

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

Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus beim primären Mammakarzinom

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

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

von Ute Sybille Benesch,
geboren am 01.11.1976 in Filderstadt

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

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. J. Dittmer
2. Prof. Dr. rer. nat. N. Arnold, Kiel
3. Prof. Dr. med. V. Müller, Hamburg

01.12.2015

14.07.2016

Meinem Freund
Felix Haarmann gewidmet

Referat

Diese Dissertationsarbeit untersuchte die Wirkung des 4G/5G-single-nucleotide-Polymorphismus des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)-Gens bei an einem primären Mammakarzinom erkrankten Patientinnen hinsichtlich seiner Bedeutung für die Inzidenz und Prognose des Mammakarzinoms sowie seiner Auswirkung auf die Expression von PAI-1 im Tumorgewebe.

Der 4G/5G-Polymorphismus in der „upstream“-Region des PAI-1-Genes beeinflusst die PAI-1-Expression im gesunden Gewebe, wobei ein 4G-Allel im Vergleich zu einem 5G-Allel eine höhere PAI-1-Expression zur Folge hat. Es wird vermutet, dass die fünf aufeinander folgenden Guanine des 5G-Allels einen essentiellen Teil einer Erkennungssequenz eines bisher noch nicht identifizierten Repressors der Transkription darstellen. PAI-1 stellt einen unabhängigen prognostischen und prädiktiven Parameter beim Mammakarzinom dar.

Der Polymorphismus wurde mittels Polymerasekettenreaktion in Leukozyten von 104 Patientinnen und 104 altersgleichen gesunden Frauen bestimmt. Die Methodik der PCR war zuvor an drei Brustkrebszelllinien – MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 – von uns etabliert worden. Die PAI-1-Proteinexpression im Tumorgewebe wurde mittels ELISA bestimmt.

In unserer Untersuchung zeigte der 4G/5G-Polymorphismus keinen Einfluss auf die Inzidenz des Mammakarzinoms. Hinsichtlich des Verlaufes der Erkrankung wies der Polymorphismus keine unmittelbare Auswirkung auf, jedoch hatten bei fortgeschrittenem Brustkrebs (d.h. positivem Nodalstatus, Tumorgroße \geq T2, entdifferenziertem Tumor \geq G2) Trägerinnen des 4G/4G-Genotyps tendenziell eine weniger günstige Prognose als Trägerinnen des 4G/5G-Genotyps, diese wiederum eine weniger günstige als Trägerinnen des 5G/5G-Genotyps. Außerdem zeigte sich, dass die durchschnittliche PAI-1-Proteinexpression positiv mit der Anzahl der vorhandenen 4G-Allele korrelierte. Brustkrebspatientinnen mit einem 5G-Allel hingegen hatten statistisch signifikant viel seltener tumorale PAI-1-Werte oberhalb des für die Therapieentscheidung wichtigen Schwellenwertes von 14 ng/mg Protein im Tumorgewebe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der 4G/5G-Polymorphismus eine modulierende Wirkung auf die PAI-1-Expression im Tumor ausübt. Auf die Prognose macht sich diese modulierende Wirkung bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Tumoren bemerkbar.

Benesch, Ute: Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus beim primären Mammakarzinom. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2015

Inhaltsverzeichnis

Referat	iii
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologische Daten	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.2 Klassifikation des Mammakarzinoms	3
1.2.1 TNM-Klassifikation	3
1.2.2 Histopathologische Klassifikation	3
1.2.3 Histologischer Grad (Grading)	3
1.3 Therapie des Mammakarzinoms	4
1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren	4
1.4.1 Klassische prognostische und prädiktive Faktoren	5
1.4.2 Neuere prognostische und prädiktive Faktoren	6
1.5 Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 als prognostischer und prädiktiver Faktor	7
1.6 Die Biomarker uPA und PAI-1 in ihrer Bedeutung für das Mammakarzinom	7
1.6.1 Etablierung des PAS als diagnostisches und therapierelevantes Instrument	7
1.6.2 Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)	8
1.6.3 Die Regulation der PAI-1-Gen-Expression	10
1.6.4 Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus	12
1.7 PAI-1 im Plasminogen-Aktivator-System und Tumorentstehung	13
1.7.1 Zelldeadhäsion, Zellmotilität und Zellmigration	13
1.8 Tumorangiogenese, Tumorprogression und Tumormetastasierung	15
2 Fragestellung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	17
3.2 Patientenkollektiv	19
3.3 Kontrollkollektiv	20
3.4 Brustkrebszelllinien	21

3.5	Bestimmung der PAI-1 und uPA-Protein-Konzentration im Tumorgewebe	21
3.6	Isolierung genomischer DNA und PAI-1-4G/5G-Genotypisierung	22
3.6.1	DNA-Isolierung aus Tumorgewebe	22
3.6.2	DNA-Isolierung aus Leukozyten	23
3.7	Ermittlung des Genotyps	24
3.7.1	Methode 1 (modifiziert nach ALVAREZ-MILLÁN et al., 2002)	24
3.7.2	Methode 2 (modifiziert nach BLASIAK et al., 2000b)	25
3.8	Statistik	27
4	Ergebnisse	28
4.1	PAI-1-4G/5G-Genotypisierung von Brustkrebszelllinien	28
4.2	Allel- und Genotypfrequenz des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus	28
4.3	Vergleich der Allel- und Genotypfrequenz des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus mit den klinisch-pathologischen Faktoren	29
4.4	Untersuchung des Zusammenhanges zwischen 4G bzw. 5G-Sequenz mit der PAI-1-Proteinexpression im Mammakarzinom	32
4.5	Vergleich der klassischen klinisch-pathologischen Parametern mit den PAI-1-Schwellenwerten	35
4.6	Prognostische Bedeutung von 4G/5G-Polymorphismus und PAI-1-Proteinlevel	36
4.6.1	Prognose in Abhängigkeit der tumoralen Proteinexpression von PAI-1 und uPA	36
4.6.2	Prognose in Abhängigkeit des Genotyps	38
4.7	Prognose in Abhängigkeit von Genotyp, Allelstatus und der tumoralen PAI-1-Expression unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Daten	39
4.7.1	Stratifizierung nach Nodalstatus	39
4.7.2	Stratifizierung nach Tumorgroße	42
4.7.3	Stratifizierung nach Grading	45
4.7.4	Stratifizierung nach Chemotherapie	46
5	Diskussion	49
5.1	Der 4G/5G-Polymorphismus und die Inzidenz des primären Mammakarzinoms	50
5.2	Der PAI-1-4G/5G-Polymorphismus und die “klassischen“ klinisch-pathologischen Parameter	51
5.3	Der PAI-1-4G/5G-Polymorphismus und die PAI-1/uPA-Expression im Tumorgewebe	53
5.4	Unterschiedliche PAI-1-Expression und ihre Auswirkung auf klinisch-pathologische Parameter	55
5.5	Der 4G/5G-Polymorphismus und die Prognose des Mammakarzinoms	56
5.6	Der 4G/5G-Genotyp und die Allelverteilung bezogen auf die Prognose des Mammakarzinoms	56

5.7	PAI-1- und uPA-Expression und Prognose des Mammakarzinoms	58
5.8	Nodalstatus, 4G/5G-Genotyp, PAI-1- und uPA-Expression in der Prognose des Mammakarzinoms	58
5.9	Tumorgröße, 4G/5G-Genotyp, PAI-1- und uPA-Expression in der Prognose des Mammakarzinoms	59
5.10	Grading, 4G/5G-Genotyp, PAI-1- und uPA-Expression in der Prognose des Mammakarzinoms	60
5.11	Adjuvante Chemotherapie, 4G/5G-Genotyp, PAI-1- und uPA-Expression in der Prognose des Mammakarzinoms	60
5.12	Das Plasminogen-Aktivatoren-System als Zielstruktur für „targeted drugs“	61
6	Zusammenfassung	63
	Literaturverzeichnis	64
	Thesen	79
	Lebenslauf	80

Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Beschreibung
AGO	Deutsche Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
ALND	Axillary Lymph Node Dissection
AP-1	Aktivatorprotein-1
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AT	Ataxia teleangiectatica
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA	BReast CAancer
CD	Cluster of Differenzierung
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
CLIS	Carcinoma Lobulare In Situ
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DCIS	Duktales Carcinoma In Situ
DGGG	Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DIN	Duktale Intraepitheliale Neoplasie
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DOC	Docetaxel
EDTA	Ethylendiamineteressigsäure
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

Bezeichnung	Beschreibung
FEC	5-Fluorouracil/ Epirubicin/ Cyclophosphamid
FGF	Fibroblast Growth Factor
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIF-1	Hypoxie-Induzierende Faktor-1
HR	Hormonrezeptor
IL	Interleukine
KI	Konfidenzintervall
LDLR	Low Density Lipoproteins-Rezeptor
LIN	Lobuläre Intraepitheliale Neoplasie
LoE	Level of Evidence
LPS	Lipopolysaccharide
MRM	Modifizierte Radikale Mastektomie
mRNA	messenger Ribocucleic Acid
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NACB	National Academy of Clinical Biochemistry
NH ₂	Aminogruppe
NNBC-3	Node Negative Breast Cancer III Study
PAI-1	Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1
PAS	Plasminogen-Aktivator System
PCR	Polymerasen-Ketten-Reaktion
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PR	Progesteronrezeptor
PTEN/MMAC1	Phosphatase, Tensin Homologue/Mutated in Multiple Advanced Cancers (Tumorsuppressorprotein)

Bezeichnung	Beschreibung
RCL	Reactive Center Loop
RGD-Sequenz	Aminosäuresequenz: Arginin, Glycin, Asparaginsäure
RKI	Robert Koch-Institut
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SERPINE	SERine Proteinase Inhibitors
SLNB	Sentinel Lymph Node Biopsy
SMAD	SMA/Mother against decapetolegis-Proteine
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Sp1	Specificity protein 1
suPAR	Soluble Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator Rezeptor
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TNF- α / β 1	Tumornekrosefaktor- α / β 1
TNM-Klassifikation	T(umor), N(odes), M(etastasen)
tPA	Plasminogen-Aktivator vom Tissue-Typ
uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator Rezeptor
USF-1	Upstream Stimulatory Factor-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
VN	Vitronektin
WHO	World Health Organization

KAPITEL 1

Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologische Daten

Brustkrebs ist sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts (ROBERT KOCH-INSTITUT, GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., 2012) erkrankten in Deutschland im Jahr 2008 rund 72.000 Frauen bundesweit, weltweit waren nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO 1.384.155 Frauen im selben Zeitraum betroffen. Laut dieser Statistik erkrankt eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs mit einem mittleren Erkrankungsalter von 65 Jahren. Damit liegt das Erkrankungsalter sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller anderen Krebserkrankungen zusammengenommen (ROBERT KOCH-INSTITUT, GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., 2012). Nach Diagnosestellung liegt die absolute 5-Jahres-Überlebensrate bei 78%, die relative bei 86%. Das Mammakarzinom steht an vierter Stelle der häufigsten Todesursachen der Frau in Deutschland, unter den Krebserkrankungen gar an erster Stelle.

Die Brustkrebsinzidenz steigt in Deutschland seit 1980 stetig an. Am deutlichsten verlief der Anstieg seit 2005, nachdem in Deutschland das Mammographie-Screening eingeführt und viele Tumoren frühzeitig entdeckt wurden (ROBERT KOCH-INSTITUT, GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., 2012). 2008 wurden etwa doppelt so viele Frauen mit Brustkrebs wie noch 1980 erfasst. Die Gründe für die zunehmende Inzidenz sind letztlich unklar und werden hypothetisch mit Änderungen der Risikoprofile (z.B. späte Schwangerschaften, veränderte Lebens- und Ernährungsgewohnheiten) in Verbindung gebracht. Die Mortalität dagegen fällt seit Mitte der 1990er Jahre leicht ab, was für ein vermehrtes Gesundheitsbewusstsein, verbesserte Prävention durch Frühdiagnosen sowie einen konsequenten Einsatz von adjuvanten Therapiemaßnahmen sprechen dürfte (ROBERT KOCH-INSTITUT, GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., 2012).

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist bis heute nicht hinreichend geklärt (KAUFMANN et al., 2006), allerdings sind viele Faktoren bekannt, die die Entstehung des Mammakarzinoms begünstigen. Das

Alter ist geschlechtsspezifisch der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms (FIORICA, 2007). Zudem spielen neben Umwelteinflüssen sowohl endogene, endokrine und reproduktive als auch konstitutionelle Faktoren eine Rolle (KAUFMANN et al., 2006, FIORICA, 2007). Der hormonelle Einfluss auf die Tumorentstehung wurde schon Ende des 19. Jahrhunderts vom Freiburger Chirurgen Albert Schinzinger (1889) und vom britischen Arzt George Thomas Beatson (1896) diskutiert (HARBECK, 2015). Eine zentrale Rolle kommt hier dem Hormon Östrogen zu. Bedingungen prolongierter hormonexponierter Zeit, wie frühe Menarche (vor dem 13. Lebensjahr), späte Menopause (>50 Jahre), menopausale Adipositas und Hormonersatztherapien, sind bekannte Risikofaktoren (KANTEHARDT et al., 2008). Die Langzeiteinnahme (>8 Jahre) von Antikonzeptiva hingegen beeinflusst das Brustkrebsrisiko bei Frauen unter 45 Jahren nur minimal (DAUDT et al., 1996). In Hinblick auf die Reproduktion ist entscheidend, in welchem Alter die erste Schwangerschaft ausgetragen wird. Die erste ausgetragene Schwangerschaft im Alter von <19 Jahren reduziert das Brustkrebsrisiko um 50% im Vergleich zu Nulliparität, während es für Erstgebärende über dem 35. Lebensjahr hingegen erhöht ist (FIORICA, 2007). Darüberhinaus belegen epidemiologische Studien die protektive Wirkung langer Stillperioden (FIORICA, 2007).

Brustkrebs ist zudem eine komplexe genetische Erkrankung. Multiple molekulare Ereignisse genetischer und epigenetischer Art werden beschrieben, die ebenfalls für die Tumorgenese verantwortlich gemacht werden (KAUFMANN et al., 2006, ZIELINSKI et al., 2004). Brustkrebs tritt mit ca. 75% hauptsächlich sporadisch auf. Bei 15-20% aller Mammakarzinompatientinnen ist die Erkrankung jedoch mit einer positiven Familienanamnese assoziiert. 3-5% dieser Patientinnen tragen eine Mutation (autosomal-dominanter Erbgang) bzw. einen Allelverlust in den Tumorsuppressor-Genen BRCA-1 bzw. BRCA-2 (BReast CAncer associated genes), die das Risiko um das fünf- bis achtfache erhöhen, an Brustkrebs mit einer prämenopausalen Manifestation zu erkranken (MAU et al., 2008). Andere für die Tumorgenese des Mammakarzinoms relevante Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene sind die Amplifikation der HER-2/neu- (Synonyme: c-erbB-2, p185)- und Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor-(EGFR; Synonym: erbB- 1)-Onkogene sowie Mutationen der Tumorsuppressorgene p53, AT (Ataxia teleangiectatica) und pTEN/MMAC1 (KAUFMANN et al., 2006).

Von großem Interesse für die klinische, aber auch pharmazeutische, Genomik sind darüberhinaus Polymorphismen einzelner Nukleotide (Single nucleotide polymorphism, SNP) in der DNA. Zu diesen SNPs zählt der in dieser Arbeit untersuchte 4G/5G-Polymorphismus im Promotorbereich des PAI-1-Gens, der Einfluss auf die Modulation der Plasminogenaktivator- Inhibitor-1-Konzentration im Gewebe hat. Von diesen Punktmutationen lässt sich etwa eine pro 1000 Nukleotide hauptsächlich in Promotorbereichen und in den Introns von Genen finden. Sie sind Ursache nicht nur interindividueller Unterschiede, sondern auch hereditärer Erkrankungen (MOONEY, 2005). In den letzten Jahren wurden durch genomweite Assoziationsstudien (Genome- wide association study, GWAS) 19 Allele bzw. SNPs auf 18 Loci (*FGFR2*, *CASP8*, *TOX3*, *MAP3K*, *2q*, *cdkn2a*, *10q22*, *COX11*, *notch*, *11q13*, *10q21*, *SLC4A7*, *6q25.1*, *8q24*, *RAD51L1*, *LSP1*, *5p12*, *10q*) identifiziert, die

in korrelativen Zusammenhang mit einem hereditären Mammakarzinom gebracht werden können und bei Trägerinnen einer BRCA1- oder BRCA2-Mutation das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, positiv beeinflussen (INGHAM et al., 2012, ANTONIOU et al., 2010, ANTONIOU et al., 2011).

1.2 Klassifikation des Mammakarzinoms

1.2.1 TNM-Klassifikation

Die klinische Einteilung der Mammakarzinome erfolgt entsprechend der cTNM-Klassifikation nach den UICC-Kriterien (International Union Against Cancer), die 1958 erstmals öffentlich für das Mammakarzinom empfohlen wurden ((UICC), 1958). Anhand der klinischen Untersuchung und bildgebenden Verfahren werden die Tumorgöße (T), der Nodalstatus (N) und das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M) bestimmt (KREIENBERGER et al., 2006). Die pathologische Klassifikation (postoperative histopathologische Klassifikation) pTNM wird anhand des chirurgischen Eingriffes und durch die pathologische Untersuchung am Resektat oder Biopsat beurteilt, der Tumorstatus nach Behandlung durch die R-Klassifikation (WITTEKIND et al., 2003).

1.2.2 Histopathologische Klassifikation

Nach der traditionellen histologischen Klassifikation der WHO wird das Mammakarzinom in nichtinvasive und invasive Karzinome sowie in das Pagetkarzinom der Mamille, eine Spezialform des duktales Mammakarzinoms, eingeteilt (DIEDRICH et al., 2007). Die In-situ-Karzinome kommen als Carcinoma lobulare in situ (CLIS) und Duktales Carcinoma in situ (DCIS) vor. Nach den internationalen Empfehlungen des AFIP (Armed Forces Institute of Pathology, USA) wird das invasive Karzinom in 17 Subtypen klassifiziert (ROSEN et al., 1992).

Mittlerweile gilt ebenfalls eine alternative und neue Terminologie, welche die Begriffe Dysplasie und Carcinoma in situ durch den Begriff der „intraepithelialen Neoplasie“ fast vollständig abgelöst hat. Die neue Nomenklatur erlaubt eine präzisere Einteilung der unterschiedlichen histologischen Subtypen des Mammakarzinoms und somit auch eine Optimierung der Therapieentscheidung (TAVASSOLI et al., 2009, BRATTHAUER et al., 2002).

1.2.3 Histologischer Grad (Grading)

Das international am weitesten anerkannte Grading-System, eine Modifikation des Scarff-Bloom-Richardson-Vorschlags, ist jenes nach Elston und Ellis (ELSTON et al., 1991), das auch als Nottingham-Grading bezeichnet wird. Es umfasst drei histologische Differenzierungsgrade, die sich aus der tubulären Differenzierung, der Kernpolymorphie und der Mitosezahl pro definierter Fläche mittels eines Punktescore-Systems erschließen lassen (DECKER et al., 2009). Ein von Bässler 1992 überarbeitetes Grading-System ermöglicht anhand des Summenscores die Einteilung des Differenzierungsgrades (BÄSSLER, 1998).

1.3 Therapie des Mammakarzinoms

Primär entscheidend für die Therapie des Mammakarzinoms ist die operative Behandlung, die sich seit den letzten 20 Jahren von der bis dato etablierten radikalen Mastektomie hin zu individuellen Operationskonzepten entwickelt hat (KREIENBERGER et al., 2006). Hierzu zählen die Brusterhaltende Therapie (BET, Tumorexzision), die modifizierte radikale Mastektomie (MRM) sowie die isolierte Entfernung des Sentinellymphknoten (SLNB, sentinel lymph node biopsy) und/oder eine Axilladissektion (ALND) (DIAN et al., 2011, HARBECK et al., 2013a). Zeitgleich mit der Reduktion der operativen Radikalität gewann sowohl in kurativer als auch palliativer Absicht die adjuvante systemische Chemotherapie zunehmend an Bedeutung. Dieser therapeutischen Veränderung liegt ein Umdenken hinsichtlich der Karzinogenese des Mammakarzinoms zugrunde, wobei nicht länger von einer lokalen Erkrankung der Brust, sondern von einer systemischen Erkrankung durch frühzeitige Dissemination von Tumorzellen über die Lymph- und Blutbahnen ausgegangen wurde (FISHER et al., 1995, FISHER, 2005, VERONESI et al., 2008). Die Entscheidung für eine zusätzliche adjuvante Chemotherapie wird individuell in Abhängigkeit von Fernmetastasen sowie mit Hilfe der prognostischen und prädiktiven Faktoren getroffen und zudem unter Berücksichtigung der neuen, nach St. Gallen 2011 formulierten molekularpathologischen Definitionen der Tumorbilogie, wodurch neue Therapiekonzepte für das frühe Mammakarzinom möglich sind (HARBECK et al., 2013a).

Zu den adjuvanten Systemtherapien zählt zudem die endokrine Therapie, die bei hormonempfindlichen Tumoren indiziert ist, sowie der monoklonale humanisierte Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), der zusammen mit einer Chemotherapie erfolgreich bei Patientinnen mit einem HER2/neu positiven Mammakarzinom eingesetzt wird (GOLDHIRSCH et al., 2011, WOLF et al., 2011). Ein weiterer großer Stellenwert in der Behandlung des Mammakarzinoms wird der Radiotherapie zugeschrieben, die nach einer brusterhaltenden Operation unter Berücksichtigung der individuellen Tumorbilogie sowie nach einer modifizierten radikalen Mastektomie in Abhängigkeit von axillärem Lymphknotenbefall und Tumorgröße empfohlen wird (SCHEITHAUER et al., 2011, NIELSEN et al., 2006, CLARKE et al., 2006, HOLLI et al., 2009, HARBECK et al., 2013a).

1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Da das Mammakarzinom ein sehr heterogenes Krankheitsbild mit einem Rezidivrisiko von 30% innerhalb von 10 Jahren darstellt (KANTELHARDT et al., 2008), sind prognostische und prädiktive Faktoren zur individuellen Vorhersage des Verlaufs sowie zur individuellen Therapieentscheidung von besonderer Bedeutung. Prognosefaktoren werden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung herangezogen, um eine Vorhersage über den Krankheitsverlauf unabhängig von der Therapie treffen zu können. (HARBECK et al., 2002a, SCHALLER et al., 2011, DECKER et al., 2009).

1.4.1 Klassische prognostische und prädiktive Faktoren

Zu den etablierten traditionellen prognostischen Faktoren im klinischen Alltag zählen hauptsächlich tumormorphologische Kriterien, die standardisiert bei jeder Erstdiagnose bestimmt werden. Der axilläre Nodalstatus (pN) gilt diesbezüglich als wichtigster und stärkster Prognosefaktor, der Hinweis auf die Mortalität und das Rezidivrisiko gibt. Als prädiktiver Faktor hat der Lymphknotenstatus indes keine Bedeutung (HARBECK et al., 2002a).

Die Tumorgröße des Primums korreliert ebenfalls mit der Rezidivwahrscheinlichkeit. Patientinnen mit einem kleinen Tumor (<1 cm) haben in der Regel eine sehr gute Prognose. Da die Größe des Primärtumors mit dem axillären Lymphknotenbefall korreliert, spielt die Tumorgröße als prognostischer Faktor bei Patientinnen mit einem nodal-positiven Status eine untergeordnete Rolle (HARBECK et al., 2002a).

Die Bestimmung des histologischen Typs gibt Aufschluss über das metastatische Potential des Mammakarzinoms. Die häufigsten histologischen Typen, das invasive duktales (75%) und das invasive lobuläre (10%) Karzinom, metastasieren häufiger als seltenere Subformen wie das tubuläre, muzinöse oder medulläre Karzinom, die jeweils 5% der Mammakarzinom-entitäten darstellen und mit einer guten Prognose verbunden sind (ELLIS et al., 1992).

Der Malignitätsgrad des Tumors kann nur bedingt zur Prognoseabschätzung herangezogen werden. Hilfreich erscheint er bei den Patientinnen, die einen sehr gut differenzierten Tumor (G1) oder einen schlecht differenzierten Tumor (G3) aufweisen, da die G1-Tumoren im Vergleich zu einem G3-Stadium mit einer sehr viel besseren Prognose einhergehen. Allerdings stellen die Patientinnen mit einer G1- oder G3-Situation mit 20-30% nur eine geringe Anzahl aller Patientinnen dar. Ein mittelgradig differenzierter Tumor (G2), welcher bei der Mehrzahl aller Patientinnen dokumentiert wird, reicht alleine nicht aus, um eine zuverlässige prognostische Aussage treffen zu können (HARBECK et al., 2002a).

Das Alter als prognostischer Faktor gewinnt hauptsächlich bei Patientinnen unter 35 Jahren an Bedeutung. Junge Patientinnen haben eine deutlich ungünstigere Prognose, da Tumoren in diesem Alter meist aggressive histologische Merkmale aufweisen (NIXON et al., 1994).

Von großer Bedeutung ist zudem der Steroidhormonrezeptor-Status von Östrogen und Progesteron, der primär eine prädiktive Aussagekraft besitzt. Bei Tumoren mit hoher Expression beider Rezeptoren (ER+/PR+) ist ein deutlich besseres Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie zu verzeichnen (KANTELHARDT et al., 2008). Patientinnen mit Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorpositiven Tumoren stellen mit etwa 75% die Mehrzahl aller Mammakarzinompatientinnen dar (HARBECK et al., 2002a). Darüber hinaus zählt der HER2/neu- Expressions-Status zu den etablierten prognostischen und prädiktiven Faktoren, der zum einen den Einsatz des humanisierten Antikörpers Trastuzumab oder des Tyrosinkinaseinhibitors Lapatinib rechtfertigt und zum anderen als Proliferationsmarker den Verlauf der Tumorerkrankung bestimmt (HARBECK et al., 2002a).

1.4.2 Neuere prognostische und prädiktive Faktoren

Die Untersuchung neuer prognostischer und prädiktiver Faktoren dient vor allem dem Ziel, sowohl das individuelle Risiko der Patientinnen bestmöglich abzuschätzen, als auch Methoden zu entwickeln, die die individuelle Biologie des Primärtumors präziser zu definieren helfen mit dem vorrangigen Zweck, eine Übertherapie zu vermeiden (HARBECK et al., 2004, HARBECK et al., 2002b, KANTELHARDT et al., 2011, THOMSEN et al., 2000, THOMSEN et al., 2003, SCHNEEWEISS, 2009). In den letzten Jahren konnte diesbezüglich durch neue molekulargenetische Untersuchungsverfahren ein tieferes Verständnis für die Tumorbiologie des Mammakarzinoms gewonnen werden.

Mittels Microarrays wurden Genexpressionsprofile erstellt, die eine neue Taxonomie des Mammakarzinoms anhand der Expression von sogenannten „intrinsischen Genen“ im Zusammenhang mit dem klinischen Bild ermöglichten (intrinsische Subgruppen) (LIEDTKE et al., 2009, STREHL et al., 2011). Die Identifizierung sogenannter Multigensignaturen wurde mittels cDNA-Microarrays und RT-PCR am Tumorgewebe durchgeführt. Diese Gensignaturen waren insbesondere den Bereichen Signaltransduktion und Zellzykluskontrolle zuzuordnen. Die Differenzierung der Subgruppen wurde nicht allein anhand des Genexpressionsprofils vorgenommen, sondern es wurden auch immunhistochemische Untersuchungsergebnisse (z.B. ER/PR-oder HER2-Status, Zytokeratin-Analyse) sowie FACS-Analysen (Cluster of Differentiation-Bestimmung) berücksichtigt (PEROU et al., 2000, PRAT et al., 2009). Die damit gegebene präzisere Differenzierung der Tumorbiologie des Mammakarzinoms erlaubte eine Einteilung in sechs intrinsische Subtypen (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched-Typ, Basal-like-Typ, Normal-like-Typ, Claudin-low-Typ; Perou2000, Soerlie2003), die jeweils anhand ihres Genexpressionsprofils unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Brustepithels zugeordnet werden konnten (PRAT et al., 2009, LIM et al., 2009).

Diese Subgruppendifferenzierung ermöglichte zusätzlich zu den traditionellen Faktoren eine individuellere Aussage bezüglich der Prognose und Prädiktion zu treffen, was in mehreren unabhängigen Studien validiert wurde (PEROU, 2011, EROLES et al., 2012, LIM et al., 2009, GORDON et al., 2003, SØRLIE et al., 2003). Des Weiteren wurden prognostische und prädiktive Marker, Gensignaturen wie zum Beispiel die 70-Gen-Signatur, Mammaprint®, die 21-Gen-Signatur, Onkotype DX®, oder die 30-Gen-Signatur etabliert (VEER et al., 2002, PAIK et al., 2004, HESS et al., 2006). Ferner wurden einzelne Gene identifiziert, die neue zielgerichtete Therapiekonzepte (z.B. mTOR-Inhibitoren bei Trastuzumab-unempfindlichen Patientinnen, BOLERO-III-Studie) versprechen lassen (deGraffenried2004, Harbeck2013c). Die neuen prognostischen und prädiktiven Marker werden derzeit bereits in Phase-III-Studien (z.B. MINDACT-Studie, TAILORx-Studie) erprobt, haben aber aufgrund einer bisher fehlenden Standardisierung und hohen Kostenaufwands im klinischen Alltag noch keinen Einzug gefunden (VEER et al., 2002, LIEDTKE et al., 2009, PAIK et al., 2004, CHEANG et al., 2008, SCHMITT et al., 2011).

1.5 Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 als prognostischer und prädiktiver Faktor

Darüber hinaus spielen Tumor-assoziierte Proteolysefaktoren, der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Gegenspieler, der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), eine entscheidende Rolle sowohl bei der Risikostratifizierung (GOLDHIRSCH et al., 2005) als auch bei der Therapieentscheidung. Ihre Konzentrationsbestimmung mittels ELISA aus frischem Tumorgewebe (VETTER et al., 2007) ermöglicht die Einteilung in eine Hochrisiko- ($\text{PAI-1} \geq 14^{\text{ng/mg}}$ und/oder $\text{uPA} \geq 3^{\text{ng/mg}}$)- und Niedrigrisikogruppe ($\text{PAI-1} < 14^{\text{ng/mg}}$ und $\text{uPA} < 3^{\text{ng/mg}}$) bei Patientinnen mit einem primären nodal-negativen Mammakarzinom (JÄNICKE et al., 1989, JACOBS et al., 2013). Diesen Proteinen kommt eine besondere Bedeutung bei der Tumorinvasion und Metastasierung zu. Erhöhte, über dem jeweiligen Schwellenwert liegende uPA- bzw. PAI-1-Konzentrationen korrelieren mit einer aggressiveren Form des Mammakarzinoms (DUFFY et al., 1988, JAENICKE et al., 1993, HARBECK et al., 2004). Ihre prognostische und prädiktive Stärke beim nodal-negativen Mammakarzinom erreichte das höchste Evidenzniveau (Level of Evidence, LoE-1) und erlaubt heute ihren routinemäßigen Einsatz im klinischen Alltag (HARBECK et al., 2004).

1.6 Die Biomarker uPA und PAI-1 in ihrer Bedeutung für das Mammakarzinom

1.6.1 Etablierung des PAS als diagnostisches und therapierelevantes Instrument

Seit Ende des letzten Jahrhunderts verdichteten sich die Daten immer weiter dahingehend, dass das Plasminogen-Aktivator System (PAS) nicht nur entscheidend für die Fibrinolyse ist, sondern auch eine große Rolle bei der Proliferation, Invasion und Metastasierung solider Tumoren spielt (DANO et al., 1985, BLASI et al., 1987, VASSALLI et al., 1991, ANDREASEN et al., 1997, DASS et al., 2008, MCMAHON et al., 2001). Die prädiktive und prognostische Signifikanz und damit der klinische Nutzen von Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 konnte bislang bei vielen soliden Tumoren, am aussagekräftigsten beim Mammakarzinom, durch zahlreiche klinische Untersuchungen belegt werden (THOMSEN et al., 2003, DASS et al., 2008). Bereits 1988 wurde durch die Arbeitsgruppe von Duffy et al. ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen zwischen einer erhöhten Proteaseaktivität (uPA) im Tumorgewebe von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom einerseits und der Tumorgöße, einem positiven Nodalstatus sowie einem kürzeren krankheitsfreien Überleben andererseits. uPA wurde als möglicher neuer prognostischer Marker beim primären Mammakarzinom vorgeschlagen (DUFFY et al., 1988). Diese Vermutung wurde kurz darauf durch die Arbeitsgruppe von Jänicke et al. bestätigt, die eine erhöhte mittels ELISA bestimmte Konzentration von uPA im Tumorgewebe unabhängig von traditionellen Biomarkern mit einer erhöhten Rezidivrate dieser Patientinnen nachweisen konnten (JÄNICKE et al., 1989). 1991 wurde durch dieselbe Arbeitsgruppe erstmals der Faktor PAI-1 als ein zu uPA komplementärer prognostischer Biomarker beschrieben, verbunden mit dem Nachweis, dass erhöhte PAI-1-Konzentrationen im Primärtumorgewebe mit einer ungünstigeren Prognose einhergingen (JÄNICKE et al., 1991).

