

Aus dem Institut für Pathologie des Klinikums Kassel,  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Philipps-Universität

Marburg

(Direktor Prof. Dr. med. J. Rüschoff)

**Biomarker zur Vorhersage des klinischen Verlaufes  
von Patientinnen mit Mammakarzinom nach  
adjuvanter Therapie mit CMF unter besonderer  
Betrachtung der Enzyme Thymidinphosphorylase,  
Dihydropyrimidindehydrogenase und  
Thymidylatsynthase**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Medizin dem Fachbereich Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Romy Porstmann**

aus Berlin

Kassel, 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-  
Universität Marburg am 18.11.2004

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. J. Rüschoff

Correferent: Prof. Dr. med. U. Wagner

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Mammakarzinom.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Prognosefaktoren des Mammakarzinoms .....	3
1.1.3 Prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom .....	9
1.1.3.1 Endokrine Therapie .....	11
1.1.3.2 Chemotherapie.....	12
1.1.3.3 Neue therapeutische Ansätze bei MK.....	14
<b>1.2 Wirkmechanismus von 5-FU und Bedeutung der Enzyme Thymidinphosphorylase, Dihydropyrimidindehydrogenase und Thymidylatsynthase .....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Wirkung von 5-FU .....	17
1.2.2 Thymidinphosphorylase .....	18
1.2.3 Dihydropyrimidindehydrogenase .....	20
1.2.4 Thymidylatsynthase.....	24
<b>1.3 Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Charakterisierung des Patientengutes .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Geräte und Chemikalien für Immunhistochemie .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 Geräte und Chemikalien für die molekularbiologische Analytik.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Methoden.....</b>	<b>37</b>
2.4.1 Gewebebehandlung .....	37
2.4.2 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.....	38
2.4.3 Immunhistochemischer Nachweis von TP, DPD, TS.....	39
2.4.4 Immunhistochemische Darstellung der tumorbiologischen Parameter .....	41
2.4.5 RNA-Isolierung aus FFPE-Geweben .....	45
2.4.5.1 Laser-Mikrodissektion.....	45
2.4.5.2 Makrodissektion .....	47
2.4.5.3 RNA-Isolierung mit HighPure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics).....	47
2.4.6 Real-Time Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR).....	49
2.4.6.1 Reverse Transkription der mRNA: erster Schritt der RT-PCR.....	49
2.4.6.2 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion mit dem LightCycler: zweiter Schritt der RT-PCR .....	50
2.4.6.3 Grundlage der Quantifizierung mit Referenzen: Datenauswertung mit Kalibrator und Haushaltsgen .....	53
<b>2.5 Statistik .....</b>	<b>55</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1 Häufigkeiten und Verteilungen.....</b>	<b>58</b>
3.1.1 Häufigkeiten und Verteilungen der klinisch pathologischen Charakteristika.....	58

3.1.2	Häufigkeiten und Verteilungen der tumorbiologischen Parameter analysiert mittels Immunhistochemie .....	58
3.1.3	Häufigkeiten und Verteilungen der prädiktiven Biomarker TP, DPD und TS analysiert mittels Immunhistochemie .....	61
3.1.4	Häufigkeiten und Verteilungen der prädiktive Biomarker TP, DPD und TS analysiert mittels RT-PCR .....	65
<b>3.2</b>	<b>Korrelation der Ergebnisse von selektierten Parametern .....</b>	<b>70</b>
3.2.1	Korrelation der klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter .....	70
3.2.2	Methodenvergleich RT-PCR und IHC für TP, DPD und TS .....	71
3.2.3	Korrelation der klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter mit den Enzymen TP, DPD und TS .....	74
<b>3.3</b>	<b>Analyse der krankheitsfreien Überlebenszeit .....</b>	<b>78</b>
3.3.1	Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit von den klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter .....	78
3.3.2	Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit von der Expression der Enzyme TP, DPD und TS (analysiert mit IHC).....	81
3.3.3	Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit von der Expression der Enzyme TP, DPD und TS (analysiert mit RT-PCR) .....	82
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
4.1	Methoden der Enzymanalytik, präanalytische, analytische und biologische Faktoren.....	91
4.2	Klinisch prognostische Marker und tumorbiologische Marker.....	98
4.3	TP, DPD und TS Analyse – Wertung der Testergebnisse.....	103
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>114</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>116</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>133</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BUPase	$\beta$ -Ureidpropionase
CH <sub>2</sub> THF	Methylentetrahydrofolat
cDNA	Copy DNA
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cp	Crossing point
Da	Dalton
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
5'-DFC	5'-Desoxy-5'-Fluorocytidin
5'-DFU	5'-Desoxy-5'-Fluorouridin
DFUR	Desoxyfluorouridin
DHF	Dihydrofolat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPase	Dipyrimidinase
DPD	Dihydropyrimidindehydrogenase
dR-1-P	2-Desoxyribose-1-phosphat
5-dR-1-P	5-Desoxyribose-1-phosphat
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
ER	Östrogenrezeptor
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementing gene1
ETOH	Ethanol
5-FU	5-Fluorouracil
FAC	5-Fluorouracil, Adriamycin (Doxorubicin), Cyclophosphamid
FBAL	Fluoro- $\beta$ -alanin
FdUrd	Fluorodesoxyuridin
FdUMP	Fluoro-Desoxyuridinmonophosphat
FdUMP-TS	Komplex von TS und FdUMP
FdUDP	Fluoro-Desoxyuridindiphosphat
FdUTP	Fluoro-Desoxyuridintriphosphat
FdUTPase	Fluoro-Desoxyuridintriphosphatase
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FUrd	Fluorouridin
FUDP	Fluoro-Uridindiphosphat
FUH <sub>2</sub>	Dihydrofluorouridin
FUMP	Fluoro-Uridinmonophosphat
FUPA	Fluoro-Uridin- $\beta$ -Ureidpropionsäure
FUTP	Fluoro-Uridintriphosphat
FPGS	Folylpolyglutamatsynthase
$\gamma$ GH	$\gamma$ -Glutamylhydrolase
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphatdehydrogenase

G6PDH	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	Hämatoxilin und Eosin
HR	Hormonrezeptor (-en)
Kras mut.	Kras-Gen Mutation
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunoreaktiver Score
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LM	Laser-Mikrodissektion
MD	Makrodissektion
MK	Mammakarzinom (-e, -s, -en)
MRP	Multidrug-Resistance-Protein
MTHF	Methylen-Tetrahydrofolat
MTHFS	Methylen-Tetrahydrofolatsynthase
NADP(H <sub>2</sub> )	Nicotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat (reduziert)
NDPK	Nukleosid-Diphosphatkinase
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NMPK	Nukleosid-Monophosphatkinase
OPRTF	Orotatphosphoribosyltransferase
PBMNC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pi	Anorganisches Phosphat
PR	Progesteronrezeptor
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
PET-PCR	Paraffin-embedded-tissue PCR
R-1-P	Ribose-1-phosphat
RNR	Ribonukleotid-Reduktase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SZ	Stromazellen
THF	Tetrahydrofolsäure
TK	Thymidinkinase
TNM	Tumor Nodalstatus Metastasen (Klassifikationssystem)
TP	Thymidinphosphorylase
TS	Thymidylatsynthase
UK	Uridinkinase
UP	Uridinphosphorylase
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen (weight/volume)
VK	Variationskoeffizient (-en)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Maligne Tumore stehen mit einer durchschnittlichen Mortalitätsrate von 23-25% an zweiter Stelle in der Todesursachenstatistik entwickelter Industriestaaten (USA, Europa und Japan). Vier Tumorlokalisationen machen etwa 60 % aller Tumore aus (Tab. 1.1)

	Tumorlokalisation	Zahl der Fälle x 1000	
		Jahr 2000	Jahr 2010
Inzidenz	Kolon-Rektum	430	530
	<b>Mamma</b>	<b>420</b>	<b>540</b>
	Lunge	410	490
	Prostata	340	500
	Alle Tumore	2900	3600
Mortalität	Lunge	370	440
	Kolon-Rektum	190	230
	<b>Mamma</b>	<b>120</b>	<b>130</b>
	Prostata	94	120
	Alle Tumore	1500	1700
Prävalenz	<b>Mamma</b>	<b>4270</b>	<b>5870</b>
	Kolon-Rektum	2800	3700
	Prostata	2520	3570
	Lunge	960	1160
	Alle Tumore	19450	25100
Zur Therapie Anstehend	<b>Mamma</b>	<b>1300</b>	<b>1770</b>
	Prostata	1190	1700
	Kolon-Rektum	1110	1110
	Lunge	660	660
	Alle Tumore	8600	11000

