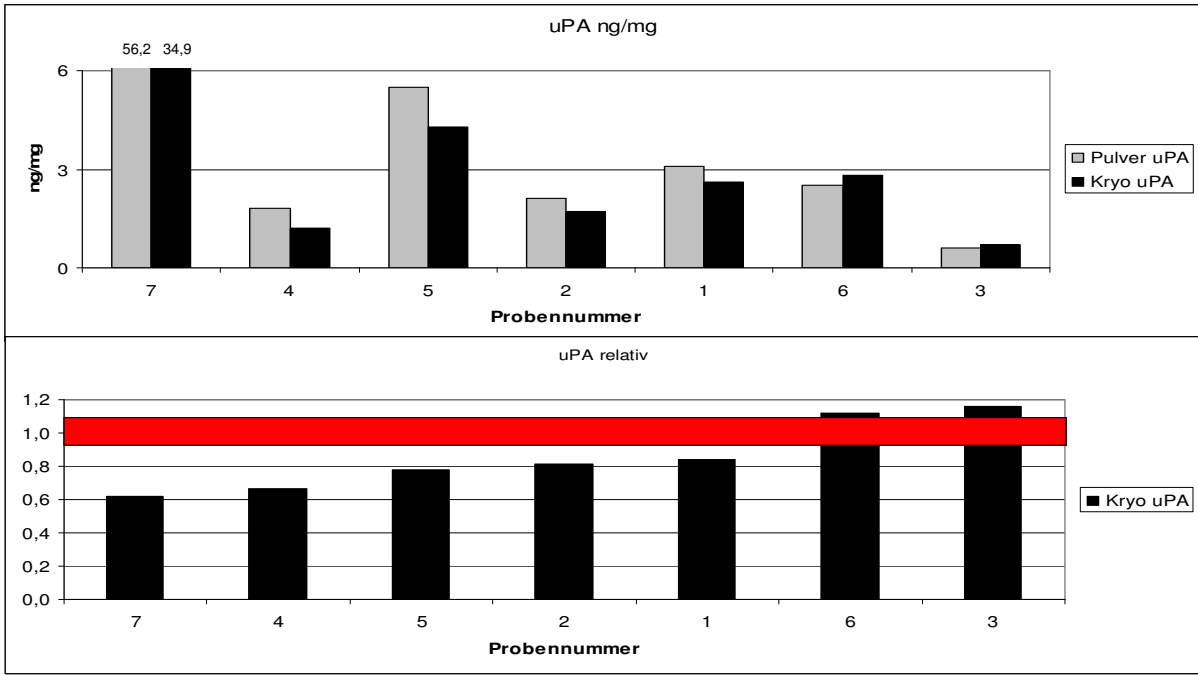
#### 4.2.2. Gewebezerkleinerung: Pulverisierung vs. Kryoschnittaufarbeitung (Frage 4)

Es wurde die Frage gestellt, ob es notwendig ist, dass gefrorene Tumorgewebe zu pulverisieren, oder ob eine andere Art der Tumorzerkleinerung (z.B. Kryoschnitt) ausreichend ist. Es wurden 7 Tumorproben geteilt und jeweils die eine Hälfte in Form von Kryoschnitten mit je 10  $\mu\text{m}$  und die jeweils andere Hälfte als Tumorblöckchen asserviert. Das Kryoschnitt-Tumorgewebe wurde unmittelbar nach dem Auftauen bei 4°C mit einer 1%igen TBS-Triton Lösung versetzt, das andere Tumorgewebe wurde Protokoll entsprechend pulverisiert. Die übrige Aufarbeitung des Tumors erfolgte gemäß Standardprotokoll.

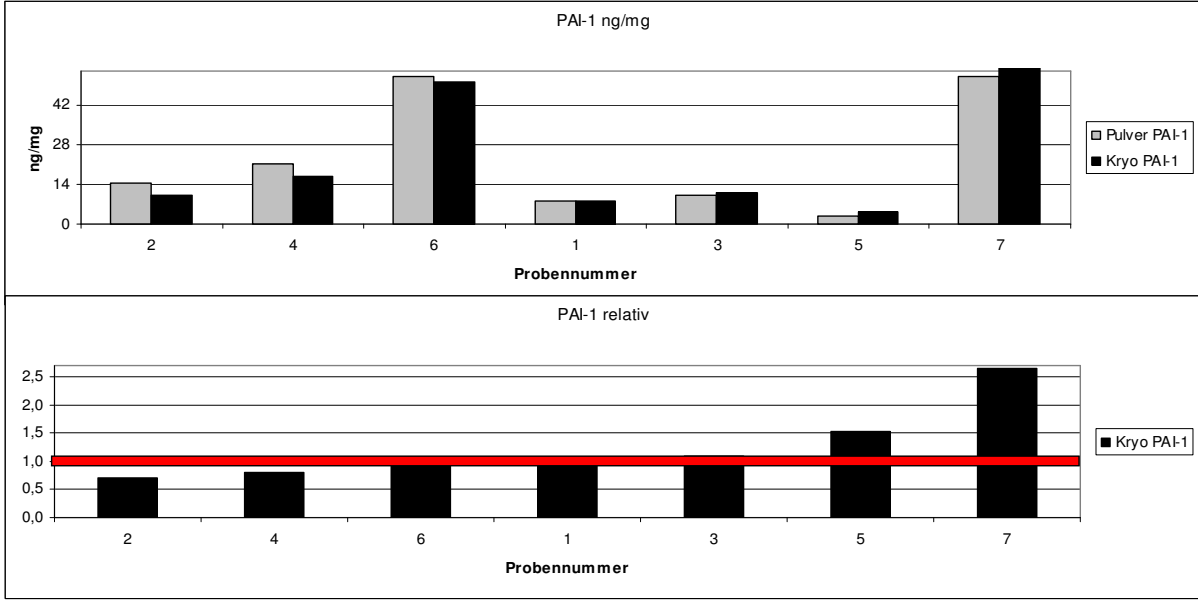
Die uPA und PAI-1 Konzentrationen lassen sich der Tabelle 17 entnehmen. Es erfolgte auch hier die Umrechnung der absoluten uPA und PAI-1-Ergebnisse in relative uPA und PAI-1-Ergebnisse. Dabei erhielt der standardisierte Ansatz der uPA und PAI-1 Werte für Pulverisierung den Wert 1,0.

Ebenso erfolgte eine graphische Darstellung mit Hilfe von Säulendiagrammen (Abb. 26 und Abb. 27), in welchen sowohl die absoluten, als auch relativen uPA bzw. PAI-1 Daten aufgetragen wurden. Der Median aus den Daten der Kryoschnittaufarbeitung betrug hierbei 0,81 ( $\text{uPA}_{\text{rel}}$ ) und 1,00 ( $\text{PAI-1}_{\text{rel}}$ ). Die Mittelwerte und Standardabweichung können mit  $0,86 \pm 0,21$  ( $\text{uPA}_{\text{rel}}$ ) und  $1,25 \pm 0,67$  ( $\text{PAI-1}_{\text{rel}}$ ) angegeben werden. Die Abweichungen der uPA Ergebnisse durch Kryoschnittaufarbeitung betrug  $\pm 20\%$ , die uPA Konzentrationen in ng/mg Protein lagen in 6 von 7 Proben deutlich über oder unter dem cut off von 3 ng/mg Gesamtprotein. Die PAI-1 Konzentrationen in ng/mg Protein lagen in 6 von 7 Proben deutlich über oder unter dem cut off von 14 ng/mg Gesamtprotein.

Es lässt sich ein Trend erkennen, dass es keinen Unterschied in diesen 7 untersuchten Tumorproben gibt, bezüglich der Aufarbeitung per Pulverisierung bzw. per Kryoschnitt.



**Abb. 26:** Pulverisierung vs. Kryoschnitt (Kryo) **oben:** uPA in ng/mg Protein paarweise vergleichend **unten:** Kryo-uPA<sub>rel</sub> (Standard: Pulverisierung = 1,0) **aufsteigend sortiert**, 10%-Intervall markiert



**Abb. 27:** Pulverisierung vs. Kryoschnitt (Kryo) **oben:** PAI-1 in ng/mg Protein paarweise vergleichend **unten:** Kryo-PAI-1<sub>rel</sub> Daten (Standard: Pulverisierung = 1,0) **aufsteigend sortiert**, 10%-Intervall markiert

**Tab. 17:** Zusammenfassung: uPA/PAI-1 in ng/mg Protein und uPA<sub>relativ</sub> / PAI-1<sub>relativ</sub> Änderungen Pulverisierung versus Kryoschnittaufarbeitung

#	uPA in ng/mg Pulver	uPA in ng/mg Kryo	uPA <sub>relativ</sub> Quotient aus Kryo/Pulver	PAI-1 in ng/mg Pulver	PAI-1 in ng/mg Kryo	PAI-1 <sub>relativ</sub> Quotient aus Kryo/Pulver
7	56,2	34,9	~0,6	~45	~45	~1,0
4	~1,8	~1,0	~0,65	~20	~15	~0,75
5	~5,5	~4,5	~0,8	~45	~45	~1,0
2	~2,2	~1,8	~0,85	~10	~10	~1,0
1	~3,2	~2,8	~0,9	~12	~12	~1,0
6	~2,8	~3,0	~1,1	~5	~5	~1,5
3	~0,8	~0,8	~1,15	~45	~45	~2,5

1	2,1	1,7	0,81	8,1	8,1	1,00
2	1,8	1,2	0,67	14,6	10,2	0,70
3	2,5	2,8	1,12	10,0	11,0	1,10
4	3,1	2,6	0,84	21,0	17,0	0,81
5	0,6	0,7	1,16	2,8	4,2	1,52
6	5,5	4,3	0,78	52,3	50,4	0,96
7	56,2	34,9	0,62	52,1	138,5	2,66

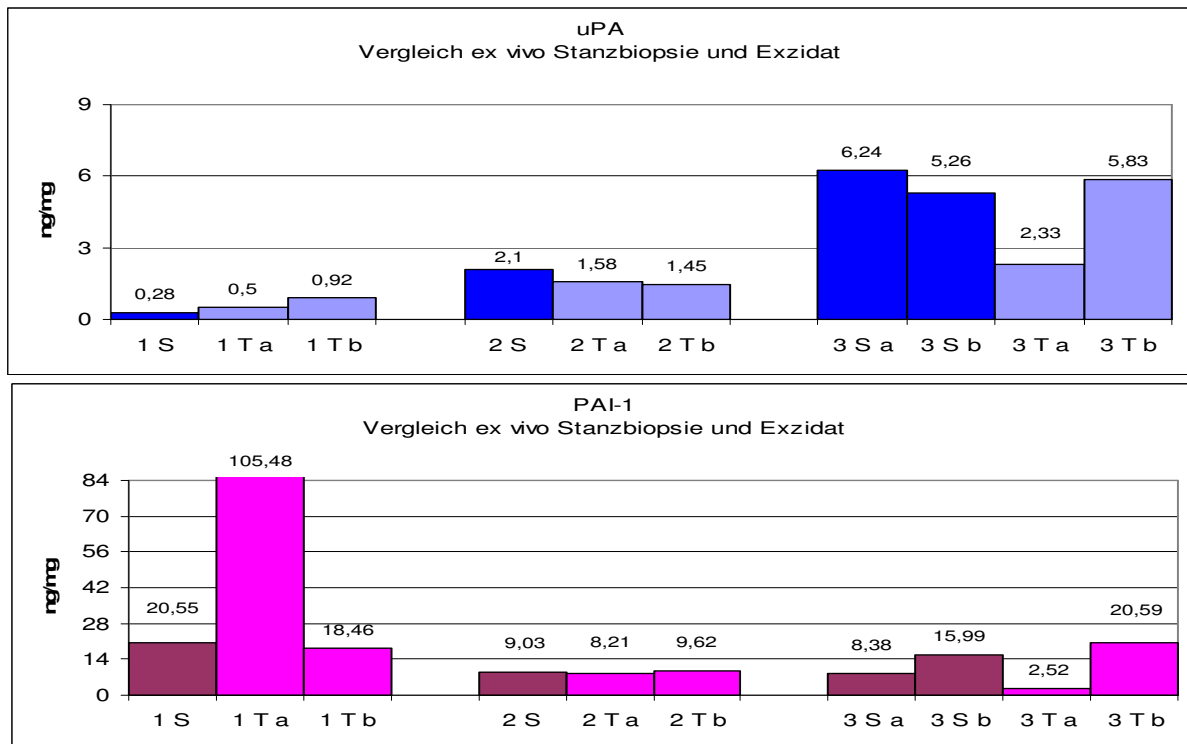
### **4.3. Biopsiebedingungen (Frage 5 und 6)**

#### **4.3.1. Vergleich von in vivo Stanzen mit in vivo OP-Exzidat und Vergleich von ex vivo Stanzen mit ex vivo Exzidat (Frage 5)**

Ist eine Aussage zur Konzentration von uPA und PAI-1 aus kleinsten Mengen Tumorgewebe möglich? Wie ähnlich sind die uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen innerhalb der Tumorstanzen? Korrelieren die uPA und PAI-1 Konzentrationen aus Stanzbiopsien mit den Werten aus OP-Exzidaten?