Die unabhängige prognostische Bedeutung von uPA und PAI-1 auf das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben bei Patientinnen mit einem primären nodal-negativen Mammakarzinom wurde daraufhin in vielen Studien bestätigt (HARBECK et al., 2004). Die erste prospektive multizentrische Chemo-N0-Studie (1993-1998) mit einem heutigen Follow-up von zehn Jahren, trug wesentlich zur Validierung der prognostischen und prädiktiven Stärke von uPA und PAI-1 als neue Biomarker bei. Aufgrund der zahlreichen aussagekräftigen retrospektiven und prospektiven Studien sowie der Chemo-N0-Studie erreichten uPA und PAI-1 als einzige Biomarker gemäß den Richtlinien des Tumor Marker Utility Grading Systems (HAYES et al., 1996) die höchste Evidenzstufe, LoE-1, (SCHMITT et al., 2010, HARBECK et al., 2013a, SCHMITT et al., 2011). Bereits 2002 wurden die Faktoren uPA und PAI-1 aufgrund der vorliegenden klinischen Daten und der qualitätskontrollierten standardisierten Nachweismethode mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA, Femtelle®) in die AGO (Deutschen Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie)- und 2007 in die ASCO (American Society of Clinical Oncology)- Leitlinien aufgenommen (HARRIS et al., 2007, ANNECKE et al., 2008) sowie 2008 in die National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines (NACB) (STURGEON et al., 2008).

Eine weitere wichtige multizentrische prospektive klinische Studie zur Validierung der Risikostratifizierung durch uPA und PAI-1 im Vergleich zu den klassischen klinisch- pathologischen Faktoren ist die von 2002 bis 2009 durchgeführte NNBC 3-Europe-Studie (Node Negative Breast Cancer 3-Europe, www.germanbreastgroup.de/nnbc3/). Erste Zwischenergebnisse zeigen ein sehr gutes Ansprechen der Hochrisikopatienten auf beide Chemotherapie-Varianten mit einer geschätzten Wahrscheinlichkeit eines 2,5-jährigen krankheitsfreien Überlebens von über 97% und einem Gesamtüberleben von um die 99% (VETTER et al., 2007, KANTELHARDT et al., 2011, HARBECK et al., 2011, THOMSEN et al., 2012). Die seit 2009 laufende West German Study Group (WSG) Plan B Studie bei HER2-negativen Mammakarzinompatientinnen geht einen Schritt weiter und nimmt eine Risikostratifizierung anhand der uPA/PAI-1-Expressionsraten und dem 21-Gene Recurrence Score (Oncotype DX, Score 0-100) vor¹.

1.6.2 Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)

Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) wurde 1983 erstmals als Inhibitor der Fibrinolyse im Kulturmedium endothelialer Rinderzellen der Aorta entdeckt (LOSKUTOFF et al., 1983). Er gehört dem Plasminogen-Aktivator-System an und spielt zum einen eine wichtige Rolle in der Homöostase des Blutgerinnungssystems, wo er im Rahmen der Fibrinolyse durch die Inhibition des gewebespezifischen Plasminogen-Aktivators (tPA) die Bildung stabiler Thromben begünstigt (LOSKUTOFF et al., 1989). Zum anderen hat PAI-1 durch Inhibition des Plasminogen-Aktivators vom Urokinase-Typ (uPA) einen entscheidenden Einfluss auf die Homöostase der extrazellulären Matrix in

¹ www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01049425

physiologischen als auch pathologischen Prozessen (Abb. 1 (LOSKUTOFF et al., 1999, SCHLEEF et al., 1990, LIJNEN, 2005, LÖFFLER et al., 2007, MCMAHON et al., 2001, ANDREASEN et al., 1990)). Darüber hinaus wird PAI-1 eine entscheidende Rolle bei der replikativen Seneszenz, dem altersbedingten Verlust der zellulären Teilungsfähigkeit, zugesprochen. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen wiesen anhand p53-defizienter, PAI-1-überexprimierender Fibroblasten eine erhöhte PAI-1-Expressionsrate in alternden Fibroblasten sowie eine von p53 unabhängige Regulation des Zellzyklus bezüglich der replikativen Seneszenz nach (KORTLEVER et al., 2006). PAI-1 ist ein aus 379 bzw. 381 Aminosäuren

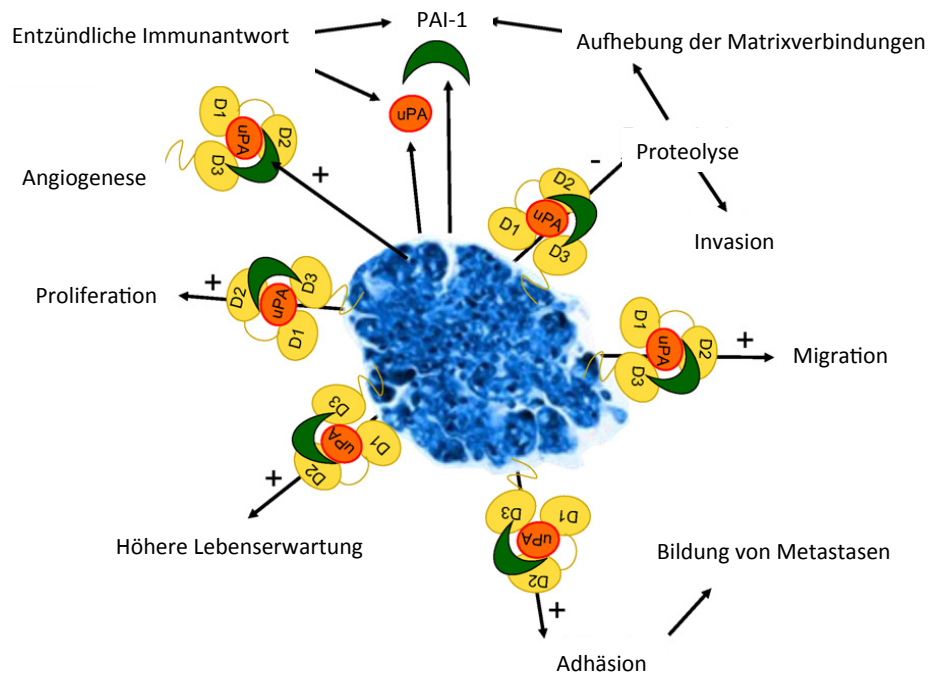


Abbildung 1: Darstellung des vielfältigen Einflusses von PAI-1 auf die Karzinogenese (D=Proteindomänen von PAI-1, D1 und D3 bilden zusammen die Bindungsstelle für die Urokinase uPA. Die Spaltung zwischen den Domänen D1 und D2 führt zu Fragmenten, die chemotaktische Eigenschaften aufweisen). Abb. modifiziert nach Bernd R. Binder and Judit Mihaly: The plasminogen activator inhibitor „paradox“ in cancer, *Immunology Letters*, 2008

(NH₂-terminale Heterogenität) bestehendes Glykoprotein und zählt zu den Serinprotease-Inhibitoren (SERPINE) (LIJNEN, 2005). Unter physiologischen Bedingungen wird PAI-1 nur von wenigen Zellen synthetisiert und in die extrazelluläre Matrix bzw. den Blutkreislauf freigesetzt. Zu diesen Zellen zählen hauptsächlich Endothelzellen, Adipozyten, glatte Gefäßmuskelzellen, Hepatozyten und Thrombozyten, wobei die Leber und das Fettgewebe zu den „Hauptproduzenten“ von PAI-1 zählen. In seiner aktiven Form inhibiert PAI-1 die Proteasen uPA und tPA (BINDER et al., 2002). In pathologischen Prozessen können weitere, durch inflammatorische Zytokine aktivierte Gewebearten bzw. Zellen, wie Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten, sowie zahlreiche Tumorzellen, PAI-1 in großen Mengen produzieren (LOSKUTOFF et al., 1998, SCHNEIDERMAN et al., 1991, BINDER et al., 2002, LIJNEN, 2005).

Pathologisch erhöhte PAI-1-Spiegel und eine damit einhergehende verringerte fibrinolytische Kapazität sind im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen beschrieben worden. Viele sind den kardiovaskulären Erkrankungen zuzuordnen (ERICKSON et al., 1990, JUHAN-VAGUE et al., 1996) und jenen Erkrankungen, die das metabolische Syndrom ausmachen (Adipositas, kardiovaskuläre Erkrankungen durch Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Dyslipidämie) (SCHÄFER et al., 2001, JUHAN-VAGUE et al., 2003, ROBBIE et al., 1996, CRAEN et al., 2012). Erhöhte PAI-Werte wurden aber auch in Assoziation mit tiefer Beinvenenthrombose (FRANCIS, 2002), diversen Tumorerkrankungen (ULISSE et al., 2009), Traumata und Infektionserkrankungen mit einem septischen Verlauf beschrieben (HACK, 2001, DELLAS et al., 2005).

1.6.3 Die Regulation der PAI-1-Gen-Expression

Das humane PAI-1-Gen, das erstmals 1986 von vier unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, ist etwa 12,2 kb lang und setzt sich aus 9 Exons und 8 Introns zusammen. Lokalisiert ist das Gen auf dem langen Arm von Chromosom 7 in der Position q21.3-q22 (PANNEKOEK et al., 1986, NY et al., 1986, GINSBURG et al., 1986, ANDREASEN et al., 1986, ULISSE et al., 2009).

Zu den regulierenden Faktoren der Genexpression zählen, wie teilweise schon erwähnt, inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1, die PAI-1 als Akut-Phase-Protein in Endothelzellen sowie HAT-1080-Fibrosarkomzellen induzieren und die tPA-Konzentration senken (BINDER et al., 2002, CRAEN et al., 2012). Des Weiteren wurde *in vitro* bei humanen sowie Rinderendothelzellen und *in vivo* eine Induktion der PAI-1-Syntheserate durch das Endotoxin Lipopolysaccharide (LPS), ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, nachgewiesen (SAMAD et al., 1996, YENDE et al., 2007), was die Vermutung nahelegt, dass PAI-1 bei Patienten mit einer Gram-negativen-Sepsis von Endothelzellen produziert und in den Blutkreislauf abgegeben wird (ZHANG et al., 1997).

Von den Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie TGF- β 1, EGF, FGF und CTGF, die ebenfalls die PAI-1-Expression regulieren, kommt vor allem TGF- β 1 bei der Onkogenese eine bedeutende Funktion zu. Beim Mammakarzinom spielt TGF- β 1 zum einen durch Inhibition der Proliferation als Tumorsuppressor eine Rolle, zum anderen wurde aber auch beim fortgeschrittenen Mammakarzinom eine erhöhte TGF- β 1-Expression im Tumorgewebe mit einer supprimierten Immunantwort und einer Induktion der Angiogenese in der Umgebung des Tumors in Verbindung gebracht (ROBERTS et al., 2003, SIEGEL et al., 2003, KAJDANIUK et al., 2013).

Des Weiteren zählen zu den regulierenden Faktoren von PAI-1 die Triglyceride, freie Fettsäuren und VLDL (very low density lipoproteins), Glukose sowie bestimmte Hormone (Insulin und Glukokortikoide), Angiotensin II, der Hypoxie-induzierende Faktor (HIF-1) und Sauerstoffradikale – also Faktoren, die beim metabolischen Syndrom entscheidend sind bzw. als dessen Folgen auftreten (ANDREASEN et al., 1990, BINDER et al., 2002, DELLAS et al., 2005, NAGAMINE et al., 2005). Die erhöhte PAI-1-Expressionrate in metastasierten Tumoren könnte zudem auch durch HIF-1 erklärbar

sein, dessen Bindungsstelle im PAI-1 Promotor bei -195/-198 zu finden ist (NAGAMINE et al., 2005, ULISSE et al., 2009).

VLDL-Response-Elemente liegen in der Promotorregion des PAI-1-Gens zwischen -672 und -657. Vermutet wird, dass möglicherweise Triglyceride über die VLDL-cis-Elemente entscheidenden Einfluss auf die erhöhte PAI-1-Expression haben (Abb. 2) (BINDER et al., 2002). Freie Fettsäuren, die typischerweise bei Diabetes mellitus erhöht vorliegen und nachweislich in Leberzellkarzinom-Zelllinien HepG2 die PAI-1-Expression positiv beeinflussen, interagieren über ein trans-Element, das zwischen -528 und -599 an der Sequenz 5'-TG(G/C)1-2CTG-3' im Promotor binden kann (CHEN et al., 2000). Weiterhin könnte der Transkriptionsfaktor Sp1 (stimulating protein 1) regulatorischen Einfluss haben, da seine Erkennungssequenz nahezu identisch mit der letztgenannten PAI-1-Promotorsequenz ist.

In Mesangiumzellen des Nierenkörperchens konnte eine erhöhte PAI-1-Rate durch eine Hyperglykämie via Sp1 induziert werden (GOLDBERG et al., 2000). Das zellzyklusregulierende Tumorsupressorprotein p53, als ein die DNA in der Promotorregion -160 bis -139 direkt bindender Transkriptionsfaktor, besitzt positiven Einfluss auf die PAI-1-Expressionsrate (BINDER et al., 2002, ROBERTS et al., 2003), negativen Einfluss hingegen auf die uPA- und tPA-Expressionsrate, wodurch die Stabilität der extrazellulären Matrix gegeben ist (BINDER et al., 2002). Im Zusammenhang mit dem zirkadianen Rhythmus der PAI-1-Plasmakonzentration wurden mehrere Zeit-Gene beschrieben, die positiven (Clock-Gen, Bmal1- und Bmal2-Gene) oder negativen (Perl-2-, Cry1-2- Decl-2-Gen) regulatorischen Charakter auf die PAI-1-Expressionsrate besitzen (LIJNEN, 2005, CHONG et al., 2006, SINGLETARY et al., 2008). Darüber hinaus haben Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymor-

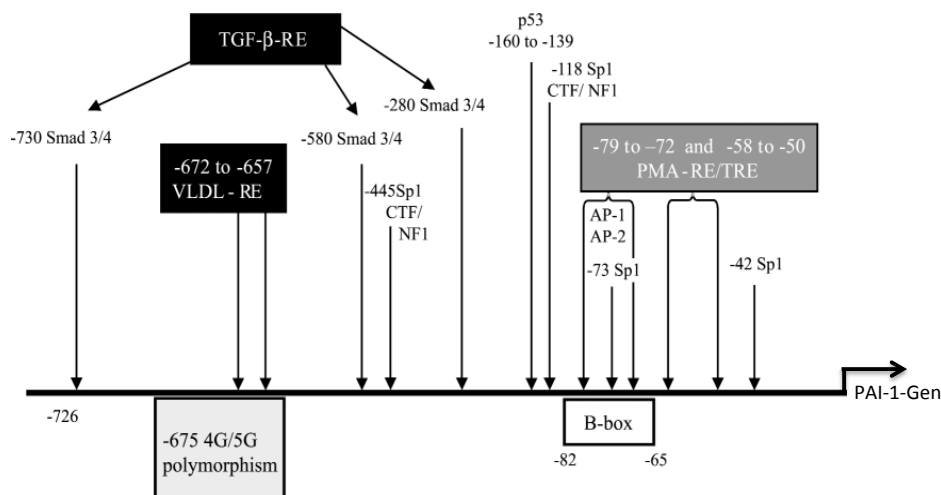


Abbildung 2: Darstellung des PAI-1-Promotors mit seinen regulatorischen Sequenzen (RE). Sequenzen, an denen Transkriptionsfaktoren nachweislich binden, sind ebenfalls aufgeführt. Abb. nach BR Binder et al. modifiziert: Plasminogen Activator Inhibitor 1: Physiological and Pathophysiological Roles, Physiology 2002

phism, SNP) Einfluss auf die Regulierung der Transkription von Genen (BETTS et al., 2012). Im

PAI-1-Gen wurden mehr als 180 SNPs identifiziert¹, wobei der 4G/5G-Polymorphismus (Abb. 3) am aussagekräftigsten untersucht wurde. Ferner kommt epigenetischen Phänomenen bei der Regulation der PAI-1-Expressionrate eine Bedeutung zu. 25 CpG-Inseln wurden in der Region -805/+152 identifiziert, deren Demethylierung mit einem deutlichen Anstieg der PAI-1 mRNA verbunden ist (GAO et al., 2005).

1.6.4 Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus

Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus wurde erstmals von Dawson et al. 1993 beschrieben und liegt im Promotorbereich des PAI-1-Gens, vom Transkriptionsstartpunkt ausgehend „upstream“ an der Position -675bp (DAWSON et al., 1993) (Abb. 3). Dieser Bereich ist regulatorisch von Bedeutung, so dass sich der kleine Unterschied zwischen 4 und 5 Guaninen (G) auf die PAI-1-Expressionsrate auswirkt. Mehrere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines 4G-Allels und einer erhöhten PAI-1-Konzentration *in vitro* und *in vivo* (Plasmakonzentration) (DAWSON et al., 1993, ERIKSSON et al., 1995, MARGAGLIONE et al., 1998, CHONG et al., 2006, DING et al., 2006). Ergänzend zu diesen Ergebnissen konnte anhand von *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass beim Vorliegen des 4G-Allels beispielsweise die HepG2-Zelllinie nach Stimulation mit IL-1 6-fach-höhere PAI-1-Konzentrationen aufwies als bei Präsenz des 5G-Allels (DAWSON et al., 1993), oder Endothelzellen nach Stimulation mit Angiotensin II im Vergleich zu dem 4G/5G- und vor allem zu dem 5G/5G-Genotyp signifikant mehr PAI-1 exprimierten (RONCAL et al., 2004). Ergänzend hierzu zeigte sich derselbe Effekt *in vitro* in durch LPS und Murein stimulierten Blutproben (YENDE et al., 2007). Auch beeinflussen VLDL via VLDL-spezifische Bindungssequenzen die PAI-1-Expression über Bindung an eine benachbarte, das 5G-Allel überlappende Region, was vermuten lassen könnte, dass VLDL mit einem bisher noch nicht identifizierten 5G-Allel-spezifischen Repressor (MA et al., 2009) um die Bindungsstelle konkurriert, was die erhöhten PAI-1-Konzentrationen in Reaktion auf VLDL erklären könnte (ERIKSSON et al., 1995). Zudem regulieren die zirkadianen Clock-Proteine 4G-allelspezifisch die PAI-1-Expression (CHONG et al., 2006). Ferner wurde bei humanen Mastzellen (HMC-1) eine erhöhte PAI-1-Konzentration nachgewiesen, vermittelt durch einen upstream stimulatory factor 1 (USF-1), der via eine 4G-Allel-abhängige E-Box (E-4G/5G) positiv regulatorischen Einfluss zeigte (MA et al., 2009). Wegen seines Einflusses auf die PAI-1-Expression steht der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen. Der homozygote 4G/4G-Genotyp korreliert beispielsweise mit einem erhöhten Myokardinfarktrisiko (BOEKHOLDT et al., 2001), mit einer familiären Disposition für eine koronare Herzerkrankung (MARGAGLIONE et al., 1998), bei Frauen mit einem erhöhten Prä-Eklampsie-Risiko (ZHAO et al., 2012) und mit einem Asthma bronchiale (MA et al., 2009). Darüber hinaus zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem 4G/4G-Genotyp und einer ungünstigen Prognose bei ausgeprägten systemisch-entzündlichen

1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>

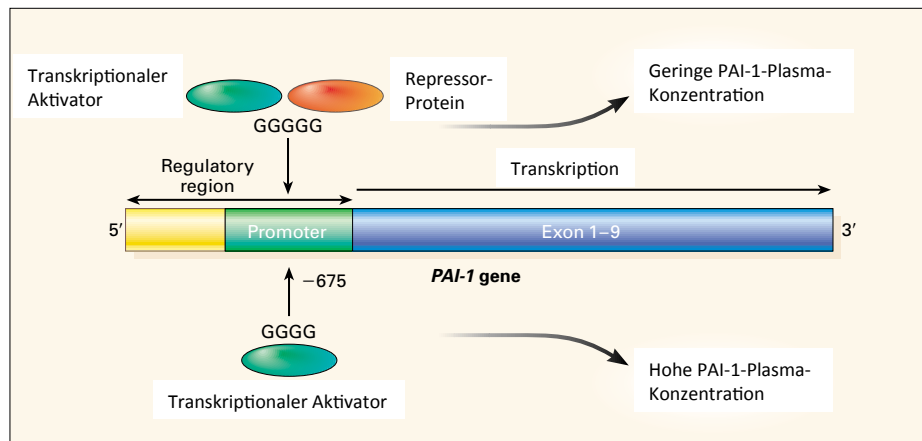


Abbildung 3: Mögliche Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus für die Bindung von Transkriptionsfaktoren im PAI-1 Promotor. Abb. nach Kohler et al. modifiziert: Plasminogen-Aktivator Inhibitor Typ 1 and Coronary Artery Disease, *The New England Journal of Medicine*, 2000.

Erkrankungen, wie der Meningokokkensepsis, sowie bei schweren Traumata (HERMANS et al., 2005). Zudem wurde eine Korrelation des 4G/4G-Genotyps mit der Inzidenz des Prostatakarzinoms (HAAS et al., 2010) sowie mit der Inzidenz des Mammakarzinoms (ZHANG et al., 2006) beschrieben. Das 4G-Allel wurde in Kombination mit einer Faktor V Leiden-Mutation in Zusammenhang mit einer tiefen Beinvenenthrombose beschrieben (FRANCIS, 2002) und mit einer höheren Anfälligkeit für eine Pneumonie (YENDE et al., 2007). In einer Metaanalyse von Wang et al., die den 4G/5G-Polymorphismus im Zusammenhang mit der Inzidenz verschiedener Krebserkrankungen untersuchte, ermittelten die Autoren eine Korrelation zwischen dem 4G-Allel und einer erhöhten Inzidenz, an einem Kolon- oder Endometriumkarzinom zu erkranken (WANG et al., 2005).

1.7 PAI-1 im Plasminogen-Aktivator-System und Tumorentstehung

1.7.1 Zelladhäsion, Zellmotilität und Zellmigration

PAI-1 kommt bei der Tumorgenese eine multifunktionale Rolle zu: Regulation der Zelladhäsion, Migration und Invasion sowie der Proliferation durch Inhibition der Apoptose und Tumorprogression, letzteres vor allem infolge Beeinflussung der Angiogenese (CRAEN et al., 2012). Der Wirkungsmechanismus von PAI-1 ist komplex und abhängig von vielen Faktoren wie beispielsweise der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, der Expressionsrate von uPAR, Integrinen und Rezeptoren, die der Internalisierung dienen, oder der Quantität an Vitronektin, wovon dann auch proteolytische bzw. nicht-proteolytische Effekte abhängen, die in unterschiedlichen Zellen zugleich vorkommen können (CRAEN et al., 2012). Der komplexe Wirkungsmechanismus des Plasminogen-Aktivator-Systems könnte die Ursache der diesbezüglich voneinander abweichenden Forschungsergebnisse sein (CRAEN et al., 2012).

Die Wirkung von PAI-1 auf die Tumorprogression lässt zunächst aufgrund der inhibitorischen

Wirkung von uPA einen protektiven Effekt auf die Degradation der EZM vermuten. Allerdings legen der Nachweis erhöhter PAI-1-Konzentrationen in malignen Mammakarzinomzellen (REILLY et al., 1992) sowie der Einfluss erhöhter PAI-1-Konzentrationen im Tumorgewebe auf eine ungünstige Prognose, eine die Tumorprogression positiv beeinflussende Wirkung, nahe (HARBECK et al., 2004). Der Einfluss von PAI-1 auf die Zellmotilität, unabhängig von seiner inhibitorischen Wirkung auf uPA, hängt zum einen von der kompetitiven Bindung via der Somatomedin B-Domäne und RGD-Sequenz an Vitronektin ab, was die Loslösung der Integrin- und uPAR-vermittelten Adhäsion der Zellen an Vitronektin zur Folge hat (DELLAS et al., 2005), und zum anderen von der von Vitronektin unabhängigen Trennung der Zell-Matrix-Interaktion durch Bindung an den uPA/uPAR-Komplex, wodurch durch die Ausbildung des uPA/uPAR/PAI-1-Komplexes und die folgende Interaktion mit Integrin die rasche Internalisierung via LDL-Rezeptor stattfindet, was eine schnelle Loslösung der beiden Rezeptoren von der EZM ermöglicht.

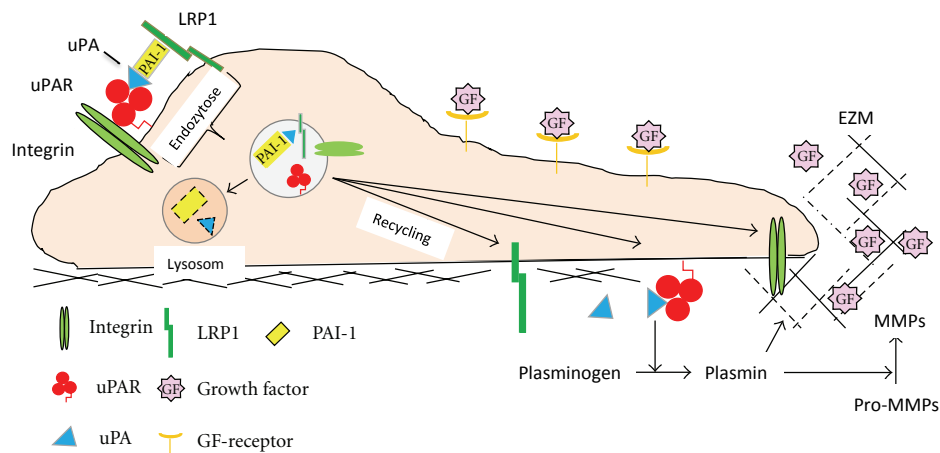


Abbildung 4: Darstellung einer gerichteten Zellmigration. Die Fortbewegung der Zelle ist durch eine Ablösung der Zelle von der Matrix bei gleichzeitiger Zelladhäsion an den entgegengesetzten Polen der Zelle möglich. Nach Czekay et al. modifiziert: PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration, *International Journal of Cell Biology*, 2011.

Diese Internalisierung des uPA/uPAR/PAI-1/Integrin/LRP1-Komplexes führt nicht nur zu einer Trennung der Zell-Matrix-Interaktion, sondern ermöglicht der Zelle eine gerichtete Migration durch Exozytose der internalisierten Rezeptoren nach Transzytose am führenden Pol der Zelle (Abb. 4) (DELLAS et al., 2005). Dies führt zum einen erneut zu einer Stabilisierung der Zelle innerhalb der EZM, aber auch zu einer weiteren lokalen Degradation der EZM. Zudem konnte durch die Arbeitsgruppe von Degryse et al. der Einfluss von PAI-1 in Abhängigkeit seiner Konzentration auf die Zellform und Umstrukturierung des Zellskeletts *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Wirkung entfaltet sich über chemotaktische Bindung eines Lipoprotein Receptor-related Proteins (LRP) mit Signaltransduktion via Jak/Stat-Signalkaskade. Niedrige PAI-1-Konzentrationen induzieren die Migration, wohingegen hohe Konzentrationen die Migration verhindern (DEGRYSE et al., 2004).

1.8 Tumorangiogenese, Tumorprogression und Tumormetastasierung

PAI-1 wird für die Neo-Angiogenese bei der Tumorprogression eine Bedeutung zugesprochen. Es wird hierbei von Tumorzellen selbst, aber auch von Fibroblasten, Endothelzellen oder Entzündungszellen exprimiert, welche die Tumorzellen umgeben. Damit Angiogenese stattfinden kann, sind eine gerichtete Migration und Proliferation von Endothelzellen und weitere proteolytische Schritte für die Kapillaraussprossung erforderlich (ANDREASEN et al., 2000, BINDER et al., 2008). Die Bedeutung von PAI-1 für die Tumorangiogenese wurde durch die Arbeitsgruppe von Bajou an einem inaktivierten PAI-1-Gen-Mausmodell nachgewiesen. In Abwesenheit von PAI-1 blieb in dieser Untersuchung die Tumorkapillarisation aus, wohingegen nach Zugabe von PAI-1 die Kapillaraussprossung stattfand. Zudem legten sie durch in vitro Untersuchungen die Vermutung nahe, dass für die Migration und Kapillaraussprossung eine kontrollierte Proteolyse stattfinden muss, da unter einer exzessiven Proteolyse keine Neoangiogenese beobachtet wurde (BAJOU et al., 1998).

Diese Annahme wurde kurze Zeit später durch Devy et al. durch in vitro Untersuchungen bestätigt. Devy et al. postulierten, dass PAI-1 während der Angiogenese die uPA-abhängige proteolytische Aktivität und damit die Zellmigration kontrolliert, allerdings nur in einer physiologischen Konzentration (DEVY et al., 2002). Erhöhte PAI-1-Konzentrationen hingegen wiesen einen anti-angiogenen Effekt auf, was zu der Annahme führte, dass aufgrund der unkontrollierten Proteolyse keine präzise Anordnung der Endothelzellen für eine Gefäßneubildung erfolgen kann (BAJOU et al., 1998, CZEKAY et al., 2011, BAJOU et al., 2004). Induziert und koordiniert wird die Neovaskularisation durch den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der beispielsweise durch Hypoxie von Tumorzellen exprimiert wird (BINDER et al., 2007). Endothelzellen müssen sich für die Gefäßneubildung zunächst aus einem Zellverband lösen und sich nach dem uPA/uPAR-abhängigen „proteolytischen Führungsende“ für eine gerichtete Migration ausrichten (BINDER et al., 2007). Eine gerichtete Migration der Endothelzellen ist durch die VEGF-induzierte uPAR-Expression am Führungsende der Zelle möglich, wodurch zunächst eine uPA-abhängige Proteolyse stattfindet, worauf nach zusätzlicher Bindung von PAI-1 sowie möglicherweise Integrin an den uPA/uPAR-Komplex via LDL-Rezeptor eine Internalisierung des Komplexes erfolgt und uPAR recycelt an dem führenden Teil der Zelle wieder exprimiert wird (PRAGER et al., 2004, BINDER et al., 2007).

Der Einfluss von PAI-1 auf die Proliferation von Tumorzellen wird zum einen auf seine in vitro nachgewiesene antiapoptotische Wirkung zurückgeführt, zum anderen auf eine in MCF-7 Brustkrebszellen beschriebene Ausbildung des uPA/uPAR/PAI-1-Komplexes, die zur Auslösung einer Signaltransduktion via Erk-Signalweg mit folgender Proliferation führt (SCHNEIDER et al., 2008, LADEMANN et al., 2008).

KAPITEL 2

Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Bedeutung des 4G/5G-single nucleotide-Polymorphismus des PAI-1-Gens für die Entwicklung und die Progression des primären invasiven Mammakarzinoms zu untersuchen.

Zum einen untersuchte ich einen möglichen Zusammenhang zwischen Genotyp-Häufigkeit und Mammakarzinom-Inzidenz und verglich dazu die Verteilung der drei 4G/5G-Genotypen innerhalb einer Gruppe von Mammakarzinompatientinnen mit der innerhalb einer Kontrollgruppe. Zum anderen ermittelte ich, ob der Polymorphismus eine Rolle beim Krankheitsverlauf spielt und ob er für die Malignität des Tumors, gekennzeichnet durch die klassischen klinisch-pathologischen Parametern, von Bedeutung ist. Auch analysierte ich, inwieweit der 4G/5G-Polymorphismus die Expression von PAI-1 im Tumorgewebe beeinflusst.

KAPITEL 3

Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Chemikalien

Agarose:	SERVA standard EEO, Heidelberg
Ammonium acetat (NH_4 Ac):	10 M NH_4 Ac, AppliChem GmbH
Chloroform:	AppliChem, Darmstadt
Ethanol:	70 Vol-%, BIOMEL GmbH Dessau
Ethidiumbromid Lösung:	1% (10 mg/ml) Stammlösung; Arbeitslösung: 0,1% in H_2O
Isopropanol:	100 Vol-%, ROTH, Karlsruhe
Phenol äquilibriert, stabilisiert:	AppliChem, Darmstadt
Chloroform: Isoamylalkohol 25:24:1:	AppliChem, Darmstadt

Lösungen

Aqua:	10 ml Ampullen, Ampuwa, Bad Homburg
PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung):	1,5 M NaCl, 0,03 M KCl, 0,08 M Na_2HPO_4 , 0,01 M KH_2PO_4 pH 7,5
Proteinkinase-K-Puffer:	50 mM Tris, pH 7,6, (2,5 ml von 1 M Stammlösung); 25 mM EDTA (2,5 ml von 1 M Stammlösung); 0,5% NP40 (1,25 ml von 20%iger Stammlösung); 0,5% SDS (1,25 von 20%iger Stammlösung)
5 x TBE-Puffer (Elektrophoreselaufpuffer):	27,5 g Borsäure, 54 g TRIS Base, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) auf 1 Liter deionisiertem H_2O Arbeitslösung: 0,5-fach TBE
TE-Puffer:	10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 7,5

Enzyme

BsI1:	10,000 U/ml; BioLabs (RO555L)
Proteinkinase-K:	20 mg/ml in TE-Puffer gelöst
RNase:	10 mg/ml in Storge-Buffer
GoTaq® Green Master Mix, 2X:	GoTaq® DNA Polymerase in 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl ₂ ; Promega, USA

Primer

PAI-BsiY1-Forw1 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' (29 pmol/µl, 22-mer)
PAI-BsiY1-Forw3 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGTGGGGG-3' (30 pmol/µl, 27-mer)
PAI-BsiY1-Rev 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3' (30 pmol/µl, 21-mer)

Eurofin-MWG-Biotech AG, Ebersberg
Alvarez-Millán et al. 2002

PAI-5G/Blasiak-F 5'-GTCTGGACACGTGGGGG-3' (39 pmol/µl, 17-mer)
PAI-4G/Blasiak-F 5'-GTCTGGACACGTGGGGA-3' (36 pmol/µl, 17-mer)
PAI-Blasiak-Rev 5'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG-3' (28 pmol/µl, 25-mer)

Eurofin-MWG-Biotech AG, Ebersberg
Blasiak et al. 1999

DNA-Ladder

BENCH TOP ladder 100 bp, Promega
Mass Ruler, DNA Ladder Mix, ready-to-use (80-10.000 bp), Fermentas
pUC Mix Marker 8 (19-1118 bp), Fermentas, O'Range
Ruler™ 50 bp DNA-Ladder, ready-to-use (Fermentas),
O'Range Ruler™ 20 bp DNA-Ladder, ready-to-use (Fermentas),
O'Range Ruler™ 100+500 bp DNA- Ladder, ready-to-use (Fermentas)

Kits

Wizard® Genomic
DNA Purification Kit: Promega

Geräte

Elektrophoresekammer:	Whatman Biometra® (Biometra GmbH Göttingen, Germany)
Inkubationsbad:	GFL®, Burgwedel
Mikrowelle:	Bosch
Mischungsgerät/Inkubator:	Thermomixer comfort 1, 5 ml (Eppendorf, Germany)
PCR-Prozessor:	Whatman Biometra®, T-Gradient, Software-Version 4.00, Biometra GmbH, Göttingen
Pipetten:	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe:	pipetus-akku, Pipettboy®, Hirschmann, Eberstadt
Schüttler:	HyperShaker, neoLab, Heidelberg
Sicherheitswerkbank:	Hera safe, Kendro Laboratory Products
Spannungsgerät:	Whatman Biometra®, Standard Power Pack P25, Biometra GmbH Göttingen
Spectrophotometer:	PharmaciaBiotech, Ultrospec 1000, Cambridge
Waage:	Scaltec SPB62, Göttingen
Zentrifugen:	Biofuge pico, Kendro Laboratory Products, Germany Micro Cenfuge 6.000 RPM, Carl Roth®, Taiwan

Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Safe Lock Tubes 2,0 ml:	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 ml:	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe Lock Tubes 0,5 ml:	Eppendorf AG, Hamburg
Handschuhe:	Transaflex®, Latex-Handschuhe Wehrheim Nitra-Tex®, Nitrile, UK
Pipettenspitzen:	Eppendorf, Hamburg

3.2 Patientenkollektiv

Das Kollektiv, welches für die Untersuchung des 4G/5G-Polymorphismus im PAI-1-Gen zur Verfügung stand, umfasste 104 Mammakarzinom-Patientinnen, die im Zeitraum zwischen 2004 bis 2007 an der Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erstdiagnostiziert und therapiert wurden, und deren Gewebeproben im Zuge ihrer Behandlung gewonnen wurden und mit schriftlicher Einwilligung der Patientinnen für weitere wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung standen. Einschlusskriterium war der Nachweis einer malignen Tumorerkrankung der Brustdrüse mit Erstdiagnose im oben genannten Zeitraum.