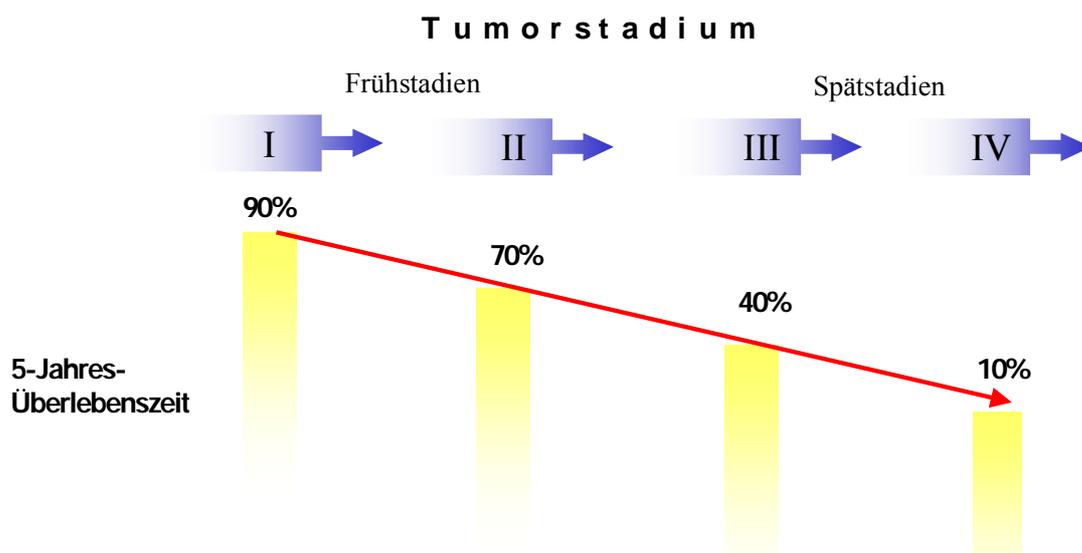
**Tab. 1.1** Inzidenz, Mortalität und Prävalenz der häufigsten Tumore

Quelle: Stanford Research Institute Consulting: Cancer Opportunities in the New Millennium, 2000 (Zahlen betreffen USA, Europa, Japan).

Aufgrund der hohen Inzidenz und der relativ geringeren Mortalität im Vergleich zu Lungen- und kolorektalen Tumoren hat das MK die höchste Prävalenz und stellt damit die meisten Patienten pro Jahr, die für eine Behandlung/Wiederbehandlung nach Rückfällen anstehen. Damit ist das MK eine der kostenintensivsten Tumorerkrankungen überhaupt.

In Deutschland erkranken jährlich ca. 40.000 Frauen an einem MK, damit jede 8. Frau (12% aller Frauen); 3,5% von den 12% Erkrankten sterben an dem Karzinom (Harris et al., 1992; Tumorzentrum München, 1998). In den USA werden 197.000 neue MK Fälle pro Jahr registriert (National Center for Health Statistics, 1998).

Etwa 60% aller MK werden im lokalisierten Stadium mit einer 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 70-90% entdeckt (Abb. 1.1)



**Abb. 1.1** Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit MK in Abhängigkeit vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Die 5-Jahres-Überlebenszeit fällt von 70-90% in Frühstadien auf 10-40% in Spätstadien.

Risikofaktoren für das Entstehen eines MK sind v.a. das Vorkommen von MK in der nahen Verwandtschaft, das Vorkommen anderer Tumore, eine späte Schwangerschaft bzw. Nulliparität, Adipositas und eine epitheliale Hyperplasie des Brustdrüsengewebes (Maass, 1994; Willett et al., 2000).

Nur etwa 15% aller MK sind assoziiert mit familiärer Häufung. Bei 0,3-0,4% aller Frauen bestehen dominante, hoch-penetrante (30-70% Penetranz) Genmutationen, die zur Entwicklung eines MK meist schon vor dem 30. Lebensjahr führt. Zwei Gene sind

bisher von Bedeutung, BRCA-1 (auf Chromosom 17) und BRCA-2 (auf Chromosom 13).

### **1.1.2 Prognosefaktoren des Mammakarzinoms**

*Definition: Prognosefaktoren lassen den Verlauf des Patienten unter gegebenen Standardtherapieverfahren mit einer definierten Wahrscheinlichkeit vorhersagen.*

Gegenwärtig werden nodalnegative MK übertherapiert. Nur etwa 20-30% aller nodalnegativen MK entwickeln über 5 Jahre eine Progression, jedoch 60-80% der nodalnegativen Patientinnen, selektiert nach NIH oder St. Gallen Kriterien, erhalten eine Chemotherapie. Diese ist teuer, hat Nebenwirkungen und verursacht auch Spätschäden (Zweitkarzinome durch Chemotherapie).

Klinische, klinisch-chemische, morphologische und molekulare Marker im Tumor, die mit dem Patientenverlauf bei Patientinnen mit MK korrelieren, werden seit Jahrzehnten gesucht und angewendet. Etablierte Faktoren sind der Prognosefaktor „Chirurg“ zur Erzielung tumorfreier Resektionsränder und geringer perioperativer Streuung von Tumorzellen, der TNM-Status, Tumorgrading und eine Reihe von Biomarkern:

Hormonrezeptoren ER/PR, Her2 Amplifikation, Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator/-Inhibitor/-Rezeptor (uPA/PAI/uPAR), Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP), Bone-Sialoprotein (BSP), Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Zyklin D und E, Kathepsin D, mutiertes p53, angiogene Faktoren (z.B. VEGF), um nur einige zu nennen. Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark hat auch prognostische Bedeutung erlangt und wird in einigen Zentren durchgeführt (Braun et al., 2001).

Im folgenden werden solche prognostische Faktoren näher erläutert, die auch in der vorliegenden Promotion analysiert und ausgewertet wurde.

#### **TNM-Klassifikation**

Die Grösse eines Karzinoms (T) und das Ausmass der axillären Lymphknotenbeteiligung (N) und Fernmetastasierung (M) sind sehr wichtige, unabhängig und additiv wirkende Prognosefaktoren (TNM-Klassifikation siehe Anhang). Die Tumorausbreitung (Stadium) ist für die Therapie und Prognose der meisten MK wichtiger als der Tumortyp oder der Differenzierungsgrad.

Tumordurchmesser (kritisches Tumolvolumen), Beginn und Ausmass der axillären und hämatogenen Metastasierung korrelieren negativ mit den Überlebensraten (Koscielny et al., 1984).

Patientinnen mit axillären Lymphknotenmetastasen haben ein hohes Risiko, Fernmetastasen zu entwickeln, obwohl der Lokaltumor komplett entfernt wurde. Lokalrezidive eines MK sind wiederum in 90% mit Fernmetastasen assoziiert.

Aus prospektiven Langzeitstudien ist bekannt, dass nur etwa 25% der Patientinnen ohne Lymphknotenbeteiligung innerhalb von 5 Jahren Rezidive erfahren (Clark et al., 1989), während es in der nodalpositiven Gruppe 75% sind.

Idealerweise sollten nur diese Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie erhalten und mit Hilfe prognostischer Faktoren akkurater identifiziert werden.

### **Tumorhistologie und –differenzierung**

Die beiden häufigsten histologischen Typen des MK, das invasive duktale und das infiltrierende lobuläre Karzinom, weisen ähnliche Prognosen auf (Tab.1.2) und unterscheiden sich von histologischen Sonderformen, die zusammen jedoch weniger als 10% der MK ausmachen.

Mammakarzinom Histologischer Typ	10-Jahres-Überlebensrate
Invasiv duktal	30%
Infiltrierend lobulär	35%
Medullär	60%
Muzinös	60%
Papillär	65%
Tubulär	65%

**Tab. 1.2** 10-Jahres-Überlebensrate der histologischen Typen des MK

**Tumordifferenzierungsgrad**

Für die Bestimmung des Malignitätsgrades (Differenzierungsgrad) wird eine von der WHO empfohlene Einteilung nach Scarff, Bloom und Richardson empfohlen. Sie umfasst den Grad der tubulären Differenzierung, der Kernpolymorphie und die Mitosezahl. Für jedes Kriterium gibt es eine Dreipunkteskala. Die Zahl der Punkte wird in einem Score zusammengefasst und in drei Grade eingeteilt. Tumore mit dem Malignitätsgrad 1 haben eine deutlich höhere 5-Jahres-Überlebenszeit als die Grade 2 und 3. Der Wert der Grade-Einteilung für die Einschätzung der Prognose des einzelnen Falles wird jedoch durch die subjektiven Bewertungsmaßstäbe eingeschränkt und bedarf mehr objektiver standardisierter Messmethoden oder Biomarker, die mit dem Tumordifferenzierungsgrad korrelieren.

Die Reproduzierbarkeit des histopathologischen Differenzierungsgrads soll 70 - 80% betragen (Robbins et al., 1995; Theissig et al., 1990).

Aus den Faktoren Differenzierungsgrad (Score 1,2,3), Lymphknotenstatus (pN0=1, pN+ in Level 1=2, pN+ in Level 2=3) und Tumorgroße (maximaler invasiver Teil in cm) wurde der prognostische Nottingham Index (NPI) gebildet, der besser als Einzelfaktoren die Prognose beurteilen lässt, wobei Alter und Hormonrezeptor (HR) -Status das Resultat nicht beeinflussen (Galea et al., 1992).

**Hormonrezeptor Status**

Der HR-Status (Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in den Tumorzellkernen) ist sowohl für die Prognoseeinschätzung als auch für die Therapieplanung von Bedeutung (prognostischer und prädiktiver Faktor) (Maass und Jonat, 1983). Das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben werden durch den HR-Status entscheidend definiert. HR-Positivität weist auf eine gute Prognose hin. Das Gesamtüberleben HR-positiver MK wurde insgesamt mit 90%, das HR-negativer MK mit etwa 60% beschrieben (Reiner et al., 1988). Durch die Therapiemöglichkeit mit Hormonantagonisten wurde die Überlebenszeit HR-positiver Tumore zusätzlich signifikant verbessert. HR-negative Tumore sind in der Mehrzahl Her2-positiv und weisen eine schlechtere histologische Differenzierung auf.