#### **Vergleich von ex vivo Stanzen mit ex vivo Exzidat**

Vorab erfolgte ein Stichprobenversuch: Es wurden ex vivo Stanzbiopsien (30-50 mg) und ex vivo Exzidate (100-300 mg) aus einem Tumor entnommen. Hieraus war ersichtlich, dass sowohl kleinere Tumormengen zur Diagnostizierung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 nutzbar sind. (s. Abb. 28)



**Abb. 28:** uPA und PAI-1 in ng/mg Protein aus ex vivo Stanzen und ex vivo Exzidaten (nebeneinander vergleichend aufgetragen)  
(S = Stanzbiopsie, T = Tumorgewebe; 1, 2 und 3 = Probennummer, a, b = Referenzgewebe innerhalb eines Tumors)

### Vergleich von in vivo Stanzen mit in vivo OP-Exzidat

Im weiteren Verlauf konnten von 7 Tumoren jeweils eine in vivo Stanzbiopsie und das dazugehörige OP-Gewebe miteinander verglichen werden. Vorab wurde aus den Stanzzyklindern an verschiedenen Stellen ein Kryoschnitt angefertigt, um den Karzinomnachweis innerhalb der Stanze nachzuweisen (s. Abb.4; Methoden).

Die uPA und PAI-1 Konzentrationen wurden gemessen und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 18 aufgeführt, graphische Darstellungen (Säulendiagramme) lassen sich aus Abb. 29 entnehmen.

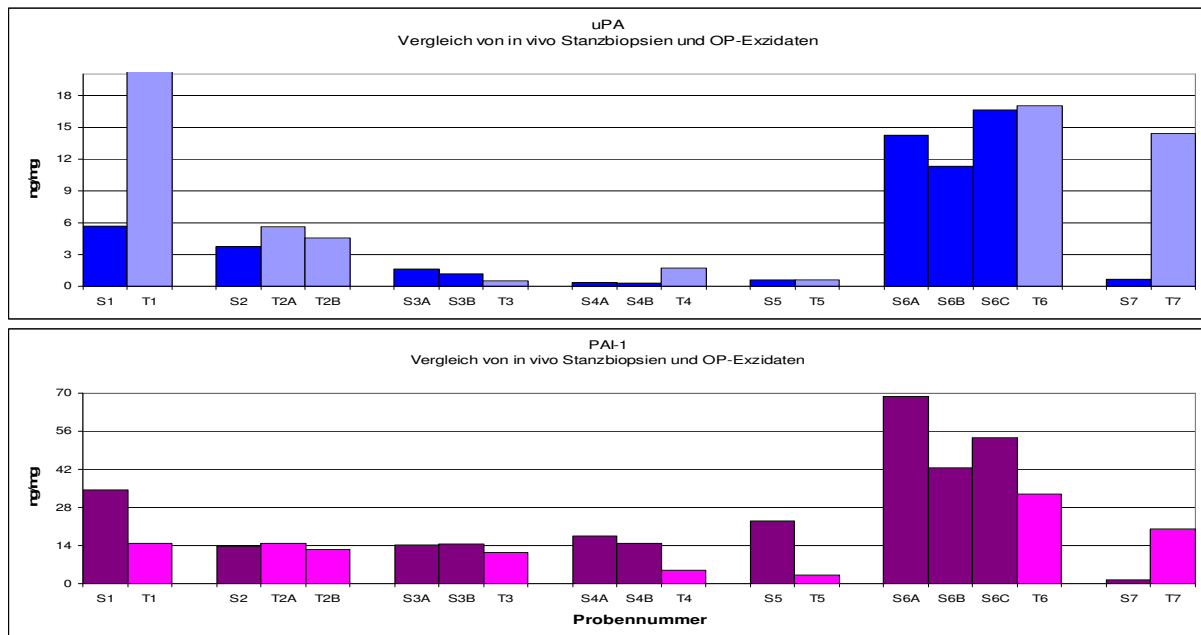
In Stanze S2 war in allen 5 Kryoschnitten Mammakarzinom nachweisbar. In den Stanzen S3 zeigte sich lediglich in einem von 5 Kryoschnitten Anteile eines Mammakarzinoms, in 2 von 5 Kryoschnitten ein DCIS. Ebenso zeigten sich in Stanze S6 nur in einem von 3 Kryoschnitten Mammakarzinomzellen. *Stanze S7 fanden sich überraschenderweise in keinem von 5 angefertigten Kryoschnitten Karzinomzellen.* In 3 Fällen konnte man keine Aussage treffen, da die Stanzen vorab bereits aufgearbeitet waren.

Von den Tumoren #3, #4 und #6 konnten mindesten 2 Tumorstanzen aufgearbeitet werden, welche allesamt ähnliche uPA/PAI-1 Proteinlevel aufwiesen- d. h. man darf davon ausgehen, dass diese uPA bzw. PAI-1 Daten aus den Stanzen durchaus repräsentativ sind.

In allen 7 Proben gab es keinen Grund zur Annahme eines höheren und/oder niedrigeren uPA bzw. PAI-1 Wert aus einer in vivo Tumorstanzbiopsie, relativ zum in vivo OP-Exzidat. Sowohl die Werte aus der Stanzbiopsie, als auch aus dem OP-Gewebe lagen entweder deutlich über, oder unter dem cut- off. Es ist äußerst wichtig, darauf zu achten, dass das Karzinom innerhalb der Stanze **nachgewiesen** wurde, um repräsentative uPA/PAI-1 Werte aus einer Stanzbiopsie zu erhalten. Ansonsten erhält man unter Umständen völlig unterschiedliche uPA und PAI-1-Werte, wie z.B. aus Stanzbiopsie S7 (kein Karzinomzellennachweis) und der dazugehörigen Tumorreferenzprobe T7.

Tab. 18: uPA und PAI-1 in ng/mg Vergleich von in vivo Stanzbiopsien u. OP-Exzidaten (S = Stanzbiopsie, T = Tumorreferenzprobe; Nummerierung 1-8 = Probennummer, A, B, C = Referenzgewebe innerhalb einer Tumorprobe/Stanze, \*\*\* keine Angabe zum Karzinomnachweis möglich)

Probennummer	uPA ng/mg	PAI-1 ng/mg	Tumornachweis
S1	5,67	34,50	***
T1	23,17	14,77	Karzinomnachweis
S2	3,77	13,72	alle Anschnitte (5) mit Karzinomnachweis
T2A	5,63	15,00	alle Anschnitte (5) mit Karzinomnachweis
T2B	4,55	12,40	Karzinomnachweis
S3A	1,62	14,24	1/5 Karzinomnachweis, 2/5 DCIS-Nachweis
S3B	1,17	14,55	1/5 Karzinomnachweis, 2/5 DCIS-Nachweis
T3	0,49	11,28	Karzinomnachweis
S4A	0,38	17,62	***
S4B	0,27	14,78	***
T4	1,73	5,10	Karzinomnachweis
S5	0,60	23,00	***
T5	0,63	3,09	Karzinomnachweis
S6A	14,20	68,94	1/3 Karzinomnachweis, 2/3 Bindegewebe
S6B	11,30	42,70	1/3 Karzinomnachweis, 2/3 Bindegewebe
S6C	16,60	53,80	1/3 Karzinomnachweis, 2/3 Bindegewebe
T6	16,97	32,86	Karzinomnachweis
S7	0,66	1,44	5/5 <b>kein</b> Karzinomnachweis
T7	14,38	20,07	Karzinomnachweis



**Abb. 29:** uPA und PAI-1 in ng/mg Protein aus in vivo Stanzbiopsien und in vivo OP-Exzidaten (nebeneinander vergleichend aufgetragen) (S = Stanzbiopsie, T = Tumorexzidat, 1-7 = Tumorprobennummer, A,B = Referenzgewebe innerhalb eines Tumors)

#### 4.3.2. Vergleich von OP-Exzidaten mit und ohne Stanzkanal (Frage 6)

Von 5 Tumoren wurden jeweils mindestens eine Gewebeprobe aus dem Stanzkanal und eine Gewebeprobe ohne Stanzkanal entnommen. Die uPA und PAI-1 Konzentrationen wurden berechnet und miteinander verglichen. Diese uPA und PAI-1 Daten sind in Tab. 19 aufgeführt, eine graphische Darstellung (Säulendiagramm) lässt sich der Abb. 30 entnehmen.

Histologisch handelte es sich bei allen 5 Tumoren um invasiv duktales Mammakarzinome. Im Einzelnen lauten die Tumorformeln:

- #1 pT2 pN0 M0 G2 ER+ PR+ HER-2 neg.
- #2 pT1c pN0 M0 G1 ER+ PR+ HER-2 neg.
- #3 pT2 pN0 M0 G2 ER+ PR+ HER-2 pos.
- #4 pT1c pN0 M0 G1 ER+ PR+ HER-2 neg.
- #5 pT2 pN2 M0 G2 ER+ PR+ HER-2 neg.

Auffällig sind die erhöhten PAI-1 Werte im Bereich des Stanzkanals, v. a. in Probe #1 (2-3fach erhöht), #2 (7fach erhöht), #3 (3fach erhöht) und Probe #5 (3 bis 5fach erhöht). Es fanden sich weitestgehend stabile uPA Konzentrationen, ggf. geringfügig erhöhte uPA Werte.

Tab. 19: uPA und PAI-1 Konzentrationen in ng/mg aus Tumorgewebe mit und ohne Stanzkanal  
 SK = Stanzkanal, R = Tumorreferenzprobe; Nummerierung 1-5 = Probennummer, A, B = Referenzgewebe innerhalb einer Tumorprobe/Stanzkanals

Probennummer	uPA ng/mg	PAI-1 ng/mg	Referenz/Stanzkanal
R1	3,18	7,98	Referenz
SK1A	2,51	19,18	Stanzkanal
SK1B	6,24	27,99	Stanzkanal
R2	1,65	20,28	Referenz
SK2	8,29	140,69	Stanzkanal
R3	14,38	20,07	Referenz
SK3	9,55	59,88	Stanzkanal
R4	0,52	17,67	Referenz
SK4	2,88	14,55	Stanzkanal
R5A	5,35	5,23	Referenz
R5B	2,5	5,73	Referenz
SK5A	2,59	51,33	Stanzkanal
SK5B	4,83	14,99	Stanzkanal

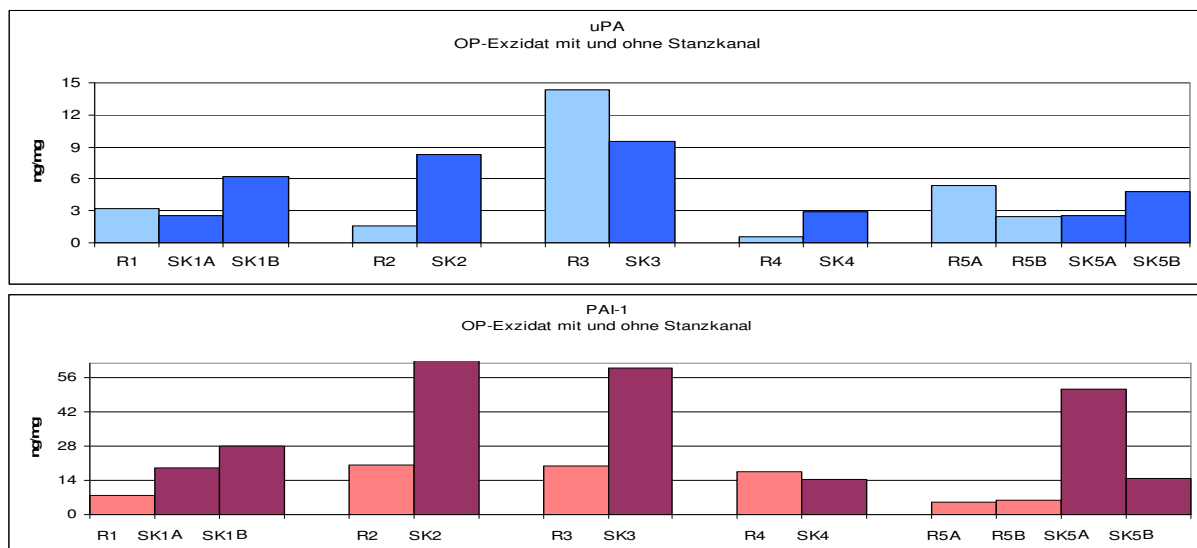


Abb. 30: uPA und PAI-1 in ng/mg Protein; Vergleich Gewebe aus Stanzkanal (SK) und Referenztumorgewebe (R)  
 1-5 = Probennummer A, B = Referenzgewebe innerhalb einer Tumorprobe/Stanzkanals

### 4.3.3. Tumorhomogenität und Tumorheterogenität (Frage 7)

Aus 13 Tumoren konnten mindestens 2 Proben entnommen werden. Der Umfang der Probenentnahme (2-5 Tumorstücke) war abhängig von der Tumorgesamtgröße.