Das mittlere Alter der Patientinnen betrug bei Erstdiagnose 57 Jahre, wobei die jüngste Patientin 33 und die älteste 88 Jahre alt war. Der Altersmedian lag bei 52 Jahren. 65% der Patientinnen waren

bei Erstdiagnose über 50 Jahre alt. In 85,6% der Fälle handelte es sich um duktales intraepitheliales Neoplasien (DIN) – diese wiederum zu 91% im T1- und T2-Stadium -, was etwas über der in der Literatur angegebenen Häufigkeitsverteilung von 65-80% liegt (ZIELINSKI et al., 2004). Die verbleibenden 14% entfielen auf lobuläre intraepitheliale Neoplasien (LIN, 9,62%), medulläre und tubuläre Mammakarzinomentitäten (4,8%). Die Häufigkeitsverteilung einer lobulären intraepithelialen Neoplasie wird in der Literatur mit ca. 10-15% angegeben (HARBECK et al., 2002a). Die Histologie wurde vom Institut für Pathologie der medizinischen Fakultät der Universität Halle ermittelt.

Hinsichtlich des Gradings wiesen 61,5% der Frauen einen mäßig differenzierten (G2) Tumor und 22,12% einen schlecht differenzierten (G3) Tumor auf. Diese Daten sind ebenfalls annähernd vergleichbar mit den Daten des Tumorzentrums in München (G1-Status in 11,8%, G2-Status in 55,3% und G3-Status in 32,8%) (Tab. 1)(MAYR et al., 2011).

Die Östrogen (ER)- und/oder Progesteronrezeptor (PR)-positiven Tumoren stellten in dieser Arbeit die Mehrzahl der Mammakarzinomentitäten dar. 82% der Frauen waren positiv für den Östrogenrezeptor, 68% für den Progesteron-Rezeptor und 66% der 104 Fälle waren positiv für beide Hormonrezeptoren. Diese Daten entsprechen ebenso ungefähr denen, die von Harbeck et al. 2002 mit etwa 75% dokumentiert wurden (HARBECK et al., 2002a). Der HER2/neu positive Status des Patientenkollektivs liegt mit 18,3% knapp unter der in der Literatur angegebenen Häufigkeitsverteilung von 25- 30% (SLAMON et al., 1987, ROSS et al., 2009).

Insgesamt drei der 104 Patientinnen wiesen bei Diagnosestellung bereits Metastasen auf. Aufgrund dieser geringen Anzahl wurde das Vorliegen von Metastasen statistisch nicht gesondert berücksichtigt. Tabelle 1 fasst die Verteilung der wichtigsten prognostischen und prädiktiven Faktoren innerhalb des Patientenkollektivs zusammen.

Von 91 Patientinnen, die zum Teil in die derzeit noch fortlaufende NNBC-3-Studie eingeschlossen waren, lagen uPA/PAI-1-Werte vor, die im Labor der Gynäkologie am Universitätsklinikum Halle (Saale) mittels ELISA aus frischem Tumorgewebe bestimmt wurden. Diese Werte wurden mit in diese Arbeit aufgenommen und mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen.

3.3 Kontrollkollektiv

Als Kontrollgruppe wurden 104, im Alter der Testgruppe gleichende und in sonstigen Kriterien zufällig ausgewählten, gesunde Frauen ausgewählt, die als Patientinnen in der Abteilung für Urogynäkologie des Universitätsklinikums Halle aufgrund einer gutartigen Erkrankung in Behandlung waren, sowie gesunde Frauen, die Blut im Institut für Transfusionsmedizin gespendet hatten. Das Durchschnittsalter der Frauen in der Kontrollgruppe lag bei 56,8 Jahre und ist damit mit dem Durchschnittsalter der Frauen im Patientenkollektiv vergleichbar. Hierbei war die jüngste Patientin 32 Jahre und die älteste Patientin 83 Jahre alt. Der Altersmedian lag bei 56 Jahren.

3.4 Brustkrebszelllinien

Um die Methoden zur Bestimmung des 4G/5G-Polymorphismus im Promotorbereich des PAI-1-Gens zu etablieren, wurden drei verschiedene humane Brustkrebszelllinien verwendet (American Type Culture Collection, www.atcc.org): MDA-MB-231, MCF-7 und SK-BR-3. Die Arbeitsgruppe von Sheridan et al. charakterisierten diese Brustkrebszelllinien anhand ihres Genexpressionsprofils und ordneten sie einem Brustkrebs-Subtypen zu (SHERIDAN et al., 2006). Die tripel-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wird dem mesenchymalen Zelltyp (bzw. Basal-like-Typ) eines Adenokarzinoms zugeordnet. SK-BR-3 ist eine Brustkrebszelllinie, die dem luminalen Zelltyp eines Adenokarzinoms mit positiver HER2/neu-Expression und negativem Hormonrezeptorstatus zuzuordnen ist. Bei der Brustkrebszelllinie MCF-7 handelt es sich um eine Zelllinie, die einem infiltrierenden duktalem Adenokarzinom mit luminaler Zelltypklassifikation mit positiver Expression des Östrogenrezeptors.

3.5 Bestimmung der PAI-1 und uPA-Protein-Konzentration im Tumorgewebe

Bestimmt wurden die uPA- und PAI-1-Protein-Konzentrationen aus dem Operationspräparat des Primärtumors (100-300 mg Frischgewebe) oder aus Stanzbiopsien (10 bis 50 mg). Das Frischgewebe wurde schockgefroren, durch einen Dismembrator pulverisiert und in einem Triton-X-haltigen Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde die uPA- und PAI-1-Protein-Konzentration mittels eines kommerziellen ELISA-Tests (FEMTELLE® uPA/PAI-1 Test von American Diagnostica GmbH, Pfungstadt) bestimmt. Bezogen auf den Gesamtproteingehalt (BCA-Proteinbestimmung, Pierce) im Tumorgewebe wird die uPA- und PAI-1-Protein-Konzentration in ng/mg Gesamtprotein angegeben.

Tabelle 1: Übersicht der Verteilung prognostischer und prädiktiver Faktoren des Patientenkollektivs

Merkmale	Fallzahl	in %
Patientinnen gesamt	104	100,0
Alter (Jahre)		
< 50	37	35,6
> 50	67	64,4
Nodalstatus		
Negativ	68	65,4
Positiv	36	34,6
Histologie		
Duktal	89	85,6
Lobulär	10	9,6
Andere	5	4,8
Tumorgröße		
T1	57	54,8
T2	38	36,5
T3/T4	9	8,7

Weiter auf nächster Seite...

Tabelle 1 – Fortsetzung von letzter Seite.

Merkmale	Fallzahl	in %
ER-Status		
Negativ	19	18,3
Positiv	85	81,7
PR-Status		
Negativ	34	32,7
Positiv	70	67,3
HER2/neu		
Negativ	85	81,7
Positiv	19	18,3
Grading		
G1	17	16,3
G2	64	61,5
G3	23	22,1

3.6 Isolierung genomischer DNA und PAI-1-4G/5G-Genotypisierung

Die DNA-Isolierung zur PAI-1 4G/5G-Genotypisierung erfolgte aus Leukozyten, die als Buffy Coat von Patientinnen und gesunden Frauen zur Verfügung standen. Zudem erfolgte zum Teil die zusätzliche Genotypisierung aus Tumorgewebe (Biopsat oder Tumorsektat), welches in Form von Zellpellets zur Verfügung stand. Die Aufarbeitung des Tumorgewebes wurde im gynäkologischen Labor des Universitätsklinikums Halle (Saale) durchgeführt. Nach operativer Entfernung wurde das Tumorgewebe in Stickstoff schockgefroren, anschließend im gefrorenen Zustand in einem Mikro-Dismembrator pulverisiert und bei -80°C gelagert.

Eine Genehmigung für diese Untersuchungen durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg lag vor.

3.6.1 DNA-Isolierung aus Tumorgewebe

Bei der Isolierung genomischer DNA aus dem Zellpellet des Tumorgewebes und der Brustkrebszelllinien wurde folgendes Verfahren angewandt: Nach Auftauen des Zellpellets und Rehydrierung in 1% Triton-X-haltigem TBS (Tris-buffered saline) wurde dieses zur Waschung in 1,8 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer) aufgenommen (2 ml Röhrchen) und vorsichtig mit einer Pipette in Lösung gebracht. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde der Überstand verworfen und nochmals 1,0 ml PBS-Puffer dazugegeben. Ein weiteres Mal wurde eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Nach Überführung des nach Zentrifugation erhaltenen Zell-Pellets in ein 1,5 ml Röhrchen wurden $400\mu\text{l}$ Proteinkinase-K-Puffer sowie $15\mu\text{l}$ des Enzyms Proteinkinase-K dazugegeben, um die Zellmembran- und Zellkern-Lyse, die Denaturierung sowie den Verdau der Proteine bei einer mindestens dreistündigen Inkubation bei 56°C zu erreichen. Um die denaturierten Proteine von der DNA zu trennen, wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion angewandt, bei der die Nukleinsäurelösung

nacheinander mit jeweils einem Volumen von 500 μ l Phenol, Phenol-Chloroform-Gemisch und Chloroform ausgeschüttelt wird. Zwischen den Arbeitsschritten wurde jeweils zentrifugiert und die obere wässrige Phase mit der DNA abpipettiert.

Das erhaltene DNA-Lysat von ca. 300 μ l wurde mittels 3 M NH_4 Ac (100 μ l) und Isopropanol (800 μ l) über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde das DNA-Pellet in 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Aufgenommen wurde das DNA-Pellet in 10 μ l H_2O (Aqua) und zur vollständigen Lösung der hochmolekularen DNA über Nacht bei -4 °C inkubiert.

Ein weiterer Reinigungsschritt der genomischen DNA war eine Behandlung mit 2 μ l RNase I (10 mg/ml) pro 10 μ l DNA-Lösung für 10 Minuten bei 37 °C. Die so isolierte genomische DNA lag zum größten Teil in Fragmentlängen von 50 bis 100 Kilobasen (kb) vor. Zwei Mikroliter dieser Lösung wurden in 98 μ l TE-Puffer für die Konzentrationsbestimmung am Spektralphotometer eingesetzt. Eine Quantifizierung der DNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Ein OD-Wert von eins entspricht einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{l/ml}$. Die Reinheit der DNA wurde über den Quotienten $^{260\text{ nm}}/^{280\text{ nm}}$ errechnet. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 wurde davon ausgegangen, dass die DNA rein ist. Um die Qualität der genomischen DNA zu untersuchen, wurde die DNA in einer Gelelektrophorese (1,8% Agarosegel, zunächst 10 Minuten bei 25 V, anschließend 20 Minuten bei 45 V) aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht (nach MCDONELL et al., 1977). Als qualitativ gute genomische DNA wurde jene angesehen, die sich als hochmolekulare DNA im Gel darstellte.

3.6.2 DNA-Isolierung aus Leukozyten

500 μ l Buffy Coat wurden zusammen mit 1500 μ l Cell Lysis Solution (Erythrozyten-lyisierende Lösung) in ein 2 ml Röhrchen pipettiert, vorsichtig gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und intermittierend leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension bei Raumtemperatur mit 13.000 rpm für 20 Sekunden zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet (weiße Blutzellen) wurde durch kurzes Vortexen wieder in Suspension gebracht und für die Zellkern-Lyse in 300 μ l „Nuclei Lysis Solution“ in 1,5 ml Röhrchen überführt. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde die Lösung gemischt und bei 37 °C inkubiert, um eine visköse Lösung ohne größere sichtbare Bestandteile zu erhalten. Im nächsten Schritt wurden 1,5 μ l RNase I zugefügt und bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Zur weiteren Bearbeitung musste die Lösung wieder Raumtemperatur erreichen, um dann 100 μ l „Protein Precipitation Solution“ zuzugeben. Nach 20 Sekunden vortexen und 3 Minuten Zentrifugation bei 13.000 rpm konnte der Überstand für die DNA-Fällung in ein neues 1,5 ml Röhrchen mit 300 μ l Isopropanol überführt werden. War eine vollständige Trennung der Proteine von der DNA nicht möglich, wurde eine zusätzliche Phenol-Chloroform-Extraktion vor der DNA-Fällung durchgeführt. Die DNA wurde durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm als weißes Pellet sichtbar und mit demselben Volumen 70%igen Ethanols gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation (13.000 rpm

für 1 Min.) wurde die DNA bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet, anschließend in 20 µl „Rehydration Solution“ aufgenommen und bei 4 °C über Nacht gelöst.

3.7 Ermittlung des Genotyps

Um den Genotyp auf den 4G/5G-Polymorphismus im Promotorbereich des PAI-1 Gens auf Chromosom 7 (7q21.3-q22) zu bestimmen, wurde eine konventionelle Genotyp-Determination mittels Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließender restriktionsenzymatischer Aufspaltung per Bsl-1-Enzym durchgeführt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Vorlage zur Etablierung des Verfahrens dienten die Publikationen von Alvarez-Millán et al., 2002, und Blasiak et al., 1999, die zum Teil modifiziert wurden. Für die Etablierung der Methoden wurden humane Brustkrebszelllinien verwendet. Die Methoden wurden von mir zusammen mit Nicole Tscheppan etabliert.

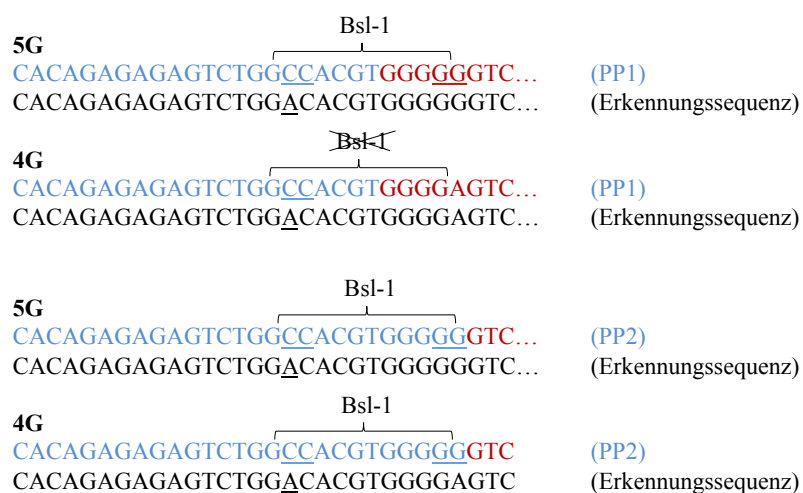
3.7.1 Methode 1 (modifiziert nach ALVAREZ-MILLÁN et al., 2002)

Zunächst wurde eine 98bp. (4G) bzw. 99bp (5G)-lange DNA im Bereich der Nukleotide an der Stelle -675 mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer

5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' (forward 1; -697/-676) und

5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3' (reverse; -598/-619) eingesetzt. Der „upstream primer“ (PP1) war so modifiziert (...CCACGT statt...AACGT wie im PAI-1 Promotor), dass Bsl-1 (Erkennungssequenz: CCNNNNNNNGG) beim Vorliegen des 5G-Genotypes schneiden konnte. Um zu prüfen, dass das Enzym prinzipiell schneiden kann, wurde parallel für jede DNA noch eine zweite PCR mit einem alternativen Primer

5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGTGGGGG-3' (forward 2; -697/-669) durchgeführt. Dieser Primer enthielt bereits die Bsl-1 Bindungsstelle. Das Bsl-1-Enzym sollte daher die mit diesem Primer entstandene DNA vollständig schneiden:



Der PCR-Mastermix setzte sich aus 18 µl H₂O, 9 µl des jeweiligen Primerpaares und 54 µl Go Taq® Green Master Mix (Promega) zusammen. Pro Amplifikationsansatz wurden 10 µl Mastermix und 2 µl der jeweiligen DNA (50 ng/µl) in ein 0,5 ml-Röhrchen gegeben, in einer Mikrozentrifuge bei 6.000 rpm kurz zentrifugiert und anschließend die Amplifikation (40 Zyklen) in einem Thermocycler bei folgenden PCR-Bedingungen ermöglicht:

- Hot Start bei 95°C für 2 Minuten
- Denaturierung bei 95°C für 1 Minute
- Hybridisierung bei 60°C für 60 Sekunden
- Synthese bei 72°C für 2 Minuten
- Stopp bei 4°C

Als Negativkontrolle wurde der Mastermix alleine ohne DNA unter denselben Bedingungen inkubiert. Für den Bsl-1 Verdau der DNA wurde ein Verdau-Mastermix angesetzt: 66 µl H₂O plus 9,5 µl Bsl-1-Restriktionsenzym (10.000 U/ml). 6 µl des PCR-Produktes und 4 µl des Verdau-Mastermixes wurden pro Verdau angesetzt und für eine Stunde bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Die Restriktionsfragmente und der Rest ungeschnittener PCR-Produkte wurden auf einem 2,1% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (160 V für 45 Minuten) und das Bandenmuster dokumentiert. Die Auswertung des Gels wurde folgendermaßen vorgenommen (vgl. Abb. 5) Zunächst wurde anhand der DNA-Leiter die Fragmentgröße festgestellt. Beim Vorliegen eines 5G-Allels konnte neben des 99bp zusätzlich ein kürzeres DNA-Fragment von 85bp identifiziert werden. Beim 5G/5G-homozygoten Genotypen war nur das 85bp-Fragment sichtbar.

3.7.2 Methode 2 (modifiziert nach BLASIAK et al., 2000b)

Das Prinzip dieser Methode nach Blasiak et al. zur PAI-1 4G/5G-Genotypisierung beruht auf Sequenzunterschied in den „forward“ Primern. Zwei allel-spezifische Primer wurden eingesetzt: Der 5G-Primer detektiert 5G-Abfolge: 5'-GTCTGGACACGTGGGGG-3', der 4G-Primer die 4G-Abfolge gefolgt von einem Adenin: 5'-GTCTGGACACGTGGGGA-3'. In beiden Fällen fungierte als „reverse“ Primer: 5'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG-3':

forward Primer - 5G: GTCTGGACACGTGGGGG

forward Primer - 4G: GTCTGGACACGTGGGGA

Die Amplifizierung (40 Zyklen) erfolgte nach folgenden PCR-Bedingungen:

- Hot Start bei 95°C für 2 Minuten
- Denaturierung bei 94°C für 1 Minute
- Hybridisierung bei 64°C für 30 Sekunden
- Elongation bei 72°C für 40 Sekunden
- Stopp bei 4°C

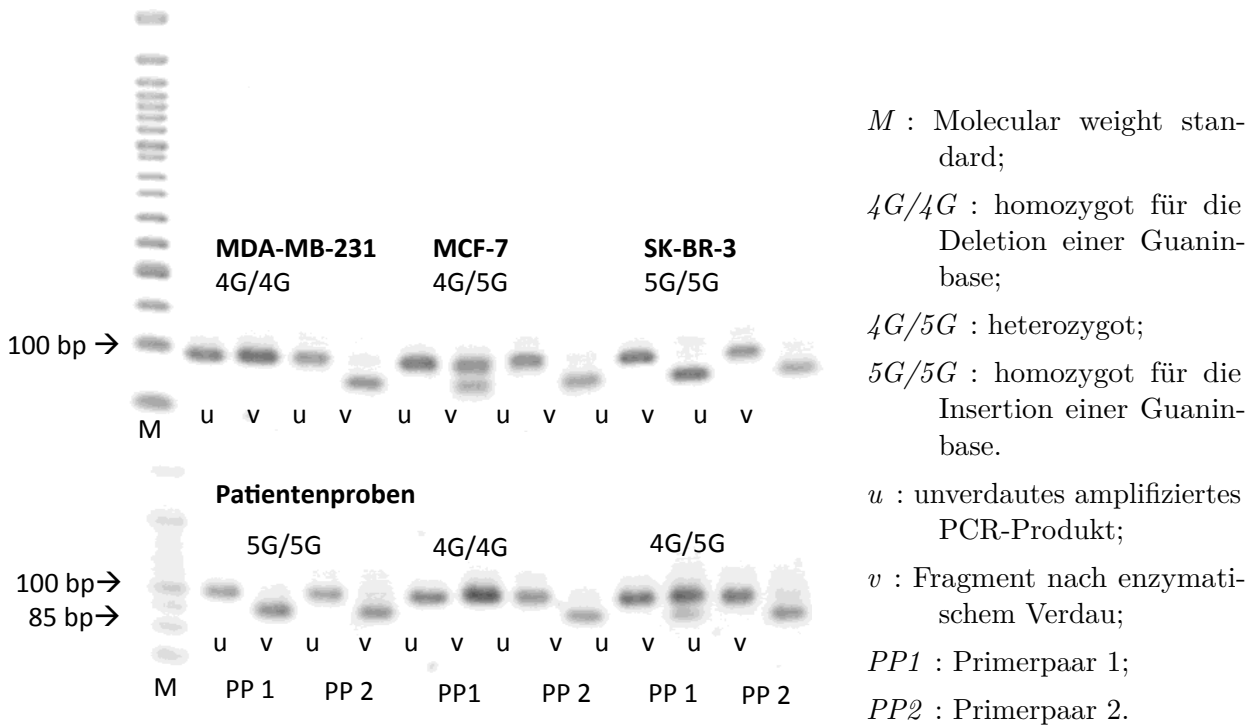


Abbildung 5: PAI-1 4G/5G-Genotypisierung nach Alvarez et al.

In der anschließenden Analyse mittels Gelelektrophorese war nur dann ein PCR-Produkt sichtbar, wenn zu dem jeweils eingesetzten Primer das zugehörige Allel in hetero- oder homozygoter Form im Genom der jeweiligen untersuchten Zelllinie bzw. dem jeweiligen Probanden vorlag (Abb. 6).

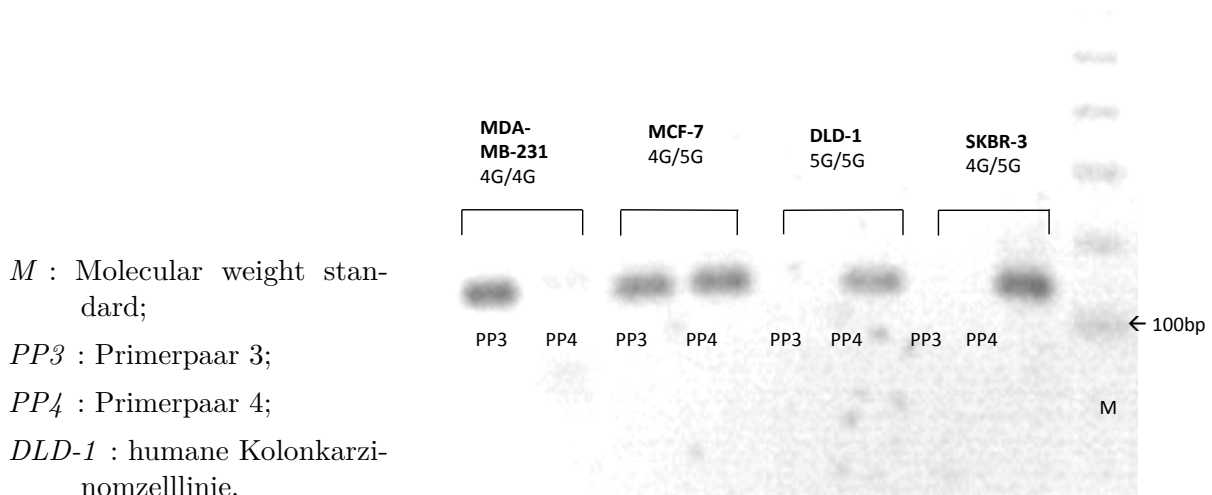


Abbildung 6: PAI-1 4G/5G-Genotypisierung nach Blasiak et al.

Beide Untersuchungsmethoden (nach Blasiak und Alvarez) ergaben die gleichen Ergebnisse. Nach Etablierung beider Methoden wurden weitere Untersuchungen nach der Methode von Alvarez et al. durchgeführt.

3.8 Statistik

Der Zusammenhang zwischen PAI-1- bzw. uPA-Konzentration und dem Genotyp wurde einerseits mittels univariater Varianzanalyse mit Post-hoc-Test nach Bonferroni, andererseits nach Einteilung der Proteinkonzentration in Gruppen (ober- und unterhalb definierter Schwellenwerte) mittels χ^2 -Tests berechnet.

Die Assoziation zwischen Genotyp und Allelfrequenzen des 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus und klinisch-pathologischen Parameter wurden mithilfe des χ^2 -Tests korreliert. Das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 festgelegt. Die Ergebnisse aller Tests sollten exploratorisch interpretiert werden. Mittels univariater Analyse durch Kaplan-Meier-Schätzung wurde das ereignisfreie Überleben ab Diagnosestellung in den verschiedenen Allelfrequenzen (4G/4G, 4G/5G, 5G/5G, 4G, 5G) ermittelt. Ereignisse waren hierbei als das Auftreten von Rezidiven, Metastasen oder Tod definiert. Für die statistischen Kalkulationen wurde das Programm Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) in der Version 15 verwendet.

Zur Berechnung des Hardy-Weiberg-Equilibriums wurde die DeFinetti-Software verwendet, die kostenlos vom Institut für Humangenetik der Technischen Universität München und dem Helmholtz-Zentrum¹ zur Verfügung gestellt wird.

Schließlich wurde in einer follow up-Studie die Überlebenswahrscheinlichkeit abhängig von Genotyp, Proteinkonzentrationen und klinisch-pathologischen Faktoren durch Logrank-Tests berechnet.

1 <http://ihg.gsf.de>

KAPITEL 4

Ergebnisse

4.1 PAI-1-4G/5G-Genotypisierung von Brustkrebszelllinien

Zunächst wurde der PAI-1-4G/5G-Genotyp für die Brustkrebszelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und SK-BR-3 bestimmt. Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wies eine Homozygotie für das 4G-Allel auf, MCF-7 ist heterozygot und SK-BR-3 zeigt eine Homozygotie für das 5G-Allel (Tab. 2).

Tabelle 2: Genotypen der Brustkrebszelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und SK-BR-3

Brustkrebszelllinie	Genotyp
MDA-MB-231	4G/4G
MCF-7	4G/5G
SK-BR-3	5G/5G

4.2 Allel- und Genotypfrequenz des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem PAI-1 4G/5G-Polymorphismus und der Inzidenz des Mammakarzinoms zu untersuchen, erfolgte eine Genotypisierung bei einer Gruppe von 104 Brustkrebspatientinnen und einer Kontrollgruppe von 104 Probandinnen, die nicht an einem Mammakarzinom erkrankt waren.

Unter den 104 Patientinnen wiesen 35 den Genotyp 4G/4G (33,7%) auf, 50 hatten den Genotyp 4G/5G (48%) und 19 den Genotyp 5G/5G (18,3%). Die Häufigkeit des 4G- und 5G-Allels betrug entsprechend 57,7% bzw. 43,3%. Im Vergleich zu den nicht an einem Mammakarzinom erkrankten Frauen ergab sich kein wesentlicher Unterschied in der Verteilung des Genotyps und der Allelfrequenz. 51 der Frauen in der Kontrollgruppe wiesen den 4G/5G-Genotyp (49,0%) auf, 32 hatten den Genotyp 4G/4G (30,8%), und bei 20,2% der Frauen wurde der 5G/5G-Genotyp identifiziert. Hinsichtlich der Allelverteilung lag das 4G-Allel etwas häufiger (57,7%) im Vergleich zu dem 5G-Allel (42,3%) vor (Tab. 3).

Die Verteilung der Allele befand sich innerhalb des Hardy-Weinberg-Äquilibrium ($p=0,934$ für Kontrollen und $p=0,877$ für Patientinnen).

Mittels Chi-Quadrat-Tests wurde die Chance, an einem Mammakarzinom in Abhängigkeit des jeweiligen Genotyps zu erkranken, berechnet. Dabei wurden der 4G/4G- und der 4G/5G-Genotyp

Tabelle 3: Allel- und Genotypfrequenz des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus bei Patientinnen mit Mammakarzinom und bei Probandinnen der Kontrollgruppe

	Brustkrebs-Patientinnen (n=104)		Probandinnen der Kontrollgruppe (n=104)	
	Anzahl	Häufigkeit	Anzahl	Häufigkeit
4G/4G-Genotyp	35	0,34	32	0,31
4G/5G-Genotyp	50	0,48	51	0,49
5G/5G-Genotyp	19	0,18	21	0,20
4G-Allel	120	0,58	115	0,55
5G-Allel	88	0,42	93	0,45

mit dem 5G/5G-Genotyp verglichen. Aus dieser Berechnung ergab sich, dass für Frauen mit einem 4G/4G-Genotyp eine 1,21-fache Chance (95% KI [0,55-2,65]; p=0,635) und für Frauen mit einem 4G/5G-Genotyp eine 1,08-fache Chance (95% KI [0,52-2,25]; p=0,830) als für Frauen mit einem 5G/5G-Genotyp besteht, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Dieser Unterschied ist gering und statistisch nicht signifikant. Bezüglich der 4G- bzw. 5G-Allelhäufigkeit und der Chance, an einem Mammakarzinom zu erkranken, ergab sich ebenfalls kein nennenswerter Unterschied. Mit Vorhandensein eines 4G-Allels besteht für die Frauen eine 1,11-fache Chance an einem Mammakarzinom zu erkranken (4G-Allel: (95% KI [0,44-1,92]; p=0,83); 5G-Allel: (95% KI [0,60-2,07]; p=0,73)).

4.3 Vergleich der Allel- und Genotypfrequenz des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus mit den klinisch-pathologischen Faktoren

Als nächstes sollte die Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen der 4G/5G-Allelhäufigkeit und den klinisch-pathologischen Daten der Patientinnen mit Mammakarzinom beantwortet werden. Die Analyse wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. In den jeweiligen Vergleichen wurden wichtige klinisch-pathologische Parameter wie Nodalstatus, Tumorgröße, histologischer Typ, und Grading sowie der ER- und PR- sowie HER2/neu-Status miteinbezogen.

Zwischen dem PAI-1-4G/5G-Polymorphismus und den klinisch-pathologischen Faktoren ergaben Chi-Quadrat-Tests keine statistisch signifikante Korrelation (Tab. 4).

Tabelle 4: Vergleich der Genotyp-Häufigkeit des 4G/5G-Polymorphismus mit klinisch-pathologischen Daten beim Mammakarzinom

Variable	N	4G/4G		4G/5G		5G/5G		p
		n	%	n	%	n	%	
	104							
Nodalstatus								0,234
Negativ	68	22	32	37	55	9	13	
Positiv	36	13	36	13	36	10	28	

Weiter auf nächster Seite...

Tabelle 4 – Fortsetzung von letzter Seite.

Variable	N	4G/4G		4G/5G		5G/5G		p
		n	%	n	%	n	%	
Tumorgröße								0,242
pT1	57	18	32	28	49	11	19	
pT2	38	12	31	20	53	6	16	
pT3/4	9	5	56	2	22	2	22	
Histologischer Grad								0,637
Duktal	88	30	34	41	47	17	19	
Lobulär	10	2	20	6	60	2	20	
Andere	6	3	50	3	50	0	0	
Grading								0,452
G1	17	7	41	7	41	3	18	
G2	64	23	36	28	44	13	20	
G3	23	5	22	15	65	3	13	
ER								0,261
Negativ	19	7	37	11	58	1	5	
Positiv	85	28	33	39	46	18	21	
PR								0,467
Negativ	34	13	38	17	50	4	21	
Positiv	70	22	32	33	47	15	21	
HER2/neu								0,843
Negativ	85	28	33	42	49	15	18	
Positiv	19	7	37	8	42	4	21	

Die Vergleiche der klinisch-pathologischen Parameter mit der Häufigkeitsverteilung des 5G-Allels bei den Patientinnen mit den Genotypen 4G/5G und 5G/5G sowie des 4G-Allels bei den Patientinnen mit einem 4G/4G- und 4G/5G-Genotyps ließen keine statistisch signifikante Korrelation im Chi-Quadrat-Test erkennen (Tab. 5 u. 6).