Die Analyse des HR-Status erfolgt in der diagnostischen Routine vorwiegend mittels Immunhistochemie (IHC) und semiquantitativer Bewertung. Nur in wenigen Laboren

werden quantitative ELISAs oder Bioassays durchgeführt, da dafür grössere Mengen an frischem Gewebe benötigt werden.

### **P53**

Mehr als 50% aller Malignome weisen Mutationen im p53-Gen auf, das damit eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielt (Lane, 1992, Levine et al., 1991). Seine prognostische Bedeutung für das MK wurde sehr widersprüchlich beschrieben. In den meisten Studien konnte gezeigt werden, dass mutiertes p53 kein unabhängiger prognostischer Faktor ist (Pietilainen et al., 1995).

P53 ist ein Tumorsuppressorgen und die Funktion des Proteins (Tetramer) ist sehr vielfältig. Als Transkriptionsfaktor (Levine et al., 1994) aktiviert p53-Gene wie APAF-1, Bax, p21<sup>WAF1</sup>, Fas/CD95, Gadd45, IGF-BP-3, PIG3, 14-3-3 $\sigma$  und Poly (ADP-ribose) polymerase (Hermekin et al., 1997; Miyashita et al., 1994a; Owen-Scaub et al., 1995; Zhan et al., 1998). P53 induziert die Transkription des G1-zyklinabhängigen Kinaseinhibitors, der den Übertritt in die S-Phase inhibiert (Dotto, 2000). Andere Gene, wie z.B. bcl2, werden durch p53 reprimiert. Transkriptions-unabhängige Funktionen wurden ebenfalls charakterisiert (Canman et al., 1998; Miyashita et al., 1994b; Zhou et al., 1999). Über Signalkaskaden trägt p53 wesentlich zur Erhaltung der genomischen Stabilität und zum Arrest des Zellzyklus in G1 und G2/M für DNA-Reparatur und/oder zur Apoptose von Zellen mit fehlerhafter DNA-Replikation bei. Es dient in normalen Zellen als „Gatekeeper“ und wird aktiviert durch Zellstress, z.B. Bestrahlung, Mutagene und Hypoxie (Lane, 1992). P53 wird inaktiviert durch Bindung an mdm2 und Abbau im Proteasom der Zellen. Normales p53 wird schnell eliminiert und ist daher immunhistologisch in Gewebeschnitten normaler Zellen nicht nachweisbar. Mutiertes p53-Protein akkumuliert in der Zelle, hat eine erhöhte Halbwertszeit, ist jedoch meist funktionslos. Daher sind Tumorzellen in der IHC oft positiv gefärbt, was zum Nachweis einer p53-Mutation genutzt wird. Sequenzierungen des Gens sind zum Nachweis von Mutationen jedoch zuverlässiger.

P53-Mutationen im Tumor wurden mit Therapieresistenz assoziiert (Lowe et al., 1993). In kolorektalen Karzinomen waren p53-Mutationen prädiktiv für ein schlechtes Ansprechen („response“) gegenüber einer 5-FU basierten Chemotherapie (Ahnen et al., 1998; Lenz et al., 1998a). Andere Studien hingegen konnten keinen Zusammenhang zwischen p53-Expression und einem Ansprechen auf eine 5-FU-Therapie aufzeigen (Cascinu et al., 2000; Yeh et al., 1999). Paradiso et al. (2000) konnte zeigen, dass p53

alleine keine prädiktive Aussage zum Ansprechen auf eine Methotrexat/5-FU-Behandlung kolorektaler Karzinome hat, jedoch in Kombination mit erhöhter TS-Expression. P53-Mutation zusammen mit hoher TS-Expression ergab Ansprechraten von 7%, ohne hohe TS-Expression hingegen von 46%. Longley et al. (2002) fanden, dass eine induzierbare TS-Expression als Folge einer Antifolat-Therapie sowohl das p53-Gen als auch dessen Zielgene in vitro moduliert.

### **Bcl2**

Bcl2 spielt bei der Regulation der Apoptose eine Rolle. Gemeinsam mit bcl-xl hemmt es die Apoptose von Zellen und ist damit ein Gegenspieler von bax und bcl-xs. Bcl2 hält die Membranen von Mitochondrien intakt und verhindert die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma, was mit beginnender Apoptose einhergeht.

Erhöhte bcl2-Expression in MK wurde mit guter Prognose assoziiert und korrelierte positiv mit anderen Parametern guter Prognose wie positivem HR-Status, kleiner Tumorgrosse und niedrigem Tumordifferenzierungsgrad (Kymionis et al., 2001).

Itaya et al. (1999) fanden keine signifikante Korrelation zwischen bcl2 und dem Tumorwachstum unter Therapie. Häufig werden Ratios von Bcl2 und bax gebildet, die die Regulation der Apoptose besser widerspiegeln als die Einzelmarker (Schiller et al., 2002).

### **Her2**

Her2 (C-Erb B-2) gehört zur Familie der EGF („Epidermal Growth Factor“-) Rezeptoren. Das Gen kodiert ein transmembranes Glykoprotein Her2, das aus einer intrazellulären Tyrosinkinase Domäne und einer extrazellulären Komponente besteht. Her2 ist ein Rezeptor für wachstumsfördernde Liganden, die zur Autophosphorylierung von Her2 an der intrazellulären Domäne und Heterodimerbildung mit dem EGF1-Rezeptor (Her1), Her3 und/oder 4 mit Beschleunigung der Phosphorylierung führen. Aktiviertes Her2 induziert eine proliferationsfördernde Signalkaskade in der Zelle unter Einbeziehung von Ras und MAP-kinasen. Her2 fördert auch Angiogenese und Resistenz der Zelle gegenüber Apoptose.

Das Her2-Gen ist in MK häufig amplifiziert (etwa 25% aller primärer MK), was mit einer entsprechenden Proteinerhöhung und Funktionsverstärkung einhergeht. Her2-

positive und nodalpositive MK haben eine schlechtere Prognose als Her2-negative (Pegram et al., 1998; Slamon et al., 1987, 1989).

Goldstandard für den Nachweis einer Her2-Genamplifikation ist die FISH-Technologie. Die Analyse mit IHC ist preiswerter und weist den erhöhten Proteinspiegel in der Zelle nach, die nicht immer mit einer Genamplifikation korreliert, bedingt durch Artefakte in der IHC und/oder transkriptionelle Induktionen der Genexpression. IHC 3+ und FISH-Positivität korrelieren sehr gut, nur 20-30% der IHC 2+ positiven Tumore sind auch FISH-positiv. Her2-positive MK (FISH + oder IHC 2+ und 3+) können mit Herceptin® behandelt werden, einem monoklonalen humanisierten therapeutischen Antikörper, der gegen Her2 gerichtet ist (Slamon et al., 1998; Tan-Chiu und Piccart, 2002).

Die Her2-Bestimmung im Serum mittels ELISA wird ebenfalls für Prognoseabschätzungen und Verlaufskontrolle der Therapie angeboten (Vetter, 2002).

### **MiB1 (Ki-67)**

Selektive Indikatoren der Zellproliferation sind p345 (Ki-67, MiB1), p170 (Topoisomerase IIa) und p100 (S-Phase-Protein) (Übersicht bei Parwaresch und Rudolph, 1996). P345 und p170 sind in allen Phasen des Zellzyklus ausser in G0 hochreguliert, p100 mehr spezifisch nur in den S-/M-Phasen. P345 ist ein Nicht-Histon Protein mit noch unklarer Funktion, das für die Zellproliferation essentiell zu sein scheint und wird auch schlechthin das „Proliferationsantigen“ genannt. Es kann mit dem monoklonalen Antikörper Ki-67 in Frischgewebe und mit MiB1 oder Ki-S5 in Paraffingewebe nachgewiesen werden. Topoisomerase IIa kontrolliert G2 und kann mit den Antikörpern Ki-S1,-4,-6,-7 und -8 detektiert werden. Nachteil von p345 und Topo IIa ist, dass sie auch in der G1-Phase exprimiert werden. Zellen in der G1 Phase schreiten nicht immer im Zellzyklus voran, bleiben dort oder gehen z.T. in Apoptose. P100 wird durch Ki-S2 angezeigt und ist spezifischer für die S- und M-Phasen des Zellzyklus. Der Nachweis der Zellproliferationsantigene erfolgt immunhistologisch oder immunzytochemisch mittels Flowzytometrie. MiB1 wurde in zahlreichen Studien mit hohem mitotischem Index, hohem Differenzierungsgrad und schlechter Prognose von MK assoziiert (Weidner et al., 1994).