Diese Tumorstückchen wurden zu gleichen Bedingungen aufgearbeitet und hinsichtlich der Tumorphomogenität/-heterogenität untersucht. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 20) zeigt die jeweiligen uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen in ng/mg Protein auf. Aus Tab. 21 und Abb. 31 lässt sich eine Aussage hinsichtlich Homogenität bzw. Heterogenität treffen. Des Weiteren werden in Tab. 21 Tumorformel und histologischem Mammakarzinom - Typ aufgeführt.

In 4 von 13 Tumoren (#2, #4, #7, #9) zeigten sich ähnliche uPA und in 5 von 13 Tumoren (#1, #4, #5, #7, #10) ähnliche PAI-1 Konzentrationen. In 9 von 13 Tumoren (#1, #3, #5, #6, #8, #10, #11, #12, #13) zeigten sich abweichende uPA und in 8 von 13 Tumoren (#2, #3, #6, #8, #9, #11, #12, #13) zeigten sich abweichende PAI-1 Proteinlevel (in unterschiedlichen Bereichen des Tumors). Lediglich in Tumor #4 und #7 fanden sich ähnliche uPA und PAI-1 Proteinlevel. Auffällig in den Tumoren #5 und #12 waren 2 mal 2 ähnliche uPA Konzentrationen.

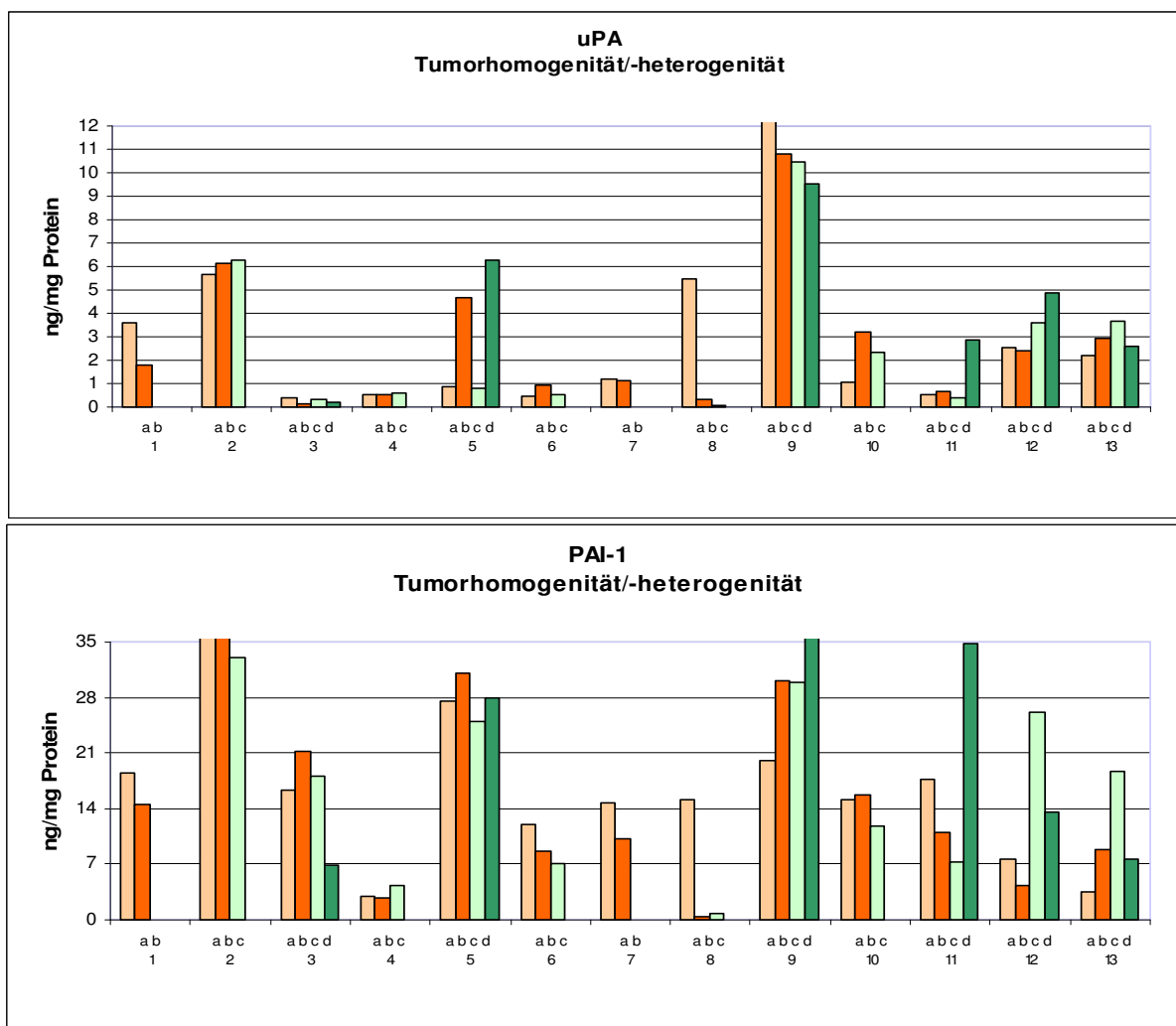
Tab. 20: Homogenität und Heterogenität: uPA und PAI-1 absolut Daten in ng/mg Protein, Nummerierung 1-13 = Tumorprobennummer; a-e Tumorproben-Teilstück(Referenzgewebe zu gleichen Bedingungen aufgearbeitet)

Probe #	uPA in ng/mg Protein Referenzproben				PAI-1 in ng/mg Protein Referenzproben			
	a	b	c	d	a	b	c	d
1	3,59	1,80			18,47	14,60		
2	5,69	6,16	6,27		83,91	61,90	33,02	
3	0,42	0,14	0,34	0,23	16,30	21,21	18,16	6,95
4	0,53	0,51	0,58		2,99	2,78	4,30	
5	0,85	4,64	0,81	6,24	27,54	30,99	25,00	27,99
6	0,50	0,92	0,55		11,91	8,56	7,07	
7	1,22	1,16			14,73	10,24		
8	5,45	0,35	0,10		15,16	0,30	0,80	
9	14,38	10,83	10,50	9,55	20,07	30,13	29,83	59,88
10	1,10	3,23	2,31		15,16	15,79	11,87	
11	0,52	0,68	0,43	2,88	17,67	11,04	7,32	34,85
12	2,52	2,43	3,61	4,87	7,71	4,28	26,22	13,55
13	2,21	2,91	3,70	2,59	3,57	8,76	18,59	7,67

Unter den Tumoren mit homogenen uPA Konzentrationen waren 4 duktales Mammakarzinome, unter den Tumoren mit homogenen PAI-1 Konzentrationen fanden sich 4 duktales und 1 medulläres Mammakarzinom.

Einen Einfluss des Tumorstadiums, des Nodalstatus, Gradings oder Hormonrezeptorstatus auf homogene bzw. heterogene uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen konnte in der doch kleinen Probenzahl nicht gefunden werden. (Tab. 14) Eine graphische Darstellung (Säulendiagramme) erfolgt gemäß Abb. 13.





**Abb. 31:** uPA und PAI-1 in ng/mg Protein Nummerierung 1-13 = Tumorprobennummer; a-d Tumorproben-Teilstück (Referenzgewebe zu gleichen Bedingungen aufgearbeitet)  
 Proben #2, #4, #7, #9 mit ähnlichen uPA Konzentrationen  
 Proben #1, #4, #5, #7, #10) mit ähnlichen PAI-1 Konzentrationen

Tab. 21: Homogenität und Heterogenität, Histologie und Tumorformel der Tumoren 1-13

Probe	Histologie	Tumorformel	Homogenität/Heterogenität
1	duktal	pT2 pN2 M0 G1 ER+ PR+ HER-2/neu +	heterogen
2	duktal-adenoid	pT2 pN3a M0 G2 ER+ PR+ HER-2/neu -	uPA homogen PAI-1 heterogen
3	muzinös	pT3 pN2a M0 G1 ER+ PR+ HER-2/neu +	heterogen
4	duktal	pT3 pN1 M0 G2 ER+ PR+ HER-2/neu -	homogen
5	duktal-adenoid	pT2 pN1 M0 G3 ER+ PR+ HER-2/neu -	uPA heterogen PAI-1 homogen
6	duktal	pT1 pN1 M0 G2 ER+ PR+ Her-2/neu -	heterogen
7	duktal	pT1c pN3a M0 G3 ER- PR- HER-2/neu -	homogen
8	duktal	pT2 pN1 M0 G3 ER+ PR+ HER-2/neu +	heterogen
9	duktal	pT1c pN0 M0 G2 ER+ PR+ HER-2/neu -	uPA homogen PAI-1 heterogen
10	medullär	pT1c pN0 M0 G3 ER- PR- HER-2/neu -	uPA heterogen PAI-1 homogen
11	adenoid	pT1c pN0 M0 G1 ER+ PR+ HER-2/neu -	heterogen
12	duktal	pT2 pN0 M0 G3 ER+ PR+ HER-2/neu -	heterogen
13	duktal	pT1c pN0 M0 G2 ER+ PR+ HER-2/neu -	heterogen

## 5. Diskussion

Prognosefaktoren spielen eine immer größere Rolle zur Planung und Durchführung einer individuellen Tumorthherapie. Eines der best untersuchten Systeme bezüglich der prognostischen Relevanz beim Mammakarzinom, ist das Plasminaktivatorsystem. Dieses System umfasst die Proteine uPA und den Inhibitor PAI-1. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den Prognosefaktoren uPA und PAI-1 und dem Ansprechen einer adjuvanten systemischen Therapie des primären Mammakarzinoms, wurde in zahlreichen Studien (Thomssen et al, 2000; Look et al 2002, Manders et al, 2004) untersucht.

Unabhängig vom Alter, Tumorgröße, Lymphknotenstatus und des ER- bzw. PR-Status konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit hohen uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen im Tumorgeewebe frühe Rezidive aufweisen. (multivariate Analyse, 1119 Tumorpatientinnen, FU 59 Monate). Hohe uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen werden vor allem bei jungen Patientinnen (jünger als 40 Jahre), in großen Tumoren (> 2 cm im Durchmesser), mit hohem Grading (54-63 % mit G3 vs. 33-45% mit G1) erwartet, hohe Konzentrationen sind oft assoziiert mit negativen ER- bzw. PR-Status (54-71% mit ER- und PR- vs. 43-49% mit ER+ und PR+). (Manders et al, 2004) Es konnte gezeigt werden, dass Tumorpatienten mit einer hohen uPA und PAI-1 Konzentration mehr von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren, als Patientinnen mit niedrigen uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen.