Tabelle 5: Vergleich der 5G-Allel-Häufigkeit mit klinisch-pathologischen Parametern bei Mammakarzinompatientinnen

Variable	N	5G-negativ		5G-positiv		p
		n	%	n	%	
	104					
Nodalstatus						0,847
Negativ	68	22	32	46	68	
Positiv	36	13	36	23	64	
Tumorgröße						0,299
pT1	57	18	32	39	68	
pT2	38	12	31	26	68	
pT3/4	9	5	56	4	44	

Weiter auf nächster Seite...

Tabelle 5 – Fortsetzung von letzter Seite.

Variable	N	5G-negativ		5G-positiv		p
		n	%	n	%	
Histologischer Grad						0,458
Duktal	88	30	34	58	66	
Lobulär	10	2	20	8	80	
Andere	6	3	50	3	50	
Grading						0,360
G1	17	7	41	10	59	
G2	64	23	36	41	64	
G3	23	5	22	18	78	
ER						0,745
Negativ	19	7	37	12	63	
Positiv	85	28	33	57	67	
PR						0,491
Negativ	34	13	38	21	62	
Positiv	70	22	32	48	69	
HER2/neu						0,791
Negativ	85	28	33	57	67	
Positiv	19	7	37	12	63	

Tabelle 6: Vergleich der 4G-Allel-Häufigkeit mit klinisch-pathologischen Daten der Mammakarzinompatientinnen

Variable	N	4G-negativ		4G-positiv		p
		n	%	n	%	
	104					
Nodalstatus						0,109
Negativ	68	9	13	59	87	
Positiv	36	10	29	24	71	
Tumorgroße						0,183
pT1	57	11	19	46	81	
pT2	38	6	16	32	84	
pT3/4	9	2	22	7	78	
Histologischer Grad						0,490
Duktal	88	17	19	71	81	
Lobulär	10	2	20	8	80	
Andere	6	0	0	6	100	
Grading						0,739
G1	17	3	18	14	82	
G2	64	13	20	51	80	
G3	23	3	13	20	87	

Weiter auf nächster Seite...

Tabelle 6 – Fortsetzung von letzter Seite.

Variable	N	4G-negativ		4G-positiv		p
		n	%	n	%	
ER						0,105
Negativ	19	1	5	18	95	
Positiv	85	18	21	67	79	
PR						0,232
Negativ	34	4	12	30	88	
Positiv	70	15	21	55	79	
HER2/neu						0,728
Negativ	85	15	18	70	82	
Positiv	4	21	15	79	63	

4.4 Untersuchung des Zusammenhanges zwischen 4G bzw. 5G-Sequenz mit der PAI-1-Proteinexpression im Mammakarzinom

Da die PAI-1-Gentranskription durch die 4G/5G-Sequenz reguliert werden kann, stellte sich die Frage, inwieweit diese genetisch bedingte Variation auf die PAI-1-Expression im Mammakarzinom Einfluss hat. Von 91 Patientinnen des Gesamtpatientenkollektivs lagen PAI-1-Proteinexpressionswerte vor, die mittels ELISAs von Proteinextrakten aus Tumorfriischgewebe erstellt wurden (s. Material Methoden, 3.6.1). Auch lagen die Proteinwerte für uPA, dem Bindungspartner von PAI-1, vor. Diese Werte wurden zum Vergleich benutzt. Für beide Proteine sind klinisch relevante Schwellenwerte bekannt (PAI-1: 14 ng/mg, uPA: 3 ng/mg), anhand deren Therapieentscheidungen getroffen werden können.

Die Verteilung des Genotyps bei diesen 91 Patientinnen ergab sich wie folgt: 32 (35,1%) wiesen den Genotyp 4G/4G auf, 44 den Genotyp 4G/5G (48,4%) und 15 der Patientinnen hatten den Genotyp 5G/5G (16,5%). Um eine mögliche Korrelation zwischen den Genotypen bzw. Allelen und dem PAI-1/uPA-Expressionslevel zu identifizieren, wurden die Patientinnen nach ihrem jeweiligen Genotyp und in Abhängigkeit ihrer ermittelten PAI-1- und uPA-Konzentration – also nach PAI-1- und uPA-Konzentrationen oberhalb oder unterhalb des entsprechenden Schwellenwertes eingeteilt. Mittels Boxplot wurde zunächst die graphische Darstellung der PAI-1- und uPA-Proteinkonzentrationen in Abhängigkeit des jeweiligen 4G/5G-Genotyps veranschaulicht (Abb. 7). Anhand des Boxplots ließ sich tendenziell eine steigende PAI-1-Expression mit der Anzahl der vorhanden 4G-Allele nachweisen. Für die uPA-Expression gab es diesen Zusammenhang nicht.

In dem einfaktoriellen ANOVA- und dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni ergab sich allerdings kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der PAI-1- bzw. der uPA-Expression und der Beschaffenheit des Genotyps. Für die Beziehung der PAI-1-Konzentration mit dem Genotyp ergab die ANOVA $p=0,581$ (KI für 4G/4G [11,28 – 26,38], KI für 4G/5G [8,45 – 24,71], KI für 5G/5G [6,54 – 16,25]).

Für die Berechnung des Zusammenhangs zwischen uPA-Konzentration und Genotyp ergab die Berechnung ebenfalls keine statistische Signifikanz ($p=0,347$, bei einem KI für 4G/4G [1,97 – 4,23], KI für 4G/5G [1,76 – 2,83], KI für 5G/5G [1,51 – 3,78]).

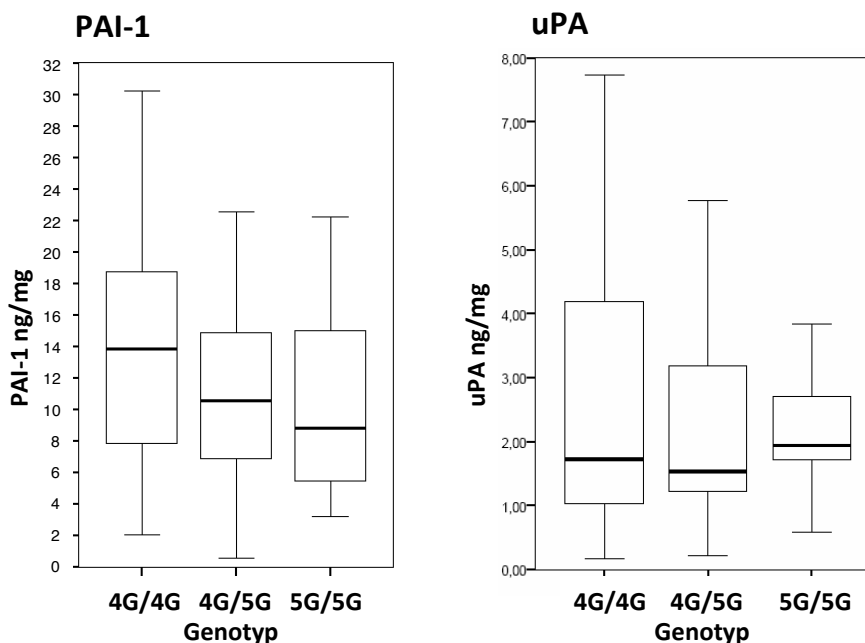


Abbildung 7: Grafische Darstellung der uPA/PAI-1-Expressionsratenverteilung im Tumorgewebe in Abhängigkeit des jeweiligen Genotyps. Tendenziell steigt die PAI-1-Proteinexpressionsrate mit Anzahl der 4G-Allele (Extrem abweichende Werte wurden nicht dargestellt).

Wurden die PAI-1-Daten anhand des Schwellenwertes ($PAI-1 < 14 \text{ ng/mg}$ bzw. $PAI-1 \geq 14 \text{ ng/mg}$) in zwei Gruppen eingeteilt, zeigte sich im Chi-Quadrat-Test ein tendenzieller Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des 4G-Allels und einer höheren PAI-1-Konzentration. Wie erwartet, gab es keine Korrelation zwischen den Genotypen und den uPA-Konzentrationen (Tab. 7).

Wurden die Analysen nach Aufteilung der Patientinnen nach Tumoren mit hoher und niedriger PAI-1-Proteinexpression und nach der Präsenz des 5G-Allels durchgeführt, so ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer niedrigen PAI-1-Expression und dem Vorliegen von mindestens einem 5G-Allel ($p=0,018$) (Tab. 8). So war das 5G-Allel in der Patientinnengruppe mit einer tumoralen PAI-1-Expression unterhalb des Schwellenwertes viel häufiger (73%) vertreten. In der Gruppe mit einer tumoralen PAI-1-Expression oberhalb des Schwellenwertes hielten sich Patientinnen mit mindestens einem 5G-Allel oder keinem 5G-Allel in etwa die Waage.

Ein ähnlicher Zusammenhang ließ sich hingegen zwischen der uPA-Expression und der 5G-Präsenz erwartungsgemäß nicht nachweisen.

Tabelle 7: Verteilung der 4G- und 5G-Sequenz in Abhängigkeit von der PAI-1- und uPA-Proteinexpression oberhalb oder unterhalb des jeweiligen Schwellenwertes.

Variable	N	4G/4G		4G/5G		5G/5G		p
		n	%	n	%	n	%	
	91							
PAI-1 (ng/mg)								0,061
<14	60	16	27	33	55	11	18	
≥14	31	16	52	11	35	4	13	
uPA (ng/mg)								0,420
<14	64	20	31	32	50	12	19	
≥14	27	12	44	12	44	3	11	

Tabelle 8: Häufigkeit des 5G-Allels bei hohen und niedrigen PAI-1- und uPA-Werten

Variable	N	5G-negativ		5G-positiv		p
		n	%	n	%	
	91					
PAI-1 (ng/mg)						0,018
<14	60	16	27	44	73	
≥14	31	16	52	15	48	
uPA (ng/mg)						0,229
<14	64	20	31	44	69	
≥14	27	12	44	15	56	

Eine analoge Analyse für die Präsenz des 4G-Allels führte nicht dazu, einen Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expression und dem Vorliegen der 4G-Sequenz (Tab. 9) festzustellen. Es scheint, als spiele der 4G/5G-umfassende Promotorbereich für die tumorale PAI-1-Expression als repressorische Einheit über die 5G-Sequenz eine wichtigere Rolle als die aktivierende Einheit über die 4G-Sequenz.

Tabelle 9: Häufigkeit des 4G-Allels bei hohen und niedrigen PAI-1- und uPA-Werten

Variable	N	4G-negativ		4G-positiv		p
		n	%	n	%	
	91					
PAI-1 (ng/mg)						0,508
<14	60	11	18	49	82	
≥14	31	4	13	27	87	
uPA (ng/mg)						0,370
<14	64	12	19	52	81	
≥14	27	3	11	24	89	

4.5 Vergleich der klassischen klinisch-pathologischen Parametern mit den PAI-1-Schwellenwerten

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expressionsrate und den klassischen klinisch-pathologischen Parametern zu erfassen, verglich ich die von 91 Patientinnen vorliegenden PAI-1-Proteinkonzentrationen mit den vorliegenden klinisch-pathologischen Parametern. Dafür teilte ich die Patientinnen nach der PAI-1-Konzentration (PAI-1 < bzw. ≥ 14 ng/mg) in zwei Gruppen ein. Eine statistisch signifikante Korrelation war im Chi-Quadrat-Test nicht nachweisbar. Wohl aber zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen einem höheren Malignitätsgrad und PAI-1-Konzentrationen über dem Schwellenwert. 15 Patientinnen mit einem G1-Tumor wiesen hauptsächlich (zu 66,7%) PAI-1-Werte unterhalb des Schwellenwertes auf, wohingegen die 18 Patientinnen mit einem G3-Tumor tendenziell (zu 44,4%) häufiger PAI-1-Werte über dem Schwellenwert aufzeigten ($p=0,091$). Zudem zeigte sich bei den Patientinnen mit Tumoren, die einen oder beide der Hormonrezeptoren exprimierten, dass diese deutlich geringere tumorale PAI-1-Konzentrationen aufwiesen (ER $p=0,139$; PR $p=0,138$). Im Vergleich dazu hatten auch jene Patientinnen geringere PAI-1-Konzentrationen, bei denen ein negativer HER2/neu-Status vorlag ($p=0,399$). Zudem wurden auch bei den Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen eher geringere PAI-1-Konzentrationen gemessen ($p=0,314$) (Tab. 10).

Tabelle 10: Vergleich der 5G-Allel-Häufigkeit mit klinisch-pathologischen Parametern bei Mammakarzinompatientinnen

Variable	N	PAI-1 < 14 ng/mg		PAI-1 \geq 14 ng/mg		p
		n	%	n	%	
	91					
Nodalstatus						0,314
Negativ	62	43	69	19	31	
Positiv	29	17	59	12	41	
Tumorgröße						0,412
pT1	52	36	69	16	31	
pT2	34	22	65	12	35	
pT3/4	5	2	40	3	60	
Histologischer Grad						0,998
Duktal	88	17	19	71	81	
Lobulär	10	2	20	8	80	
Andere	6	0	0	6	100	
Grading						0,091
G1	15	10	67	5	33	
G2	58	42	72	16	28	
G3	18	8	44	10	56	
ER						0,139
Negativ	16	8	50	8	50	
Positiv	75	52	69	23	31	

Weiter auf nächster Seite...

Tabelle 10 – Fortsetzung von letzter Seite.

Variable	N	PAI-1 < 14 ng/mg		PAI-1 ≥ 14 ng/mg		p
		n	%	n	%	
PR						0,138
Negativ	29	16	55	13	88	
Positiv	62	44	71	18	29	
HER2/neu						0,399
Negativ	75	48	64	27	36	
Positiv	16	12	75	4	25	

4.6 Prognostische Bedeutung von 4G/5G-Polymorphismus und PAI-1-Proteinlevel

Es wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen vom Zeitpunkt der Erstdiagnose (2004-2007) bis 2012 analysiert. Daraus ergab sich eine mittlere Nachbeobachtungszeit von 62,83 Monaten (min. 1 Monat/max. 93 Monate) ergab. Acht Patientinnen wurden aus der Überlebenszeitanalyse aufgrund fehlender Rückmeldung ausgeschlossen, so dass von insgesamt 96 Patientinnen die Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Kaplan-Meier-Analysen berechnet werden konnte. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde in Abhängigkeit des Genotyp- und Allel-Status des 4G/5G-Polymorphismus, der tumoralen Expression von PAI-1 und uPA- sowie in Abhängigkeit des Nodalstatus, der Tumorgröße und des Gradings berechnet. Zusätzlich wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen, die eine Chemotherapie erhalten hatten, in Abhängigkeit der genannten Variablen evaluiert und mit der Gruppe der Frauen verglichen, die keine Chemotherapie erhalten hatten. Der Einfluss des Hormonrezeptorstatus (Östrogen, ER- und Progesteron-Rezeptor, PR) sowie des HER2/neu-Status auf die Überlebenswahrscheinlichkeit konnte nicht erfasst werden, da in den jeweiligen Subpopulationen zu wenige Ereignisse für eine statistische Analyse auftraten. Für die Berechnung der Bedeutung der tumoralen Proteinexpression von PAI-1 und uPA auf die Prognose lagen Daten von 84 Patientinnen vor.

Bei 13 Patientinnen der 96 Patientinnen trat in diesem Zeitraum ein Ereignis auf. Bei all diesen Patientinnen bestand das Ereignis im Auftreten von Metastasen, bei zwei Patientinnen wurde zeitgleich mit der Diagnose der Metastasierung auch ein Lokalrezidiv festgestellt. Neun dieser Patientinnen verstarben im weiteren Verlauf der Beobachtungszeit. Von den 96 Patientinnen wiesen 33 Patientinnen den Genotyp 4G/4G auf, 45 Patientinnen den Genotyp 4G/5G und 18 Patientinnen den Genotyp 5G/5G.

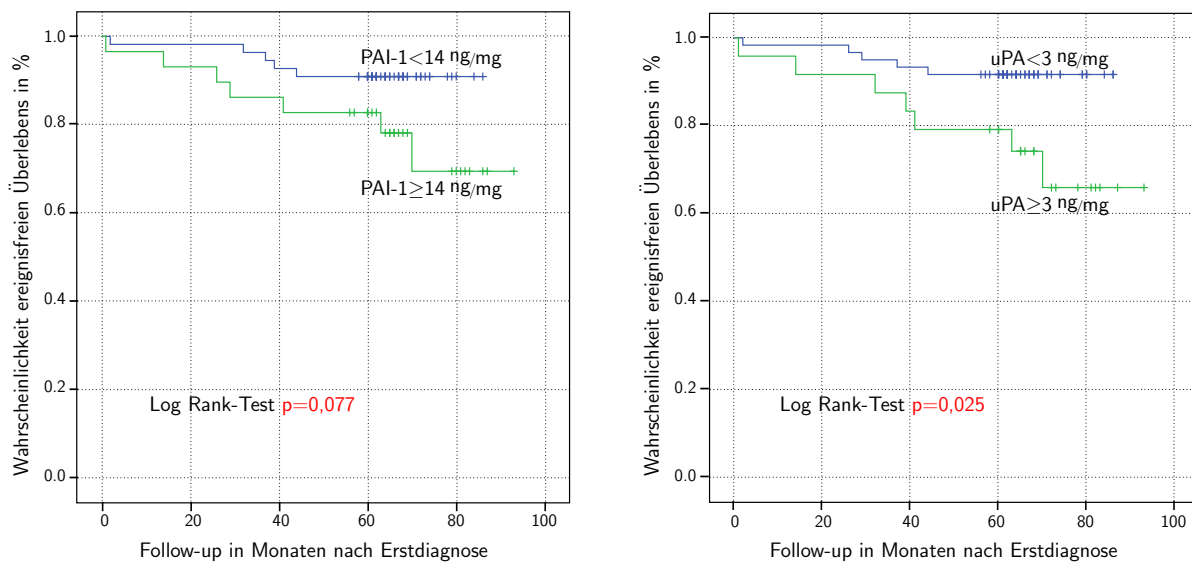
4.6.1 Prognose in Abhängigkeit der tumoralen Proteinexpression von PAI-1 und uPA

Die Patientinnen wurden entsprechend dem Schwellenwert von 14 ng/mg Protein für PAI-1 bzw. 3 ng/mg Protein für uPA in jeweils zwei Untergruppen eingeteilt. 29 der 84 Patientinnen zeigten eine tumorale PAI-1-Expression, die oberhalb des Schwellenwertes lag. Bei den uPA-Werten waren das 24 der 84 Patientinnen. 16 Patientinnen wiesen sowohl für PAI-1 als auch für uPA Werte oberhalb

des Schwellenwertes auf.

Bei Patientinnen mit hohen PAI-1-Werten traten 7 Ereignisse auf, bei denjenigen mit niedrigen PAI-1 Werten 5 Ereignisse, so dass sich über den Beobachtungszeitraum für Patientinnen mit erhöhten PAI-1-Konzentrationen eine 76%ige Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben im Vergleich zu einer 91%igen Wahrscheinlichkeit für Patientinnen mit niedrigen Werten ergab. Nach Log-Rank-Test war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ($p=0,077$), (Abb. 8(a)).

Ein ähnliches Bild ergab sich bei einer analogen Analyse mit den uPA-Werten. Auch hier traten mit 7 Fällen häufiger Ereignisse in der Gruppe mit hohen uP-Werten als bei Patientinnen mit niedrigen uPA-Werten (5 Ereignisse) auf. Die Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben betrug hier für Patientinnen mit hohen Werten 71%, während sie für Patientinnen mit niedrigen Werten 91% betrug. Der Vergleich der beiden Gruppen erbrachte hier einen signifikanten Unterschied ($p=0,025$), (Abb. 8(b)).

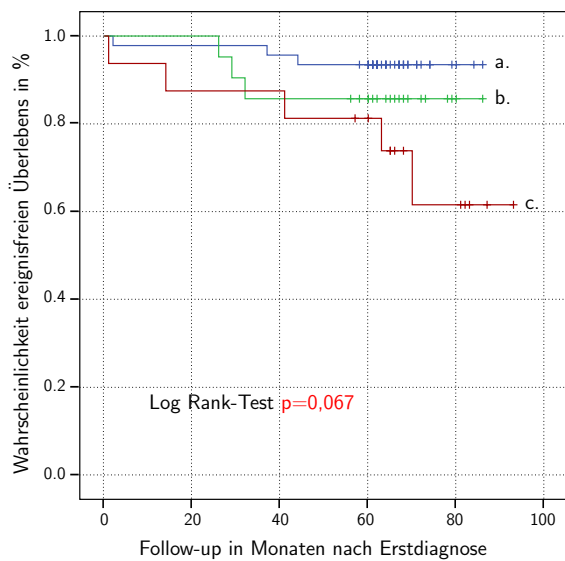


(a) Abhängig von PAI-1 Expression

(b) Abhängig von uPA-Expression

Abbildung 8: Überlebenschancen in Abhängigkeit von der tumoralen PAI-1- und uPA-Expression

In einer weiteren Berechnung wurden beide Proteinwerte berücksichtigt; die Patientinnenpopulation wurde hierzu in 3 Untergruppen eingeteilt: Patientinnen mit Werten für PAI-1 und uPA oberhalb des Schwellenwertes (Abb. 9-a), mit Werten für PAI-1 oder uPA oberhalb des Schwellenwertes (Abb. 9-b) und mit Werten für beide Proteine unterhalb des Schwellenwertes (Abb. 9-c). Die Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben betrug für die Gruppe mit hohem PAI-1- plus hohem uPA-Werten 69%, die für die Gruppe mit hohem PAI-1 oder hohem uPA-Wert 86% und für die Gruppe mit niedrigen Werten für beide Proteine 94%. Der Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,067$).



- a.: PAI-1 *und* uPA unterhalb des Schwellenwertes
 b.: PAI-1 *oder* uPA oberhalb des Schwellenwertes
 c.: PAI-1 *und* uPA oberhalb des Schwellenwertes

Abbildung 9: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der tumoralen PAI-1- und uPA-Expression (kombiniert)

Diese Ergebnisse entsprechen denen früherer Studien (LOOK et al., 2002, HARBECK et al., 2004, HARBECK et al., 2013b). Hier ergab sich aber aufgrund der höheren Anzahl der in der Studie eingeschlossenen Patientinnen ein statistisch signifikanter Unterschied.

4.6.2 Prognose in Abhängigkeit des Genotyps

Nachdem ich zeigen konnte, dass die tumoralen PAI-1-Werte auch in dem von mir verwendeten Kollektiv, wenn auch nicht statistisch signifikant, so doch einen klinisch relevanten Einfluss auf die Prognose der Brustkrebspatientinnen haben, untersuchte ich die Bedeutung des Genotypen- und Allel-Status des PAI-1-Polymorphismus auf die Prognose.

Die meisten Ereignisse traten in der 4G/4G- und der 4G/5G-Gruppe mit jeweils 6 Ereignissen (dies bedeutet eine Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben von 82% bzw. 87%) auf. In der 5G/5G-Gruppe war nur 1 Ereignis (ereignisfreies Überleben: 94%) zu verzeichnen. Der Vergleich der Gruppen mittels Log-Rank-Test ergab allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,506$) (Abb. 10).

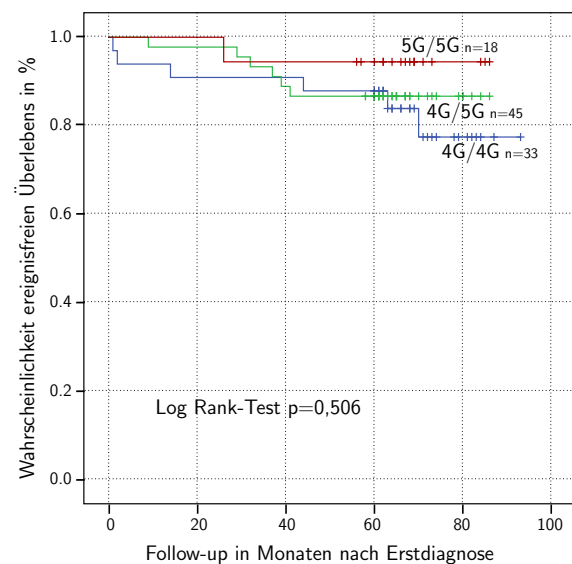
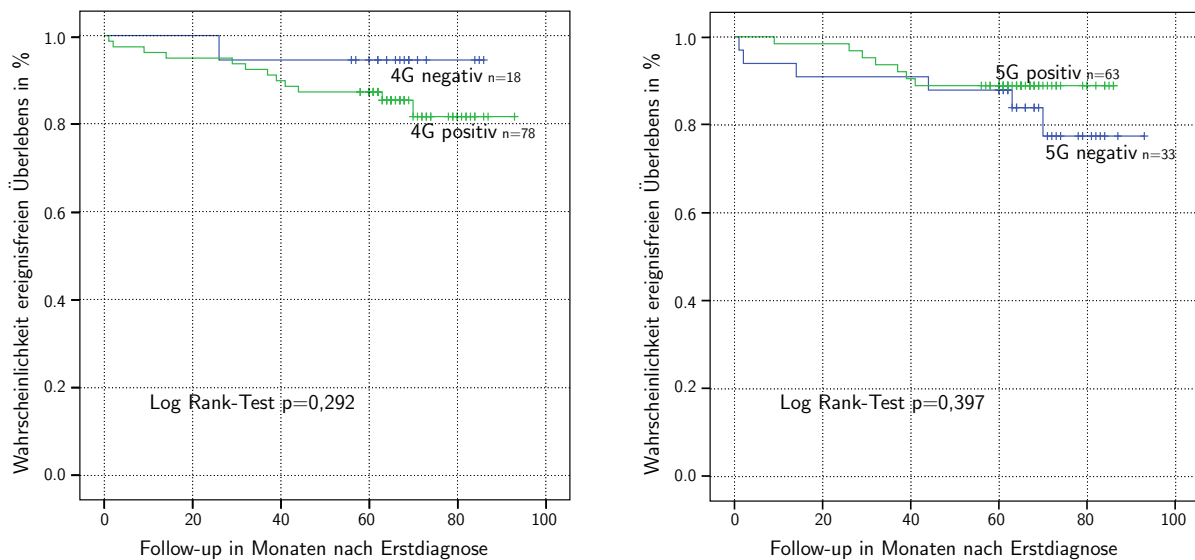


Abb. 10: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Genotypen-Status des 4G/5G-Polymorphismus

Eine Einteilung der untersuchten Population nach Allel-Status des 4G/5G-Polymorphismus ergab folgende Verteilung: 78 Patientinnen waren 4G-positiv (mindestens ein 4G-Allel), 18 4G-negativ, 63 5G-positiv (mindestens ein 5G-Allel) und 33 5G-negativ. 4G-positive Patientinnen wiesen mit 12 Ereignissen (15%) häufiger Ereignisse auf als 4G-negative Patientinnen mit einem Ereignis (5,6%). Der Unterschied erreichte im Log-Rank-Test jedoch nicht das Signifikanzniveau ($p=0,292$). Unter



(a) Status 4G-Allel

(b) Status 5G-Allel

Abbildung 11: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Allel-Status des 4G/5G-Polymorphismus

den 5G-positiven Patientinnen traten 7 Ereignisse (11%) auf, während 5G-negative Patientinnen 6 Ereignisse (18%) aufwiesen. Auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,397$), (Abb. 11(a) und 11(b)).

4.7 Prognose in Abhängigkeit von Genotyp, Allelstatus und der tumoralen PAI-1- Expression unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Daten

4.7.1 Stratifizierung nach Nodalstatus

Bei Stratifizierung nach Nodalstatus ergab sich, dass der PAI-1-Genotypen-Status bei Patientinnen mit einem nodalnegativen Mammakarzinom die Überlebenswahrscheinlichkeiten nicht beeinflusst. Tendenzielle Unterschiede wurden für nodalpositive Patientinnen beobachtet: Hier wiesen Patientinnen mit dem Genotyp 4G/4G und einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 67% die schlechteste Prognose auf, wohingegen die Untergruppe mit 5G/5G-Genotyp kein Ereignis aufzeigte. Die Überlebenswahrscheinlichkeit in der Gruppe mit heterozygotem Genotyp lag dazwischen.

Tabelle 11: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Genotypen- und Nodalstatus (p=0,394)

Nodalstatus	Genotyp	Patientinnen (gesamt)	Anzahl der Ereignisse	Anteil ohne Ereignisse
negativ	4G/4G	21	2	91%
	4G/5G	34	3	91%
	5G/5G	8	1	88%
	Gesamt	63	6	91%
positiv	4G/4G	12	4	67%
	4G/5G	11	3	73%
	5G/5G	10	0	100%
	Gesamt	33	7	79%
Gesamt		96	13	87%

Dieses Ergebnis wird auch in der Kaplan-Meier-Darstellung deutlich (Abb. 12(a) und 12(b)). Allerdings ist der Unterschied innerhalb der nodalpositiven Gruppe statistisch nicht signifikant (p=0,394).

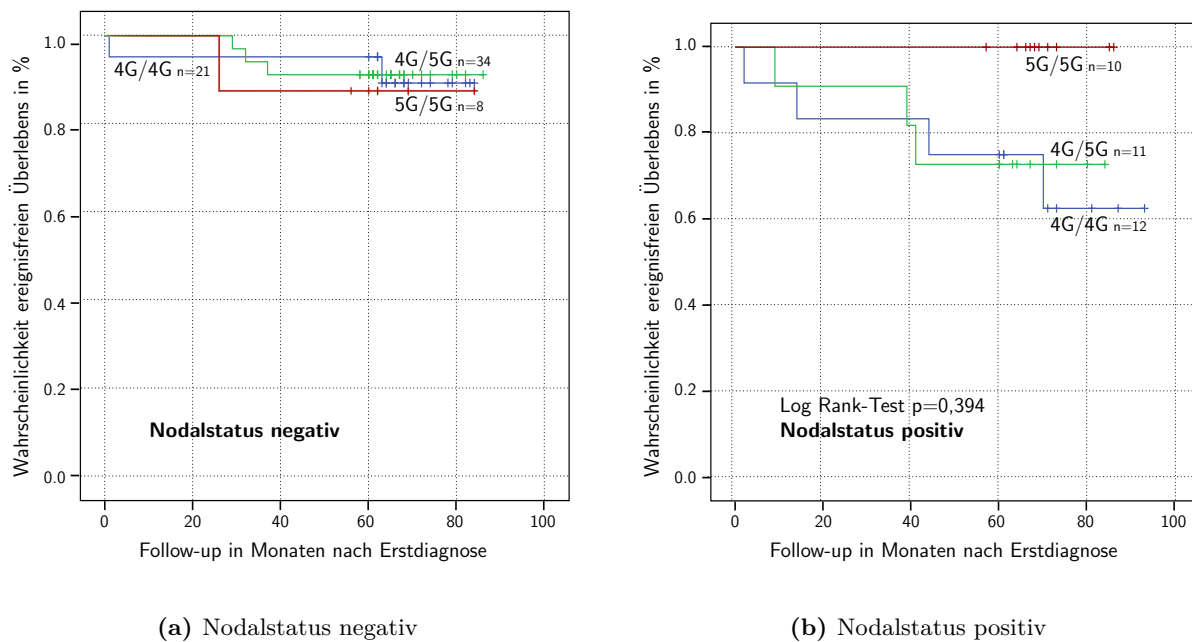


Abbildung 12: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Genotypen- und Nodalstatus

Auch ein Vergleich nur der homozygoten Genotypen in der nodalpositiven Gruppe erreicht nicht das Signifikanzniveau (p=0,209). Diese Resultate deuten darauf hin, dass der Nodalstatus möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf den Zusammenhang zwischen dem PAI-1-Polymorphismus und der Prognose ausübt. Allerdings ergab sich wahrscheinlich wegen der mit 45 Patientinnen geringen

Größe der nodalnegativen Gruppe keine statistische Signifikanz.

Wurde eine analoge Analyse für den 4G-Allel-Status durchgeführt, ergab sich ein ähnliches Bild (Abb. 13(a) und 13(b)). Nur in der nodalpositiven Gruppe zeigte sich ein tendenzieller Unterschied in der Prognose zwischen den 4G-positiven und 4G-negativen Patientinnen in der Weise, dass 4G-positiv Patientinnen eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als 4G-negative Patientinnen ($p=0,179$). Damit ist die Präsenz von mindestens einem 4G-Allel ungünstig für die Prognose von Patientinnen mit nodalpositiven Tumoren.