### 1.1.3 Prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom

*Definition: Prädiktive Faktoren lassen das Ansprechen eines Patienten auf eine spezifische Mono- oder Kombinationstherapie mit einer definierten Wahrscheinlichkeit vorhersagen.*

Man unterscheidet einerseits Faktoren für die Vorhersage der Effizienz und andererseits für die Vorhersage der Nebenwirkungen. Mit Hilfe von prädiktiven Faktoren/Biomarkern lässt sich eine mehr individuell zugeschnittene Therapie für den jeweiligen Patienten aussuchen (Kim, 2003).

Molekulare Ursachen für Therapieresistenz und Nebenwirkungen werden zunehmend verstanden und Biomarker werden identifiziert, mit denen Vorhersagen besser getroffen und individuelle Therapieempfehlungen abgeleitet werden können. Bedeutung für Therapieentscheidungen im Routinealltag haben bisher nur HR- und Her2-Expression bei MK erreicht. Biomarker können schlechte prognostische Faktoren darstellen und gute prädiktive Marker sein (Beispiel Her2) oder gute prognostische Faktoren und gute prädiktive Marker sein (Beispiel ER/PR-Expression), da diese Biomarker gleichzeitig auch das Ziel von zwei wichtigen Standardtherapien darstellen - Herceptin® und Tamoxifen. Die Analyse des „target“-Moleküls (Zielmoleküls) im Tumor und die daraus resultierende Selektion der Patienten für die eine oder andere Therapie resultiert in verbesserten Ansprechraten und Überlebenszeiten. Dennoch ist der Anteil von Therapieversagern („non-responder“) bei Monotherapie noch sehr hoch, z.B. 40-60% bei Tamoxifen, 70-80% bei Herceptin® (Freebairn et al., 2001; Haskell und Casciato, 2000).

Die Expression des „targets“ eines Medikaments kann mit dem Ansprechen auf das Medikament korrelieren, in vielen Fällen gibt es jedoch keine Korrelation.

Im Stadium der Forschung befinden sich zahlreiche weitere Einzelmarker sowie Markerprofile, analysiert mit Microarray Technologien. Zur Verbesserung der Selektionsschärfe von Patienten bedarf es der Analyse von Markerprofilen, die wichtige Signalwege in Richtung Apoptose einbeziehen und die Resistenz von Tumoren gegenüber Therapie wesentlich breiter umfassen als die Bestimmung der „target“-Expression alleine.

Semiquantitative/quantitative diagnostische Methoden der Markerbestimmung im Tumor erlauben mit hoher Wahrscheinlichkeit eine akkuratere Patientenselektion als qualitative Methoden.

**1.1.3 Therapie des frühen Mammakarzinoms**

MK wird heute als systemische Erkrankung mit lokaler Komponente angesehen und auch als solche therapiert. Daher werden eine lokoregionale (chirurgische und strahlentherapeutische) und eine systemische Therapie unterschieden.

Eine ausreichende Lokalthherapie mit tumorfreien Absetzungsrändern steht im Zentrum der Behandlung. Sie kann bereits mehr als 50% aller Patientinnen Heilung bringen.

Segmentektomie (weite Exzision), Segmentektomie mit Bestrahlung und/oder Tamoxifen-Behandlung und die Mastektomie (mit oder ohne Bestrahlung) stehen zur Auswahl.

Zwei wesentliche Konferenzen haben, basierend auf Metaanalysen, zur Konsensusbildung hinsichtlich adjuvanter systemischer Therapie des MK beigetragen:

- Konsensuskonferenz an den National Institutes of Health (2000)
- Konferenz in St.Gallen (2001).

Danach werden Patientinnen mit geringem Risiko und sonstige Patientinnen (mit mittlerem und hohem Risiko) definiert. MK mit geringem Risiko werden nicht mit systemischer adjuvanter Therapie behandelt oder maximal mit Tamoxifen und sind definiert durch Tumorgösse < 2 cm, positivem Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus (ER- und PR-Status), histologischem Grad 1, negativem Nodalstatus und Alter > 35 Jahre.

Die Einbeziehung der Zahl der positiven Lymphknoten wird nicht mehr empfohlen. Patientinnen mit mehr als einem dieser Risikofaktoren erhalten nach diesen neuen Empfehlungen eine Therapie wie dargestellt in Tab. 1.3 und 1.4 (Eidtmann und Jonat, 2002).

Status	ER und/oder PR positiv	
	Nodalnegativ	Nodalpositiv
Prämenopause	LHRH-Analoga oder LHRH-Analoga + Tamoxifen oder Chemotherapie + Tamoxifen oder BELIEBIGE KOMBINATION	
Postmenopause	Tamoxifen oder Chemotherapie + Tamoxifen	Chemotherapie + Tamoxifen

**Tab. 1.3** Adjuvante Therapie von Patientinnen mit mässigem bis hohem Risiko und Hormon-Rezeptor-positivem Tumor.

Status	ER und/oder PR negativ	
	Nodalnegativ	Nodalpositiv
Prämenopause Und Postmenopause	Chemotherapie	

**Tab. 1.4** Adjuvante Therapie von Patientinnen mit mässigem bis hohem Risiko und Hormon-Rezeptor-negativen Tumor.

### 1.1.3.1 Endokrine Therapie

Tamoxifen, ein selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (SERM) ist das meistverschriebene Medikament bei MK. Seine Verwendung bei Brustkrebs wurde von einer „first-line“ Medikation bei fortgeschrittenem Stadium mit Metastasen (Bezwoda et al., 1991) zur adjuvanten (EBCTCG, 1992, 2001) und sogar präventiven Applikation bei Risikopatientinnen erweitert (Powles, 2002; Wickerham, 2002). Tamoxifen erzielt bei HR-positiven MK nach 5 Jahren eine Reduktion der Brustkrebs-bezogenen Mortalität um 4% und nach 15 Jahren um 9% (Minckwitz und Kaufmann, 2002), eine Kombination mit Chemotherapie erhöht die Effektivität. Die EBCTCG (2001) wies für Frauen mit adjuvanter 5-jähriger Tamoxifen-Therapie einen Überlebensvorteil von 10,9% für nodalpositive und von 5,6% für nodalnegative frühe MK nach, unabhängig von anderen Patientinnencharakteristika oder Therapieformen. GnRH-Analoga bei prämenopausalen Frauen zur Ovarialsuppression (Goserelin, Zoladex®) wurden in der ZEBRA-Studie getestet: zweijährige Goserelin-Therapie im Vergleich mit 6 Zyklen CMF (Cyclophosphamid/ Methotrexat/ 5-Fluorouracil) bei prämenopausalen MK. Goserelin bei HR-positiven Tumoren war bezogen auf das rezidivfreie Überleben im Vergleich zu CMF gleichwertig. In anderen Studien war Goserelin sogar überlegen. Die Kombination von Ovarialsuppression und Tamoxifen stellt eine Optimierung der endokrinen Therapie dar und ist einer CMF-Therapie wahrscheinlich überlegen.

Anastrozol (Arimidex®) ist ein neuer Aromatasehemmstoff und hat sich in klinischen Studien bewährt. Es wird Tamoxifen aus der adjuvanten Therapie verdrängen (ATAC Trialists Group, 2001).

Ferner stehen für die Therapie des MK Aromatase-Inaktivatoren wie Formestan und Progesterone wie Megestrolacetat zur Verfügung (Mutschler, 1996; Sayer et. al., 2002).

### 1.1.3.2 Chemotherapie

In der Regel werden mittels Chemotherapie nicht einzelne Substanzen verabreicht sondern Kombinationen als Polychemotherapie, die entweder ein Anthrazyklin oder ein Taxan enthalten. Folgende Studienergebnisse lassen sich zusammenfassen: Polychemotherapie führt nach 10 Jahren zu einem Überlebensvorteil von 4,4% und nach 15 Jahren von 3,7%, zu einer Senkung des Rezidivrisikos nach 10 Jahren um 6,4% und nach 15 Jahren um 7,3% mit grösster Reduktion bei Frauen unter 40 Jahren. Grösster Überlebensvorteil (11,3%) wird bei nodalpositiven Frauen unter 50 Jahren erreicht.

Eine adjuvante Polychemotherapie reduziert das Risiko eines Wiederauftretens des MK in Form eines Lokalrezidivs, kontralateralen MK oder von Fernmetastasen in den ersten 5 Jahren um 35% bei Frauen unter 50 Jahren und um 20% bei Frauen über 50 Jahren (EBCTCG, 1998a). Die Mortalität sinkt jeweils um 27% bzw. 11%. Die 10-Jahres-Überlebensraten verbessern sich für Frauen unter 50 Jahren auf 7-11% und auf 2-3% bei Frauen über 50 Jahren, abhängig vom Befall der regionalen Lymphknoten bei Erstdiagnose (EBCTCG, 2002b).

Geringgradig höherer aber signifikanter Effekt entsteht mit Anthrazyklin-haltigen Schemata (Reduktion der Todesfälle um 15,7%) im Vergleich zu CMF (Cyclophosphamid/ Methotrexat/ 5-Fluorouracil). Langzeittoxizität ist noch nicht ausreichend dokumentiert. Anthrazykline werden im FAC- (5-FU/ Doxorubicin/ Cyclophosphamid) oder FEC- (5-FU/ Epirubicin/ Cyclophosphamid) Kombinationen eingesetzt.