Durch die verbesserte Diagnostik zur Erkennung des Mammakarzinoms nimmt die Anzahl der kleinen Tumoren zu. In der Früherkennung des Mammakarzinoms spielt die Mammographie eine wichtige Rolle. Derzeit empfohlen ist die Durchführung einer Mammographie bei asymptomatischen Frauen ab dem 50. Lebensjahr, oder in Kombination mit einem ärztlich-klinischen Befund, oder in Untersuchungsintervallen von längstens 24 Monaten (nach Erkrankung). Es konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass durch das Brustkrebs-Screening (durch Mammographie) die Mortalität des Mammakarzinoms gesenkt werden kann. (De Wolf et al, 1996; Hölzel et al, 1996; Schulz et al, 2003) Heutzutage werden, gemäß den Vorgaben aus den Europäischen Leitlinien, den Empfehlungen der European Society for Mastology und der S3-Leitlinie, mehr als 70% aller suspekten, nicht tastbaren und nur apparativ entdeckten Mammaläsionen vor der offenen Biopsie bereits interventionell abgeklärt. (De Wolf et al, 1996; Hölzel et al, 1996; Schulz et al, 2003) Nach Vorliegen des histologischen Ergebnisses aus minimal-invasiver Diagnostik gewonnenen Materials (z.B. Hochgeschwindigkeits-Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie usw.), werden diese mit der Bildgebung korreliert und ggf. wiederholt. Nicht selten werden dabei kleinste Mammakarzinome oder

Vorläuferläsionen entdeckt. Umso wichtiger ist es, von diesen kleinen Tumoren eine Prognoseabschätzung zu gewinnen und eine optimale Therapie zu veranlassen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beruhen auf einem Gesamt-Proteinnachweis und dem spezifischen Nachweis der uPA bzw. PAI-1 Menge durch ELISA. Die, wie im Standardkit des ELISA, geforderte Tumormenge von 100-300 mg ist oftmals nicht zu gewährleisten, da wie angesprochen, die Tumorkläsionen immer häufiger sehr klein sind. Deshalb müssen mehr und mehr kleinste Tumormengen, bzw. die Tumor-Stanzbiopsien zur Aufarbeitung herangezogen werden, um aus diesen die Prognosefaktoren uPA und PAI-1 zu bestimmen. Ob sich Unterschiede zwischen den uPA und PAI-1 Konzentrationen aus Stanzbiopsien bzw. operativ entferntem Tumorgewebe erkennen lassen, wird vielfach untersucht. Erste signifikante Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen, wie z. B. Schmitt et al, München, zeigen, dass die uPA und PAI-1 Daten aus den Tumorstanzbiopsien eine gute Übereinstimmung mit den uPA und PAI-1 Daten aus OP-Exzidaten zeigten.

Die uPA und PAI-1 Konzentrationen der vorliegenden Arbeit wurden durch ELISA (derzeitiger Standard) bestimmt. Voraussetzung für diese Testmethode ist, dass die Proteine nicht denaturieren sind. Andere Nachweismethoden von uPA und PAI-1 im Tumorgewebe sind die Immunhistochemie und die RT-PCR (auf mRNA - Ebene). Der immunhistochemische Nachweis von uPA und PAI-1 zeigt keinen Zusammenhang mit der Prognose (Grund: PAI-1 im EZM, Verfügbarkeit der AK-Bindungsstellen). Eine Alternative wäre die so genannte Real-time quantitative RT-PCR Analyse, bei welcher nur kleinste Tumormengen (100 ng Gewebe) zur Diagnostik ausreichen. Vergleichende Ergebnisse zum Nachweis der uPA und PAI-1 Proteinlevel auf mRNA-Ebene versus auf Proteinebene liegen vor. (Leissner et al, 2006; Sweep et al, 1998; Han et al, 2005)

An 54 Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, dass hohe uPA und PAI-1- RNA-Level nachgewiesen durch RT-PCR, assoziiert sind mit ungünstiger Prognose und dass diese mRNA Daten mit den Proteindaten korrelieren. (Castello et al, 2002) Eine andere Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls, retrospektiv an 130 Patientinnen, dass hohe uPA und PAI-1 Konzentrationen mit kürzerem DFS assoziiert sind, unabhängig von Nodalstatus und HR-Status. Diese Daten wurden zum einen durch RT-PCR zum anderen durch ELISA (Proteine) erhoben und miteinander verglichen. Auch hier konnte eine Korrelation beider Nachweismethoden belegt werden. (Spyratos et al, 2002)

In der vorliegenden Arbeit wurden methodische Aspekte untersucht, mit dem Ziel, die bisher standardisierte Bestimmung von uPA und PAI-1 zu vereinfachen.

## **5.1. Asservierungsbedingungen**

### **5.1.1. Lagerungstemperatur und Aufarbeitungszeitpunkt**

In der vorliegenden Arbeit wurden 17 Tumoren zu standardisierten Bedingungen aufgearbeitet. Neben den standardisierten Bedingungen wurden aus denselben Tumoren Proben auf unterschiedlichen Temperaturen schockgefroren und an unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet. Hinsichtlich der Lagerungs- und Aufarbeitungsbedingungen konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich Tag 0 versus Tag 15 bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufgezeigt werden ( $p=0,03$ ). Diese Signifikanz sollte auf Tumorheterogenität zurückzuführen sein, da es keinen signifikanten Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 30 bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gibt ( $p=0,34$ ). In den anderen Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen gefunden werden.

Das heißt weder die Lagerungstemperatur von  $-196^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  oder  $-20^{\circ}\text{C}$ , noch der Tag der Aufarbeitung der Proben (Tag 0, Tag 15 oder Tag 30) haben einen Einfluss auf die uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen im Mammakarzinomgewebe. Das heißt, dass das Tumorgewebe ebenso auf Trockeneis ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) oder in einem herkömmlichen Tiefkühlschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  asserviert werden kann. So bestünde für Kliniken die Möglichkeit, Tumorproben zu lagern und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Trockeneis) bzw.  $-20^{\circ}\text{C}$  an etablierte Zentren innerhalb von 30 Tagen zu versenden, um die Prognosefaktoren uPA und PAI-1 bestimmen zu lassen.

Die Stabilität von Proteinen über eine definierte Lagerungszeit und eine definierte Lagerungstemperatur an anderen körpereigenen Proteinen wurde bereits mannigfaltig untersucht.

Die Effekte der Lagerungszeit und der exogenen Zufuhr von Proteaseninhibitoren auf die Plasmaprotein-Konzentrationen wurde z. B. 2006 untersucht. Von 12 Probanden wurden Seren mit und ohne Proteaseninhibitoren (MMP-Inhibitor, alpha1-Protease-Inhibitor) präpariert. Die Seren wurden zunächst sofort auf die Plasmaproteinkonzentration (MMP, Serin, PAI-1, VEGF), zum anderen nach Lagerung von 2 Stunden bei Raumtemperatur untersucht. Die Untersuchung erfolgte mittels ELISA. (Ayche et al, 2006) Man hatte erwartet, dass die Konzentration der o. g. Faktoren durch die proteolytische Degradation während der Lagerung fallen würde. Es zeigte sich in den Plasmen ohne Proteasen-Inhibitoren-Zusatz aber, dass keiner der Faktoren nach 2 Stunden abfiel, sondern die Level von mehr als einem Drittel der gemessenen Faktoren anstieg. In den Plasmen mit Proteasen-Inhibitoren-Zusatz veränderte sich die Proteinkonzentration nur geringfügig. (Ayche et al, 2006)

In der Schlussfolgerung stellten die Autoren fest, dass sich die Proteinkonzentration während der Lagerung unabhängig von Proteaseninhibitoren ändern kann. Die Änderung der Plas-

maproteinkonzentration kann laut Autoren auf die Zytokinproduktion zurück zu führen sein. Wie in Studien gezeigt, weisen Serum- und Plasmaproteine stabile Konzentrationen über einen langen Zeitraum auf, wenn im Vorfeld die festen Blutbestandteile entfernt wurden. (Ayche et al, 2006) Eine Lagerung von Plasma mit Proteasen-Inhibitoren ist dann für mindestens 48 Stunden (bei Raumtemperatur) möglich, bei stabiler Proteinkonzentration. (Ayche et al, 2006; Hulmes et al 2004)

Die Untersuchung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 auf ihre Stabilität bei Raumtemperatur, bzw. +4°C war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, sollte aber ggf. bei Folgeuntersuchungen im Vergleich zur Lagerung des Gewebes in flüssigem Stickstoff mit angedacht werden.

Des Weiteren wurde anhand von MMP-9 die Stabilität von Peptiden nach einer 2 jährigen Lagerung bei -80°C untersucht. Die Proteindaten wurden durch Zymographie (Enzymnachweis), ELISA und Western blot erhoben. Nach 2 Jahren Lagerungszeit der Seren konnte ein Abfall der MMP-9 Konzentration um 65% festgestellt werden. Die TIMP-1 Konzentration (Inhibitor der MMP-9 und MMP-2) blieb vielmehr stabil über diesen Zeitraum. (Rouy et al 2005)

Das heißt, die Stabilität der Proteinkonzentration ist nicht einheitlich, sondern für jedes Protein individuell unterschiedlich.

## **5.2. Aufarbeitungsbedingungen**

### **5.2.1. Zentrifugation**

Im Standardprotokoll des uPA/PAI-1 ELISA ist das Abzentrifugieren der Tumorzellsuspension per Ultrazentrifuge vorgesehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in wie weit sich in den uPA/PAI-1 Proteinlevel Unterschiede ergeben, wenn eine geringere Zentrifugalbeschleunigung (per Tischzentrifuge, 15.000g) zur Aufarbeitung benutzt wird. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der uPA ( $p=0,907$ ) und PAI-1 ( $p=0,321$ ) Konzentrationen zwischen der Aufarbeitung mittels Ultrazentrifuge bzw. Tischzentrifuge in den untersuchten Tumorproben in der vorliegenden Arbeit. Das heißt, zur Bestimmung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 muss die Tumorgewebesuspension nicht zwangsläufig per Ultrazentrifugation abzentrifugiert werden. Mit einer geringeren Zentrifugalbeschleunigung (z.B. 15.000g), wie sie durch eine Tischzentrifuge gewährleistet werden kann und welche in fast allen Laboratorien zur Verfügung steht, erhält man genauso zuverlässige uPA und PAI-1 Konzentrationen wie mit der Standardmethodik.

## 5.2.2. Gewebezerkleinerung

Weiterhin wurde, im Rahmen der Modifikation der Aufarbeitungsbedingungen, die Notwendigkeit der Pulverisierung des Tumorgewebes hinterfragt. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied in 7 untersuchten Tumorproben aufgezeigt werden, hinsichtlich der uPA und PAI-1 Proteinlevel und der vorausgegangenen Aufarbeitung per Pulverisierung und/oder Kryoschnittasservierung und -aufarbeitung. Das heißt, zur Bestimmung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 muss die Zerkleinerung des Tumorgewebe nicht zwangsläufig durch Pulverisierung mittels Mikro-Dismembrator durchgeführt werden, sondern mit jeder anderen adäquaten Zerkleinerung (z.B. Kryoschnitt) des Tumorgewebe erhält man genauso zuverlässige uPA und PAI-1 Konzentrationen. Durch die eher kleine Anzahl an untersuchten Proben sollte hier zur Diskussion stehen, diese Art der Gewebezerkleinerung weiterhin zu validieren.

## 5.3. Biopsiebedingungen

### 5.3.1. Vergleich ex vivo Stanzen mit ex vivo OP-Exzidat und in vivo Stanzen mit in vivo OP-Exzidaten

Bei den zu untersuchenden Biopsiebedingungen sollte geklärt werden, in wie weit kleine Mengen Tumorgewebe zur Beurteilung von uPA und PAI-1 herangezogen werden können. Da die Tumorerläsionen häufig nur klein sind, ist die geforderte Mindesttumormenge von 100-300 mg zur Aufarbeitung gemäß Standardprotokoll häufig schwierig zu gewährleisten.

Aus den Stichproben der ex vivo Stanzbiopsie und dem ex vivo Exzidat war zu ersehen, dass kleinere Tumormengen zur Diagnostizierung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 nutzbar sind.

In 7 untersuchten in vivo Tumorproben konnte kein Unterschied in der uPA bzw. PAI-1 Konzentration zwischen einer Stanzbiopsie und dem OP-Exzidat gefunden werden. Sowohl die Werte aus der Stanzbiopsie, als auch die aus dem OP-Exzidat lagen entweder deutlich *über*, oder *unter* dem cut-off. Das heißt die Daten aus der in vivo Stanzbiopsie sind denen aus dem in vivo OP-Exzidat ähnlich.