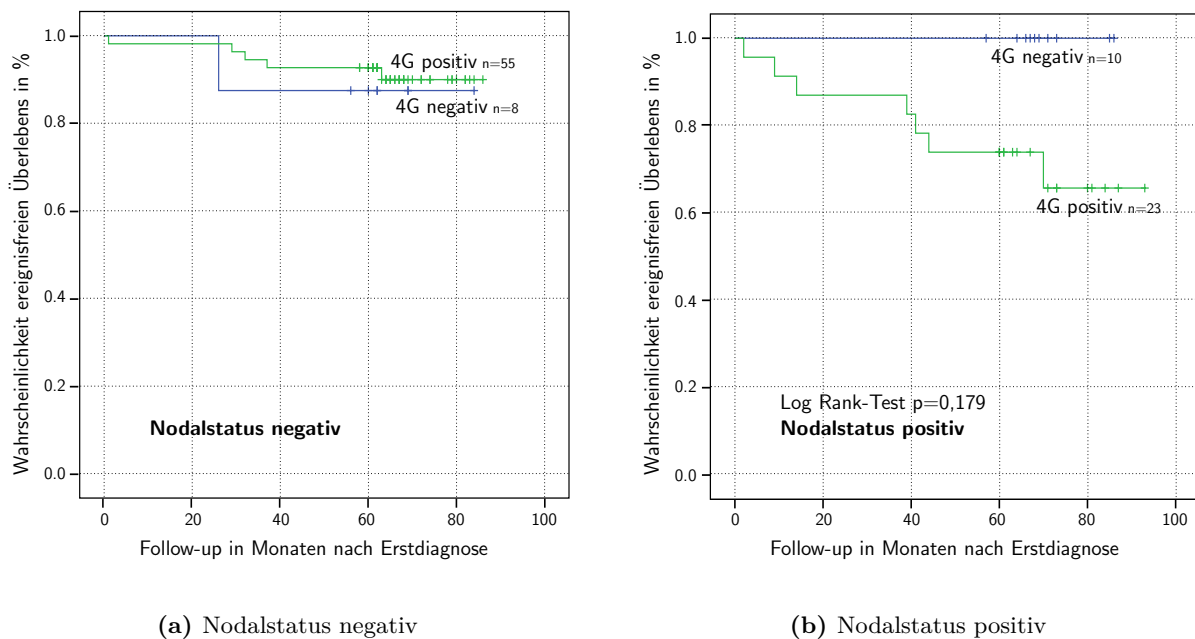


Abbildung 13: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom 4G-Allel- und vom Nodalstatus

Tabelle 12: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der PAI-1-Expression und von dem Nodalstatus

Nodalstatus	PAI-1 Konzentration	Patientinnen (gesamt)	Anzahl der Ereignisse	Anteil ohne Ereignisse
negativ	PAI-1 ≥ 14 ng/mg	19	4	79%
	PAI-1 < 14 ng/mg	39	2	95%
	Gesamt	58	6	90%
positiv	PAI-1 ≥ 14 ng/mg	10	3	70%
	PAI-1 < 14 ng/mg	16	3	81%
	Gesamt	26	6	77%
Gesamt		96	13	87%

Zum Vergleich wurde auch der Einfluss der tumoralen PAI-1-Expression auf die Prognose in der nodalpositiven und nodalnegativen Gruppe getrennt betrachtet. Es ergab sich das Bild, dass PAI-1-Werte oberhalb des Schwellenwertes sowohl bei nodalnegativen als auch bei nodalpositiven Tumoren die Ereignisrate erhöhen (Tab. 12), ohne jedoch eine statistische Signifikanz im Chi-Quadrat-Test erkennen zu lassen ($p=0,112$), (Abb. 14(a) und 14(b)).

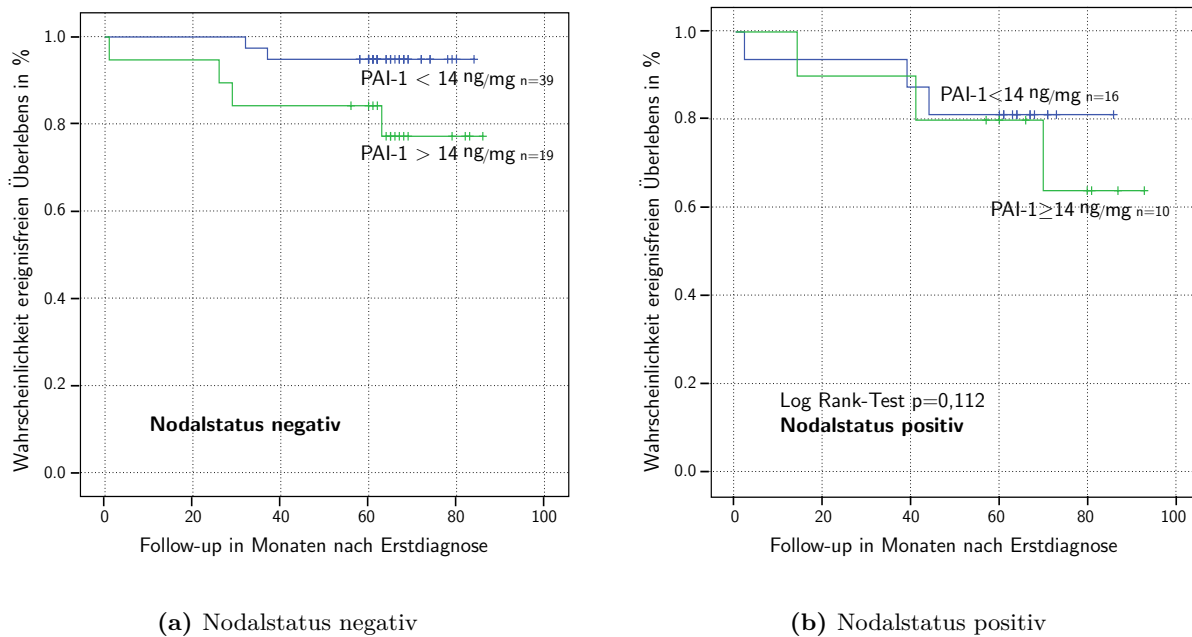


Abbildung 14: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der PAI-1-Expression und vom Nodalstatus

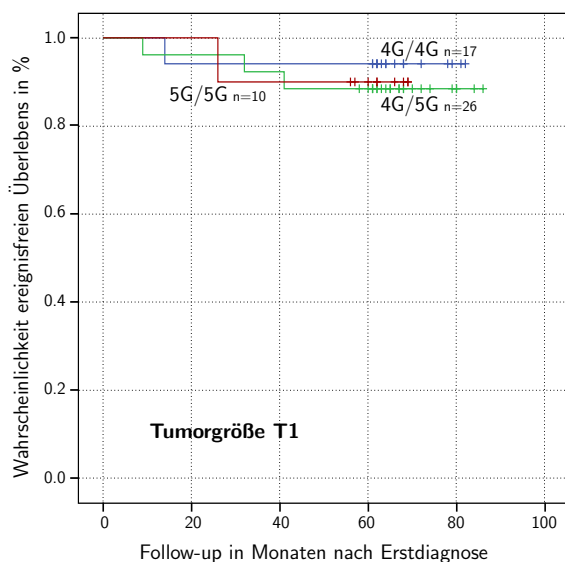
4.7.2 Stratifizierung nach Tumorgröße

Analog zur Einteilung nach Nodalstatus wurde eine Einteilung nach Tumorgröße – gemäß TNM-Klassifikation - vorgenommen, indem Patientinnen mit T1-klassifizierten Tumoren denen mit T2- bis T4-klassifizierten Tumoren gegenübergestellt wurden.

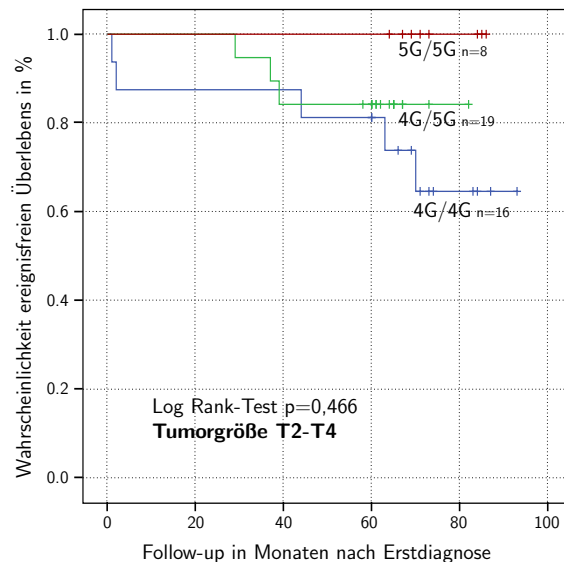
In dieser Gegenüberstellung ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der Stratifizierung nach Nodalstatus: Für das Überleben der Patientinnen mit weniger fortgeschrittenem Tumor (T1) zeigte sich kein Zusammenhang mit dem Genotyp-Status (Tab. 13, Abb. 15(a) und 15(b)). Hingegen lässt sich anhand der Überlebenswahrscheinlichkeit bei weiter fortgeschrittenen Mammakarzinomen (T2-T4) ein Einfluss des Genotyps vermuten. Eine statistische Signifikanz konnte im Chi-Quadrat jedoch nicht nachgewiesen werden ($p=0,466$).

Tabelle 13: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Genotypenstatus und von der Tumorgöße

Tumorgöße	Genotyp	Patientinnen (gesamt)	Anzahl der Ereignisse	Anteil ohne Ereignisse	
T1	4G/4G	17	1	94%	p=0,466
	4G/5G	26	3	89%	
	5G/5G	10	1	90%	
	Gesamt	53	5	91%	
T2-4	4G/4G	12	4	69%	p=0,230
	4G/5G	11	3	84%	
	5G/5G	10	0	100%	
	Gesamt	33	7	81%	
Gesamt		96	13	87%	



(a) Tumorgöße T1



(b) Tumorgöße T2-T4

Abbildung 15: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Genotypenstatus und der Tumorgöße

Stellt man die für das 4G- bzw. 5G-Allel homozygoten Patientinnen gegenüber, wird der p-Wert geringer ($p=0,209$), aber es wird nach wie vor keine statistische Signifikanz erreicht.

Eingeteilt nach Vorliegen des 4G-Allels in der Gruppe mit T2-T4-Mammakarzinomen ergibt sich eine Überlebenswahrscheinlichkeit für 4G-positive Patientinnen von 77% gegenüber 100% für 4G-negative Patientinnen ($p=0,230$), (Abb. 16(a) und 16(b)).

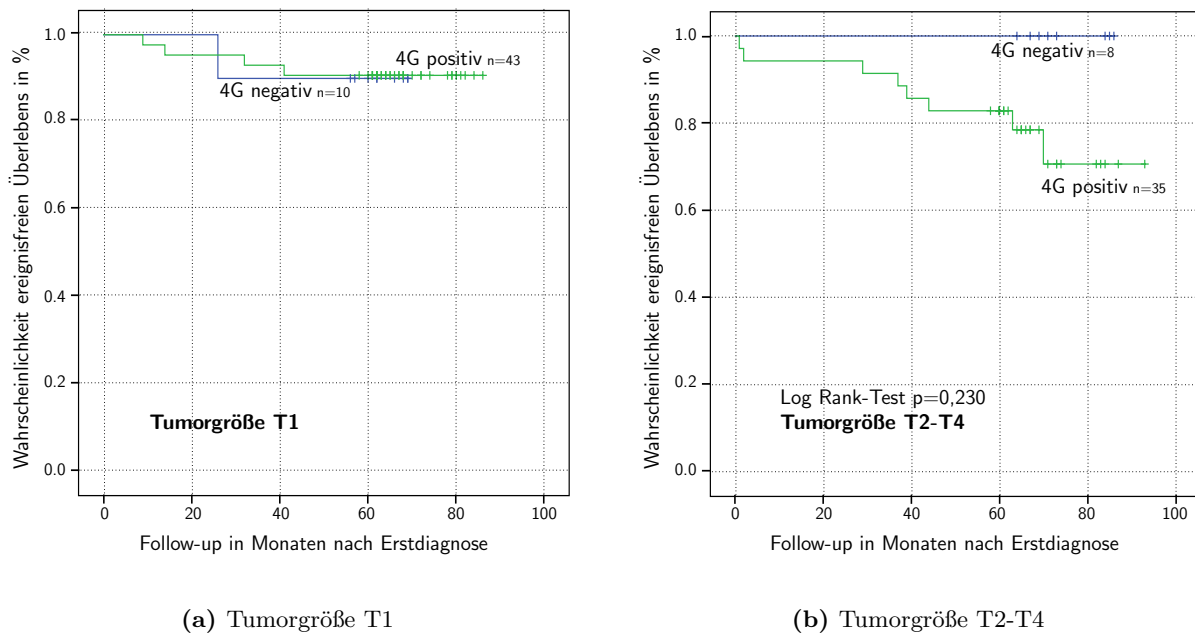


Abbildung 16: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des 4G-Allel-Status und der Tumorgröße

Entsprechende Analysen für die tumorale PAI-1-Expression zeigten, dass eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit mit einem erhöhten PAI-1-Wert sowohl für T1-klassifizierte Tumoren (81% vs. 97%) als auch für fortgeschrittene Tumoren (69% vs. 82%) verbunden ist (Tab. 14, Abb. 17(a) und 17(b)). Im Chi-Quadrat-Test ergibt sich allerdings keine statistische Signifikanz ($p=0,089$).

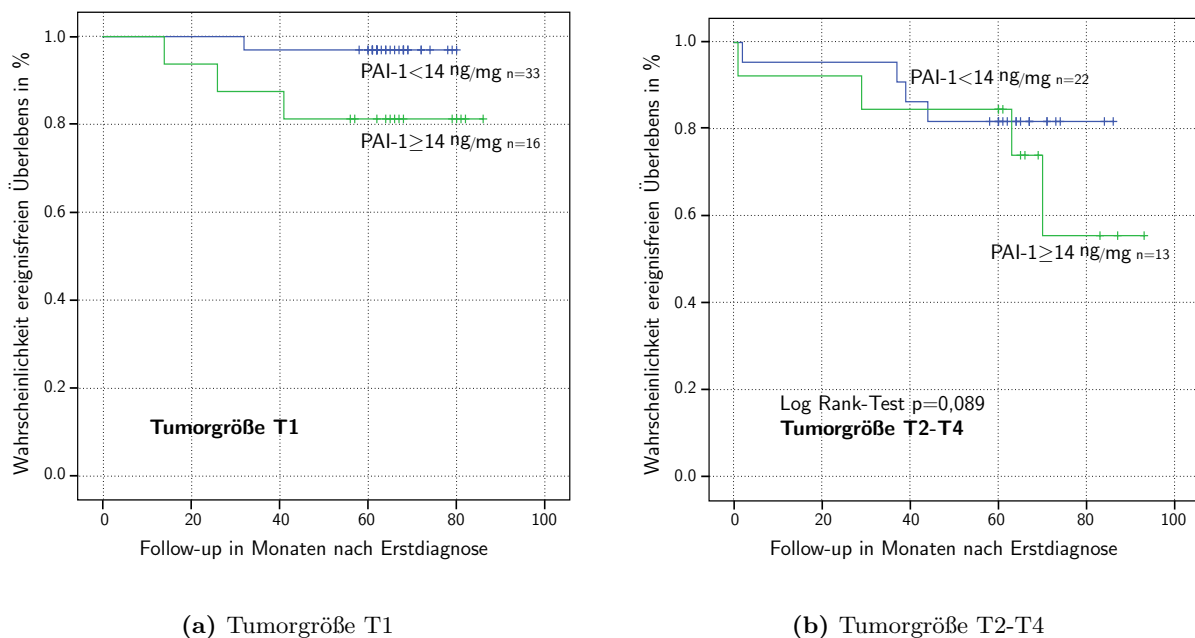


Abbildung 17: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des PAI-1-Wertes und der Tumorgröße

Tabelle 14: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der PAI-1-Expression und der Tumorgröße p=0,089

Tumorgröße	PAI-1 Konzentration	Patientinnen (gesamt)	Anzahl der Ereignisse	Anteil ohne Ereignisse
T1	PAI-1 \geq 14 ng/mg	16	3	81,3%
	PAI-1<14 ng/mg	33	1	97,0%
	Gesamt	49	4	91,8%
T2-4	PAI-1 \geq 14 ng/mg	13	4	69,2%
	PAI-1<14 ng/mg	22	4	81,8%
	Gesamt	35	8	77,1%
Gesamt		84	12	85,7%

4.7.3 Stratifizierung nach Grading

Die Stratifizierung nach Grading (G1 im Vergleich zu G2-G4) ließ bei der G2-G4-Gruppe einen tendenziellen Zusammenhang zwischen dem des 4G/4G-Genotyps und einer schlechteren Prognose feststellen (Tab. 15, Abb. 18(a)), ohne allerdings im Chi-Quadrat-Test einen signifikanten Zusammenhang zu ergeben (p=0,398).

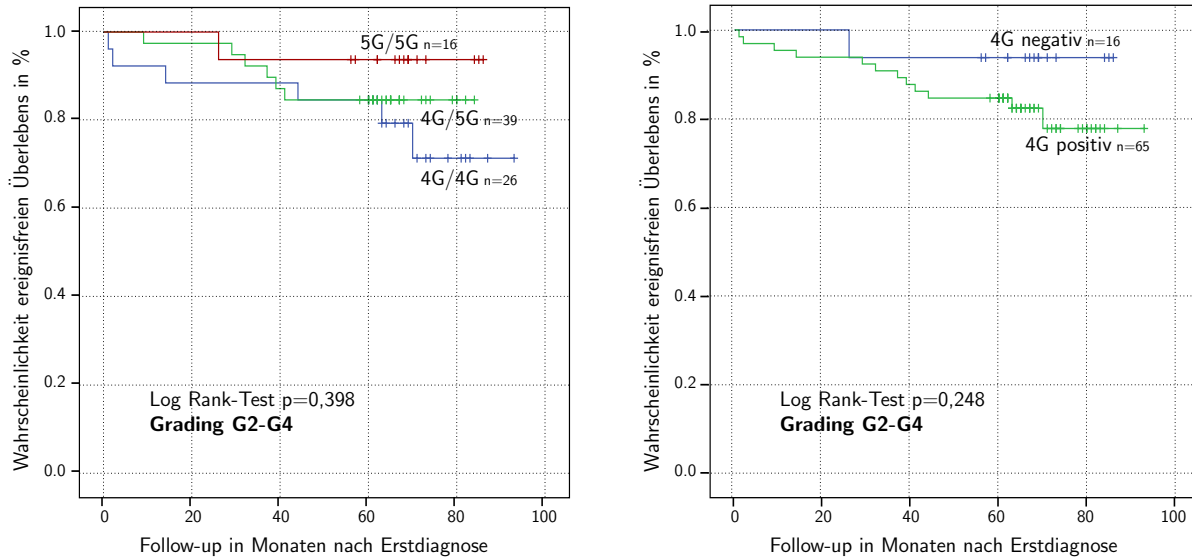
Tabelle 15: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von dem Genotypenstatus und dem Grading p=0,398

Grading	Genotyp	Patientinnen (gesamt)	Anzahl der Ereignisse	Anteil ohne Ereignisse
G1	4G/4G	7	0	100%
	4G/5G	6	0	100%
	5G/5G	2	0	100%
	Gesamt	15	0	100%
>G1	4G/4G	26	6	77%
	4G/5G	39	6	85%
	5G/5G	16	1	94%
	Gesamt	81	13	84%
Gesamt		96	13	87%

In der G1-Gruppe konnten wegen fehlender Ereignisse keine Rückschlüsse auf den Einfluss des Genotyp-Status auf die Prognose gezogen werden.

Ein Vergleich der Patientinnen mit nur homozygotem Genotyp zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (p=0,18). Eine Gegenüberstellung der 4G-Allel-positiven mit den 4G-negativen Patientinnen in der Gruppe mit G2, G3 und G4-Tumoren ergab eine geringere

Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben für 4G-positive Patientinnen Im Log-Rank-Test zeigte sich allerdings keine statistische Signifikanz ($p=0,248$), (Abb. 18(b)).



(a) Status Genotyp

(b) Status 4G-Allel

Abbildung 18: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Genotyps und 4G-Allel-Status bei Patientinnen mit G2-, G3- und G4-Tumoren

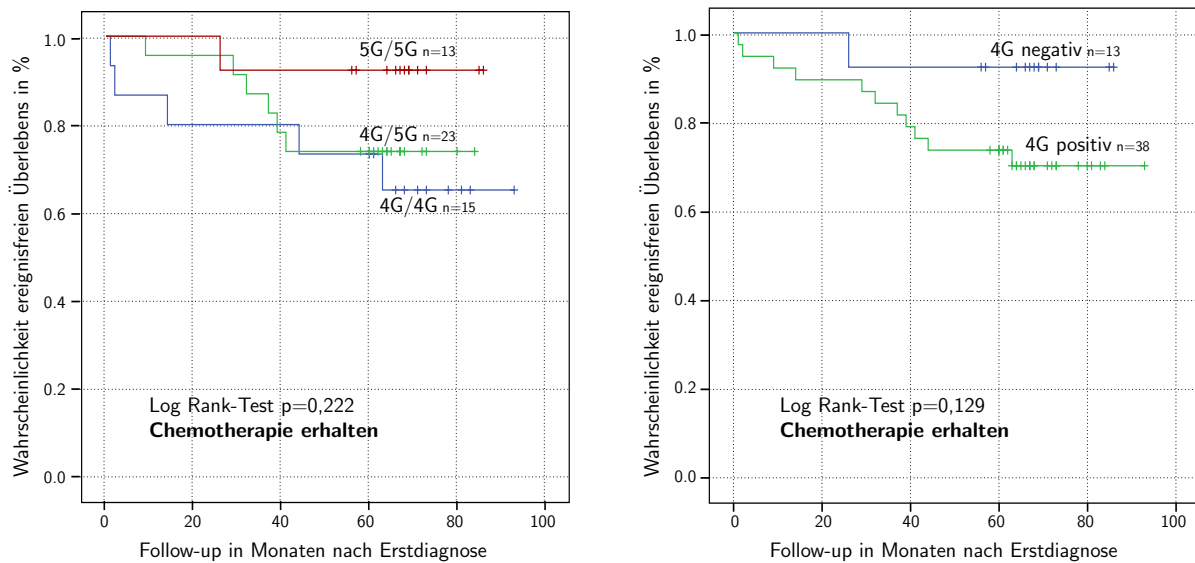
4.7.4 Stratifizierung nach Chemotherapie

Von den 91 Patientinnen hatten 51 Patientinnen eine Chemotherapie erhalten, 45 Patientinnen waren nicht durch eine Chemotherapie behandelt worden (Tab. 16).

Tabelle 16: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von dem Genotypenstatus bei chemotherapierten und unbehandelten Patientinnen

Chemotherapie	Genotyp	Patientinnen (gesamt)	Anzahl der Ereignisse	Anteil ohne Ereignisse
nein	4G/4G	18	1	94%
	4G/5G	22	0	100%
	5G/5G	5	0	100%
	Gesamt	45	1	98%
ja	4G/4G	15	5	67%
	4G/5G	23	6	74%
	5G/5G	13	1	92%
	Gesamt	51	12	77%
Gesamt		96	13	87%

In der unbehandelten Gruppe waren zu wenig Ereignisse, um Rückschlüsse auf die Bedeutung des PAI-1 Genotyps auf die Prognose zu erlauben. Für die Gruppe der Patientinnen, die eine Chemotherapie erhalten hatten, zeigte sich tendenziell ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Wahrscheinlichkeit eines ereignisfreien Überlebens. Patientinnen mit dem 4G/4G-Genotyp hatten häufiger ein Ereignis als Patientinnen mit dem 5G/5G-Genotyp, allerdings bestand statistisch keine Signifikanz ($p=0,222$), (Abb. 19(a)).



(a) Status Genotyp

(b) Status 4G-Allel

Abbildung 19: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Genotyp- und 4G-Allel-Status bei chemotherapierten Patientinnen

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Patientinnen, die in Abhängigkeit des Risikoprofils des Mammakarzinoms eine Chemotherapie erhalten hatten und den 4G/4G-Genotyp aufwiesen, im Vergleich mit den anderen Genotypen eine insgesamt geringere Wahrscheinlichkeit für ereignisfreies Überleben hatten (Abb. 19(a)). Die Patientinnen, die Trägerinnen mindestens eines 4G-Allels waren, wiesen eine tendenziell ungünstigere Überlebenswahrscheinlichkeit auf (71% vs. 92%; $p=0,129$), Abb. 19(b)).

Untersucht man die Bedeutung der tumoralen PAI-1-Expression in chemotherapierten und nicht behandelten Patientinnen (Tab. 17), so zeigt sich tendenziell

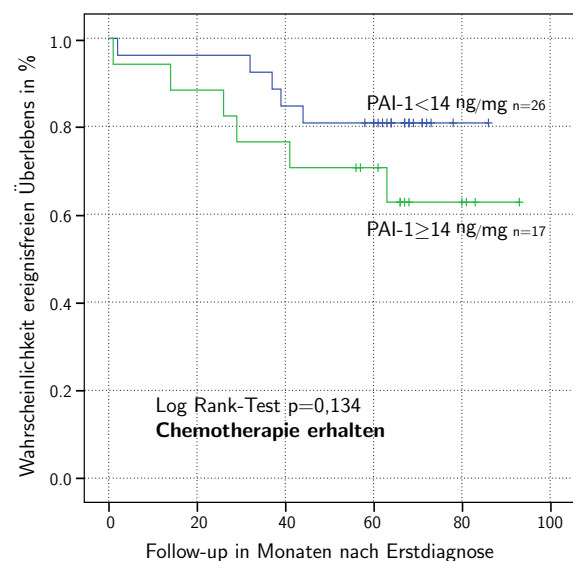


Abb. 20: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der PAI-1-Expressions bei chemotherapierten Patientinnen

sowohl für die chemotherapierten Patientinnen als auch für die nicht behandelten eine höhere Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses beim Vorliegen erhöhter PAI-1-Werte ($p=0,134$, Abb. 20).

Tabelle 17: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der PAI-1-Expression bei chemotherapierten Patientinnen

Chemotherapie	PAI-1-Konzentration	Patientinnen (gesamt)	Anzahl der Ereignisse	Anteil ohne Ereignisse
nein	PAI-1 ≥ 14 ng/mg	12	1	92%
	PAI-1 < 14 ng/mg	29	0	100%
	Gesamt	41	1	98%
ja	PAI-1 ≥ 14 ng/mg	17	6	65%
	PAI-1 < 14 ng/mg	26	5	81%
	Gesamt	43	11	74%
Gesamt		84	12	86%

KAPITEL 5

Diskussion

Das Anliegen dieser Arbeit war es zum einen, den Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus im Promotorbereich des PAI-1-Gens und der Inzidenz des primären Mammakarzinoms der Frau einerseits und zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und den etablierten klinisch-pathologischen Faktoren andererseits zu identifizieren. Zum anderen wurde die PAI-1-Expressionsrate im Brustkrebsgewebe im Zusammenhang mit dem 4G/5G-Polymorphismus und den klinisch-pathologischen Faktoren analysiert. Weiterhin wurde die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des jeweiligen 4G/5G-Genotyps, der PAI-1-Expression und den klinisch-pathologischen Daten (Nodalstatus, Tumorgröße und Grading) berechnet. Darüberhinaus wurde die Erkrankungschance in Abhängigkeit von 4G/5G-Polymorphismus und PAI-1-Expressionslevel im Vergleich zu den literarischen Angaben betrachtet.

Es sind bereits Untersuchungen zur Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus beim Mammakarzinom publiziert worden (BLASIAK et al., 2000b, ALVAREZ-MILLÁN et al., 2002, CASTELLÓ et al., 2006, STERNLICHT et al., 2006, ZHANG et al., 2006, MINISINI et al., 2007, LEI et al., 2008, YAGMURDUR et al., 2008, PALMIROTTA et al., 2009, LEE et al., 2013) jedoch ist die Datenlage diskordant. Anhand eines Halleschen Kollektivs sollte die Rolle des 4G/5G-Polymorphismus beim Mammakarzinom in dieser Arbeit erneut untersucht werden. Das untersuchte Kollektiv umfasste 104 Patientinnen und 104 gesunde Frauen. Bei 12 Patientinnen wurde die Genotypisierung zum Vergleich außer anhand von Leukozyten auch anhand von Tumorgewebe durchgeführt. Der Genotyp war in den Leukozyten und im Tumorgewebe bei allen 12 Patientinnen identisch.

Dieses Ergebnis entsprach der Erwartung, da es sich beim 4G/5G-Polymorphismus um einen Keimbahn-SNP, und nicht um eine Neumutation, die im Laufe der Karzinogenese erworben wurde, handelt. Türkmen et al. wiesen ebenfalls bei fünf an einem Ovarialtumor erkrankten Frauen keinen Unterschied des 4G/5G-Genotyps im Promotorbereich des PAI-1-Gens in Leukozyten und Tumorgewebe nach, ebenso Blasiak et al. bei 25 Patienten mit einem Kolonkarzinom (TURKMEN et al., 1997, BLASIAK et al., 2000a). Palmirotta et al., die den 4G/5G-Polymorphismus bei 99 Patientinnen mit einem Mammakarzinom aus Tumorzellen und Lymphozyten bestimmten, beobachteten nur in 5% der Fälle einen abweichenden Genotyp, was im Zuge der Karzinogenese mit einer möglichen genetischen Instabilität der Tumor-DNA diskutiert wurde (PALMIROTTA et al., 2009, ZHANG et al., 2006).

5.1 Der 4G/5G-Polymorphismus und die Inzidenz des primären Mammakarzinoms

Aufgrund der hohen prognostischen und prädiktiven Aussagekraft der PAI-1-Expression im Tumorgewebe beim primären Mammakarzinom wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob der 4G/4G-Genotyp mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein Mammakarzinom einhergehen könnte. Basierend auf *in vitro* Daten sollte der 4G/4G-Genotyp theoretisch zu einer höheren PAI-1 Expression führen und könnte somit eine höhere Inzidenz an Mammakarzinom und/oder einen aggressiveren Krankheitsverlauf zur Folge haben. Meine Untersuchungen erbrachten allerdings keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Inzidenz eines Mammakarzinoms und dem 4G/5G-Polymorphismus im Promotorbereich des PAI-1-Gens. Vielmehr besteht eine nahezu identische Verteilung des Genotyps zwischen der Gruppe der untersuchten Patientinnen und der Gruppe der untersuchten gesunden Frauen. Dabei trat der dominierende heterozygote 4G/5G-Genotyp in beiden Gruppen mit etwa 50% gleich häufig auf. Die Häufigkeit des 4G/4G-Genotyps war in der Gruppe der Patientinnen nur leicht erhöht, so dass das Odds Ratio für Patientinnen mit einem 4G/4G-Genotyp im Vergleich zu Patientinnen mit 5G/5G-Genotyp nicht signifikant etwa 1,21 betrug.

Vergleicht man diese Daten mit Untersuchungsergebnissen anderer Studien am primären Mammakarzinom, so wiesen mehrere Studien eine ähnliche Verteilung des Genotyps auf (BLASIAK et al., 2000b, ALVAREZ-MILLÁN et al., 2002, CASTELLÓ et al., 2006, STERNLICHT et al., 2006, ZHANG et al., 2006, LEI et al., 2008, YAGMURDUR et al., 2008). Die Arbeitsgruppe von Blasiak et al. zeigte ebenfalls bei 100 Frauen mit einem duktalem Mammakarzinom im Vergleich zu 106 gesunden Frauen einen unwesentlichen Unterschied in der Verteilung des Genotyps bzw. in der Häufigkeitsverteilung der Allele (BLASIAK et al., 2000b). Ebenso wiesen Sternlicht et al., die eine große Population von 2539 britischen Patientinnen und 1832 gesunden Frauen auf ihren 4G/5G-Genotyp hin untersuchten, eine nahezu identische Verteilung des Genotyps in diesen zwei Gruppen ohne statistisch signifikanten Unterschied nach (STERNLICHT et al., 2006). Diese Ergebnisse wurden außerdem bestätigt von der Arbeitsgruppe Palmirotta et al., die 99 Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu 50 gesunden Frauen untersuchten (PALMIROTTA et al., 2009), und auch durch Minisini et al., die den Genotyp von 193 Patientinnen und 142 Kontrollen analysierten (MINISINI et al., 2007).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beschrieben zwei Studien einen Einfluss des 4G-Allels auf die Inzidenz des Mammakarzinoms: Castello et al. wiesen einen tendenziellen Einfluss des 4G-Allels bei 104 Patientinnen nach (CASTELLÓ et al., 2006), Eroglu et al. fanden ein signifikant erhöhtes Risiko des 4G/4G-Genotyps bei 22 Patientinnen (EROGLU et al., 2006). Eine hierzu veröffentlichte Metaanalyse von Lee et al. umfasste die zehn wichtigsten Studien, die den 4G/5G-Polymorphismus beim Mammakarzinom untersuchten, von denen wiederum sieben Studien – mit insgesamt 3976 Patientinnen und 3276 Kontrollen - den Zusammenhang zwischen 4G/5G-Polymorphismus und Inzidenz berücksichtigten. Dieser Metaanalyse ließ sich entnehmen, dass der 4G/4G-Genotyp mit einem 39% erhöhten Risiko einen signifikanten Einfluss auf die Brustkrebsinzidenz ausübt, im Vergleich zu den anderen Genotypen (LEE et al., 2013).

Hinsichtlich des Einflusses des 4G/5G-Polymorphismus auf die Inzidenz anderer Tumorerkrankungen liegen zwei große kürzlich erschienene Metaanalysen vor, die den 4G/5G-Polymorphismus im Zusammenhang mit dem Ovarial-, Endometrium-, Zervix-, Prostata-, Kolon-, Rektum-, Magen-, Mundhöhlen-, Leberzell- und auch Mammakarzinom untersuchten. Die Metaanalyse von Wang et al., die 25 Fall-Kontroll-Studien (9205 Fälle, 11827 Kontrollen), davon acht Mammakarzinomstudien, umfasste, dokumentierte einerseits einen Zusammenhang zwischen dem 4G/4G-Genotyp und einem erhöhten Krebsrisiko - besonders für die im angelsächsischen Sprachraum sogenannten „Kaukasier“ - und andererseits ein höheres Risiko für Patienten mit bereits einem 4G-Allel, an einem Kolonkarzinom (5 Studien) oder einem Endometriumkarzinom (2 Studien) zu erkranken. Dagegen fand sich laut dieser Analyse kein Hinweis für ein erhöhtes Risiko, an Brustkrebs, Ovarialkarzinom, Mundbodenkarzinom oder einem hepatozellulären Karzinom zu erkranken (WANG et al., 2013).

Betrachtet man die einzelnen Studien, so wiesen sie bezüglich des Kolonkarzinoms und des Endometriumkarzinoms die meisten übereinstimmenden Ergebnisse auf: der 4G/4G-Genotyp wurde beim Kolonkarzinom vorwiegend im Zusammenhang mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium festgestellt, und die zwei Studien zum Endometriumkarzinom zeigten, dass sich Trägerinnen des 4G/4G-Genotyps vor allem unter den Patientinnen fanden (LOKTIONOV et al., 2003, FÖRSTI et al., 2007, VOSSEN et al., 2011, WOO et al., 2007, GILABERT-ESTELLÉS et al., 2012, SU et al., 2011). Eine vergleichbare Metaanalyse von Xu et al., die insgesamt 21 Studien berücksichtigte, wovon 19 ebenso in der Metaanalyse von Wang et al. einbezogen wurden, bestätigte das erhöhte Krebsrisiko für „kaukasische“ Trägerinnen des 4G/4G-Genotyps im Allgemeinen, sowie das erhöhte Risiko bei Vorliegen des 4G-Allels, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken (XU et al., 2012). Andere Studien fanden dagegen Hinweise für ein erhöhtes Risiko durch ein vorliegendes 5G-Allel, an einem hepatozellulären Karzinom und einem familiären Prostatakarzinom zu erkranken (WENG et al., 2010, JORGENSON et al., 2007).