CMF sollte nach heutigen Empfehlungen bei Patientinnen mit niedrigerem Rezidivrisiko eingesetzt werden (z.B. bei Wahrscheinlichkeit eines krankheitsfreien Überlebens > 70% innerhalb von 10 Jahren) oder bei reduziertem Allgemeinzustand.

**Cyclophosphamid** ist eine Stickstoff-Lost-Verbindung und zählt zu den Nukleinsäure-alkylantien, welche als „Radiomimetika“ in jeder Phase des Zellzyklus (phasenunspezifisch) interferieren. Als „prodrug“ wird es in der Leber durch Zytochrom P450 oxidiert und aktiviert. Der zytotoxische Effekt macht sich nur während der DNA-Synthese, der Replikation, sowie der Transkription bemerkbar. Durch Alkylierung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) kommt es zu verschiedenen Veränderungen wie abnormer Basenpaarung, Vernetzung von DNA- bzw. RNA-Strängen, Strangbrüchen und Imidazolringsspaltung.

**5-Fluorouracil (5-FU)**, ein Fluoropyrimidin und Antimetabolit, wird seit mehr als 40 Jahren als Therapeutikum bei zahlreichen malignen Tumoren, u.a. beim MK, eingesetzt. Obwohl 5-FU als Monotherapie nur eine Ansprechrate um 10-15% hat, bleibt es noch Standardtherapie bei kolorektalen Karzinomen (Moertel, 1994), wird aber zunehmend mit Oxaliplatin und Irinotecan kombiniert. Zur Wirkungsweise von 5-FU siehe Kapitel 1.2.1.

Versuche, die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Fluoropyrimidine zu verbessern, haben zu der Entwicklung von Capecitabin (Xeloda®) geführt. Capecitabin ist ein oral verfügbares „prodrug“ von 5-FU, welches in der Leber metabolisiert und bevorzugt in Tumorzellen zum eigentlichen Wirkstoff 5-FU umgewandelt wird. Damit steigt die Verträglichkeit und die Therapie ist etwas effizienter. Xeloda hat in einer Studie in Kombination mit Taxol bei metastasierten MK einen Überlebensvorteil von 3 Monaten gezeigt und ist damit dem 5-FU in der Kombination überlegen.

**Methotrexat (MTX)** ist ein Folsäureantagonist und Antimetabolit, welches Dihydrofolsäure vom Enzym Dihydrofolatreduktase kompetitiv verdrängt und zudem das Enzym hemmt. Da Tetrahydrofolsäure, ein Substrat der Purinnukleotidsynthese, demzufolge fehlt, ist die DNA-/RNA-Synthese in der S-Phase vermindert. MTX besitzt eine hohe Toxizität mit ausgeprägten Nebenwirkungen (in Knochenmark, Leber und Mukosa). Zytostatische Wirkung und Nebenwirkungen können mit dem Antidot Tetrahydrofolsäure („Leucovorin®-Rescue“) vollständig aufgehoben werden.

Ferner eingesetzt werden mikrotubuläre Inhibitoren wie Vinblastin und Taxane.

Trotz adjuvanter Therapie gehen etwa noch ein Drittel aller nodalnegativen und mehr als die Hälfte aller nodalpositiven MK in eine Progression (Valagussa et al., 1978).

### 1.1.3.3 Neue therapeutische Ansätze bei MK

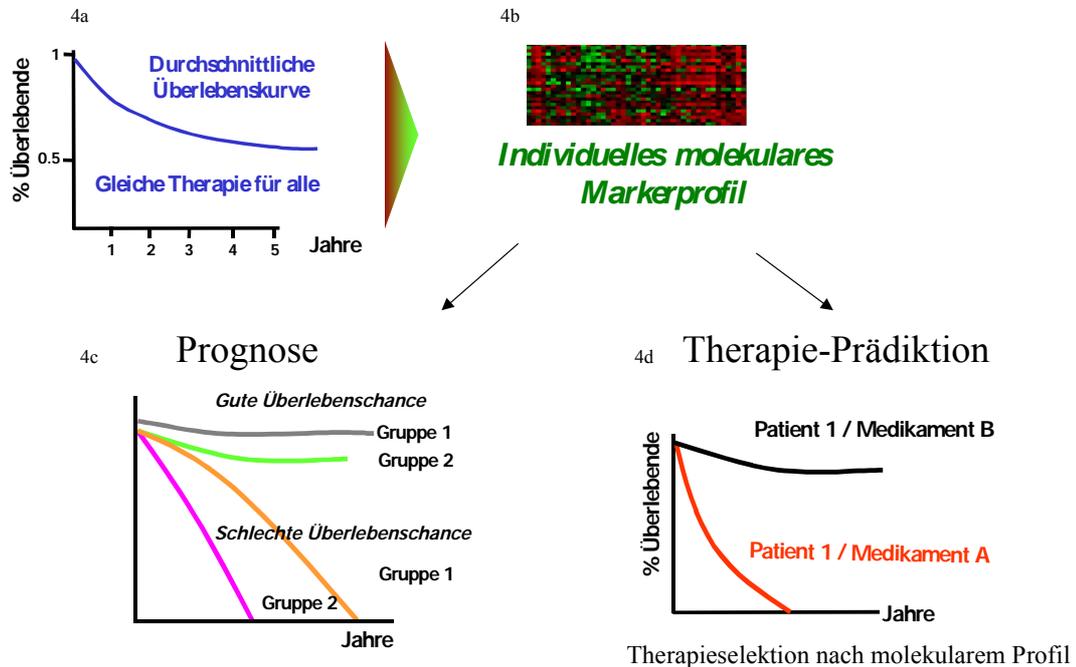
Mehr als 100 neue Substanzen sind zur Therapie des MK in klinischer Entwicklung. Es sind vorwiegend Verbindungen, die einzelne dysregulierte Moleküle als Ziel attackieren („tumor targeting“). Solche dysregulierten Moleküle spielen im Zellzyklus, der Apoptoseregulation, der Adhäsions- und Migrationsregulation von Zellen, der Stromaregulation, der Angiogenese und in einer Reihe anderer Stoffwechselwege eine Rolle. Neuere Substanzen sind spezifische humanisierte monoklonale Antikörper, niedermolekulare Substanzen, in Liposomen verpackte Moleküle, Gentherapie und Vakzine, die dysregulierte Moleküle im Tumor neutralisieren, wieder normalisieren oder die körpereigene Immunabwehr induzieren. Häufige Ziele sind Her 1–4 (Familie der EGF-Rezeptoren), Tumorsuppressorgene wie p53, Retinoblastomgen, Onkogene wie Ras, Myc und Myb, Proliferationsgene wie PCNA, MiB, Topoisomerasen 1/2 und Zykline, Stromaproteinasen wie Matrix-Metalloproteinasen und entsprechende Inhibitoren, Apoptose beeinflussende Moleküle wie bcl2, bax, NFkB und NFkB-I und eine Reihe angiogener Faktoren wie VEGF, Angiogenin und deren, u.a.

Erwartet wird ein Durchbruch in der Tumorthherapie mit höheren Effizienzen und weniger Nebenwirkungen.

Iressa® und Tarceva® (beide Inhibitoren des EGF1-R), Zarnestra® (Farnesyltransferaseinhibitor für das Ras Onkogen), Genasense® (bcl2 anti-sense RNA), Advexin® (p53-Gentherapie), RB94® (Retinoblastoma Gentherapie), Avastin® (VEGF-Inhibitor), Angiozyme® (Angiogenin Katabolisation), Glivec® (bcl-abl Inhibitor) und AG 3340® (Matrix-Metalloproteinaseinhibitor) sind einige Beispiele solcher neuer Therapieansätze in der klinischen Entwicklung.

Da solche gewählten „targets“ für neue Substanzen immer nur in einem mehr oder weniger kleinem Teil der Tumore dysreguliert sind und individuelle Tumoreigenschaften darstellen, wird eine Patientenselektion nach molekularen Markern mit prädiktiven Diagnostika (auch genannt „Theranostika“) Voraussetzung werden, um ausreichende Effizienzen zu erreichen (Crafts-Lighty, 2000). Gegenwärtige Therapieentscheidungen in der Onkologie werden „evidence based“ getroffen. „Evidence“ wird geliefert durch Ergebnisse randomisierter prospektiver Studien mit Medikamenten, die an kaum selektierten Patienten durchgeführt werden. Patienten für Medikamentenstudien werden gegenwärtig bestenfalls nur nach Tumorlokalisierung und