Eine Arbeit aus dem Jahre 2002 bestätigt die Vergleichbarkeit von Proteindaten aus Stanzgewebe vs. Op-Gewebe (Kuner et al 2000). In dieser Arbeit wurden Mamma-Stanzbiopsien und Op-Gewebe auf die uPA, PAI-1 und Kathepsin D Expression und den Östrogen-, Progesteron- und EGF- Rezeptorstatus untersucht. (63 Mammakarzinompatientinnen) Die Daten des Op-Gewebes wurden mit denen der Stanze verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die

Sensitivität und Spezifität der gemessenen Prognosefaktoren im Gewebe der Stanzbiopsien im Vergleich zu dem Op-Gewebe zwar in den Parametern Änderungen zeigte, diese aber innerhalb des statistischen Sicherheitsspielraums bei 86-100% lagen. Das heißt, die Analyse von Prognosefaktoren aus Stanzbiopsien stellt eine verwertbare Alternative zur Analyse aus dem Op-Gewebe dar. (Kuner et al 2000).

Die diagnostische Aussagekraft von Mammastanzbiopsien wurde 2002 untersucht. Die Daten der Stanzbiopsien mit denen aus dem OP-Gewebe wurden verglichen. Hierzu wurden die Daten von 1158 Stanzen mit den aus dem OP-Gewebe über einen Zeitraum von 18 Jahren (1982-2000) verglichen. Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 (n = 231) waren alle Patientinnen bis zum 40 Lj. Gruppe 2 (n = 927) alle Patientinnen ab 41.Lebensjahr. In Gruppe 1 konnten durch Stanzbiopsie 51% maligne (n = 1 falsch pos.), 9% suspekte und 39% benigne (n = 1 falsch neg.) gefunden werden. Das entsprach einer Sensitivität von 99% und einer Spezifität ebenfalls von 99%. In der Gruppe 2 konnten durch Stanze 74% maligne (n = 3 falsch pos.), 10% suspekte und 14% benigne (n = 18 falsch neg.) gefunden werden. Das entsprach einer Sensitivität von 98% und einer Spezifität von 97%. In der Schlussfolgerung stellen die Autoren fest, dass sowohl die Sensitivität, als auch die Spezifität der Diagnostik durch Stanzbiopsie bemerkenswert hoch ist, so dass die Stanzbiopsie eine hervorragende Methode zur Diagnoseklärung von Mammakarzinomen ist, insbesondere der palpablen Läsionen. (Ari-ga et al 2002)

Des Weiteren untersuchten Connor et al die diagnostische Aussagekraft von Mammastanzbiopsien, hinsichtlich Prognosefaktoren. Hierzu wurden die Daten von 44 Tumorstanzen mit denen aus dem Op-Gewebe verglichen. Es fanden sich, wie im Folgenden aufgeführt, unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Daten aus den Stanzen und denen aus dem Op-Gewebe: Diskordanz des Progesteronrezeptors 87 %, des Gratings 36%, des Östrogenrezeptors 2%, MIB 18%, Her-2/neu 9%, EGFR 10%, p53 9% und bcl-2 0%. Ein positiver Progesteronrezeptorstatus wurde in den Stanzbiopsien (als einziger) signifikant häufiger als im OP-Gewebe (p=0,03) gefunden, des Weiteren empfahlen die Autoren bevorzugt aus dem Op-Gewebe das endgültige Grading des Tumors zu bestimmen. Im Fazit stellen die Autoren fest, dass Stanzbiopsien über die meisten prognostischen Tumormarker eine adäquate Auskunft geben. (Connor et al 2002)

Um uPA und PAI-1 Werte klinisch verwertbar zu machen, wird derzeit empfohlen aus gestanzten Tumoren mindestens 2 Tumorstanzen zur uPA und PAI-1 Bestimmung heranzuziehen. Man erhält zusätzlich die Sicherheit, Bestimmungsfehler die sich durch Inhomogenität des Tumorgewebes ergeben können, zu erkennen.

Es ist unbedingt darauf zu achten, dass das Karzinom innerhalb der Stanze nachgewiesen wurde, um die Prognosefaktoren aus der Stanzbiopsie verwertbar zu machen. Ansonsten sind unterschiedliche uPA und PAI-1 Konzentrationen in Stanzen und den zugehörigen Tumoren zu erwarten. Diese Erkenntnis lässt sich bereits aus der kleinen Probenzahl schließen. Für eine weitergehende Aussage ist die Untersuchung einer größeren Fallzahl notwendig.

### **5.3.2. Referenzgewebe und Gewebe mit Stanzkanal**

Es konnten von 5 Tumoren jeweils mindestens eine Gewebeprobe aus dem Stanzkanal und das dazugehörige Op-Gewebe miteinander verglichen werden. Histologisch handelte es sich bei allen 5 Tumoren um invasiv duktales Mammakarzinome. Auffällig waren in den Proben erhöhte PAI-1 Werte im Bereich des Stanzkanals, teilweise 3-7fach erhöht. Es fanden sich weitestgehend stabile uPA Konzentrationen, ggf. geringfügig erhöhte uPA Werte. Ursächlich hierfür kann die lokale Entzündungsreaktion sein, die aus dem „Gewebe trauma“ der Stanze resultiert, bzw. die beginnenden Gewebsreparaturmechanismen. Die Rolle des PAI-1 bei Entzündungen als Antwort auf ein lokales Gewebe trauma beschreiben die Autoren Renckens et al, 2005. An wild-type Mäusen, denen subkutan Terpentin injiziert wurde konnte PAI-1 auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Durch die Terpentininjektion wurde eine lokale Entzündung provoziert. Bereits 8h nach der Injektion entwickelten die Mäuse an der Einstichstelle Nekrosen und Ödeme. Die PAI-1 Konzentration in diesem Gewebe stieg merklich an. In ihrer Zusammenfassung stellen die Autoren fest, dass PAI-1 nicht nur ein Marker bei Gewebsveränderungen ist, sondern auch eine Rolle bei der lokalen und systemischen Reaktion nach Traumata spielt. (Renckens et al, 2005) An Zellkulturen von Bronchialgewebe wurde 2003 nachgewiesen, dass PAI-1 nicht nur eine Rolle bei der lokalen Fibrinolyse spielt, sondern auch ansteigt bei Entzündungen und Neoplasien. (Shetty et al 2003)

Bereits an der kleinen Probenzahl ist erkennbar, dass eine Gewebsentnahme aus dem Bereich des Stanzkanals zu veränderten PAI-1 Konzentrationen führt. Für eine weitergehende Aussage ist die Untersuchung einer größeren Fallzahl notwendig.

### **5.4. Homogenität/Heterogenität**

Da die Untersuchungen zur Lagerung von Tumorproben nur an unterschiedlichen Gewebestücken möglich waren, ist die Frage der Tumorerogenität von Bedeutung. Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 17 Tumoren (im Rahmen des Temperaturansatzes/Lagerungszeitansatzes) zeigten 7 homogene uPA und PAI-1 Konzentrationen und 10 heterogene uPA und PAI-1 Konzentrationen.



Um der Frage der Tumorphomogenität bzw. Tumorerogenität genauer auf den Grund zu gehen, wurden aus 13 Tumoren mindesten 2 Tumorstücke entnommen und jeweils zu gleichen Bedingungen aufgearbeitet.

Dabei fanden sich in 4/13 Tumoren homogene uPA und 5/13 Tumoren homogene PAI-1 Konzentrationen und 9/13 Tumoren bzw. 8/13 Tumoren heterogene uPA/PAI-1 Konzentrationen.

Unter den homogenen Tumoren fanden sich 4 duktale Mammakarzinome und 1 medulläres Mammakarzinom. Unter den heterogenen Mammakarzinomen befanden sich 2 adenoid- und ein muzinöses Mammakarzinom, die übrigen Karzinome waren duktales Typs. Auffällig war bei 5 von 8 heterogenen Tumoren ein hohes Tumorstadium (T2-T3). An dieser Stelle sollte darüber diskutiert werden, ob die Tumorbiologie selbst (z.B. muzinöses Mammakarzinom/adenoid-zystisches Mammakarzinom) und die zunehmende Tumornekrose innerhalb eines großen Tumors (>1,5 cm) einen Einfluss auf die uPA und PAI-1 Konzentrationen hat und somit Fehlbeurteilungen zustande kommen können. Die Zahl der Publikationen hinsichtlich Tumorerogenität ist nicht groß. Dennoch gibt es Arbeiten, die die Inhomogenität des adenoid-zystischen und des muzinösen Mammakarzinoms dargelegt haben.

Zum Beispiel erhoben Arpino et al 2002 an 28 Patientinnen mit einem adenoid-zystischen Mammakarzinom (ACC) klinische Follow-up Daten und sammelten biologische Informationen des adenoid-zystischen Karzinoms, insbesondere des ER- und PR-Status, über einen medianen Zeitraum von 83 Monaten. Sie fanden keine signifikanten Korrelationen unter den demographischen- und den Tumorcharakteristika und den Biomarkern (ER, PR, Ploidie, SPF). Auffällig war eine erhöhte Anzahl adenoid-zystischer Mammakarzinome mit positiven Hormonrezeptorstatus (46% ER+, 36% PR+). Hingewiesen wurde auf die kleine Patientenfallzahl dieser Studie. In der Diskussion führten die Autoren an, dass schon in vielen anderen Studien Gewebe des ACC histologisch untersucht wurde, aber keine Aussage über die biologischen Charakteristika getroffen wurde und das zudem die Patientenzahl immer sehr klein war. (Arpino et al, 2002)

Weiterhin wird diskutiert, dass die originäre Zelle des ACC umstritten bleibt. Man vermutet zwei Ursprungszellen des ACC, zum einen die duktales Epithelzelle, zum anderen die Myoepithelzelle. Eine alternative Hypothese ist, dass das ACC kein Tumor einer speziellen duktales oder myoepithelialen Zelle ist, sondern ein Abkömmling einer multipotenten Vorläuferzelle, welche die Möglichkeit besitzt, alle epithelialen Elemente einer Drüse und der kompletten duktales bzw. azinären Einheit zu bilden. (Foschini et al, 1998; Zaloudek et al, 1979; Azopardi, 1979; Dardick et al, 1983) An dieser multipotenten Vorläuferzelle konnten verschie-

denen Wachstumsmuster bemerkt werden. (Ro et al, 1987; Orenstein et al, 1985) Diese Konfigurationen wurden beschrieben als cribiform, solide, glandulär (tubulär), reticulär und basaloïd. Obwohl heterogene Züge im Wachstumsmuster der meisten ACC angetroffen werden, kann die Läsion gewöhnlich nur dann als solche beschrieben werden, wenn im Vorfeld eine adäquate histologische Beurteilung getroffen wurde. (Jeannon et al, 1999; Dori et al, 2000; Miller et al, 1994; Wick et al, 1998; Shick et al, 1995; Dimery et al, 1987) Des Weiteren untersuchten Komenaka et al 2003 65 Patientinnen, die an einem muzinösen Mammakarzinom erkrankt waren, hinsichtlich demographischer und tumorcharakteristischer Unterschiede. Sie beschrieben das muzinöse Mammakarzinom als ein Karzinom mit einer guten Prognose, obwohl auffallend große Tumoren bei den 65 untersuchten Patientinnen gefunden wurden. Die Tumorgröße schien jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (mittlere Größe von 2,0 cm und mediane Tumorgröße 1,8 cm, größte Läsion 19,0 cm) zu haben- viel eher hatte die Menge des vom Tumor produzierten Schleims einen Einfluss auf die Tumorgröße. Der einzige signifikante Prädiktor für die Tumorprognose war die Anzahl der befallenen Lymphknoten. Die Mehrzahl der Tumoren war Hormonrezeptor-positiv (91% ER+, 79% PR+). Alle Tumoren waren aufgrund ihrer Größe klinisch palpabel, aber nicht unbedingt mammographisch auffällig (z. T. als benigne Läsion eingestuft). (Komenaka et al 2003) Diese Ergebnisse überraschten nicht, da der Schleimanteil der größte Anteil des muzinösen Karzinoms war und nur 18% der Karzinome Mikrokalzifikationen aufwies. Aufgrund des hohen Schleimanteils konnten allerdings nicht alle Tumoren mammographisch entdeckt werden. Warum ist nicht ganz klar, es wurde angeführt, dass möglicherweise die Mikrokalzifikationen erst im späteren Verlauf entstehen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Schleimbildung dazu führt, dass die Mikrokalke verstreuen und dass dadurch weniger Mikrokalzifikationen entstehen als in soliden Tumoren. (Andre et al, 1995; Koenig et al, 1998; Wilson et al, 1995)

Eine andere Arbeit zur Histologie des muzinösen Mammakarzinoms erschien 2002. In einem Zeitraum von 1994-2001 wurden 556 Patientinnen an einem Mammakarzinom operiert (WE und MRM). Fünf Patientinnen zeigten ein muzinöses Mammakarzinom auf, von denen im Vorfeld 3 Patientinnen durch Stanzbiopsie nicht aufgefallen waren. In der feingeweblichen Untersuchung fand sich eine nur moderate Zellansammlung, die kohäsive Cluster und mikropapilläre Strukturen mit zarten pleomorphen Tumorzellen entlang des schleimigen Untergrundes aufwies. Im Fazit stellt der Autor fest, dass der charakteristischen Zytologie und Histologie die das muzinöse Mammakarzinom aufweist, eine erhöhte Aufmerksamkeit zu schenken ist. (Ng, 2002)

Die in der vorliegenden Arbeit als heterogen eingestuften Tumoren zeigen unterschiedliche Konzentrationen von uPA und PAI-1 auf. Es scheint in der Biologie der Tumoren begründet, dass das Tumorgewebe einiger Karzinome z. T. sehr diffus wächst, sodass punktuell unterschiedliche Konzentrationen von Proteinen vorliegen. So kann auch die Konzentration der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 schwanken. Dies kann bei der Einschätzung der Prognose der Erkrankung maßgebliche Konsequenzen haben.