Aufgrund der diskordanten Datenlage kann der PAI-1-4G/5G-Polymorphismus bislang nicht als zusätzlicher Faktor zur Abschätzung des Brustkrebsrisikos herangezogen werden. Allerdings bleibt es erwähnenswert, dass trotz der unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse die Metaanalyse von Lee et al. ein erhöhtes Brustkrebsrisiko für Patientinnen mit einem 4G/4G-Genotyp bestätigte (LEE et al., 2013). Möglicherweise war die Anzahl der eingeschlossenen Patientinnen und Kontrollen in den einzelnen Studien zu gering, so dass erst die erhöhte Power durch Zusammenführung der Ergebnisse in der Metaanalyse eine ausreichende Aussagekraft schuf.

5.2 Der PAI-1-4G/5G-Polymorphismus und die "klassischen" klinisch-pathologischen Parameter

Der Vergleich des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus mit den klinisch-pathologischen Daten der Patientinnen zeigte in meiner Untersuchung ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation. Auffallend war jedoch, dass fünf der neun Patientinnen mit der Tumorgroße pT3/4 den 4G/4G-Genotyp aufwiesen. Dieses Ergebnis könnte allerdings aufgrund der geringen Patientenzahl auch einen zufäl-

ligen Befund darstellen (vgl. Tab. 4). Hinsichtlich der Allelverteilung ist erwähnenswert, dass bei Patientinnen mit 4G-Allel häufiger ein negativer Hormonrezeptorstatus (ER/PR) festgestellt wurde (vgl. Tab. 4).

Auch im Hinblick auf den Vergleich des 4G/5G-Genotyps mit klinisch-pathologischen Faktoren existieren in der Literatur sehr unterschiedliche Daten. Blasiak et al., Sternlicht et al. und Palmirotta et al. verzeichneten keinen Zusammenhang zwischen dem Genotyp bzw. den Allelen und den klinisch-pathologischen Daten (BLASIAK et al., 2000b, STERNLICHT et al., 2006, PALMIROTTA et al., 2009). Alvarez-Millan et al. hingegen, die 28 Patientinnen einschlossen, stellten für den 5G/5G-Genotyp eine nahezu statistisch signifikante Korrelation dahingehend fest, dass Tumoren dieser Patientinnen weniger aggressiv und besser differenziert waren und tendenziell mehr Patientinnen einen positiven Hormonrezeptorstatus – und damit bessere therapeutische Möglichkeiten und prognostische Merkmale - aufwiesen (ALVAREZ-MILLÁN et al., 2002). Ergänzend zu diesen Daten von Alvarez-Millan sind die Ergebnisse von Castello et al. zu betrachten, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des 4G-Allels und einem höheren histologischen Malignitätsgrad (G3) sowie einer Tumorgroße >2 cm identifizierten (CASTELLÓ et al., 2006). Einen positiven Zusammenhang zwischen 4G/4G-homozygoten Trägerinnen und einem positiven Nodalstatus wiesen Minisini und seine Arbeitsgruppe nach (MINISINI et al., 2007).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stellten Lei et al. bei 959 an einem Mammakarzinom erkrankten schwedischen Frauen eine Korrelation zwischen dem 5G/5G-Genotyp einerseits und einem erhöhten Vorkommen regional befallener Lymphknoten, einem höheren Malignitätsgrad und der Tumorgroße andererseits fest (LEI et al., 2008). Betrachtet man nun die Ergebnisse der bereits oben genannten Metaanalyse von Lee et al., so wurde laut selbiger in der Auswertung von fünf Studien ein positiver Zusammenhang zwischen dem 5G/5G-Genotyp und Lymphknotenmetastasen ermittelt ($p=0,018$). Keine Korrelation ergab der Vergleich der Genotypen mit dem histologischen Befund anhand von vier vergleichbaren Studien (LEE et al., 2013). Dieser Vergleich zwischen Genotyp bzw. Allel-Häufigkeit und den klinisch-pathologischen Daten lässt ebenfalls aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse keinen eindeutigen Zusammenhang erkennen. Ein unmittelbarer Einfluss des 4G/5G-Genotyps auf die Schwere der Tumorerkrankung erscheint daher zum gegenwärtigen Kenntnisstand nicht wahrscheinlich. Allerdings dürfen die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Lei et al. nicht außer acht gelassen werden, die – anders als die anderen berücksichtigten Studien - eine größere Population von 959 Frauen mit einem primären Mammakarzinom untersuchten und eine deutliche Korrelation zwischen dem 5G/5G-Genotyp und einem aggressiveren Tumor dokumentierten (LEI et al., 2008). Die Differenz könnte zum einen auf die im Studienmaterial teilweise fehlenden Angaben zu klinisch-pathologischen Faktoren zurückzuführen sein, zum anderen diskutierten Sternlicht et al. eine mögliche Diskrepanz nicht nur im Rahmen der unterschiedlich modifizierenden molekulargenetischen Faktoren, sondern auch im Rahmen von Lebensgewohnheiten (z.B. Rauchen, Ausmaß körperlicher Bewegung, fettreiche Ernährung, Aufnahme von Antioxidantien), demographischen und

biologischen (z.B. Menopause) Einflüssen (LEI et al., 2008, STERNLICHT et al., 2006, HOEKSTRA et al., 2003).

5.3 Der PAI-1-4G/5G-Polymorphismus und die PAI-1/uPA-Expression im Tumorgewebe

Ich betrachtete in dieser Arbeit nicht nur die PAI-1, sondern auch die uPA-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum 4G/5G-Genotyp, da interessanterweise Sarah Vogel im Rahmen ihrer Masterarbeit in dem Forschungslabor der Gynäkologie in Halle an zwei unterschiedlichen mesenchymalen, tripel-negativen Brustkrebszelllinien (HS578T- und MDA-MB 231-Zellen) gezeigt hatte, dass PAI-1 und uPA sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen (VOGEL, 2012). So wurde nachgewiesen, dass PAI-1 je nach Zelltyp nicht nur inhibitorische Wirkung auf uPA haben kann, sondern die uPA-Expression auch stimulieren und überdies uPA auch positiven Einfluss auf die PAI-1-Expression ausüben kann. Dies könnte auch die zum Teil korrelierenden Ergebnisse in meiner Arbeit zwischen der uPA-Konzentration und dem 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus erklären und zwar dahingehend, dass mit Vorliegen des 4G-Allels und erhöhten PAI-1-Konzentrationen ebenfalls die uPA-Konzentration steigt (vgl. Tab. 9).

Der 4G/4G-Genotyp wurde tendenziell häufiger bei jenen Patientinnen nachgewiesen, die PAI-1-Werte über dem definierten Schwellenwert aufwiesen, wohingegen der 5G/5G-Genotyp häufiger bei solchen Patientinnen mit geringerem PAI-1-Level identifiziert wurde. Der Genotyp 4G/5G war vorwiegend in der Subgruppe mit PAI-1-Werten unterhalb des Schwellenwertes zu verzeichnen. Hinsichtlich der uPA-Werte bestand, in Parallelität zum Befund der PAI-1-Expression, ein leichter Trend dahingehend, dass mehr Patientinnen mit einem 4G/4G-Genotyp uPA-Werte oberhalb des festgesetzten Schwellenwertes aufwiesen und Patientinnen mit einem 5G/5G-Genotyp eher Werte unterhalb desselben (vgl. Tab. 7). Auch im Vergleich der PAI-1- und uPA-Konzentrationen mit den einzeln betrachteten Allelen zeigte sich bei Patientinnen, die homozygot für das 5G-Allel bzw. Trägerinnen eines 5G-Allels waren, dass diese signifikant häufiger PAI-1-Werte unter dem Schwellenwert erkennen ließen ($p=0,018$) – und zugleich zeigte sich auch ein diskreter Zusammenhang für niedrige uPA-Konzentrationen und Vorliegen eines 5G-Allels (vgl. Tab. 8). Das 4G-Allel betrachtend ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation, wohl aber ein diskreter Zusammenhang zwischen dem 4G-Allel und erhöhten PAI-1- (87% vs. 82%) und uPA- (89% vs. 81%) Konzentrationen (vgl. Tab. 9).

Diese Befunde könnten darauf hinweisen, dass die die PAI-1-Expression mindernde Auswirkung des 5G-Allels die Wirkung des 4G-Allels, die zu einer Zunahme der Expression führt, quantitativ übersteigt.

Viele Studien haben auf Grund des Einflusses von PAI-1 auf die Schwere zahlreicher Tumorerkrankungen, Erkrankungen des kardiovaskulären Systems und entzündlichen Erkrankungen die PAI-1-Konzentration im Tumorgewebe bzw. im Plasma im Zusammenhang mit dem 4G/5G-Polymorphismus untersucht. Bezüglich des Mammakarzinoms bestätigte die Arbeitsgruppe von Castello et al. eben-

falls bei 104 Patientinnen, die ein 4G-Allel aufwiesen, eine statistisch signifikante Erhöhung der PAI-1-Konzentration im Tumorgewebe (CASTELLÓ et al., 2006). Sternlicht et al. und Palmirotta et al. bestätigten diesen Zusammenhang beim Mammakarzinom hingegen nicht, allerdings ermittelten Palmirotta et al. die PAI-1-Konzentration im Plasma anstatt im Tumorgewebe (PALMIROTTA et al., 2009). In einer Untersuchung bei Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom wurde ebenfalls eine Zunahme der mRNA-PAI-1-Expression beim Vorliegen des 4G-Allels im Vergleich zum 5G-Allel (GILABERT-ESTELLÉS et al., 2012) gefunden.

Weitere Studien, die den Zusammenhang zwischen dem PAI-1-4G/5G-Polymorphismus und PAI-1-Werten beim Myokardinfarkt, ischämischen Hirninfarkt, tiefer Beinvenenthrombose, beim allergischen Asthma sowie der Sepsis im Serum oder in Mastzellen untersuchten, dokumentierten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem 4G-Allel und erhöhten PAI-1-Konzentrationen (ERIKSSON et al., 1995, IWAI et al., 1998, SEGUI et al., 2000, GOOR et al., 2005, HERMANS et al., 2005, DING et al., 2006, MA et al., 2009), wohingegen die Arbeitsgruppe von de Paula Sabino et al. bei jungen Patienten mit einem ischämischen Hirninfarkt dies nicht beobachtete (PAULA SABINO et al., 2011).

Wie zuvor erwähnt, führten frühere Untersuchungen zu der Hypothese, dass mit Vorliegen eines 4G-Allels im Rahmen des 4G/5G-SNPs im Promotorbereich des PAI-1-Gens die Bindung eines 5G-abhängigen Repressors während der Transkription erschwert oder verhindert wird, was wiederum zu einer erhöhten PAI-1-Expression führt. Die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse sind erklärbar, führt man sich die vielfältigen Faktoren, die ebenfalls Einfluss auf die PAI-1-Expressionsrate haben, vor Augen. Dazu gehören zahlreiche regulatorische Faktoren, die die Transkription von PAI-1 regulieren können, wie Wachstumsfaktoren (z.B. EGF), Hormone (z.B. Insulin oder Glukokortikoide), Zytokine (z.B. TGF- β 1, TNF- α , IL-1 oder IL-6) oder das Apoptose-regulierende Protein p53 (BINDER et al., 2002). Aktuelle Untersuchungen beschreiben zudem eine Genregulation mittels „Long-Range“ regulatorischen Elementen, die in nicht kodierenden DNA-Abschnitten distal des Promotorbereichs liegen und anhand von Long-Range-DNA-Interaktionen durch Ausbildung von Chromatin-Loops das Ziel-Gen bzw. seine Transkriptionsfaktoren positiv oder negativ beeinflussen (BETTS et al., 2012). Außer den Tumorzellen selbst können auch stromale Zellen, welche die Tumorzellen umgeben, wie Fibroblasten, Makrophagen oder Endothelzellen (BIANCHI et al., 1995, USHER et al., 2005) an der PAI-1 Expression beteiligt sein und zur Komplexität der PAI-1 Expression im Tumorgewebe beitragen. Ferner zeigte sich, dass die einzelnen Komponenten des Plasminogen-Aktivator-Systems in verschiedenen Zellen unterschiedlich stark exprimiert werden können (HILDENBRAND et al., 2008, CHARAFE-JAUFFRET et al., 2006). Darüber hinaus beeinflussen ebenso epigenetische Veränderungen und Genamplifikation die PAI-1 Expression (STERNLICHT et al., 2006). Einige Autoren gehen davon aus, dass letztgenannte Faktoren sogar noch einen viel größeren Stellenwert bezüglich der PAI-1 Genexpression einnehmen (BISSELL et al., 1999) als zum Beispiel der 4G/5G-Polymorphismus. Das Ausmaß, in dem PAI-1 exprimiert wird, muss sicherlich als Folge des komplexen Zusammenspiels all der genannten Faktoren zu sehen sein.

5.4 Unterschiedliche PAI-1-Expression und ihre Auswirkung auf klinisch-pathologische Parameter

Aufgrund des bekannten negativen Einflusses von PAI-1 auf die Prognose des Mammakarzinoms sowie der Kenntnis über den Einfluss von PAI-1 auf Tumorgenese und Tumorprogression untersuchte ich, inwieweit die PAI-1-Expression im Zusammenhang mit günstigen – d.h. weniger fortgeschrittenen - bzw. ungünstigen klinisch-pathologischen Faktoren steht.

Der Vergleich von PAI-Konzentrationen mit klinisch-pathologischen Daten zeigte in meiner Untersuchung keinen signifikanten Zusammenhang. Allenfalls konnte ein tendenzieller Effekt bei jenen Patientinnen nachgewiesen werden, deren Tumor positiv für den Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor war und PAI-1-Expressionen unterhalb des Schwellenwertes aufwiesen. Zudem zeichnete sich ein diskreter Zusammenhang zwischen positivem Nodalstatus (41% vs. 31%), höherem Malignitätsgrad (G3 56% vs. G2 28% vs. G1 33%) und einer erhöhten PAI-1-Konzentration ab (vgl. Tab. 10), der teilweise auch in der Literatur beschrieben wurde.

Eine Metaanalyse, die 18 Studien mit insgesamt 8377 Mammakarzinom-Patientinnen umfasste, bestätigte eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten PAI-1-Expression auf der einen und einem positiven Nodalstatus, einem höheren Malignitätsgrad, negativem Hormonrezeptorstatus (ER und/ oder PR), einer Tumorgroße von T2 bis T4 und dem Alter der Patientinnen (<35 und >70 Jahren) auf der anderen Seite (LOOK et al., 2002). Einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhtem PAI-1-Level und negativem Hormonrezeptorstatus zeigten auch Jänicke et al. (JAENICKE et al., 1993). Ebenso fand die Arbeitsgruppe von Castello et al. eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten PAI-1-Konzentration und einem höheren Malignitätsgrad und auch der Tumorgroße (CASTELLÓ et al., 2006). Palmirotta et al. konstatierten ergänzend einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einem erhöhten PAI-1-Wert und der Tumorgroße T3/T4 (PALMIROTTA et al., 2009). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Alvarez et al., die eine positive Assoziation zwischen erhöhten intrazellulären uPA-PAI-1-Komplexen und einem tendenziell weniger aggressiven und besser differenzierten Tumor aufzeigten (ALVAREZ-MILLÁN et al., 2002).

PAI-1 ist ebenfalls bekannt als Risikofaktor für kardiovaskuläre und entzündliche Erkrankungen. Auch beim Diabetes mellitus Typ 2 spielt PAI-1 möglicherweise eine pathogenetische Rolle, da sich eine Korrelation zwischen einer erhöhten PAI-1-Konzentration im Serum und der Ausprägung der Insulin-Resistenz zeigte, was wiederum mit einem erhöhten Risiko für eine koronare Herzerkrankung assoziiert war (MANSFIELD et al., 1996). Zudem wurde eine erhöhte PAI-1-Serumkonzentrationen bei Patienten, die einen ischämischen Hirninfarkt erlitten, im Vergleich zu einer gesunden Population dokumentiert (MARGAGLIONE et al., 1994) (LINDGREN et al., 1996). Die Arbeitsgruppe von van Goor et al. bestätigte diesen Zusammenhang bei 125 niederländischen Patienten allerdings nicht (GOOR et al., 2005). Ferner korrelierten erhöhte PAI-1-Konzentrationen bei Frauen und Männern, die ein erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil aufwiesen, mit einer positiven Wahrscheinlichkeit, an

einem akuten Koronarsyndrom neu zu erkranken (THÖGERSEN et al., 1998). Auch unabhängig von einem kardiovaskulären Risikoprofil wurden erhöhte PAI-1-Werte in Korrelation mit einer koronaren Herzerkrankung nachgewiesen (ANVARI et al., 2001).

Die teils unterschiedlichen, teils korrelierenden Ergebnisse bezüglich des Mammakarzinoms könnten einerseits auf die Komplexität von PAI-1 im Rahmen des Plasminogen-Aktivator-Systems mit seinen proteolytischen, aber auch nicht-proteolytischen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der extrazellulären Matrix, andererseits auf die unterschiedliche Beeinflussung der einzelnen Komponenten des uPA-Systems untereinander zurückzuführen sein (DELLAS et al., 2005, MCMAHON et al., 2007, VOGEL, 2012). Zudem wird PAI-1, wie bereits beschrieben, von unterschiedlichen Zellen in unterschiedlicher Konzentration exprimiert und wirkt in Abhängigkeit davon inhibierend oder fördernd auf die Tumorgenese (HILDENBRAND et al., 2008, BAJOU et al., 1998, GUTIERREZ et al., 2000, STEFANSSON et al., 2001, MCMAHON et al., 2001, BAJOU et al., 2004). PAI-1 wurde als ein von den klassischen klinisch-pathologischen Faktoren unabhängiger Prognosefaktor, als welcher es beim primären Mammakarzinom mittlerweile etabliert ist, in dieser Arbeit bestätigt.

5.5 Der 4G/5G-Polymorphismus und die Prognose des Mammakarzinoms

Um einen möglichen Einfluss des 4G/5G-Genotyps auf die Prognose der Mammakarzinom-Patientinnen zu untersuchen, wurde nach einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 62,83 Monaten von 96 Patientinnen des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit ihres jeweiligen 4G/5G-Genotyps, der einzelnen 4G- bzw. 5G-Allele sowie der PAI-1- und uPA-Konzentrationen die Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Kaplan-Meier-Analysen berechnet. Zudem wurde die Prognose mit den bereits genannten Variablen in Abhängigkeit des jeweiligen Nodalstatus, der Tumorgöße und des Gradings in Zusammenhang gebracht. Schließlich betrachtete ich den Einfluss des 4G/5G-Genotyps auf die Progression der Erkrankung unter Berücksichtigung, ob die untersuchten Patientinnen eine Chemotherapie erhalten hatten und ob eine vom Genotyp abhängige Therapiesensitivität bestand.

5.6 Der 4G/5G-Genotyp und die Allelverteilung bezogen auf die Prognose des Mammakarzinoms

Insgesamt wurde keine signifikante Korrelation zwischen den einzelnen Genotypen und der einzelnen Allele auf die Überlebenswahrscheinlichkeit gefunden. Bemerkenswert ist allerdings, dass in den Subgruppen der Patientinnen mit 4G/4G- oder 4G/5G-Genotyp jeweils sechs von insgesamt dreizehn Ereignissen zu verzeichnen waren und demgegenüber nur ein Ereignis bei für das 5G-Allel homozygoten Patientinnen auftrat. Die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens lag somit bei Patientinnen mit einem 5G/5G-Genotyp am höchsten. Dementsprechend stellt sich die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der jeweiligen Allele dar: Zwölf Ereignisse traten bei Patientinnen mit 4G-Allel auf, die damit eine Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens von 84,6% (vs. 94,4% im Vergleich zu den 4G-negativen Patientinnen) besaßen.

Keinen deutlichen Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit erbrachte die Berechnung für das

5G-Allel. Allerdings zeichnete sich auch hier eine schlechtere Prognose bei 5G-negativen Patientinnen ab (vgl. Abb. 10-11(b)). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse kann ein Zusammenhang zwischen Vorliegen des 4G/4G-Genotyps bzw. des 4G-Allels auf der einen und einer höheren Ereignisrate - und damit einer insgesamt schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit auf der anderen Seite - angenommen werden. Allerdings bleibt die Aussagekraft aufgrund der geringen Ereignisrate unterhalb der statistischen Signifikanz. Bemerkenswert ist, dass es sich bei allen dreizehn Ereignissen um das Auftreten einer Metastasierung handelte, wobei zwei Patientinnen gleichzeitig auch ein erneutes Lokalrezidiv aufwiesen. Nicht sicher sagen lässt sich jedoch, ob dieser Befund für ein vom Genotyp abhängiges Risiko einer Metastasierung spricht – denkbar wäre eine Verbindung zwischen dem Vorliegen eines 4G-Allels und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Metastasenentwicklung.

Für einen Vergleich mit anderen Kriterien der Tumorprogression, wie etwa dem Auftreten eines Lokalrezidivs, wäre jedoch eine größere zu untersuchende Fallzahl erforderlich.

Vergleichbare Untersuchungen diesbezüglich zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Sternlicht et al., die von 2539 britischen Frauen mit einem Mammakarzinom die Prognose in Abhängigkeit des jeweiligen Genotyps bestimmten, stellten keinen Zusammenhang fest (STERNLICHT et al., 2006), ebenso eine Metaanalyse der Arbeitsgruppe von Lee et al., welche die wichtigsten Arbeiten zu diesem Thema berücksichtigte (LEE et al., 2013).

Die Arbeitsgruppe von Zhang dagegen, die 1083 chinesische Patientinnen mit Mammakarzinom untersuchten, fand bei 4G-homozygoten Patientinnen eine statistisch signifikant erhöhte Ereignisrate sowie ein dadurch vermindertes Gesamtüberleben im Vergleich zu 5G-homozygoten Trägerinnen (ZHANG et al., 2006). Diesem Befund entgegengesetzt fanden Lei und Mitarbeiter einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Vorliegen des 5G/5G-Genotyps und einem ungünstigeren Gesamtüberleben (LEI et al., 2008).

In Hinblick auf andere Tumorerkrankungen stellten De Haas et al., die den 4G/5G-Polymorphismus bei 324 Männern mit einem Hodentumor (Nichtseminom) untersuchten, ebenfalls eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem 4G/4G-Genotyp und einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit fest (HAAS et al., 2010). Eine günstigere Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte sich zudem bei Patienten mit einem Kolonkarzinom (Stadium A und B nach der Dukes-Klassifikation) und dem Nachweis des 5G/5G-Genotyps in einer Arbeit von Försti et al., die 308 Patienten dahingehend untersuchten (FÖRSTI et al., 2007). In einer Studie von Halamkova et al., die ebenfalls den 4G/5G-Polymorphismus im Zusammenhang mit der Überlebenswahrscheinlichkeit bei 80 Patienten mit einem Kolonkarzinom untersuchten, wurde hingegen kein Zusammenhang gefunden (HALAMKOVA et al., 2013).

5.7 PAI-1- und uPA-Expression und Prognose des Mammakarzinoms

Von den 96 Patientinnen, bei denen eine Nachbeobachtung möglich war, lagen von 84 Patientinnen die PAI-1- und uPA-Konzentrationen vor, so dass zusätzlich die Prognose dieser Patientinnen in Abhängigkeit der Expression von PAI-1 und uPA bestimmt wurde. Hierbei ergab sich in der Tendenz für Patientinnen mit erhöhten PAI-1-Konzentrationen eine geringere (75,9%ige vs. 90,9%ige) Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens. Für uPA zeigte sich ein noch deutlicherer, statistisch signifikanter Effekt mit geringerer Wahrscheinlichkeit ereignisfreien Überlebens (70,8% im Vergleich zu 91,7%) bei hohen uPA-Konzentrationen. Unter Berücksichtigung beider Parameter ergab sich ein nahezu signifikanter Unterschied des ereignisfreien Überlebens zwischen den Patientinnen, die niedrige (93,5%) bzw. hohe (68,8%) Werte für PAI-1 und uPA aufwiesen (vgl. Abb. 8(a)-9). Diese Ergebnisse sind konkordant mit den Befunden mehrerer bereits publizierter Untersuchungen zum Mammakarzinom (JÄNICKE et al., 1991, HARBECK et al., 1999, LOOK et al., 2002, DUFFY et al., 2004, STERNLICHT et al., 2006, HARBECK et al., 2013a) und auch zu anderen Tumorerkrankungen wie beispielsweise dem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (HUNSDORFER et al., 2004), dem Magenkarzinom (SAKAKIBARA et al., 2006), dem Kolonkarzinom (HALAMKOVA et al., 2013, BLASIAK et al., 2000a, BERGER, 2002), dem Endometriumkarzinom (GILABERT-ESTELLÉS et al., 2012) sowie dem Schilddrüsenkarzinom (BALDINI et al., 2012) und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (WERLE et al., 2004). Ferner korrelieren erhöhte PAI-1-Werte mit einem erhöhten Rezidivrisiko für eine tiefe Beinvenenthrombose (SCHULMAN et al., 1996) sowie mit der Schwere und einer ungünstigen Prognose bei einer septischen Systemerkrankung (HERMANS et al., 2005). Die Bedeutung von uPA und PAI-1 als prognostische Marker bei einer Vielzahl von Erkrankungen ist damit wiederholt untermauert worden.

5.8 Nodalstatus, 4G/5G-Genotyp, PAI-1- und uPA-Expression in der Prognose des Mammakarzinoms

In der Gruppe von Patientinnen, die keine Lymphknotenmetastasen aufwiesen, existierte nur ein geringfügiger Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich der Verteilung der Ereignisse und in der Überlebenswahrscheinlichkeit. Interessanterweise zeigte sich jedoch im Vergleich zu den Patientinnen mit einem nodal-positiven Status, dass der 4G/5G-Genotyp sehr wohl Einfluss auf die Prognose hat und zwar dahingehend, dass Patientinnen mit 4G/4G- und 4G/5G-Genotyp im Vergleich zu jenen mit einem 5G/5G-Genotyp eine wesentlich ungünstigere Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens aufwiesen (vgl. Abb. 12(a) und 12(b)).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Berechnung der Prognose in Abhängigkeit des 4G-Allels verglichen mit dem 5G-Allel. Für die Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen ergab sich hierbei erneut kein relevanter Unterschied hinsichtlich der Prognose, wohingegen bei positivem Lymphknotenstatus und Vorhandensein eines 4G-Allels nur noch eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 69,6% (vs. 100% in der 4G-negativen Subpopulation) zu verzeichnen war (vgl. Abb. 13(a) und 13(b)). Diese

Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass in einem Stadium, in dem der Tumor in situ bzw. als wenig aggressive Neoplasie vorliegt, der 4G/5G-Genotyp keine relevante Aussagekraft bezüglich der Prognose besitzt, sondern dass über die Prognose vielmehr die klassischen prognostischen Parameter sowie die PAI-1-Konzentration im Tumor Aufschluss geben können. Wenn allerdings der Prozess der Invasion und Metastasierung beim Mammakarzinom eingesetzt hat und damit tendenziell hohe PAI-1-Konzentrationen zu erwarten sind, scheint sich der weitere Verlauf der Erkrankung durchaus auch in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus zu vollziehen. Dies stützt die Annahme, dass bei Vorliegen der Genotypen 4G/4G und 4G/5G transkriptionale Repressorproteine, die nur an die 5G-Sequenz binden können, nicht bzw. weniger stark die PAI-1-Konzentration inhibieren können, so dass die Invasion und Metastasierung begünstigt wird.

Betrachtet man nun die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von Nodalstatus und der PAI-1- und uPA-Konzentrationen, ergibt sich das Bild, dass sowohl bei nodalnegativen wie auch nodalpositiven Patientinnen erhöhte PAI-1- und/oder -uPA-Werte die Ereignisrate erhöhen und somit die Prognose negativ beeinflussen. Liegt zusätzlich eine nodalpositive Situation vor, so haben die Patientinnen mit zusätzlich über dem Schwellenwert liegenden PAI-1- und/oder uPA-Werten eine noch weniger günstige Prognose (vgl. Abb. 14(a) und 14(b)). Diese Ergebnisse lassen die unabhängige Einflussstärke von PAI-1 sowohl bei nodalnegativen als auch bei nodalpositiven Patientinnen deutlich erkennen sowie auch die unabhängige prognostische Aussagekraft des Nodalstatus. Viele Studien liegen bereits vor, die ebenfalls die prognostische Stärke von PAI-1 und uPA beim Mammakarzinom bestätigt sowie den Zusammenhang zwischen erhöhten PAI-1- und uPA-Konzentrationen und fortgeschrittenen bzw. aggressiveren Tumorformen beschrieben haben (JAENICKE et al., 1993, HARBECK et al., 1999, DUFFY et al., 2004, HARBECK et al., 2004, HARBECK et al., 2008, LOOK et al., 2002, PALMIROTTA et al., 2009, ELJUGA et al., 2011). PAI-1- als prognostischer Parameter sowie als Parameter für eine aggressivere bzw. invasivere Tumorverlaufsform wurde zudem beim Ovarial- und Endometriumkarzinom beschrieben, bei Karzinomen des Gastrointestinaltraktes (Ösophagus-, Magen-, Kolorektalkarzinom) und auch beim hepatozellulären Karzinom, beim Pankreaskarzinom, Nierenzellkarzinom und Gliom sowie im Zusammenhang mit einer Leukämie (ULISSE et al., 2009).

5.9 Tumorgröße, 4G/5G-Genotyp, PAI-1- und uPA-Expression in der Prognose des Mammakarzinoms

Die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Tumorgröße (gering fortgeschrittene Tumoren der Größe T1 vs. mäßig bis weit fortgeschrittene Tumoren der Größen T2-T4) und in Abhängigkeit des jeweiligen Genotyps zeigte, dass die unterschiedlichen Genotypen bei Vorliegen eines Tumors mit einer Größe von bis zu 2cm keinen relevanten Einfluss auf die Prognose hatten. Im Gegensatz hierzu zeigen meine Ergebnisse bei Tumoren, die größer als 2cm im Durchmesser waren, einen deutlichen Einfluss des 4G/4G- und 4G/5G-Genotyps auf die Überlebenswahrscheinlichkeit mit erhöhter Ereignisrate im Vergleich zum 5G/5G-Genotyp (68,8% vs. 84,2% vs. 100%, vgl. Abb.

15(a)-16(b)). Desgleichen zeigte sich erneut bei der Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Tumorgröße und der PAI-1-Konzentration der ungünstige Einfluss von PAI-1 auf die Prognose. Patientinnen mit einem T1-Tumor und einer hohen PAI-1-Konzentration wiesen eine 81,3%ige Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu einer 97,0%igen Überlebenswahrscheinlichkeit für Patientinnen mit niedrigen PAI-1-Werten auf. Eine deutlich ungünstigere Überlebenswahrscheinlichkeit von 69,2% zeigte sich dann bei Patientinnen, die ein fortgeschrittenes Mammakarzinom (T2-T4) und zusätzlich erhöhte PAI-1-Werte aufwiesen (vgl. Abb. 17(a) und 17(b)).

5.10 Grading, 4G/5G-Genotyp, PAI-1- und uPA-Expression in der Prognose des Mammakarzinoms

Ebenso wie in den vorherigen Kalkulationen ließ sich bei einem geringen Malignitätsgrad (G1) kein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Genotypen und der Ereignisrate feststellen, es war in jeder Untergruppe kein Ereignis aufgetreten. Hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit der Mammakarzinom-Patientinnen mit einem höheren Malignitätsgrad (G2-G4) zeigte sich erneut eine deutlich ungünstigere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patientinnen mit 4G/4G- oder 4G/5G-Genotyp (76,9% vs. 84,6%), wohingegen für jene Patientinnen mit einem 5G/5G-Genotyp eine 93,8%ige Überlebenswahrscheinlichkeit bestand (vgl. Abb. 18(a) und 18(b)).

Interessanterweise wurde in der Arbeit von De Haas et al. ebenfalls darüber berichtet, dass der 4G/4G-Genotyp häufiger bei Patienten mit einer aggressiveren Form des Hodentumors nachgewiesen wurde und damit auch mit einer ungünstigeren Prognose verbunden war (HAAS et al., 2010). Gleichermaßen wurde dies von der Arbeitsgruppe Försti et al. und Loktionov et al. beim Kolonkarzinom beschrieben (LOKTIONOV et al., 2003, FÖRSTI et al., 2007). Diese Ergebnisse unterstützen die auch von mir aufgestellte Hypothese, dass der 4G/5G-Genotyp vor allem bei aggressiveren und fortgeschrittenen Tumorformen als prognostischer Faktor dienen kann.

5.11 Adjuvante Chemotherapie, 4G/5G-Genotyp, PAI-1- und uPA-Expression in der Prognose des Mammakarzinoms

Schließlich untersuchte ich die Abhängigkeit des PAI-1-Polymorphismus vom Erhalt einer adjuvanten Chemotherapie. Hierbei betrachtete ich zum einen, inwieweit sich die Verlaufsformen bei unterschiedlichem Genotyp ohne Erhalt einer Chemotherapie darstellten, zum anderen ging ich der Frage nach, ob unterschiedliche Genotypen mit einer unterschiedlichen Sensitivität auf eine Chemotherapie reagierten.