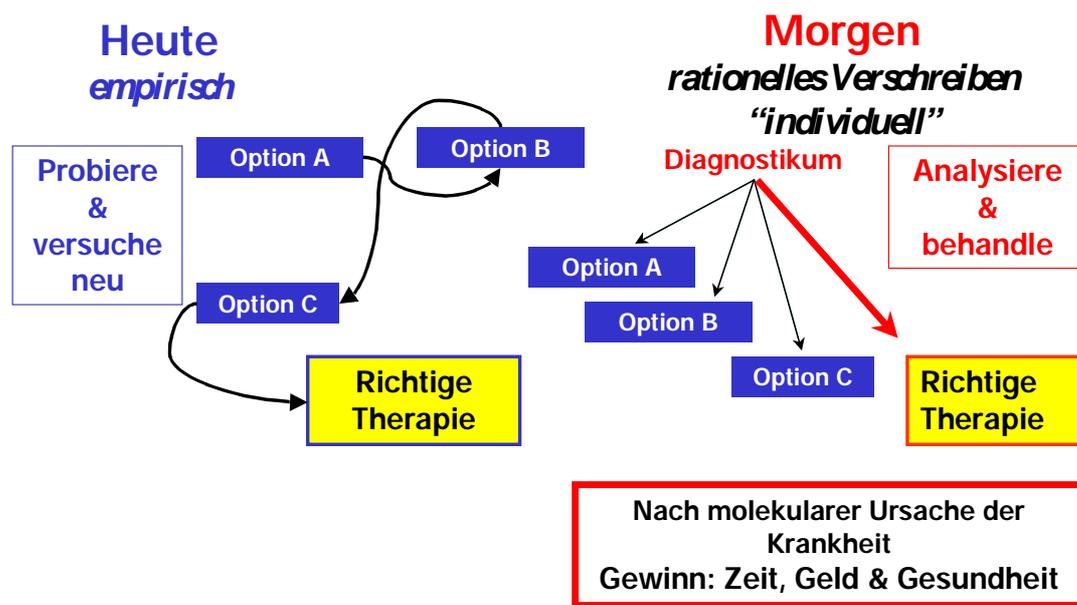
Stadium selektiert, nicht nach molekularen Tumorcharakteristika (Abb. 1.2). Ausnahmen waren Studien mit Herceptin® und Tamoxifen.



**Abb. 1.2** Molekulare Markerprofile: Unterscheidung von Patienten-Subgruppen mit unterschiedlichem Verlauf. Gegenwärtige klinische Studien mit Medikamenten resultieren in durchschnittlichen Überlebenskurven (4a). Individuelle molekulare Markerprofile (4b) lassen in Zukunft die Unterscheidung von Patientensubgruppen mit unterschiedlichen Prognosen (4c) und unterschiedlichem Ansprechen auf Therapie sowie die Selektion der für den jeweiligen Patienten passenden Therapieoption zu (4d).

Absehbarer Trend für die Tumorthherapie wird eine engere Verbindung von Diagnostika und Therapeutika, was zu individuell zugeschnittenen Selektionen und Kombinationen von Medikamente führen wird. Prädiktive diagnostische Tests mit relevanten Biomarkern lassen „responder“ selektieren und die Effizienz von Therapeutika erhöhen (Abb. 1.3).

Gegenwärtig liefern komplexe Profilanalysen von Markern auf Chips noch wenig reproduzierbare Daten und die Analyse von Einzelmarkern und kleinen Markerprofilen steht noch im Fokus. Technologien, die solche Analysen im Tumor reproduzierbar möglich machen, sind im Aufbau (z.B. Laser-Capture Mikrodisektion von Zellen mit quantitativer PCR-Analyse von Markern auf kommerziell verfügbaren Gerätesystemen).



**Abb. 1.3** Zukunft: Individuelle Medizin  
 Von „Probiere und versuche“ („trial and error“) zu individuellem rationalem Verschreiben der richtigen Medizin für den einzelnen Patienten.

## 1.2 Wirkmechanismus von 5-FU und Bedeutung der Enzyme Thymidinphosphorylase, Dihydropyrimidindehydrogenase und Thymidylatsynthase

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Prädiktion des Ansprechens von MK auf 5-FU, eines der immer noch am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika in der Onkologie. Als neue prädiktive Biomarker wurden drei Enzyme getestet, die im Metabolismus und bei der Wirkung des 5-FU eine entscheidende Rolle spielen: Thymidinphosphorylase (TP), Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) und Thymidylatsynthase (TS). Sie sind in zahlreichen Publikationen mit der Resistenz gegenüber 5-FU in Zusammenhang gebracht worden. Tumore von MK Patientinnen wurden nach chirurgischer Resektion vor adjuvanter Therapie mit zwei verschiedenen Technologien der Enzymanalytik untersucht und die Ergebnisse wurden mit dem Ansprechen auf Therapie und mit dem klinischen Verlauf der Patientinnen korreliert. Klinisch prognostische Parameter (TNM Status) und bekannte prognostische Marker

(HR Status, p53, bcl2, Her2 und MiB1) wurden ebenfalls bestimmt und mit dem klinischen Patientenverlauf korreliert.

### 1.2.1 Wirkung von 5-FU

5-FU ist ein Uracil-Analogon mit einem Fluoratom statt eines Wasserstoffatoms an der C5-Position. 5-FU wird intrazellulär u.a. von TP in mehrere aktive Metabolite umgewandelt: Fluoro-Desoxyuridinmonophosphat (FdUMP), Fluoro-Desoxyuridintriphosphat (FdUTP) und Fluoro-Uridintriphosphat (FUTP). Diese aktiven Metaboliten hemmen das Enzym TS und stören die DNA- und RNA-Synthese. 5-FU wird über das Enzym DPD katabolisiert und inaktiviert.

Somit spielen drei wichtige Enzyme bei der Wirkung von 5-FU eine Rolle: TP, DPD und TS. Diese haben eine potentielle prädiktive Bedeutung zur Vorhersage einer Therapieeffizienz mit 5-FU und auch zur Vorhersage von Nebenwirkungen (Abb. 1.4a und b).

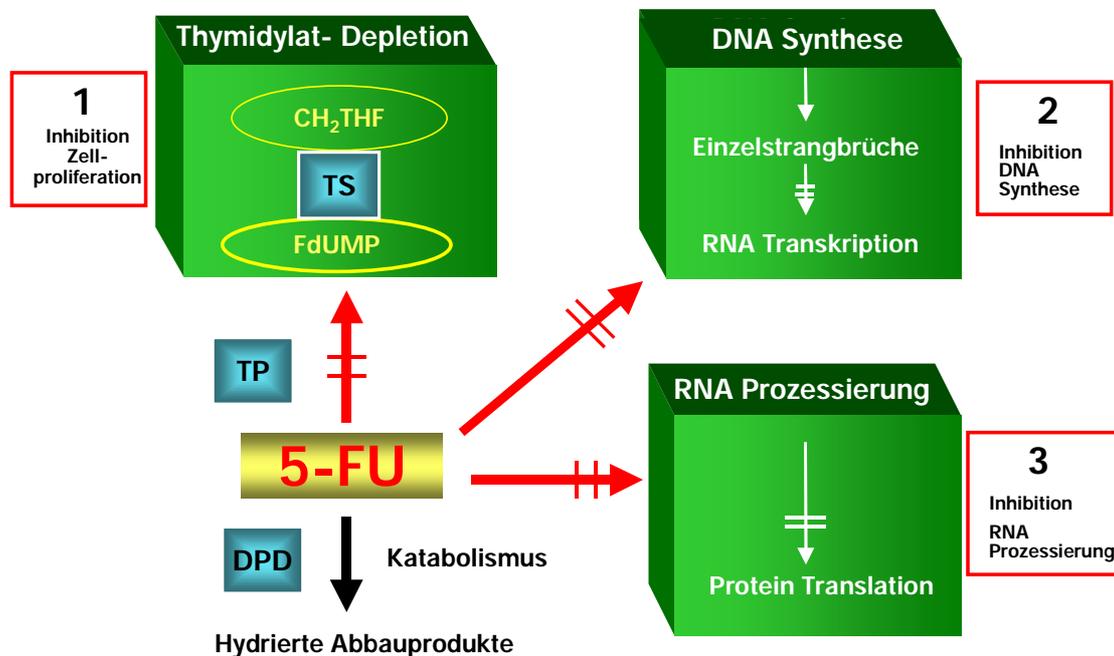
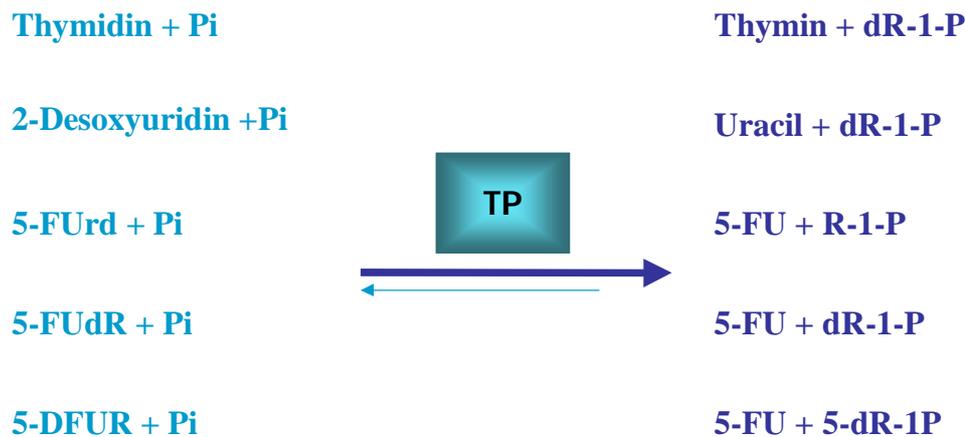


Abb. 1.4a Wirkungsweise von 5-Fluorouracil





**Abb. 1.5** Katalysierte Reaktionen von Thymidinphosphorylase (TP); adaptiert nach Ackland und Peters (1999). Siehe Abkürzungsverzeichnis.