### **5.5. Schlussfolgerung**

Aus der vorliegenden Arbeit lässt sich folgendes schlussfolgern:

Die Serinproteasen uPA und PAI-1 sind robuste Prognosefaktoren, die in der klinischen Routine zur Abschätzung der Krankheitsprognose des Mammakarzinoms eingesetzt werden können und sollen.

Das Tumorfriechgewebe kann sowohl bei -20°C, als auch bei -80°C oder in flüssigen Stickstoff schockgefroren werden. Die Aufarbeitung des schockgefrorenen Tumorgewebes sollte innerhalb von 30 Tagen erfolgen.

Im Rahmen der Aufarbeitung kann die Ultrazentrifuge (10<sup>5</sup> g) durch eine Tischzentrifuge (15.000g) ersetzt werden, man erhält genauso zuverlässige uPA und PAI-1 Konzentrationen.

Die uPA und PAI-1 Konzentrationen, die in Stanzbiopsien gemessen werden sind repräsentativ und zuverlässig. Wichtig im Vorfeld der uPA und PAI-1 Bestimmung ist der Karzinomnachweis innerhalb des Stanzzylinders. Werden uPA und PAI-1 aus bereits gestanzten Tumoren bestimmt, sollte es vermieden werden Tumorgewebe mit Stanzkanal aufzuarbeiten.

Es gibt homogene und heterogene Tumoren. Um repräsentative uPA und PAI-1 Konzentrationen des Tumorgewebes zu erhalten, sollten mindestens 2 Referenzproben gemessen werden.

## 6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, welchen Einfluss Asservierungs-, Aufarbeitungs- und Biopsiebedingungen auf den Nachweis von uPA und PAI-1 haben. Tumormproben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  und in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) schockgefroren und jeweils am Tag der Operation (Tag 0), 15 Tage post operationem und 30 Tage post operationem aufgearbeitet. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Asservierungsbedingungen, haben unter den beschriebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die gemessenen uPA bzw. PAI-1 Proteinlevel im Tumorgewebe. Des Weiteren wurde der Einfluss der Zentrifugalbeschleunigung an homogenisierten Tumorzellsuspensionen und die Art der Tumorzerkleinerung (hälftig in Form von Kryoschnitten mit je  $10\ \mu\text{m}$  vs. hälftig pulverisiert lt. Standardprotokoll) überprüft. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Aufarbeitungsbedingungen, (Zentrifugalbeschleunigung, Schwebeteilchen, Tumorzerkleinerung), haben unter den beschriebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die gemessenen uPA bzw. PAI-1 Proteinlevel im Tumorgewebe.

Weiterhin konnten kleine Mengen Tumorgewebe (Tumorstanzen 30-50 mg) mit OP-Tumorgewebe (100-300 mg) verglichen werden. Es zeigte sich, dass bereits aus kleinen Tumormengen die Prognosefaktoren uPA und PAI-1 diagnostiziert werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde darauf geachtet, dass das Karzinom innerhalb der Stanze nachgewiesen wurde, um repräsentative uPA/PAI-1 Werte aus einer Stanzbiopsie zu erhalten. Ferner wurden von Tumoren mindestens eine Gewebeprobe aus dem Stanzkanal und dem dazugehörigen Op-Gewebe entnommen. Eine Änderung der uPA/PAI-1-Konzentrationen nach Stanzbiopsie im Bereich des Stanzkanals konnte nachgewiesen werden.

Es zeigte sich im Verlauf der Arbeit, dass die Tumor(in)homogenität einen Einfluss auf die uPA bzw. PAI-1 Proteinlevel hat. Hierzu wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Von Tumoren konnten Tumorreferenzstücke entnommen und zu gleichen Bedingungen aufgearbeitet werden. Es zeigten sich teilweise homogene, aber auch sehr unterschiedliche uPA und PAI-1 Proteinlevel. In der Art und Weise des Tumorgewebes und Tumorzellanordnung in einigen Tumoren kann die Tumor(in)homogenität begründet sein. Hierdurch werden, wie in dieser Arbeit nachgewiesen, unter Umständen sehr unterschiedliche uPA und PAI-1 Konzentrationen in den verschiedenen Arealen des Tumors gemessen werden. Die hieraus eventuell folgende falsche Interpretation der uPA und PAI-1 Konzentrationen kann dann gegebenenfalls erhebliche Konsequenzen für die Festlegung der Therapie der Mammakarzinompatientin haben.

## 7. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollten vor allem die unterschiedlichen Asservierungs- und Aufarbeitungsbedingungen und deren Einfluss auf die uPA und PAI-1 Konzentrationen beim Mammakarzinom untersucht werden. Eine derartige Untersuchung ist in der Literatur bis dato nicht beschrieben, wohl aber die Stabilität bzw. Instabilität anderer Proteine bei veränderten Asservierungsbedingungen. Das macht es Zentren, an welchen die Bestimmung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 erfolgt, in Zukunft sicher leichter, die Aufarbeitung von Mammakarzinomgewebe für umliegende Kliniken anzubieten. Obwohl die Ergebnisse zeigen, dass das Tumorgewebe gegenüber dem Standardprotokoll modifiziert aufgearbeitet werden kann, sollte die Aufarbeitung des Tumorgewebes derzeit dennoch etablierten Labors vorbehalten sein. Grund ist, dass die etablierten Laboratorien nach wie vor strengen zertifizierten ELISA-Qualitätskontrollen (Ringversuche) unterliegen, bevor deren uPA/PAI-1 Daten zur Festlegung der adjuvanten Therapie herangezogen werden dürfen.

Ebenfalls wurde der Einfluss der Biopsiebedingungen untersucht, hier stand eine kleine Anzahl an Tumorproben zur Verfügung. Um einen Einfluss der Biopsiebedingungen auf die Konzentration von uPA und PAI-1 vollständig nachweisen zu können, bedarf es noch weiterer ausführlicherer Untersuchungen.

Durch die immer früher erkannten und somit auch immer kleiner werdenden Mammakarzinome, stehen zur Abschätzung der Prognose mittels uPA und PAI-1 und damit zur Festlegung der Therapie, oftmals nur kleinste Mengen an Tumormaterial zur Verfügung. Hier kann die Bestimmung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 aus Stanzbiopsien eine Alternative sein, eine histologische Sicherung des Mammakarzinoms in der Stanze erscheint sinnvoll. Ebenfalls als eine Alternative diskutiert, sollte der Nachweis von uPA und PAI-1 auf mRNA-Basis sein (vgl. ELISA auf Proteinbasis). Hierzu bedarf es ebenfalls weiterer Untersuchungen.

In der Zukunft sollte der in der vorliegenden Arbeit herausgearbeiteten Frage der Gewebegleichmäßigkeit mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden. Die histologische Beurteilung durch die Pathologen zeigt möglicherweise vorab eine heterogene Tumorzellstruktur und -anordnung auf. Diese Tumorerheterogenität kann u. U. mit einer Fehlbestimmung der uPA und PAI-1 Konzentrationen verbunden sein. Es bedarf diesbezüglich unbedingt weiterer Untersuchungen, um die Grenzen, bzw. die Verwertbarkeit der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 für klinischen Alltag aufzeigen zu können.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Alkhalaf M, Murphy LC: Regulation of c-jun and jun-B by progestins in T-47D human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 6 1992: 1625–1633.
2. André S, Cunha F, Bernardo M, Meneses e Sousa J, Cortez F, Soares J: Mucinous carcinoma of the breast: a pathologic study of 82 cases. *J Surg Oncol* 1995 Mar 58 (3): 162-7.
3. Ariga R, Bloom K, Reddy VB, Kluskens L, Francescatti D, Dowlat K, Siziopikou P, Gattuso P: Fine-needle aspiration of clinically suspicious palpable breast masses with histopathologic correlation. *Am J Surg* 2002 Nov 184 (5): 410-3.
4. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut 2004 Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. 4. überarbeitete, aktualisierte Auflage. Saarbrücken.
5. Arpino G, Clark GM, Mohsin S, Bardou VJ, Elledge RM: Adenoid cystic carcinoma of the breast: molecular markers, treatment, and clinical outcome. *Cancer* 2002 Apr 15;94 (8): 2119-27. Review.
6. ASCO Expert Panel. 1997 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 16 1998: 793–795.
7. Ayache S, Panelli M, Marincola FM, Stroncek DF: Effects of storage time and exogenous protease inhibitors on plasma protein levels. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 174-184.
8. Azzopardi JG, Ahmed A, Millis RR: Problems in breast pathology. *Major Probl Pathol* 1979; 11: 1-466.
9. Benraad, TJ, Geurts-Moespot J, Grøndahl-Hansen J, Schmitt M, Heuvel JJ, de Witte JH, Foekens JA, Leake RE, Brunner N and Sweep CGJ.: Immunoassays (ELISA) of urokinase-type plasminogen activator (uPA): report of an EORTC/BIOMED-1 workshop. *Eur J Cancer*, 32A 1996: 1371–1381.
10. Bhat RA, Harnish DC, Stevis PE, Lyttle CR and Kromm BS: A novel human estrogen receptor  $\beta$ : identification and functional analysis of additional N-terminal amino acids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 67 1998: 233–240.
11. Böcker W, Denk H, Heitz PU: Repetitorium Pathologie, 1. Auflage, Urban & Fischer, München-Jena, 2004
12. Boyle P, Ferlay J: Cancer incidence and mortality in Europe 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481–488.
13. Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 63 1989: 181–187

14. Casella R, Shariat SF, Monoski MA, Lerner SP: Urinary levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in the detection of bladder carcinoma. *Cancer*. 2002; 95: 2494–2499.
15. Castello R, Estelles A, Vaquez C, Falco C, Espana F, Almenar SM, Fuster C, Aznar J: Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer. *Clin Chem* 2002, 48:1288-1295.
16. Chio I, Ko C, Park-Sarge OK, Nie R, Hess RA, Graves C and Katzenellenbogen BS: Human estrogen receptor  $\beta$ -specific antibodies: characterization and use in studies of estrogen receptor  $\beta$  protein expression in reproductive tissues. *Mol Cell Endocrinol* 181 2001: 139–150.
17. Clark G: Prognostic and predictive factors. In: Harris JR, Lippmann ME, Morrow M, Osborne CK (eds) *Diseases of the breast*, Lippincott-Raven Publishers 2nd edn., Philadelphia, 2000, S. 489–514.
18. Connor CS, Tawfik OW, Joyce AJ, Davis MK, Mayo MS, Jewell WR: A comparison of prognostic tumor markers obtained on image-guided breast biopsies and final surgical specimens. *Am J Surg*. 2002 Oct 184 (4): 322-4.
19. Czekay RP, Loskutoff DJ: Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004 Dec 229 (11): 1090-6. Review.
20. Dardick I, Van Nostrand AW, Jeans MT, Rippstein P, Edwards V: Pleomorphic adenoma, II: Ultrastructural organization of "stromal" regions. *Hum Pathol* 1983 Sep 14 (9): 798-809.
21. Dimery IW, Jones LA, Verjan RP, Raymond AK, Goepfert H, Hong WK: Estrogen receptors in normal salivary gland and salivary gland carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987 Oct 113 (10): 1082-5.
22. Dotzlaw H, Leygue E, Watson P, and Murphy L; Expression of estrogen receptor- $\beta$  in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82 1997: 2371–2374.
23. Dotzlaw H, Leygue E, Watson P H, and Murphy LC; Estrogen receptor- $\beta$  messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Cancer Res* 59 1999: 529–532.
24. Dori S, Trougouboff P, David R, Buchner A; Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptors in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Oral Oncol* 2000 Sep 36 (5): 450-3.
25. Duffy MJ, Reilly D, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen PA; Urokinase plasminogen activator as a prognostic marker in different subgroups of patients with breast cancer. Department of Nuclear Medicine, St. Vincent's Hospital, Dublin, Ireland. *Cancer*. 1994 Oct 15; 74 (8): 2276-80.

26. Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ: Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 1988, 62: 531-533.
27. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group; Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomized trials involving 31000 recurrences and 24000 deaths among 75000 women. *Lancet* 339: 1-15 1992, 71-85.
28. EBCTCG 2005; Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365 (9472) 2005: 1687-1717.
29. Ellis IO, Galea M, Broughton N; Pathological prognostic factors in breast cancer II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 20 1992: 479
30. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-A; Human estrogen receptor b gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 1997: 4258-4265.
31. Escot C, Zhao Y, Puech C, Rochefort H: Cellular localisation by in situ hybridisation of cathepsin D, stromelysin 3, and urokinase plasminogen activator RNAs in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996, 38: 217-226.
32. Fisher JL, Field CL, Zhou H, Harris TL, Henderson MA, Choong PF: Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases -a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases. *Breast Cancer Res Treat* 2000, 61: 1-12.
33. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brunner N, Janicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC: The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 2000, 60: 636-643.
34. Foschini MP, Eusebi V. Carcinomas of the breast showing myoepithelial cell differentiation. A Review of the literature. *Virchows Arch* 1998 Apr; 432 (4): 303-10. Review.
35. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Willson TM, Moore JT; Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer Res* 1999 Nov 1; 59 (21): 5425-8.
36. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Moore JT, Mohsin SK, Osborne CK, Clark GM, Allred DC; Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters. *Cancer Res* 2003 May 15; 63 (10): 2434-9.



37. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ; Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol* 19 2001: 3817–3827.
38. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD; Meeting Highlights: Updated International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3357–3365
39. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ; Panel Members- Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005 Review; *Annals of Oncology Advance Access* published September 7, 2005.
40. Han B, Nakamura M, Mori I, Nakamura Y, Kakudo K; Urokinasetype plasminogen activator system and breast cancer (Review). *Oncology Reports* 2005, 14: 105-112.
41. Hansen S, Overgaard J, Rose C, Knoop A, Laenkholm AV, Andersen J, Sorensen FB, Andreasen PA: Independent prognostic value of angiogenesis and the level of plasminogen activator inhibitor type 1 in breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003, 88: 102-108.
42. Harbeck N, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates RE, Hofler H, Janicke F, Graeff H, Schmitt M: Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. *Cancer Res Treat* 1999, 54: 147-157.
43. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JG, Kruger A, Kiechle M, Janicke F, Schmitt M, Foekens JA: Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type1 (n=3424). *Cancer Res.* 2002 Aug 15; 62 (16): 4617-22.
44. Harbeck, Aigner, Kuschel, Kiechle; Mammakarzinom – prognostische und prädiktive Faktoren *Onkologe* 2002 8: 808–816.
45. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M: Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J. Clin. Oncol.*, 20: 1000–1007, 2002.
46. Harbeck N, Thomssen C: urokinase type plasminogen activator (uPA) and its PA-inhibitor 1 are not only prognostically but also predictively significant and support clinical decisions on therapy in primary carcinoma of the breast. *Zentralb Gynakol* 2003 Sep; 125(9): 362-7.
47. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Janicke F, Thomssen C, Look MP, Foekens JA; Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004, 5: 348-352.

48. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M: Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* 2004, 91: 450-456.
49. Hellebrekers BW, Trimbos-Kemper GC, Bakkum EA, Trimbos JB, Declerck PJ, Kooistra T, Emeis JJ; Short-term effect of surgical trauma on rat peritoneal fibrinolytic activity and its role in adhesion formation. *Thromb Haemost*. 2000 Nov; 84 (5): 876-81.
50. Heywang-Köbrunner SH, Schreer I; *Bildgebende Mammadiagnostik, 2. Auflage* Thieme, Stuttgart 2003
51. Hoffmann G, Pollow K, Weikel W, Strittmatter HJ, Bach J, Schaffrath M, Knapstein, Melchert F, Pollow B; Urokinase and plasminogen activator-inhibitor (PAI-1) status in primary ovarian carcinomas and ovarian metastases compared to benign ovarian tumors as a function of histopathological parameters. *Clin Chem Lab Med* 1999 Jan; 37 (1): 47-54.
52. Hulmes JD, Bethea D, Ho K; An investigation of plasma collection, stabilisation and storages procedures for proteomic analysis of clinical samples. *Clin Proteomics* 2004; 1: 17-31.
53. Ishikawa N, Endo Y, Sasaki T: Inverse correlation between mRNA expression of plasminogen activator inhibitor-2 and lymph node metastasis in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1996, 87: 480-487.
54. Janicke F, Schmitt M, Graeff H: Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin Thromb Hemost* 1991, 17: 303-312.
55. Janicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H: Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993, 24: 195-208.
56. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C; Randomized adjuvant therapy trial in high-risk lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type I. *J Natl Cancer Inst* 2001 93: 913–920.
57. Jarvinen T, Peltö-Huikko M, Holli K and Isola J; Estrogen receptor - is coexpressed with ER alpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol*, 2000, 156: 29–35.
58. Jeannon JP, Soames JV, Bell H, Wilson JA; Immunohistochemical detection of oestrogen and progesterone receptors in salivary tumours. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1999 Feb; 24 (1): 52-54.
59. Juhan-Vague L, Valadier J, Alessi MC, Aillaud MF, Ansaldi J, Philip-Joet C, Holvoet P, Serradimigni A, Collen D; Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels

- in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1987; 57: 67–72.
60. Kielberg V, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Nielsen L S, Skriver L, and Danø, K. Proenzyme to urokinase-type plasminogen activator in the mouse in vivo. *FEBS Lett*, 1985, 182: 441–445.
  61. Koenig C, Tavassoli FA; Mucinous cystadenocarcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 1998 Jun; 22 (6): 698-703.
  62. Krege J H, Hodgin J B, Couse J F, Enmark E, Warner M, Mahler J F, Sar M, Korach K S, Gustafsson J A and Smithies O; Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15677–15682.
  63. Kuner R, Pollow K, Lehnert A, Pollow B, Scheler P, Krummenauer F, Casper F, Hoffmann G; Needle biopsy vs. conventional surgical biopsy - biochemical analysis of various prognostic factors. *Zentralbl Gynakol* 2000; 122 (3): 160-4.
  64. Lijnen HR, Collen D. Fibrinolysis. *Baillie`re's Clin Haematol* 1995; 8: 277–90.
  65. Lijnen HR; Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 2005 Jan; 3 (1): 35-45.
  66. Lindberg P, Kinnby B, Lecander I, Lang NP, Matsson L; Increasing expression of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 2 in dog gingival tissues with progressive inflammation. *Arch Oral Biol* 2001 Jan; 46 (1): 23-31.
  67. Leissner P, Verjat T, Bachelot T, Paye M, Krause A, Puisieux A, Mougin B; Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer* 2006 Aug 31; 6: 216.
  68. Levi M, Lensing AWA, Buller HR, Prandoni P, Dooijewaard G, Cuppini S, ten Cate JW; Deep vein thrombosis and fibrinolysis. Defective urokinase type plasminogen activator release. *Thromb Haemost* 1991; 66: 426–9.
  69. Leygue E, Dotzlaw H, Watson P and Murphy L; Altered estrogen receptor alpha and beta mRNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*, 1998, 58: 3197–3201.
  70. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH and Murphy L; Expression of estrogen receptor  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 5 messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer Res*, 1999, 59: 1175–1179.
  71. Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ et al. Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in 8,377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94: 116–128.
  72. Manders P, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Grebenchtchikov N, Foekens JA, Beex LV, Sweep CG; Predictive impact of urokinase-type plasminogen activator: plasminogen activator inhibitor type-1 complex on the efficacy of adjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Cancer Res* 2004 Jan 15; 64 (2): 659-64.

73. Miller AS, Hartman GG, Chen SY, Edmonds PR, Brightman SA, Harwick RD; Estrogen receptor assay in polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. An immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994 Jan; 77 (1): 36-40.
74. Mustjoki S, Sidenius N, Sier CF; Soluble urokinase receptor levels correlate with number of circulating tumor cells in acute myeloid leukemia and decrease rapidly during chemotherapy. *Cancer Res* 2000; 60: 7126–7132.
75. Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder JD, Fink U, Siewert JR; Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 1994 Jun 1; 54 (11): 2900-7.
76. Nekarda H; Faktoren der tumorinvasiven Proteolyse als Prognoseparameter beim residualfrei resezierten Magenkarzinom. Habilitationsschrift. Fakultät für Medizin der TU München 2001.
77. Ng WK; Fine-needle aspiration cytology findings of an uncommon micropapillary variant of pure mucinous carcinoma of the breast: review of patients over an 8-year period. *Cancer* 2002 Oct 25; 96 (5): 280-8.
78. Odekon LE, Sato Y, Rifkin DB; Urokinase-type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor-induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity. *J Cell Physiol* 1992 Feb; 150 (2): 258-63.
79. Orenstein JM, Dardick I, van Nostrand AW; Ultrastructural similarities of adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma. *Histopathology*. 1985 Jun; 9 (6): 623-38.
80. Pacheco MM, Nishimoto IN, Mourao Neto M, Mantovani EB, Brentani MM: Prognostic significance of the combined expression of matrix metalloproteinase-9, urokinase type plasminogen activator and its receptor in breast cancer as measured by Northern blot analysis. *Int J Biol Markers* 2001, 16: 62-68.
81. Pavao M, Traish AM; Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta. *Steroids*, 2001, 66: 1–16.
82. Peache K, Webb P, Kuyper G G J M, Nilsson S, Gustaffson J A, Kushner P J, Scanlon TS; Differential ligand activation of estrogen receptors ER alpha and ER beta at AP-1 sites. *Science*, 1998, 277: 1508–1510.
83. Prins MH, Hirsh JA; critical review of the evidence supporting a relationship between impaired fibrinolytic activity and venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1721–31.
84. Ree AH, Pacheco MM, Tvermyr M, Fodstad O, Brentani MM: Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6: 1778-1783.

85. Reilly D, Andreasen PA, Duffy MJ; Urokinase-plasminogen activator in breast cancer: assay by both catalytic and immunoassay. Education and Research Center, St Vincent's Hospital, Dublin, Ireland. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991 Feb; 2 (1): 47-50.
86. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Shen C, Newcomer LM, Goldhaber SZ, Hennekens CH; Baseline fibrinolytic state and the risk of future venous thrombosis. A prospective study of endogenous tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. *Circulation* 1992; 85: 1822–7.
87. Ro JY, Silva EG, Gallager HS; Adenoid cystic carcinoma of the breast. *Hum Pathol*. 1987 Dec; 18 (12): 1276-81. Review.
88. Rouy D, Ernens I, Jeanty C, Wagner DR; Plasma storage at –80 °C not protect matrix metalloprotease-9 from degradation. *Anal Biochem* 2005 Mar; 338 (2): 294-8.
89. Robert-Koch-Institut 2005. Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie – Dachdokumentation Krebs.
90. Roche Lexikon Medizin, 3. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, 1993
91. S3-Leitlinie für Brustkrebsfrüherkennung
92. Saji S, Jensen E V, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson J-A; Estrogen receptor alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci* 2000, 97: 337–342.
93. Schulz KD et al; Konzentrierte Aktion zur Brustkrebsfrüherkennung in Deutschland. *Forum DKG* 2001, 6: 21-25.
94. Shick PC, Riordan GP, Foss RD; Estrogen and progesterone receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995 Oct; 80 (4): 440-4.
95. Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2003 Jun-Sep; 22 (2-3): 205-22. Review.
96. Sier CF, Sidenius N, Mariani A, et al; Presence of urokinase-type plasminogen activator receptor in urine of cancer patients and its possible clinical relevance. *Lab Invest* 1999; 79: 717–722.
97. Simon R, Altman D G Statistical aspects of prognostic factor studies in oncology. *Br J Cancer*, 1994, 69: 979–985.
98. Skriver L, Larsson LI, Kielberg V, Nielsen LS, Andresen PB, Kristensen P, Danø, K; Immunocytochemical localization of urokinase-type plasminogen activator in Lewis lung carcinoma. *J Cell Biol*, 1984, 99: 752–757.
99. Spyrtos F, Bouchet C, Tozlu S, Labroquere M, Vignaud S, Becette V, Lidereau R, Bieche I; Prognostic value of uPA, PAI-1 and PAI-2 mRNA expression in primary breast cancer. *Anticancer Res* 2002, 22: 2997-3003.