Für Patientinnen ohne Chemotherapie ergab sich in Abhängigkeit des jeweiligen Genotyps hinsichtlich des ereignisfreien Überlebens kein deutlicher Unterschied, da nur ein Ereignis - in der Untergruppe mit 4G/4G-Genotyp - aufgetreten war.

Dahingegen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem jeweiligen Genotyp und der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens für jene Patientinnen, die mit einer Chemotherapie

behandelt wurden. Auch in dieser Betrachtung zeichnete sich deutlich ab, dass Patientinnen mit einem 4G/4G-Genotyp die ungünstigste Prognose hatten im Vergleich zu jenen Patientinnen, die Trägerinnen des 4G/5G- bzw. 5G/5G-Genotyp waren (66,7% vs. 73,9% vs. 92,3%). Dieser Unterschied wurde noch deutlicher in der Gegenüberstellung der beiden Allele (vgl. Abb. 19(a) und 19(b)). Zunächst ist der Unterschied in den Subgruppen sicherlich dadurch zu erklären, dass die Patientinnen ohne Erhalt einer Chemotherapie zu jenen zählten, die ein Mammakarzinom in einem frühen Stadium bzw. eine ohnehin weniger aggressive Form eines Mammakarzinoms aufwiesen - und die auch just deswegen keine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten-, und dass im Gegenzug diejenigen Patientinnen, die mit einer Chemotherapie behandelt wurden, entsprechend ein fortgeschrittenes bzw. aggressiveres Mammakarzinom aufwiesen.

Diese Ergebnisse rechtfertigen zum einen die Vermutung, dass die unterschiedlichen Genotypen bei Patientinnen mit einer weniger aggressiven Form des Mammakarzinoms und ohne Erhalt einer Chemotherapie keinen Einfluss auf die Prognose haben, zum anderen lassen die Ergebnisse keinen Einfluss des Genotyps auf die Therapiesensitivität erkennen. Ebenso zeichnete sich kein Ansprechen auf eine Chemotherapie in Abhängigkeit der PAI-1-Konzentration ab (vgl. Abb. 20). Diesem Ergebnis stehen die kürzlich erschienenen Ergebnisse der Chemo-N0-Studie gegenüber, die einen hohen prädiktiven Wert erhöhter PAI-1- und uPA-Konzentrationen für das Ansprechen einer adjuvanten Chemotherapie beschrieben (mit ca. 80% krankheitsfreiem Überleben innerhalb von 10 Jahren) (HARBECK et al., 2013b).

5.12 Das Plasminogen-Aktivatorsystem als Zielstruktur für „targeted drugs“

Aufgrund der sich zunehmend verdichtenden Daten hinsichtlich des Plasminogen-Aktivator-Systems und seines positiven Einflusses auf die Tumorgenese bei Patienten mit soliden Tumoren erscheinen die einzelnen Komponenten uPA, uPAR und PAI-1 als sinnvolle neue potente Zielstrukturen für eine Anti-Krebs-Therapie, zumal in Tiermodellen gezeigt wurde, dass der Verlust der einzelnen Komponenten keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit, Fruchtbarkeit und Gesundheit hat (CARMELIET et al., 1993, CARMELIET et al., 1994, DEWERCHIN et al., 1996). Dies führt zu der Annahme, dass andere Protease-Systeme die von uPAS induzierten physiologischen Funktionen übernehmen könnten, wenn es zu einer pharmakologischen Inhibition seiner Wirkung käme. Eine funktionelle Überlappung von Plasmin und Matrixmetalloproteinasen bei der Wundheilung, plazentärer Entwicklung und Brustdrüseninvolution nach Laktation wurde tatsächlich von der Arbeitsgruppe von Dano et al. bestätigt (USHER et al., 2005).

Erste Untersuchungen zur Wirkung einer uPA-Inhibition datieren bereits einige Zeit zurück: 1983 erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Ossowski der Nachweis einer verminderten Metastasierungsrate humaner Leberkarzinomzellen (Hep3B) durch monoklonale Antikörper gegen das humane uPA in vitro (OSSOWSKI et al., 1983). Seitdem wurden viele therapeutische Verfahrensweisen oder gegen Malignomzellen gerichtete Toxine entwickelt, welche die Inhibition der Genexpression und Aktivi-

tät der einzelnen Komponenten sowie die Inhibition der uPA/uPAR-Interaktion zum Ziel haben (ULISSE et al., 2009). Viele dieser Ansätze zeigten vielversprechende Ergebnisse durch Reduktion der Tumorprogression und Dissemination wie auch Induktion der Tumorregression in Tiermodellen (MOHAN et al., 1999, GONDI et al., 2004, GONDI et al., 2007, KONDRAGANTI et al., 2006). PAI-1-neutralisierende monoklonale Antikörper wurden ebenfalls bereits in den achtziger Jahren von der Arbeitsgruppe Nielsen et al. beschrieben (NIELSEN et al., 1982). Im Verlauf wurden zwar mehrere Varianten von monoklonalen Antikörpern geschaffen sowie Inhibitoren der PAI-1-Synthese, allerdings gibt es bis heute keinen potenten PAI-1-Inhibitor, der Einzug in klinische Krebstherapie-Studien erhalten hätte, was höchstwahrscheinlich an einer unzureichenden Spezifität des Inhibitors liegen dürfte (SCHMITT et al., 2011, CRAEN et al., 2012).

Wenige uPA-Inhibitoren haben unlängst Einzug in klinische Studien gefunden wie beispielsweise die synthetischen uPA-Inhibitoren (WX-UK1, WX-671/Mesupron®, die Vorstufe von WX-UK1), die von der WILEX AG (München, Germany) entwickelt wurden, sowie das von Ångstrom Pharmaceuticals Inc.'s (CA, USA) entwickelte Å6-Peptid.

In präklinischen Studien konnte von der Arbeitsgruppe Setyono-Hen eine statistisch hochsignifikante Reduktion von Tumorwachstum und Metastasierung durch WX-UK1 ohne Auftreten von Nebenwirkungen nachgewiesen werden (SETYONO-HAN et al., 2005). Zudem wurde vor dem Hintergrund der durchgeführten Phase I/Ib/IIa-Studie von einer guten Verträglichkeit ohne ernsthafte Nebenwirkungen berichtet (GOLDSTEIN, 2008). Im August 2008 wurde eine Phase-II-Studie beim metastasierten, HER2/neu negativen Mammakarzinom begonnen, welche die Wirksamkeit der Mesupron-Therapie in Kombination mit Capecitabin im Vergleich zu einer Capecitabin-Monotherapie verglich, nachdem bereits erste vielversprechende Ergebnisse einer abgeschlossenen Phase-II-Studie veröffentlicht wurden, welche die Wirksamkeit von Mesupron beim inoperablen nichtmetastatierten Pankreaskarzinom untersuchte (SCHMITT et al., 2011). Möglich ist, dass die uPA-Inhibitoren WX-UK1 und WX-671 neue Therapiemöglichkeiten nicht nur bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom darstellen, sondern auch beim Mamma-, Ovarial-, Magen- und Kolonkarzinom eingesetzt werden können.

Das Å6-Peptid, ein Derivat des Plasminogenaktivators vom Urokinase-Typ, beeinflusst die Zelladhäsion durch Bindung an das Transmembranprotein CD44, welches an der Oberfläche von Gewebs- und Blutzellen sowie Tumorzellen exprimiert wird (DAMAJ et al., 2010). Vermutet wird, dass durch die Bindung von Å6 die Zelladhäsion verstärkt wird und dadurch Angiogenese, Zellwanderung und -Invasion und damit auch die Metastasierung verhindert werden. Es wird von einem „onkoparalytischen Effekt“ durch Å6 gesprochen, der in präklinischen Studien (GUO et al., 2000, PIOTROWICZ et al., 2011, GOLD et al., 2012) und in bereits erfolgten klinischen Phase I und II Studien beim asymptomatischen Ovarialkarzinom (SCHMITT et al., 2011) erfolgreich nachgewiesen wurde.

So vielversprechend diese Ansätze klingen, müssen allerdings weitere Untersuchungen zeigen, ob sich im Einsatz dieser Präparate das beschriebene Nutzen-Risiko-Verhältnis weiterhin reproduzieren lässt, bevor uPA-Inhibitoren Einzug in die klinische Therapie halten.

KAPITEL 6

Zusammenfassung

Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus stellt einen single nucleotide-Polymorphismus im Promotorbereich des Plasminogen-Aktivator-1 (PAI-1)-Gens dar und ist im Zusammenhang mit der Regulation der Genexpression beschrieben worden. Dem 5G-Allel wird hierbei hypothetisch eine Funktion als Erkennungssequenz für reprimierende Transkriptionsfaktoren zugesprochen. Entsprechend dieser Hypothese geht ein 4G-Allel mit einer verminderten Repression – und damit mit einer erhöhten PAI-1 Transkription - einher. PAI-1 ist als Teil des Plasminogen-Aktivator-Systems ein Mediator verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse. Im Rahmen neoplastischer Erkrankungen ist PAI-1 durch Modulation der extrazellulären Matrix an der Zellmigration beteiligt und erfüllt Funktionen im Rahmen der auch für eine Tumorprogression wichtigen Angiogenese. PAI-1 ist heutzutage als sicherer, unabhängiger prognostischer und prädiktiver Parameter beim Mammakarzinom etabliert.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen ließen keinen Einfluss des 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus auf die Inzidenz des Mammakarzinoms erkennen. Die unterschiedlichen Genotypen waren etwa gleichmäßig sowohl im Patientinnen- als auch im Kontrollkollektiv verteilt. Auch fanden sich keine Hinweise auf eine Assoziation von Genotyp und Ausprägung der Malignität des Mammakarzinoms. In Einklang mit den Erwartungen zeigte sich eine vom Polymorphismus abhängige Konzentration von PAI-1 im Tumorgewebe, wobei beim Vorliegen eines 5G-Allels die Konzentration geringer war. Bezüglich des Krankheitsverlaufs beim Mammakarzinom kommt laut meinen Ergebnissen dem 4G/5G-Polymorphismus keine *unmittelbare* prognostische Aussagekraft zu. Die Überlebenskurven verliefen bei allen drei Genotypen ähnlich. Allerdings ergaben Subgruppenanalysen, dass das 4G-Allel mit einer tendenziell schlechteren Prognose bei größeren Tumoren und bei Tumoren mit positivem Nodalstatus und höherem Grading verbunden ist. Das könnte darauf hinweisen, dass der 4G/5G-PAI-1 Polymorphismus bei fortgeschrittenen Mammakarzinomen eine Bedeutung haben könnte.

Literaturverzeichnis

- ALVAREZ-MILLÁN, JJ, C BOCOS, V FERRÍN, AR LUCAS, A RUIBAL, J SCHNEIDER (2002): „PAI-1 promoter polymorphism modulates uPA-PAI complex accumulation by breast cancer cells.“ *Oncology*, 62(3): 286–290.
- ANDREASEN, PA, A RICCIO, KG WELINDER, R DOUGLAS, R SARTORIO, LS NIELSEN, C OPPENHEIMER, F BLASI, K DANO (1986): „Plasminogen activator inhibitor type-1 : reactive center and amino-terminal heterogeneity determined by protein and cDNA sequencing“. *FEBS Letters*, 209(2): 213–218.
- ANDREASEN, PA, R EGELUND, HH PETERSEN (2000): „The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis“. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(1): 25–40.
- ANDREASEN, PA, L KJOLLER, L CHRISTENSEN, MJ DUFFY (1997): „The Urokinase-Typ Plasminogen Activator System in Cancer Metastasis: A Review“. *International Journal of Cancer*, 72: 1–22.
- ANDREASEN, PA, B GEORG, LR LUND, A RICCIO, SN STACEY (1990): „Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins“. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 68(1): 1–19.
- ANNECKE, K, M SCHMITT, U EULER, M ZERM, D PAEPKE, S PAEPKE, G von MINCKWITZ, C THOMSEN, N HARBECK (2008): „uPA and PAI-1 in breast cancer: Review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial“. *Advances in Clinical Chemistry*, 45: 31–46.
- ANTONIOU, A, C KARTSONAKI, OM SINILNIKOVA (2011): „Common alleles at 6q25.1 and 1p11.2 are associated with breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers“. *Human Molecular Genetics*, 20: 3304–3321.
- ANTONIOU, AC, J BEESLEY, L MCGUFFOG (2010): „Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction“. *Cancer Research*, 70(23): 9742–9742.
- ANVARI, A, E SCHUSTER, M GOTTSÄUNER-WOLF, J WOJTA, K HUBER (2001): „PAI-I 4G/5G Polymorphism and Sudden Cardiac Death in Patients with Coronary Artery Disease“. *Thrombosis Research*, 103: 103–107.
- BAJOU, K, A NOEL, RD GERARD, V MASSON, N BRUNNER, C HOLST-HANSEN, M SKOBE, NE FUSENIG, P CARMELIET, D COLLEN, JM FOIDART (1998): „Absence of Host Plasminogen Activator Inhibitor 1 Prevents Cancer Invasion and Vascularization“. *Nature Medicine*, 4: 923–928.
- BAJOU, K, C MAILLARD, M JOST, RH LIJNEN, A GILS, P DECLERCK, P CARMELIET, JM FOIDART, A NOEL (2004): „Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth“. *Oncogene*, 23: 6986–6990.
- BALDINI, B, S SORRENTI, ED ARMIENTO, FM DI MATTEO, A CATANIA, S ULISSE (2012): „The urokinase plasminogen activating system in thyroid cancer: clinical implications“. *Il Giornale di Chirurgia*, 33: 305–310.
- BÄSSLER, R (1998): „Histopathologie und aktuelle Klassifikationen des Mammakarzinoms“. *Onkologe*, 4: 878–895.

- BERGER, DH (2002): „Plasmin/Plasminogen System in Colorectal Cancer“. *World Journal of Surgery*, 26: 767–771.
- BETTS, JA, JD FRENCH, MA BROWN, SL EDWARDS (2012): „Long-Range Transcriptional Regulation of Breast Cancer Genes“. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1–13.
- BIANCHI, E, RI COHEN, A DAI, AT THOR, MA SHUMAN, HS SMITH (1995): „Immunohistochemical Localization of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Breast Cancer“. *International Journal of Cancer*, 60: 597–603.
- BINDER, BR, G CHRIST, F GRUBER, N GRUBIC, P HUFNAGL, M KREBS, J MIHALY, GW PRAGER (2002): „Plasminogen Activator Inhibitor 1: Physiological and Pathophysiological Roles“. *Physiology*, 17: 56–61.
- BINDER, BR, J MIHALY (2008): „The plasminogen activator inhibitor “paradox” in cancer“. *Immunology Letters*, 118: 116–124.
- BINDER, BR, J MIHALY, GW PRAGER (2007): „uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: A vascular biologist’s view“. *Thromb Haemost.* 97: 336–342.
- BISSELL, MJ, VM WEAVER, SA LELIEVRE, F WANG, OW PETERSEN, KL SCHMEICHEL (1999): „Tissue Structure, Nuclear Organization, and Gene Expression in Normal and Malignant Breast“. *Cancer Research*, 59: 1757–1764.
- BLASI, F, JD VASSALLI, K DANO (1987): „Urokinase-Type Plasminogen Activator: Proenzyme, Receptor, and Inhibitors“. *The Journal of Cell Biology*, 104: 801–804.
- BLASIAK, J, B SMOLARZ, I KUBRYN, A KULIG, A DZIKI, J ULAŃSKA, B PANDER (2000a): „Plasminogen Activator Inhibitor-1 level and 4G/5G genetic polymorphism in patients with colorectal cancer“. *Experimental Oncology*, 22: 48–51.
- BLASIAK, J, B SMOLARZ (2000b): „Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer.“ *Acta Biochimica Polonica*, 47(1).
- BOEKHOLDT, SM, NR BIJSTERVELD, AH MOONS, M LEVI, HR BÜLLER, RJ PETERS (2001): „Genetic Variation in Coagulation and Fibrinolytic Proteins and Their Relation With Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review“. *Circulation*, 104(25): 3063–3068.
- BRATTHAUER, GL, FA TAVASSOLI (2002): „Lobular intraepithelial neoplasia: previously unexplored aspects assessed in 775 cases and their clinical implications“. *Virchows Arch*, 440: 134–138.
- CARMELIET, P, JM STASSEN, L SCHOONJANS, B REAM, JJ van den OORD, MD MOL, RC MULLIGAN, D COLLEN (1993): „Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis“. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(6): 2756–2760.
- CARMELIET, P, L SCHOONJANS, L KIECKENS, B REAM, J DEGEN, R BRONSON, RD Vos, JJVD OORD, D COLLEN, RC MULLIGAN (1994): „Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice“. *Nature*, 368: 419–424.
- CASTELLÓ, R, F ESPANA, C VÁZQUEZ, C FUSTER, SM ALMENAR, J AZNAR, A ESTELLÉS (2006): „Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity“. *Thrombosis Research*, 117(5): 487–492.
- CHARAFE-JAUFFRET, E, C GINESTIER, F MONVILLE, P FINETTI, J ADELAIDE, N CERVERA, S FEKAIRI, L XERRI, J JACQUEMIER, D BIRNBAUM, F BERTUCCI (2006): „Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers“. *Oncogenomics*, 25: 2273–2284.
- CHEANG, MC, M van de RIJN, TO NIELSEN (2008): „Gene Expression Profiling of Breast Cancer“. *Annual review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3: 67–97.

- CHEN, Y, JJ BILLADELLO, DJ SCHNEIDER (2000): „Identification and Localization of a Fatty Acid Response Region in the Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20: 2696–701.
- CHONG, NW, V CODD, D CHAN, NJ SAMANI (2006): „Circadian clock genes cause activation of the human PAI-1 gene promoter with 4G/5G allelic preference“. *FEBS Letters*, 580(18): 4469–4472.
- CLARKE, M, R COLLINS, S DARBY, C DAVIES, P ELPHINSTONE, E EVANS, J GODWIN, R GRAY, C HICKS, S JAMES, E MACKINNON, P MCGALE, T MCHUGH, R PETO, C TAYLOR, Y WANG, EBCTCG (EBCTCG). (2006): „Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials“. *The Lancet*, 366(9503): 2087–2106.
- CRAEN, BVD, PJ DECLERCK, A GILS (2012): „The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo“. *Thrombosis Research*, 130: 576–585.
- CZEKAY, RP, CE WILKINS-PORT, SP HIGGINS, J FREYTAG, JM OVERSTREET, RM KLEIN, CE HIGGINS, R SAMARAKOON, PJ HIGGINS (2011): „PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration“. *International Journal of Cell Biology*, 1–9.
- DAMAJ, BB, F INCARDONNA, R PIOTROWICZ, SB HOWELL, M FINLAYSON (2010): „A6 peptide binds to CD44 and inhibits migration and metastasis of CD44+ cell lines in in vitro and in vivo studies“. *Presented at: American Association for Cancer Research 101st Annual Meeting. Washington, DC, USA, 17-21 April 2010 (Abstract 5120)*,
- DANO, K, PA ANDREASEN, J GRONDAHL-HANSEN, P KRISTENSEN, LS NIELSEN, L SKRIVER (1985): „Advances in Cancer Research - Plasminogen Activators, Tissue Degradation, and Cancer“. Edit.: KLEIN, G, S WEINHOUSE. 44. Academic Press Inc. (London) LTD: 140–239.
- DASS, K, A AHMAD, AS AZMI, SH SARKAR, FH SARKAR (2008): „Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers“. *Cancer Treatment Reviews*, 34(2): 122–136.
- DAUDT, A, AJ ALBERG, KJ HELZLSOUER (1996): „Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer“. *Current Opinion in Oncology*, 8: 455–461.
- DAWSON, SJ, B WIMANS, A HAMSTEN, F GREEN, S HUMPHRIES, AM HENNEY (1993): „The Two Allele Sequences of a Common Polymorphism in the Promoter of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene Respond Differently to Interleukin-1 in HepG2 Cells*“. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(15): 10739–10745.
- DECKER, T, D HUNGERMANN, W BÖCKER (2009): „Prognostische und prädiktive Faktoren invasiver Mammakarzinome“. *Der Pathologe*, 30(1): 49–55.
- DEGRYSE, B, JG NEELS, RP CZEKAY, K AERTGEERTS, YI KAMIKUBO, DJ LOSKUTOFF (2004): „The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Is a Motogenic Receptor for Plasminogen Activator Inhibitor-1“. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21): 22595–22604.
- DELLAS, C, DJ LOSKUTOFF (2005): „Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease“. *Thrombosis and Haemostasis*, 93: 631–640.
- DEVY, L, S BLACHER, C GRIGNET-DEBRUS, K BAJOU, V MASSON, RD GERARD, A GILS, G CARMELIET, P CARMELIET, PJ DECLERCK, A NOËL, JM FOIDART (2002): „The pro- or anti-angiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent“. *The FASEB Journal*, 16(2): 147–154.
- DEWERCHIN, M, AV NUFFELEN, G WALLAYS, A BOUCHÉ, L MOONS, P CARMELIET, RC MULLIGAN, D COLLEN (1996): „Generation and Characterization of Urokinase Receptor-deficient Mice“. *Journal of Clinical Investigations*, 97: 870–878.

- DIAN, D, C ANTHUBER, I BAUERFEIND, et al. (2011): „Operative Therapie des primären Mammakarzinoms und Rekonstruktionsverfahren“. Edit.: BAUERFEIND, I. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München. 8: 121–131.
- „Gynäkologie & Geburtshilfe - Mammakarzinom“ (2007). Edit.: DIEDRICH, K, W HOLZGREVE, W JONAT, A SCHULZE-MOSGAU, KTM SCHNEIDER, JM WEISS. Springer Medizin Verlag. 11.11.2: 267–274.
- DING, J, BJ NICKLAS, MD FALLIN, N de REKENEIRE, SB KRITCHEVSKY, M PAHOR, N RODONDI, R LI, JM ZMUDA, TB HARRIS (2006): „Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphisms and haplotypes are associated with plasma plasminogen activator inhibitor type 1 levels but not with myocardial infarction or stroke“. *American Heart Journal*, 152(6): 1109–1115.
- DUFFY, MJ, C DUGGAN (2004): „The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer“. *Clinical Biochemistry*, 37: 541–548.
- DUFFY, MJ, P O’GRADY, D DEVANEY, L O’SIORAIN, JJ FENNELLY, HJ LIJNEN (1988): „Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report“. *Cancer*, 62: 531–533.
- ELJUGA, D, JJ RAZUMOVIC, K BULIC, M PETROVECKI, N DRACA, SO BULIC (2011): „Prognostic importance of PAI-1 in node negative breast cancer patients - Results after 10 years of follow up“. *Pathology - Research and Practice*, 207(5): 290–294.
- ELLIS, IO, M GALEA, N BROUGHTON, A LOCKER, RW BLAMEY, CW ELSTON (1992): „Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up“. *Histopathology*, 20: 479–489.
- ELSTON, CW, IO ELLIS (1991): „Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up“. *Histopathology*, 19: 403–410.
- ERICKSON, LA, GJ FICI, JE LUND, TP BOYLE, HG POLITES, KR MAROTTI (1990): „Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene“. *Nature*, 346: 74–76.
- ERIKSSON, P, B KALLIN, FM van ’t HOOFT, P BÅVENHOLM, A HAMSTEN (1995): „Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction“. *Medical Sciences*, 92: 1851–1855.
- EROGLU, A, A ULU, R CAM, N AKAR (2006): „Plasminogen activator inhibitor -1 gene 4G/5G polymorphism in patients with breast cancer“. *Journal of BUON (Balkan Union of Oncology)*, 11: 481–484.
- EROLE, P, A BOSCH, JA PÉREZ-FIDALGO, A LLUCH (2012): „Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways“. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6): 698–707.
- FIORICA, JV (2007): „Clinical Gynecologic Oncology - Breast Diseases“. Edit.: DiSAIA, PJ, WT CREASMAN. 7. Mosby Elsevier. 14: 411.
- FISHER, B, EP MAMOUNAS (1995): „Preoperative chemotherapy: a model for studying the biology and therapy of primary breast cancer.“ *Journal of Clinical Oncology*, 13(3): 537–40.
- FISHER, IB (2005): „Bernard Fisher Reflects on a Half-Century’s Worth of Breast Cancer Research“. *Journal of the National Cancer Institute*, 97: 1636–1637.
- FÖRSTI, A, H LEI, B TAVELIN, K ENQUIST, R PALMQVIST, A ALTIERI, G HALLMANS, K HEMMINKI, P LENNER (2007): „Polymorphisms in the genes of the urokinase plasminogen activation system in relation to colorectal cancer“. *Annals of Oncology*, 18(12): 1990–1994.

- FRANCIS, CW (2002): „Plasminogen Activator Inhibitor-1 Levels and Polymorphisms - Association With Venous Thromboembolism“. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 126: 1401–1404.
- GAO, S, S SKELDAL, A KROGDAHL, JA SORENSON, PA ANDREASEN (2005): „CpG methylation of the PAI-1 gene 5' flankung region is inversely correlated with PAI-1 mRNA levels in human cell lines“. *Thromb Haemost.* 94: 651–660.
- GILABERT-ESTELLÉS, J, LA RAMÓN, A BRAZA-BOÏLS, J GILABERT, M CHIRIVELLA, F ESPAÑA, A ESTELLÉS (2012): „Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4 G/5 G polymorphism and endometrial cancer. Influence of PAI-1 polymorphism on tissue PAI-1 antigen and mRNA expression and tumor severity“. *Thrombosis Research*, 130: 242–247.
- GINSBURG, D, R ZEHEB, AY YANG, UM RAFFERTY, PA ANDREASEN, L NIELSEN, K DANO, RV LEBE, TD GELEHRTERT (1986): „cDNA Cloning of Human Plasminogen Activator-inhibitor from Endothelial Cells“. *The Journal of Clinical Investigation*, 78: 1673–1680.
- GOLD, MA, WE BRADY, HA LANKES, PG ROSE, JL KELLEY, K DEGEEST, MA CRISPENS, KE RESNICK, SB HOWELL (2012): „A phase II study of a urokinase-derived peptide (A6) in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study“. *Gynecologic Oncology*, 125: 635–639.
- GOLDBERG, HJ, J SCHOLEY, IG FANTUS (2000): „Glucosamine Activates the Plasminogen Activator Inhibitor 1 Gene Promoter Through Sp1 DNA Binding Sites in Glomerular Mesangial Cells“. *American Diabetes Association*, 49: 863–871.
- GOLDHIRSCH, A, JH GLICK, RD GELBER, AS COATES, B THÜRLIMANN, HJ SENN (2005): „Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005“. *Annals of Oncology*, 16(10): 1569–1583.
- GOLDHIRSCH, A, WC WOOD, AS COATES, RD GELBER, B THÜRLIMANN, HJ SENN, P MEMBERS (2011): „Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011“. *Annals of Oncology*, 22(8): 1736–1747.
- GOLDSTEIN, LJ (2008): „Experience in Phase I Trials and an Upcoming Phase II Study with uPA Inhibitors in Metastatic Breast Cancer“. *BreastCare*, 3: 25–28.
- GONDI, CS, SS LAKKA, DH DINH, WC OLIVERO, M GUJRATI, JS RAO (2007): „Intraperitoneal Injection of an hpRNA-expressing Plasmid Targeting uPAR and uPA Retards Angiogenesis and Inhibits Intracranial Tumor Growth in Nude Mice“. *Clinical Cancer Research*, 13: 4051–4060.
- (2004): „RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas“. *Oncogene*, 23: 8486–8496.
- GOOR, ML van, EG GARCÍA, F LEEBEEK, GJ BROUWERS, P KOUDSTAAL, D DIPPEL (2005): „The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 levels in ischemic stroke“. *Thromb Haemost.* 93: 92–96.
- GORDON, LA, KT MULLIGAN, H MAXWELL-JONES, M ADAMS, RA WALKER, JL JONES (2003): „Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype“. *International Journal of Cancer*, 106: 8–16.
- GUO, Y, AAR HIGAZI, A ARAKELIAN, BS SACHAIS, D CINES, RH GOLDFARB, TR JONES, H KWAAN, AP MAZAR, SA RABBANI (2000): „A peptide derived from the nonreceptor binding region of urokinase plasminogen activator (uPA) inhibits tumor progression and angiogenesis and induces tumor cell death in vivo“. *The FASEB Journal*, 14(10): 1400–1410.
- GUTIERREZ, LS, A SCHULMAN, T BRITO-ROBINSON, F NORIA, VA PLOPLIS, FJ CASTELLINO (2000): „Tumor Development Is Retarded in Mice Lacking the Gene for Urokinase-Type Plasmino-

- gen Activator or Its Inhibitor, Plasminogen Activator Inhibitor-1“. *Cancer Research*, 60(20): 5839–5847.
- HAAS, EC de, N ZWART, C MEIJER, AJ SUURMEIJER, K MEIJER, HJ GUCHELAAR, HJ HOEKSTRA, FE van LEEUWEN, DT SLEIJFER, HM BOEZEN, JA GIETEMA (2010): „Association of PAI-1 gene polymorphism with survival and chemotherapy-related vascular toxicity in testicular cancer“. *Cancer*, 116(24): 5628–5636.
- HACK, CE (2001): „Fibrinolysis in Disseminated Intravascular Coagulation“. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS*, 27: 633–638.
- HALAMKOVA, J, I KISS, Z PAVLOVSKY, J TOMASEK, J JARKOVSKY, Z CECH, D BEDNAROVA, S TUCEK, L HANAKOVA, M MOULIS, J ZAVRELOVA, M MAN, P BENDA, O ROBEK, Z KALA, M PENKA (2013): „Clinical impact of PAI 1 4G/5G gene polymorphism in colorectal carcinoma patients“. *Neoplasma*, 60: 151–159.
- HARBECK, N, M AIGNER, B KUSCHEL, M KIECHLE (2002a): „Mammakarzinom – prognostische und prädiktive Faktoren“. *Onkologe*, 8: 808–816.
- HARBECK, N, M SCHMITT, M VETTER, J KROL, D PAEPKE, M UHLIG, S PAEPKE, F JÄNICKE, A GEURTS-MOESPOT, G von MINCKWITZ, F SWEEP, C THOMSSSEN (2008): „Prospective Biomarker Trials Chemo N0 and NNBC-3 Europe Validate the Clinical Utility of Invasion Markers uPA and PAI-1 in Node-Negative Breast Cancer“. *Breast Care*, 3(2): 11–15.
- HARBECK, N, C THOMSSSEN, M GNANT (2013a): „St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion“. *Breast Care*, 8: 102–109.
- HARBECK, N, M SCHMITT, C MEISNER, C FRIEDEL, M UNTCH, M SCHMIDT, CGJ SWEEP, BW LISBOA, MP LUX, T BECK, S HASMÜLLER, M KIECHLE, F JÄNICKE, C THOMSSSEN (2013b): „Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients“. *European Journal of Cancer*, (49): 1825–1835.
- HARBECK, N (2015): *Zielgerichtete Therapie beim Mammakarzinom*. Edit.: HARBECK, N. Schattauer: 1–2.
- HARBECK, N, C THOMSSSEN (2011): „A New Look at Node-Negative Breast Cancer“. *The Oncologist*, 16: 51–60.
- HARBECK, N, RE KATES, MP LOOK, MEM van GELDER, JGM KLIJN, A KRUGER, M KIECHLE, F JÄNICKE, M SCHMITT, JA FOEKENS (2002b): „Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1“. *Cancer Research*, 62: 4617–4622.
- HARBECK, N, C THOMSSSEN, U BERGER, K ULM, RE KATES, H HÖFLER, F JÄNICKE, H GRAEFF, M SCHMITT (1999): „Invasion marker PAI 1 remains a strong prognostic factor after long term follow up both for primary breast cancer and following first relapse“. *Breast Cancer Research and Treatment*, 54(2): 147–157.
- HARBECK, N, RE KATES, K GAUGER, A WILLEMS, M KIECHLE, V MAGDOLEN, M SCHMITT (2004): „Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer“. *Thrombosis and Haemostasis*, 91: 450–456.
- HARRIS, L, H FRITSCHKE, R MENNEL, L NORTON, P RAVDIN, S TAUBE, MR SOMERFIELD, DF HAYES, RC BAST (2007): „American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer“. *Journal of Clinical Oncology*, 25: 5287–5312.