TP-Expression wird induziert durch Hypoxie, niedrige pH-Werte, Zytokine (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$  und Interferone), Röntgenstrahlen oder Chemotherapeutika wie Paclitaxel, Docetaxel, Mitomycin C und Cyclophosphamid (Endo et al., 1999; Sawada et al., 1999). TP wird in Normal- und in Tumorgewebe exprimiert. In bestimmten Tumortypen ist die TP um ein Vielfaches höher verglichen mit umgebendem Normalgewebe (Miwa et al., 1998; O'Brien et al., 1995; Peters et al., 1999; Takebayashi et al., 1995, 1996). Ausserdem war in der IHC der Prozentsatz positiver TP-Zellen bei fortgeschrittenen Karzinomen deutlich höher als in frühen Karzinomen. Patterson et al. (1995) fanden höhere TP-Werte in MK verglichen mit normalem Brustgewebe.

Struktur und Funktion von TP sind identisch mit der des tumorassoziierten Angiogenesefaktor sowie des Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF) (Maghaddam et al., 1995; Miyadera et al., 1995; Moghaddam und Bicknell, 1992).

Damit ist TP ein wichtiger angiogenetischer Faktor, der wahrscheinlich über chemotaktische und mitogene Stimulierung von Endothelzellen wirkt (Toi et al., 1996) und die Invasion und Metastasierung von Malignomen fördert (Carmeliet und Jain, 2000; Ribatti et al., 1999).

Toi et al. (1995a) zeigten in der IHC, dass TP mit der Gefässdichte (microvessel density) in MK assoziiert ist.

Nach Kojima et al. (2002) sind in 132 untersuchten Adenokarzinomen der Lunge/Stadium I die TP-Expression in Stromazellen (und nicht die in Tumorzellen) ebenso wie die VEGF-Expression in Tumorzellen schlechte prognostische Faktoren. In Tumoren konnte durch Einsatz von TP-Inhibitoren die Angiogenese gehemmt und der Apoptoseindex erhöht werden (Matsushita et al., 1999). TP verhindert die Apoptose von Tumorzellen, was für ein schnelles, invasives Tumorwachstum und damit für eine schlechte Prognose spricht (Kitazono et al., 1998; Matsuura et al., 1999).

TP-Analysen in Zervix-, Lungen-, Nieren-, Pankreas-, Leber- und Magen-Darm-Karzinomen bestätigten eine positive Korrelation von hoher TP-Expression mit einer schlechten Prognose (Imazano et al., 1997; Koukourakis et al., 1997, 1998; Metzger et al., 1998; Miwa et al., 1998; Takao et al., 1998).

Die TP-Expression korrelierte auch positiv mit Expressionen von TS und VEGF sowie mit anderen Prognosefaktoren wie Tumorstadium und -differenzierungsgrad.

Inwiefern hier auch die den Tumor umgebenden und infiltrierenden mononukleären und Stromazellen eine Rolle spielen, die teilweise eine sehr starke TP-Expression zeigen, wurde in zahlreichen Studien untersucht und ergab widersprüchliche Ergebnisse (Koukourakis et al., 1998; Maeda et al., 1996; Miwa et al., 1987; Takahashi et al., 1996; Takebayashi et al., 1996).

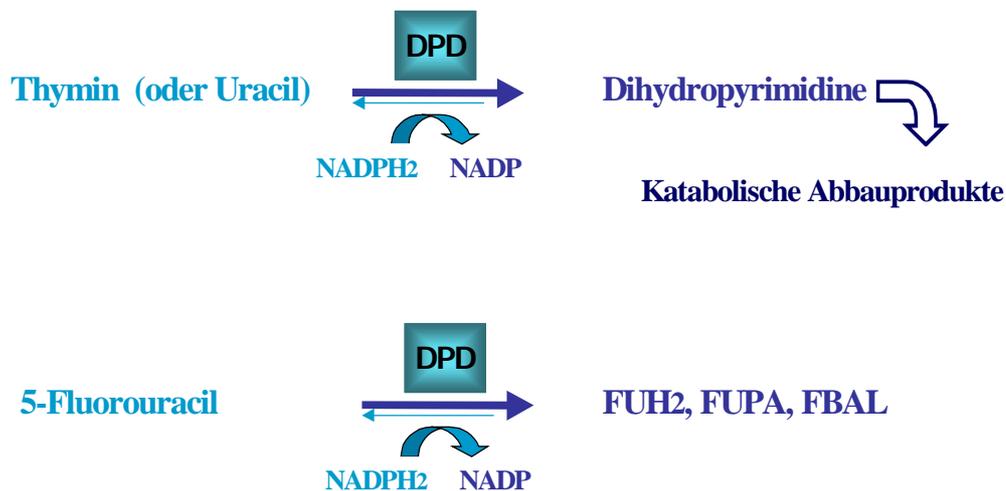
TP scheint allerdings kein prognostischer Marker bei unbehandeltem MK zu sein und korrelierte in einigen Studien nicht mit anderen prognostischen Parametern (Fox et al., 1997; Kanzaki et al., 2002; Toi et al., 1995a). Verschiedene Brustkrebsstudien haben aber ergeben, dass eine hohe TP-Expression möglicherweise ein guter prädiktiver Marker für eine CMF-Therapie darstellt (Fox et al., 1997; Gasparini et al., 1999).

### **1.2.3 Dihydropyrimidindehydrogenase**

Das DPD-Gen liegt auf Chromosom 1p22. Die mRNA besteht aus 3078 Basenpaaren (23 Exons), das Protein aus zwei Untereinheiten mit jeweils 110 kDa.

DPD ist das initiale und geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Reduktion von Thymin und Uracil mit  $\text{NADPH}_2$  als Co-Faktor und Wasserstoffdonor zu Dihydrothymin und Dihydrouracil (Abb. 1.6). DPD ist auch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym beim Abbau von Fluoropyrimidinen wie 5-FU (Naguib et al., 1985). DPD ist in den meisten normalen und malignen Geweben

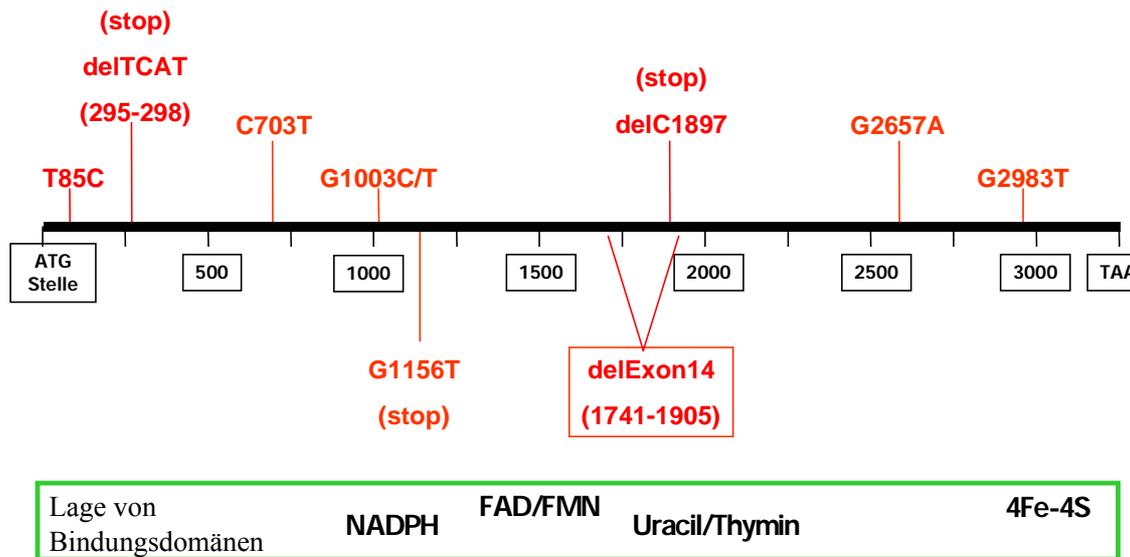
nachweisbar. Die höchste Konzentration von DPD wird in Lebergewebe und peripheren Monozyten gefunden (Ho et al., 1986). 5-FU wird zu 80% in der Leber zu inaktiven Metaboliten abgebaut.



**Abb. 1.6** Von DPD katalysierte Reaktionen

Eine verminderte DPD-Aktivität in der Leber kann zu schweren Nebenwirkungen bis hin zu Todesfällen bei einer Therapie mit 5-FU führen (Diasio et al., 1988; Wei et al., 1996).

Etwa 3-5% der Bevölkerung sollen heterozygot für eine von sehr vielen beschriebenen Mutationen im DPD-Gen sein. Mehr als 20 Polymorphismen im DPD-Gen wurden bisher beschrieben, wobei mehr als 9 davon mit verminderter Enzymaktivität einhergehen (Collie-Duguid et al., 2000; Gonzalez und Fernandez-Salguero, 1995; van Kuilenburg, 1999; Milano und McLeod, 2000). Die aufgeführten Mutationen führen zu einem partiellen oder totalen Verlust der DPD-Aktivität (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7** Häufige Mutationen im DPD-Gen  
Die Lokalisation von Mutationen im Gen und ihr Bezug zu Genregionen mit wichtiger Funktion sind angezeigt.