100. Sweep CG, Geurts-Moespot J, Grebenschikov N, de Witte JH, Heuvel JJ, Schmitt M, Duffy MJ, Janicke F, Kramer MD, Foekens JA, et al.: External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *Br J Cancer* 1998, 78: 1434-1441.
101. Thomssen C, Jänicke F, Harbeck N; Clinical Relevance of Prognostic Factors in Axillary Node-Negative Breast Cancer *Onkologie* 2003; 26: 438-445.
102. Tong D, Schneeberger C, Czerwenka K, Schmutzler RK, Speiser P, Kucera E, Concin N, Kubista E, Leodolter S, Zeillinger R; Messenger RNA determination of estrogen receptor, progesterone receptor, pS2, and plasminogen activator inhibitor-1 by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999, 5: 1497-1502.
103. UICC TNM classification of malignant tumours. 2002
104. Umeda T, Eguchi Y, Okino K, Kodama M, Hattori T; Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors and their mRNAs in breast cancer tissues. *J Pathol* 1997, 183: 388-397.
105. Wick MR, Ockner DM, Mills SE, Ritter JH, Swanson PE; Homologous carcinomas of the breasts, skin, and salivary glands. A histologic and immunohistochemical comparison of ductal mammary carcinoma, ductal sweat gland carcinoma, and salivary duct carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1998 Jan; 109 (1): 75-84.
106. Wilson TE, Helvie MA, Oberman HA, Joynt LK; Pure and mixed mucinous carcinoma of the breast: pathologic basis for differences in mammographic appearance. *AJR Am J Roentgenol* 1995 Aug; 165 (2): 285-9.
107. Zaloudek C, Oertel YC, Orenstein JM; Adenoid cystic carcinoma of the breast. *Am J Clin pathol* 1984 Mar; 81 (3): 297-307.

## 9. Thesen

Die Messung von uPA und PAI-1 erfolgt mittels ELISA. Dazu ist es nötig, dass die Proteine uPA und PAI-1 als freie Moleküle in nativer Form vorliegen. Faktoren, die während der Aufarbeitung und Lagerung von Tumorgewebe darauf Einfluss nehmen, verändern das Messergebnis.

Gegenstand dieser Arbeit war, die Einflüsse von Biopsie-, Aufarbeitungs- und Asservierungsbedingungen auf den Nachweis von uPA und PAI-1 beim Mammakarzinom zu untersuchen. Hierzu wurden die Tumorproben zum einem laut Standardprotokoll, zum anderen modifiziert aufgearbeitet.

Insgesamt wurden aus 17 Tumorproben Teilstücke auf  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  und in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) schockgefroren und jeweils am Entnahmetag (Tag 0), 15 Tage post operationem und 30 Tage post operationem aufgearbeitet. Es wurde der Einfluss der Lagerungstemperatur und der Einfluss der Dauer der Gewebelagerung bis hin zur Gewebeaufarbeitung auf die uPA und PAI-1 Konzentration im Tumorgewebe untersucht.

**These 1:** Weder die Lagerungstemperaturen von  $-196^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  oder  $-20^{\circ}\text{C}$ , noch die Dauer der Lagerung der Proben (zumindest innerhalb von 30 Tagen), haben einen Einfluss auf die gemessenen uPA bzw. PAI-1 Konzentrationen im Mammakarzinomgewebe (unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen).

Tumorproben wurden nach Standardprotokoll aufgearbeitet, die Art der Zentrifugation wurde modifiziert, um den Einfluss der Zentrifugalbeschleunigung zu untersuchen ( $10^5\text{g}$  vs.  $15.000\text{g}$ ).

**These 2:** Es gibt keinen Unterschied der uPA- und PAI-1-Konzentrationen hinsichtlich der Aufarbeitung mittels Ultrazentrifuge ( $10^5\text{g}$ ) bzw. per Tischzentrifuge ( $15.000\text{g}$ ). Vorhandene Schwebeteilchen (nicht heraus zentrifugiert) haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse des uPA/PAI-1 ELISAs (unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen).

Tumorproben wurde jeweils die eine Hälfte in Form von Kryoschnitten mit je  $10\ \mu\text{m}$  und die jeweils andere Hälfte entsprechend Standardprotokoll pulverisiert aufgearbeitet, um die Notwendigkeit der Tumorpulverisierung zu hinterfragen.

**These 3:** Es gibt keinen Unterschied der uPA- und PAI-1-Werte hinsichtlich der Aufarbeitung per Pulverisierung und/oder Kryoschnittasservierung und -aufarbeitung (unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen).

Des Weiteren sollte eine Aussage getroffen werden, ob die Konzentration von uPA und PAI-1 aus kleinsten Mengen (< 100 mg) Tumorgewebe repräsentativ sind. Es wurden in vivo Tumorstanzungen mit dem in vivo Exzidaten (100-300 mg) desselben Tumors verglichen, ebenso erfolgte der Vergleich von ex vivo Tumorstanzungen (weniger als 100 mg) und dem entsprechenden ex vivo Exzidaten (100-300 mg). Im Vorfeld erfolgte von den in vivo Stanzungen eine histologische Sicherung des Mammakarzinoms.

**These 4:** Kleinere Tumormengen zur Diagnostizierung der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 sind nutzbar; die Werte repräsentativ. Es ist wichtig, darauf zu achten, dass das Karzinom innerhalb der Stanze nachgewiesen wurde, um repräsentative uPA und PAI-1 Konzentrationen aus einer Stanzbiopsie zu erhalten (unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen).

Erwartete Änderungen der uPA bzw. PAI-1-Konzentrationen nach Stanzbiopsie im Bereich des Stanzkanals sollten nachgewiesen oder widerlegt werden. Tumorgewebsproben wurden mit einer zugehörigen Gewebeprobe aus dem Stanzkanal verglichen.

**These 5:** Die uPA Konzentrationen bleiben stabil, sind ggf. geringfügig erhöht im Bereich des Stanzkanals. Die PAI-1 Konzentrationen im Bereich des Stanzkanals sind deutlich erhöht (unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen).

Im Rahmen der Aufarbeitung der 17 untersuchten Tumoren aus Frage 1 und 2 (Temperatur und Lagerungszeit) fanden sich sowohl Tumoren mit homogenen, als auch heterogenen uPA und PAI-1 Konzentrationen. Daher wurden von 13 weiteren Tumoren jeweils mindestens 2 Tumorstücke entnommen und zu gleichen Kautelen aufgearbeitet.

**These 6:** Heterogene Tumoren zeigen unterschiedliche Konzentrationen von uPA und PAI-1 auf. In der Biologie einiger Tumoren liegt begründet, dass das Tumorgewebe einiger Karzinome z. T. sehr diffus wächst, sodass unterschiedliche Konzentrationen der Prognosefaktoren uPA und PAI-1 innerhalb eines Tumors gemessen werden können. Das hätte bei der Einschätzung der Prognose der Erkrankung maßgebliche Konsequenzen (unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen).



## **Lebenslauf**

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Ursula Katharina Bauerfeind, geb. Beau  
Geburtsdatum: 01.01.1976  
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg  
Familienstand: verheiratet, ein Kind  
Nationalität: deutsch

### SCHULBILDUNG

1982-1990 Geschwister-Scholl-Schule  
1990-1991 Leistungsklasse der Rosa-Luxemburg-Schule  
1991-1994 Melanchthon-Gymnasium  
06/1994 Abitur

### AUSBILDUNG UND BERUFLICHER WERDEGANG

1994-2001 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle/Saale

1999 Beschäftigung an der Universitätsklinik für Chirurgie (u. a. im Bereich des Breast Departements) an der Airlangga-Universität in Surabaya/Indonesien

2001 Beschäftigung an der Medizinischen Klinik des Kantonsspitals Luzern/Schweiz

11/2001 Erlangen der Ärztlichen Teilapprobation

02/2002-07/2003 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum an der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kölbl

01.08.2003 Erlangen der Ärztlichen Approbation

seit 01.08.2003 Tätigkeit als Assistenzärztin an der Universitätsklinik u. Poliklinik für Gynäkologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kölbl; seit 12/2003 Leitung durch Herrn Prof. Dr. C. Thomssen und Tätigkeit an der Universitätsklinik u. Poliklinik für Geburtshilfe an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Röpke

04/2005 Dissertationsbeginn: „Einfluss von Biopsie-, Aufarbeitungs- und Asservierungsbedingungen auf den Nachweis von urokinase type plasminogen activator (uPA) und plasminogen activator inhibitor – 1 (PAI-1) beim Mammakarzinom“ betreut durch PD Dr. rer. nat. habil. J. Dittmer

## **Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich versichere hiermit an Eides statt,

- dass ich die vorgelegte Arbeit „Einfluss von Biopsie-, Aufarbeitungs- und Asservierungsbedingungen auf den Nachweis von urokinase type plasminogen activator (uPA) und plasminogen activator inhibitor – 1 (PAI-1) beim Mammakarzinom“ selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht wurden.
- dass ich die Dissertation bisher keinem Fachvertreter an einer anderen Hochschule, sowohl im Inland, als auch im Ausland, zur Überprüfung vorgelegt habe.
- dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geldwerte für Leistungen oder Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

## **Hinweise auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit**

### **Postervortrag**

(Internationale Mammakarzinom-Konferenz St. Gallen, 2007)

Influence of the storage conditions in measurable uPA and PAI-1 protein levels in breast cancer tissue specimen

Vetter, M.<sup>1</sup>, Bauerfeind, U.<sup>1</sup>, Olenik, C.<sup>2</sup>, Thomssen, C.<sup>1</sup>, und Dittmer, J.<sup>1</sup>, 2007

Klinik für Gynäkologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg<sup>1</sup>, American Diagnostica, Pfungstadt<sup>2</sup>

## **Danksagungen**

Ich möchte an dieser Stelle ganz besonders meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Jürgen Dittmer, dem Leiter des Forschungslabors der Frauenklinik, für das Bereitstellen des Themas, seine fachliche und menschliche Betreuung und für seine ständige Gesprächsbereitschaft danken.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Christoph Thomssen, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zum einen für die Möglichkeit im Rahmen der klinischen Ausbildung im Forschungslabor der Frauenklinik arbeiten zu dürfen, zum anderen für seine konstruktive Kritik an der vorliegenden Arbeit.

Vielen herzlichen Dank an Frau Dr. Martina Vetter, die mich im Forschungslabor eingearbeitet hat und die mir immer mit Rat und Tat bei den experimentellen Versuchen zur Seite stand.

Dr. Eva Kantelhardt, Cornelia Willing, Angela Dittmer, Anja Kiesling, dem Team des pathologischen Schnellschnittlabors und dem Team der Mammographieabteilung bin ich sehr dankbar für die immer währende freundliche und tatkräftige Unterstützung. Mit allen zusammen entstand ein hervorragendes Arbeitsklima in welchem ich mich zu jeder Zeit willkommen gefühlt habe.

Lieben Dank an Dr. Lars Köthe für das Korrekturlesen der Arbeit.

Besonders erwähnt seien an dieser Stelle mein Ehemann Frank Bauerfeind, unsere kleine Ruth, meine lieben Eltern, Silvia und Wolfgang Beau, und die Familie Michael Beau, die für mich in allen Lebenslagen da sind und da waren.

Ich möchte an dieser Stelle vor allem zwei weitere Personen nicht vergessen, die mich während des gesamten Medizinstudiums uneigennützig unterstützt haben- Ursula Beau senior und mein Großvater Kurt Kruber.