- HAYES, DF, RC BAST, CE DESCH, H FRITSCH, NE KEMENY, JM JESSUP, GY LOCKER, JS MACDONALD, RG MENNEL, L NORTON, P RAVDIN, STRJ WINN (1996): „Tumor Marker Utility Grading System: a Framework to Evaluate Clinical Utility of Tumor Markers“. *Journal of the National Cancer Institute*, 88: 1456–1466.
- HERMANS, PWM, JA HAZELZET (2005): „Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Gene Polymorphism and Sepsis“. *Clinical Infectious Diseases*, 41(7):S453–S458.
- HESS, KR, K ANDERSON, WF SYMMANS, V VALERO, N IBRAHIM, JA MEJIA, D BOOSER, RL THERIAULT, AU BUZDAR, PJ DEMPSEY, R ROUZIER, N SNEIGE, JS ROSS, T VIDAURRE, HL GOMEZ, GN HORTOBAGYI, L PUSZTAI (2006): „Pharmacogenomic Predictor of Sensitivity to Preoperative Chemotherapy With Paclitaxel and Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide in Breast Cancer“. *Journal of Clinical Oncology*, 24: 4236–4244.
- HILDENBRAND, R, A SCHAAF (2008): „The urokinase-system in tumor tissue stroma of the breast and breast cancer cell invasion“. *International Journal of Oncology*, 34: 15–23.
- HOEKSTRA, T, JM GELEIJNSE, C KLUFT, EJ GILTAY, FJ KOK, EG SCHOUTEN (2003): „4G/4G Genotype of PAI-1 Gene Is Associated With Reduced Risk of Stroke in Elderly“. *Stroke*, 34: 2822–2829.
- HOLLI, K, P HIETANEN, R SAARISTO, H HUHTALA, M HAKAMA, H JOENSUU (2009): „Radiotherapy After Segmental Resection of Breast Cancer With Favorable Prognostic Features: 12-Year Follow-Up Results of a Randomized Trial“. *Journal of Clinical Oncology*, 27(6): 927–932.
- HUNSDORFER, B, HF ZEILHOFER, KP BOCK, P DETTMAR, M SCHMITT, HH HORCH (2004): „Prognostische Bedeutung des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp (uPA) und des Plasminogenaktivator-Inhibitors (PAI-1) beim primär resezierten Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle“. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie*, 8: 173–179.
- INGHAM, SL, J WARWICK, H BYERS, F LALLOO, WG NEWMAN, D GARETH, R EVANS (2012): „Is multiple SNP testing in BRCA2 and BRCA1 female carriers ready for use in clinical practice? Results from a large Genetic Centre in the UK“. *Clinical Genetics*, 84(1): 37–42.
- IWAI, N, H SHIMOIKE, Y NAKAMURA, S TAMAKI, M KINOSHITA (1998): „The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor gene is associated with the time course of progression to acute coronary syndromes“. *Atherosclerosis*, 136: 109–114.
- JACOBS, V, R KATES, E KANTELHARDT, M VETTER, R WUERSTLEIN, T FISCHER, M SCHMITT, F JAENICKE, M UNTCH, C THOMSEN, N HARBECK (2013): „Health economic impact of risk group selection according to ASCO-recommended biomarkers uPA/PAI-1 in node-negative primary breast cancer“. *Breast Cancer Research and Treatment*, 138(3): 839–850.
- JAENICKE, F, M SCHMITT, L PACHE, K ULM, NHH HOEFLER, H GRAEFF (1993): „Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer“. *Breast Cancer Research and Treatment*, 24: 195–208.
- JÄNICKE, F, M SCHMITT, H GRAEFF (1991): „Clinical Relevance of the Urokinase-Type and Tissue-Type Plasminogen Activators and of Their Type 1 Inhibitor in Breast Cancer“. *Thrombosis and Haemostasis*, 17: 303–312.
- JÄNICKE, F, M SCHMITT, KU WOLFGANG, H GRAEFF (1989): „Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer“. *The Lancet*, 334: 1049.
- JORGENSEN, E, SR DEITCHER, M CICEK, X LIU, S PLUMMER, G CASEY, JS WITTE (2007): „Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) Polymorphism 4G/5G Is Associated With Prostate Cancer Among Men With a Positive Family History“. *The Prostate*, 67: 172–177.

- JUHAN-VAGUE, I, MC ALESSI, A MAVRI, PE MORANGE (2003): „Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk“. *Thromb Haemost.* 1: 1575–1579.
- JUHAN-VAGUE, I, SD PYKE, MC ALESSI, J JESPERSEN, F HAVERKATE, SG THOMPSON, on behalf of the ECAT STUDY GROUP* (1996): „Fibrinolytic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients With Angina Pectoris“. *Circulation*, 94(9): 2057–2063.
- KAJDANIUK, D, B MAREK, H BORGIEL-MAREK, B KOS-KUDLA (2013): „Transforming growth factor b1 (TGFb1) in physiology and pathology“. *Endokrynologia Polska*, 64: 384–396.
- KANTELHARDT, E, M VETTER, N HARBECK, C THOMSEN (2008): „Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms“. Edit.: UNTCH, M, H SITTEK. Zuckschwerdt. Praxisrelevante und evidenzbasierte prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom: 228–239.
- KANTELHARDT, EJ, M VETTER, M SCHMIDT, C VEYRET, D AUGUSTIN, V HANF, C MEISNER, D PAEPKE, M SCHMITT, F SWEEP, G von MINCKWITZ, PM MARTIN, F JAENICKE, C THOMSEN, N HARBECK (2011): „Prospective evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: Phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6 ? FEC versus 3 ? FEC/3 ? Docetaxel“. *BMC Cancer*, 11: 1–10.
- KAUFMANN, M, G von MINCKWITZ, A SCHARL, SD COSTA (2006): „Die Gynäkologie - Mammakarzinom: Biologie des Mammakarzinoms“. Edit.: KAUFMANN, M, SD COSTA, A SCHARL. Springer. 31.1: 477–493.
- KONDRAGANTI, S, CS GONDI, I MCCUTCHEON, DH DINH, M GUJRATI, JS RAO, WC OLIVERO (2006): „RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator and its receptor in human meningioma cells inhibits tumor invasion and growth“. *International Journal of Oncology*, 28: 1353–1360.
- KORTLEVER, RM, PJ HIGGINS, R BERNARDS (2006): „Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence“. *Nature Cell Biology*, 8: 877–884.
- KREIENBERGER, R, T VOLM, T BECK (2006): *Management des Mammakarzinoms*. Edit.: KREIENBERGER, R, W JONAT, T VOLM, V MÖBIUS, D ALT. Springer: 183–191.
- LADEMANN, UA, MU ROMER (2008): „Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)“. *Thromb Haemost.* 100: 1041–1046.
- LEE, JH, Y KIM, JW CHOI, YS KIM (2013): „Clinicopathological Significance of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promoter 4G/5G Polymorphism in Breast Cancer: A Meta-analysis“. *Archives of Medical Research*, 44(1): 39–45.
- LEI, H, K HEMMINKI, R JOHANSSON, A ALTIERI, K ENQUIST, R HENRIKSSON, P LENNER, A FÖRSTI (2008): „PAI-1-675 4G/5G polymorphism as a prognostic biomarker in breast cancer“. *Breast Cancer Research and Treatment*, 109(1): 165–175.
- LIEDTKE, C, L KIESEL (2009): „Die Bedeutung von Mikroarrays für das Mammakarzinom“. *Gynäkologische Endokrinologie*, 7: 99–110.
- LIJNEN, HR (2005): „Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1“. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 35–45.
- LIM, E et al. (2009): „Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers“. *Nature Medicine*, 15: 907–913.
- LINDGREN, A, C LINDOFF, B NORRVING, B ÅSTEDT, BB JOHANSSON (1996): „Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Stroke Patients“. *Stroke*, 27(6): 1066–1071.
- LÖFFLER, G, PC HEINRICH, PE PETRIDES (2007): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch. Springer London, Limited.

- LOKTIONOV, A, MA WATSON, WS STEBBINGS, CT SPEAKMAN, SA BINGHAM (2003): „Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism and colorectal cancer risk and prognosis“. *Cancer Letters*, 189: 189–196.
- LOOK, MP, WLJ van PUTTEN, MJ DUFFY, N HARBECK, et al. (2002): „Poold Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients“. *Journal of the National Cancer Institute*, 94: 116–128.
- LOSKUTOFF, DJ, JA van MOURIK, LA ERICKSON, D LAWRENCE (1983): „Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(10): 2956–2960.
- LOSKUTOFF, DJ, M SAWDEY, J MIMURO (1989): „Type 1 plasminogen activator inhibitor“. *Progress in hemostasis and thrombosis*, 9: 87–115.
- LOSKUTOFF, DJ, SA CURRIDEN, G HU, G DENG (1999): „Regulation of cell adhesion by PAI-1“. *APMIS*, 107: 54–61.
- LOSKUTOFF, DJ, F SAMAD (1998): „The Adipocyte and Hemostatic Balance in Obesity Studies of PAI-1“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18: 1–6.
- MA, Z, D PAEK, CK OH (2009): „Plasminogen activator inhibitor-1 and asthma: role in the pathogenesis and molecular regulation“. *Clinical & Experimental Allergy*, 39: 1136–1144.
- MANSFIELD, MW, DM HEYWOOD, PJ GRANT (1996): „Circulating Levels of Factor VII, Fibrinogen, and von Willebrand Factor and Features of Insulin Resistance in First-Degree Relatives of Patients With NIDDM“. *Circulation*, 94: 2171–2176.
- MARGAGLIONE, M, G DI MINNO, E GRANDONE, G VECCHIONE, E CELENTANO, G CAPPUCCI, M GRILLI, P SIMONE, S PANICO, M MANCINI (1994): „Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke.“ *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14(11): 1741–5.
- MARGAGLIONE, M, G CAPPUCCI, D COLAIZZO, N GIULIANI, G VECCHIONE, E GRANDONE, O PENNELLI, G DI MINNO (1998): „The PAI-1 Gene Locus 4G/5G Polymorphism Is Associated With a Family History of Coronary Artery Disease“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(2): 152–156.
- MAU, C, M UNTCH (2008): „Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms“. Edit.: UNTCH, M, H SITTEK. Zuckschwerdt. Hereditäres Mammakarzinom: 26–31.
- MAYR, D, P DETTMAR, B HOEGEL, J NAEHRIG, K SOTLAR (2011): *Mammakarzinome*. Edit.: MÜNCHEN, T. Ingo Bauerfeind: 56–58.
- MCDONELL, MW, MN SIMON, FW STUDIER (1977): „Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels“. *Journal of Molecular Biology*, 110: 119–146.
- MCMAHON, B, HC KWAAN (2007): „The Plasminogen Activator System and Cancer“. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 36: 184–194.
- MCMAHON, GA, E PETITCLERC, S STEFANSSON, E SMITH, MKK WONG, RJ WESTRICK, D GINSBURG, PC BROOKS, DA LAWRENCE (2001): „Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Tumor Growth and Angiogenesis“. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 33964–33968.
- MINISINI, AM, D FABBRO, CD LORETO, M PESTRIN, S RUSSO, GG CARDELLINO, C ANDRETTA, G DAMANTE, F PUGLISI (2007): „Markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer“. *Anatomic Pathology*, 128: 112–117.
- MOHAN, PM, SK CHINTALA, S MOHANAM, CL GLADSON, ES KIM, ZL GOKASLAN, SS LAKKA, JA ROTH, BF FANG, R SAWAYA, AP KYRITSIS, JS RAO (1999): „Adenovirus-mediated Delivery

- of Antisense Gene to Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor Suppressor Glioma Invasion and Tumor Growth“. *Cancer Research*, 59: 3369–3373.
- MOONEY, S (2005): „Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis“. *Briefings In Bioinformatics*, 6: 44–56.
- NAGAMINE, Y, RL MEDCALF, P MUÑOZ-CÁNOVES (2005): „Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system“. *Thrombosis and Haemostasis*, 93: 661–675.
- NIELSEN, HM, M OVERGAARD, C GRAU, AR JENSEN, J OVERGAARD (2006): „Study of Failure Pattern Among High-Risk Breast Cancer Patients With or Without Postmastectomy Radiotherapy in Addition to Adjuvant Systemic Therapy: Long-Term Results From the Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82 b and c Randomized Studies“. *Journal of Clinical Oncology*, 24(15): 2268–2275.
- NIELSEN, LS, JG HANSEN, L SKRIVER, EL WILSON, K KALTOFT, J ZEUTHEN, K DANOE (1982): „Purification of zymogen to plasminogen activator from human glioblastoma cells by affinity chromatography with monoclonal antibody“. *Biochemistry*, 21(25): 6410–6415.
- NIXON, A, D NEUBERG, D HAYES, R GELMAN, J CONNOLLY, S SCHITT, A ABNER, A RECHT, F VICINI, J HARRIS (1994): „Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I and II breast cancer“. *Journal of Clinical Oncology*, 12(5): 888–894.
- NY, T, M SAWDEY, D LAWRENCE, JL MILLAN, DJ LOSKUTOFF (1986): „Cloning and sequence of acDNA coding for the humana-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor“. *Biochemistry*, 83: 6776–6780.
- OSSOWSKI, L, E REICH (1983): „Antibodies to Plasminogen Activator Inhibit Human Tumor Metastasis“. *Cell*, 35: 611–619.
- PAIK, S, S SHAK, G TANG, C KIM, J BAKER, M CRONIN, FL BAEHNER, MG WALKER, D WATSON, T PARK, W HILLER, ER FISHER, DL WICKERHAM, J BRYANT, N WOLMARK (2004): „A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer“. *New England Journal of Medicine*, 351(27): 2817–2826.
- PALMIROTTA, R, P FERRONI, A SAVONAROLA, F MARTINI, F CIATTI, A LAUDISI, V SINI, GD MONTE, F GUADAGNI, M ROSELLI (2009): „Prognostic value of pre-surgical plasma PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) levels in breast cancer“. *Thrombosis Research*, 124(4): 403–408.
- PANNEKOEK, H, H VEERMAN, H LAMBERS, P DIERGAARDE, CL VERWEIJ, AJ van ZONNEVELD, JA van MOURIK (1986): „Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family“. *The EMBO Journal*, 5(10): 2539–2544.
- PAULA SABINO, A de, DD RIBEIRO, CP DOMINGUETI, MS dos SANTOS, T GADELHA, LMS DUSSE, M das GRAÇAS CARVALHO, AP FERNANDES (2011): „Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 plasma levels in young patients with ischemic stroke“. *Molecular Biology Reports An International Journal on Molecular and Cellular Biology*, 38: 5355–5360.
- PEROU, CM (2011): „Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers“. *The Oncologist*, 16(1): 61–70.
- PEROU, CM, T SÛRLIE, MB EISEN, M van de RIJN, SS JEFFREYK, CA REES, JR POLLACK, DT ROSS, H JOHNSEN, LA AKSLEN, O FLUGE, A PERGAMENSCHIKOV, C WILLIAMS, SX ZHU, PE LÛNNING, AL BÛRRESEN-DALE, PO BROWN, D BOTSTEIN (2000): „Molecular portraits of human breast tumours“. *Nature*, 406: 747–752.

- PIOTROWICZ, RS, BB DAMAJ, M HACHICHA, F INCARDONA, SB HOWELL, M FINLAYSON (2011): „A6 Peptide Activates CD44 Adhesive Activity, Induces FAK and MEK Phosphorylation, and Inhibits the Migration and Metastasis of CD44-Expressing Cells“. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10: 2072–82.
- PRAGER, GW, JM BREUSS, S STEURER, D OLCAYDU, J MIHALY, PM BRUNNER, H STOCKINGER, BR BINDER (2004): „Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2–Induced Initial Endothelial Cell Migration Depends on the Presence of the Urokinase Receptor“. *Circulation Research*, 94(12): 1562–1570.
- PRAT, A, CM PEROU (2009): „Mammary development meets cancer genomics“. *Nature Medicine*, 15: 842–844.
- REILLY, D, U CHRISTENSEN, M DUCH, N NOLAN, MJ DUFFY, PA ANDREASEN (1992): „Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas“. *International Journal of Cancer*, 50(2): 208–214.
- ROBBIE, LA, NA BOOTH, PA BROWN, B BENNETT (1996): „Inhibitors of Fibrinolysis Are Elevated in Atherosclerotic Plaque“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 16(4): 539–545.
- ROBERT KOCH-INSTITUT, GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. (2012): *Krebs in Deutschland 2007/2008*. http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Krebsregisterdaten/krebs_node.html. Aufgerufen: 13.11.2012.
- ROBERTS, AB, LM WAKEFIELD (2003): „The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis“. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15): 8621–8623.
- RONCAL, C, J ORBE, J RODRIGUEZ, M BELZUNCE, O BELOQUI, J DIEZ, J PÁRAMO (2004): „Influence of the 4G/5G PAI-1 genotype on angiotensin II-stimulated human endothelial cells and in patients with hypertension“. *Cardiovascular Research*, 63(1): 176–185.
- ROSEN, PP, HA OBERMAN (1992): „Tumors of the mammary gland“. *Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.* 115–175.
- ROSS, JS, EA SLODKOWSKA, WF SYMMANS, L PUSZTAI, PM RAVDIN, GN HORTOBAGYI (2009): „The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine“. *The Oncologist*, 14(4): 320–368.
- SAKAKIBARA, T, K HIBI, M KOIKE, M FUJIWARA, Y KODERA, K ITO, A NAKAO (2006): „Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of gastric cancer“. *Cancer Science*, 97: 395–399.
- SAMAD, F, K YAMAMOTO, DJ LOSKUTOFF (1996): „Distribution and Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Murine Adipose Tissue In Vivo Induction by Tumor Necrosis Factor-“. *The Journal of Clinical Investigation*, 97: 37–46.
- SCHÄFER, K, K FUJISAWA, S KONSTANTINIDES, DJ LOSKUTOFF (2001): „Disruption of the plasminogen activator inhibitor-1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic ob/ob mice“. *The FASEB Journal*, 15: 1840–2.
- SCHALLER, G, S HASMÜLLER, J JÜCKSTOCK, et al. (2011): „Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom“. Edit.: BAUERFEIND, I. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München. 6: 92–96.
- SCHIEITHAUER, H, HP HELLEMANN, H LINDNER, et al. (2011): *Radioonkologische Behandlung*. Edit.: BAUERFEIND, I. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München. 9: 132–139.
- SCHLEEF, RR, TJPE DUNNE, J MIMURO, DJ LOSKUTOFF (1990): „The Majority of Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor Associated with Cultured Human Endothelial Cells Is Located

- under the Cells and Is Accessible to Solution-phase Tissue-type Plasminogen Activator“. *The Journal of Cell Biology*, 110: 155–163.
- SCHMITT, M, N HARBECK, N BRÜNNER, F JÄNICKE, C MEISNER, B MÜHLENWEG, H JANSEN, J DORN, U NITZ, EJ KANTELHARDT, C THOMSEN (2011): „Cancer therapy trials employing level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1“. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11: 617–634.
- SCHMITT, M, K MENGELE, R NAPIERALSKI, V MAGDOLEN, U REUNING, A GKAZEPIS, F SWEEP, N BRÜNNER, J FOEKENS, N HARBECK (2010): „Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1“. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10: 1051–1067.
- SCHNEEWEISS, A (2009): „Mammakarzinom - Prädiktive Marker für die Therapieoptimierung“. *Gynäkologie*, 42: 841–846.
- SCHNEIDER, DJ, Y CHEN, BE SOBEL (2008): „The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis“. *Thromb Haemost.* 100: 1037–1040.
- SCHNEIDERMAN, J, DJ LOSKUTOFF (1991): „Plasminogen activator inhibitors“. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1(3): 99–102.
- SCHULMAN, S, B WILMAN (1996): „The significance of hypofibrinolysis for the risk of recurrence of venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation (DURAC) Trial Study Group“. *Thromb Haemost.* 75: 607–61.
- SEGUI, R, A ESTELLES, Y MIRA, F ESPANA, P VILLA, C FALCO, A VAYA, S GRANCHA, F FERRANDO, J AZNAR (2000): „PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects“. *British Journal of Haematology*, 111: 122–128.
- SETYONO-HAN, B, J STÜRZEBECKER, WA SCHMALIX, B MUEHLENWEG, AM SIEUWERTS, M TIMMERMANS, V MAGDOLEN, M SCHMITT, JGM KLIJN, JA FOEKENS (2005): „Suppression of rat breast cancer metastasis and reduction of primary tumour growth by the small synthetic urokinase inhibitor WX-UK1“. *Thromb Haemost.* 93: 779–786.
- SHERIDAN, C, H KISHIMOTO, RK FUCHS, S MEHROTRA, P BHAT-NAKSHATRI, CH TURNER, R GOULET, S BADVE, H NAKSHATRI (2006): „CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis“. *Breast Cancer Research*, 8(5): 1–13.
- SIEGEL, PM, W SHU, RD CARDIFF, WJ MULLER, J MASSAGUE (2003): „Transforming growth factor β signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis“. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14): 8430–8435.
- SINGLETERY, JH, D CHAN, NJ SAMANI, NW CHONG (2008): „The canonical E-box motif: A target for glucocorticoid action that drives rhythmic mouse Pai-1 transcription in vitro“. *Gene*, 420(1): 42–47.
- SLAMON, DJ, GM CLARK, SG WONG, WJLA ULLRICH, WL MCGUIRE (1987): „Human Breast Cancer: Correlation of Relaps and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene“. *Science*, 9: 177–182.
- SØRLIE, T, R TIBSHIRANI, J PARKER, T HASTIE, JS MARRON, A NOBEL, S DENG, H JOHNSEN, R PESICH, S GEISLER, J DEMETER, CM PEROU, PE LØNNING, PO BROWN, AL BØRRESENDALE, D BOTSTEIN (2003): „Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets“. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14): 8418–8423.
- STEFANSSON, S, E PETITCLERC, MKK WONG (2001): „Inhibition of Angiogenesis in Vivo by Plasminogen Activator Inhibitor-1“. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 8135–8141.

- STERNLICHT, MD, AM DUNNING, DH MOORE, PD PHAROAH, DG GINZINGER, K CHIN, JW GRAY, FM WALDMAN, BA PONDER, Z WERB (2006): „Prognostic Value of PAI1 in Invasive Breast Cancer: Evidence That Tumor-Specific Factors Are More Important Than Genetic Variation in Regulating PAI1 Expression“. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, (15): 2107–2114.
- STREHL, JD, DL WACHTER, PA FASCHING, MW BECKMANN, A HARTMANN (2011): „Invasive Breast Cancer: Recognition of Molecular Subtypes“. *BreastCare*, 6: 258–264.
- STURGEON, CM et al. (2008): „National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers“. *Clinical Chemistry*, 54(12):e11–e79.
- SU, CK, KT YEH, CB YEH, PH WANG, ESC HO, MC CHOU, KC LIU, SF YANG, YC YI (2011): „Genetic Polymorphism of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 is Associated With an Increased Risk of Endometrial Cancer“. *Journal of Surgical Oncology*, 104: 755–759.
- TAVASSOLI, FA, V EUSEBI (2009): *AFIP Atlas of Tumor Pathology Serie IV, Tumors of the Mammary Gland*. Edit.: TAVASSOLI, FA, V EUSEBI. American Registry of Pathology Bookstor.
- THÖGERSEN, AM, JH JANSSON, K BOMAN, TK NILSSON, L WEINEHALL, F HUHTASAARI, G HALLMANS (1998): „High Plasminogen Activator Inhibitor and Tissue Plasminogen Activator Levels in Plasma Precede a First Acute Myocardial Infarction in Both Men and Women: Evidence for the Fibrinolytic System as an Independent Primary Risk Factor“. *Circulation*, 98(21): 2241–2247.
- THOMSEN, C, F JÄNICKE, N HARBECK (2003): „Clinical Relevance of Prognostic Factors in Axillary Node-Negative Breast Cancer“. *Onkologie*, 26: 438–445.
- THOMSEN, C, F JÄNICKE (2000): „Do we need better prognostic factors in node-negative breast cancer?: Pro:“ *European Journal of Cancer*, 36(3): 293–298.
- THOMSEN, C, EJ KANTELHARDT, C MEISNER, M VETTER, M SCHMIDT, P MARTIN, C VEYRET, D AUGUSTIN, V HANF, D PAEPKE, W MEINERTZ, G HOFFMANN, W WIEST, F SWEEP, M SCHMITT, F JAENICKE, G von MINCKWITZ, NHO behalf of the NNBC-3 STUDY GROUP (2012): „First planned efficacy analysis of the NNBC 3-Europe trial: Addition of docetaxel to anthracycline containing adjuvant chemotherapy in high risk node-negative breast cancer patients“. *Cancer Research*, 72. Aufgerufen: 01.12.2013: 13.
- TURKMEN, B, M SCHMITT, B SCHMALFELDT, P TROMMLE, W HELL, S CREUTZBURG, H GRAEFF, V MAGDOLEN (1997): „Mutational analysis of the genes encoding urokinase- type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in advanced ovarian cancer“. *Electrophoresis*, 18: 686–689.
- (UICC), IUAC (1958): *Committee on Clinical Stage Classification and Applied Statistics: Clinical stage classification and presentation of results, malignant tumours of the breast and larynx*. Tech. rep. International Union Against Cancer (UICC).
- ULISSE, S, E BALDINI, S SORRENTI, M D’ARMIENTO (2009): „The Urokinase Plasminogen Activator System: A Target for Anti-Cancer Therapy“. *Current Cancer Drug Targets*, 9: 32–71.
- USHER, PA, OF THOMSEN, P IVERSEN, M JOHNSEN, NB ?NNER, G HØYER-HANSEN, P ANDRE-ASEN, K DANØ, BS NIELSEN (2005): „Expression of urokinase plasminogen activator, its receptor and type-1 inhibitor in malignant and benign prostate tissue“. *International Journal of Cancer*, 113: 870–880.
- VASSALLI, JD, AP SAPPINO, D BELIN (1991): „The plasminogen activator/plasmin system“. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(4): 1067–1072.
- VEER, LJ van ’t, H DAI, MJ van de VIJVER, YD HE, AA HART, M MAO, HL PETERSE, K van der KOOY, MJ MARTON, AT WITTEVEEN, GJ SCHREIBER, RM KERKHOVEN, C ROBERTS, PS

- LINSLEY, R BERNARDS, SH FRIEND (2002): „Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer“. *Nature*, 415: 530–536.
- VERONESI, U, W GATZMEIER (2008): „Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms“. Edit.: UNTCH, M, H SITTEK. Zuckschwerdt. Lokoregionäre Behandlung des Mammakarzinoms: Der Wandel des Paradigmas - Von der Radikaloperation zur minimalinvasiven lokalen Therapie: 157–178.
- VETTER, M, EJ KANTELHARDT, K ANNECKE, J DITTMER, D PAEPKE, A PRECHTL, M SCHMITT, F JÄNICKE, G v MINCKWITZ, M KIECHLE-BAHAT, C THOMSEN, N HARBECK (2007): „Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 im Tumorgewebe bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom: Von Forschungsergebnissen zur klinischen Anwendung am Beispiel der NNBC 3-Europe-Studie“. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 67: 1144–1152.
- VOGEL, S (2012): „Einfluss des Plasminogen-Aktivator-Systems auf die Expression von Tumorrelevanten Membranproteinen in Brustkrebszellen“. MA thesis. Institut für Biochemie und Biotechnologie der naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- VOSSEN, CY, M HOFFMEISTER, JC CHANG-CLAUDE, FR ROSENDAAL, H BRENNER (2011): „Clotting Factor Gene Polymorphisms and Colorectal Cancer Risk“. *Journal of Clinical Oncology*, 29(13): 1722–1727.
- WANG, S, Q CAO, X WANG, B LI, M TANG, W YUAN, J FANG, J QIAN, C QIN, W ZHANG (2013): „PAI-1 4G/5G Polymorphism Contributes to Cancer Susceptibility: Evidence from Meta-Analysis“. *PLOS ONE A Peer-Reviewed, Open Access Journal*, 8: 1–9.
- WANG, Y, JGM KLIJN, Y ZHANG, AM SIEUWERTS, MP LOOK, F YANG, D TALANTOV, M TIMMERMANS, MEM van GELDER, J YU, T JATKOE, EMJJ BERNS, D ATKINS, JA FOEKENS (2005): „Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer“. *The Lancet*, 365(9460): 671–679.
- WENG, CJ, CM TSAI, YC CHEN, YH HSIEH, CW LIN, YF LIU, SC SU, MK CHEN, SF YANG (2010): „Evaluation of the Association of Urokinase Plasminogen Activator System Gene Polymorphisms with Susceptibility and Pathological Development of Hepatocellular Carcinoma“. *Annals of Surgical Oncology*, 17: 3394–3401.
- WERLE, B, M KOTZSCH, TT LAH, J KOS, D GABRIJELCIC-GEIGER, E SPIESS, J SCHIRREN, W EBERT, W FIEHN, T LUTHER, V MAGDOLEN, M SCHMITT, N HARBECK (2004): „Cathepsin B, Plasminogenactivator-inhibitor (PAI-1) and Plasminogenactivator-receptor (uPAR) are Prognostic Factors for Patients with Non-small Cell Lung Cancer“. *Anticancer Research*, 24: 4147–4162.
- WITTEKIND, C, HJ MEYER, F BOOTZ (2003): *TNM Klassifikation Maligner Tumoren*. 6th ed. Springer Singapore Pte. Limited.
- WOLF, C, C ANTHUBER, B ATASEVEN (2011): „Adjuvante Systemtherapie“. Edit.: BAUERFEIND, I. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München. 11: 154–172.
- WOO, M, K PARK, J NAM, JC KIM (2007): „Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer“. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22: 1064–1070.
- XU, X, Y XIE, Y LIN, X XU, Y ZHU, Y MAO, Z HU, J WU, H CHEN, X ZHENG, J QIN, L XIE (2012): „PAI-1 promoter 4G/5G polymorphism (rs1799768) contributes to tumor susceptibility: Evidence from meta-analysis“. *The Journal of Experimental Medicine*, 4: 1127–1133.
- YAGMURDUR, MC, FB ATAC, NU TUTAR, H VERDI, I ISIKLAR, BH OZDEMIR, N OZBEK, H KARAKAYALI, M HABERAL (2008): „Prognostic value of the PAI-1 4G/5G polymorphism in invasive ductal carcinoma of the breast“. *International Journal of Surgery*, 93: 163–168.

- YENDE, S, DC ANGUS, J DING, AB NEWMAN, JA KELLUM, R LI, RE FERRELL, J ZMUDA, SB KRITCHEVSKY, TB HARRIS, M GARCIA, K YAFFE, FTHAS RICHARD G WUNDERINK (2007): „4G/5G Plasminogen Activator Inhibitor-1 Polymorphisms and Haplotypes Are Associated with Pneumonia“. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176: 1129–1137.
- ZHANG, WJ, J WOJTA, BR BINDER (1997): „Notoginsenoside R1 Counteracts Endotoxin-Induced Activation of Endothelial Cells In Vitro and Endotoxin-Induced Lethality in Mice In Vivo“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(3): 465–474.
- ZHANG, X, XO SHU, Q CAI, Z RUAN, YT GAO, W ZHENG (2006): „Functional Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Variants and Breast Cancer Survival“. *Clinical Cancer Research*, (12): 6037–6042.
- ZHAO, L, MB BRACKEN, AT DEWAN, S CHEN (2012): „Association between the SERPINE1 (PAI-1) 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism (rs1799889) and pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis“. *Molecular Human Reproduction*, 19(3): 1–8.
- ZIELINSKI, C, KPM KIECHLE (2004): „Die Onkologie - Klassifikation und Stadieneinteilung“. Edit.: HIDDEMANN, W, H HUBER, C BARTRAM. *Sprin.* 43.4: 1012–1023.

Thesen

1. Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus hat keine Bedeutung für die Inzidenz des primären Mammakarzinoms.
2. Es besteht keine Korrelation zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und den traditionellen klinisch-pathologischen Parametern.
3. Tendenziell steigt die durchschnittliche PAI-1-Proteinexpression im Tumorgewebe mit der Anzahl der vorhandenen 4G-Allele.
4. Mammakarzinompatientinnen mit einem 5G-Allel weisen statistisch signifikant seltener tumorale PAI-1-Werte oberhalb des für die Therapieentscheidung wichtigen Schwellenwertes auf.
5. Der 4G/5G-Polymorphismus hat keine Bedeutung für den Krankheitsverlauf beim primären Mammakarzinom.
6. Beim fortgeschrittenen Mammakarzinom (positiver Nodalstatus, $T \geq 2\text{cm}$, $G \geq 2$) haben Patientinnen mit einem 4G/4G-Genotyp eine tendenziell ungünstigere Prognose.
7. Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus hat keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber einer adjuvanten Chemotherapie.

Lebenslauf

Personalien

Name Ute Benesch
ledig, deutsch

Anschrift August-Bebel-Platz 4
06108 Halle
01577/3948076
u.benesch@gmx.de

Geburtsdaten 01. November 1976, Filderstadt

Schulbildung

08/1983–06/1997 Freie Waldorfschule Esslingen
1997 Abitur

09/1997–12/1998 Soziales Jahr in England, Arbeit mit Menschen mit sog. geistiger Behinderung

04/1999–04/2002 Ausbildung zur Gesundheitspflegerin an der Freien Krankenpflegeschule der Filderklinik e.V., Filderstadt

03/2002 Krankenpflegeexamen

05/2002–09/2003 Arbeit als Gesundheitspflegerin in der Inneren Medizin mit dem Schwerpunkt Endokrinologie, Gastroenterologie, Kardiologie, Onkologie und Pulmologie, Filderklinik, Filderstadt

10/2003–06/2010 Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Ärztliche Tätigkeit

21.06.2010 Ärztliche Approbation

09/2010–04/2013 Assistenzärztin in der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie Universitätsklinikum Halle (Saale)

Seit 02/2014 Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Sächsisches Krankenhaus Altscherbitz Dr. med. B. Richter

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Der 4G/5G-PAI-1-Polymorphismus beim primären Mammakarzinom“ selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften oder Medien entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

<Halle, 9. Dezember 2015>

<Ute Benesch>

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

<Halle, 9. Dezember 2015>

<Ute Benesch>

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer, der mir diese Arbeit anvertraut hat und auf dessen freundliche Hilfe ich wiederum auf dem Weg zur Dissertation immer vertrauen konnte.

Mit ihm danke ich auch Frau Angela Dittmer, die mir ebenfalls über die gesamte Arbeit immer hilfreich zur Seite stand und über so manche Fallstricke im Labor hinweggeholfen hat.

Ebenso ist Frau Dr. rer. nat. Martina Vetter für ihre Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente und für ihre Anregungen zur weiteren Recherche zu danken.

Bei Frau Dr. med. Eva Kantelhardt bedanke ich mich für ihre wichtige Unterstützung bei Akquirierung und Auswertung der Patientendaten.

Frau Tina Ruider im Studiensekretariat gilt mein Dank für die umfangreichen Daten zur Nachbeobachtung.

Viel Unterstützung fand ich außerdem in der Zusammenarbeit mit meinen Co-Doktorandinnen Frau Nicole Tzscheppan, MD, und Dr. med. Lena Mohr, für die ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Bei der Auswertung der Ergebnisse half zudem Frau Dr. Susanne Unverzagt vom Institut für Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Universität Halle, für deren wertvolle Unterstützung ich ebenfalls sehr dankbar bin.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht außerdem an meinen Bruder Jörg und an meinen Freund Felix, die halfen, diese Arbeit in Form zu gießen.

Zuletzt, aber nicht am wenigsten, danke ich allen, die hier nicht genannt wurden, aber nichtsdestoweniger große und kleinere Beiträge zum Abschluß dieser Arbeit geleistet haben.