Goldstandard der DPD-Analyse ist die Aktivitätsbestimmung, welche aufgrund der geringen spezifischen Aktivität des Enzyms sehr aufwendig ist und radiochemische Methoden erfordert. Zunehmend werden Mutationsanalysen des DPD-Gens empfohlen, um Träger einer klinisch relevanten Mutation von einer 5-FU-Therapie auszusparen. Die häufigste Mutation, die mit einer DPD-Defizienz und resultierender 5-FU-Toxizität einhergeht, ist eine G→A Mutation im Intron 14 der Splice-Donor-Region, die zu einer Deletion des benachbarten Exons (delExon14) (Raida et al., 2001; Wei et al., 1996). Die prätherapeutische Analyse der DNA peripherer mononukleärer weisser Blutzellen (PBMNC) mittels PCR oder Sequenzierung zur Suche nach definierten Mutationen in der DPD hält bereits Einzug in die klinische Diagnostik. Ob die DNA-Analytik durch mRNA- oder Proteinbestimmung der DPD in PBMNC ersetzt werden kann, bedarf weiterer grosser Studien (Chazal et al., 1996; Fleming et al., 1992). Diese würden alle Mutationen erfassen lassen, sofern diese immer mit Abfall der Transkription oder Translation einhergehen, was aber nicht immer der Fall zu sein scheint. Auch ist unklar, ob die Genexpression der DPD in PBMNC konkordant ist mit der Expression der DPD in der Leber (andere Splice-Varianten, Leberzirrhose und Ernährung beeinflussen spezifisch die DPD-Aktivität in der Leber, nicht in PBMNC). Die DPD-Expression scheint einem zirkadianen Rhythmus zu unterliegen mit Einfluss auf die

Pharmakodynamik und -kinetik von 5-FU (McLeod et al., 1998; Milano und McLeod, 2000). Unklar ist noch, welchen Einfluss variable systemische Spiegel der DPD auf die Effizienz der 5-FU-Therapie haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich die DPD mRNA- oder Protein-Konzentrationen im Tumorgewebe gemessen.

Milano et al. (1995) zeigten, dass mit 5-Ethynyluracil, einem Inhibitor von DPD (Porter et al., 1992; Specter et al., 1993), die 5-FU-Zytotoxizität in fünf humanen Krebszelllinien mit ursprünglich hoher basaler DPD-Expression gesteigert werden konnte.

Die Expression von DPD in verschiedenen Tumoren einschliesslich MK korrelierte in mehreren Studien signifikant invers mit dem Ansprechen gegenüber 5-FU (Beck et al., 1994; Etienne et al., 1995; Ishikawa et al., 1999; Nita et al., 1998; Salonga et al., 2000; Takabayashi et al., 2000).

Bei einer Therapie mit Vorstufen von 5-FU wie Furtulon oder Capecitabin scheinen die TP/DPD Ratios einen höheren prädiktiven Wert zu haben als die alleinigen DPD-Werte (Ishikawa et al., 1998).

Die DPD-Konzentrationen wurden von Mori et al. (2000) in verschiedenen Tumoren mittels ELISA quantifiziert, dessen Ergebnisse exzellent mit DPD-Aktivitätsbestimmung korrelieren. Die Variationsbreite (Range) der DPD-Expression in MK verschiedener Patientinnen ist sehr hoch. Sie variiert zwischen 32 und 402 Units/mg und damit 13-fach. In MK wurde eine höhere Aktivität von DPD als im Normalgewebe gefunden (Anan et al., 2003; Hamaji et al., 2000). Unklar bleibt, ob die DPD-Aktivität im Tumor die lokale Konzentration von 5-FU beeinflusst.

Hakamada et al. (2000) fanden eine höhere Tumor/Normalgewebe Ratio für DPD in MK von Patientinnen mit Rezidiven im Vergleich zu Patientinnen ohne Rezidiv.

Bei Tumoren der Kopf-Hals Region war DPD stadienunabhängig in gleicher Höhe exprimiert (Etienne et al., 1995).

Immunhistochemische Analysen haben gezeigt, dass DPD relativ homogen in einem Tumorgewebe exprimiert ist. In Kolonkarzinomen ist die Färbeintensität der Tumorzellen nicht stärker verglichen mit korrespondierendem Normalgewebe (Takenoue et al., 2000). Tumor-infiltrierende mononukleäre Zellen, Fibroblasten und Plasmazellen färben sich auch mit DPD-Antikörpern an.

#### 1.2.4 Thymidylatsynthase

Das TS-Gen liegt auf Chromosom 18p11. Die mRNA besteht aus 942 Basenpaaren und das Protein hat ein Molekulargewicht von 63 kDa.

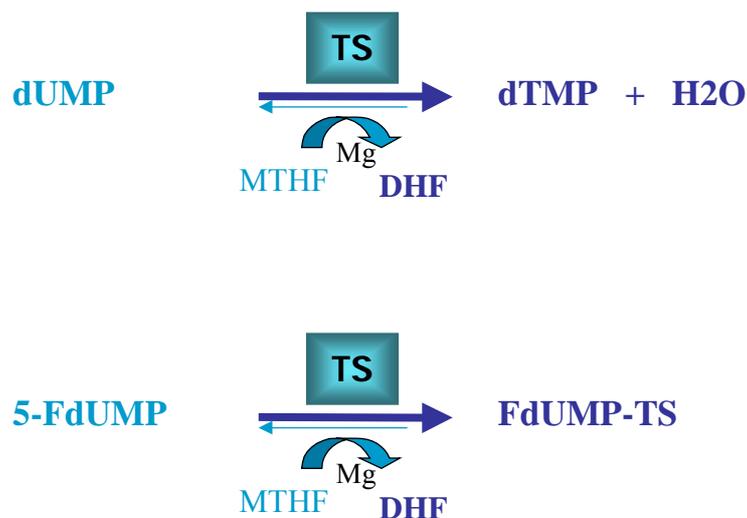
Das Enzym TS spielt eine zentrale Rolle im Pyrimidinstoffwechsel, in der Biosynthese und Replikation von DNA und ist das Zielmolekül von Fluoropyrimidinen wie z.B. 5-FU (Danenberg, 1977; Grem, 1988; Harrap et al., 1989; Pinedo und Peters, 1988).

Es katalysiert die Methylierung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) und seine Umwandlung zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP). Somit stellt TS die einzige intrazelluläre de novo Quelle für Thymidylat dar.

Die Expression von TS hängt vom Zellzyklus und vom Status der Zellproliferation ab: TS ist am höchsten während der S-Phase und ist in schnell proliferierenden Zellen etwa 20-fach höher exprimiert als in nicht proliferierenden Zellen (Johnston et al., 1991; Parsels, 2000). Die TS-Expression wird auf transkriptionaler und auf translationaler Ebene reguliert (Dolnick und Black, 1996; Dolnick, 1993) mit negativer Feedback-Regulation der TS mRNA auf die TS-Proteintranslation (Chu et al., 1991, 1993a, 1996). TS-Protein reguliert auch über Komplexbildung mit der mRNA von c-myc und p53 deren Translation (Chu et al., 1995, 1999).

Immunhistochemische Färbungen belegen, dass nur Tumorzellen und infiltrierende Lymphozyten TS exprimieren, wobei die Färbeintensität an der invasiven Tumorfront stärker ist als im Tumorzentrum. TS wird vor allem zytoplasmatisch angefärbt, selten nukleär. Stromazellen sind TS-negativ (Haqqani et al., 1999; van Triest et al., 2000).

5-FU hemmt das Enzym TS über seinen Metaboliten Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP). Gemeinsam mit Metylentetrahydrofolat (MTHF) bindet es TS in einem kovalenten ternären Komplex und blockiert so die Nukleotid-Bindungsstellen des Enzyms (Peters et al., 1995) (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8** Von TS katalysierte Reaktionen

Die Hemmung von TS führt zur Bildung unbalancierter Desoxynukleotidtriphosphat-Vorräte. Diese Vorläufer der DNA-Synthese verursachen vermehrt DNA-Strangbrüche (Okabe et al., 2000). Weitere 5-FU-Metabolite, wie Fluoro-Uridintriphosphat (FUTP) und Fluoro-Desoxyuridintriphosphat (FdUTP), werden als falsche Nukleotide in die RNA bzw. DNA eingebaut (Ishikawa et al., 1999). TS wird auch eine Rolle bei der induzierten sekundären Therapieresistenz zugeschrieben. 5-FU induziert die TS-Expression in Tumorzellen (Berger et al., 1985; Johnston et al., 1992; Washtein et al., 1984). Die molekulare Basis scheint die damit verminderte Autoregulierbarkeit der TS zu sein (Chu et al., 1993b). Die Genamplifikation der TS ist ein Mechanismus zur Entwicklung einer 5-FU-Resistenz unter Therapie.

Die TS-Hemmung durch 5-FU basiert auf molekularer Basis stöchiometrisch. Mit einer kritischen Konzentration an nicht komplexierter aktiver TS wird die Proliferation der Tumorzellen wieder ermöglicht (Berger et al. 1985; Danenberg et al., 1989; Spears et al., 1988). TS wurde als prädiktiver Faktor für das Ansprechen gastrointestinaler Tumoren, insbesondere des kolorektalen Karzinoms, auf eine 5-FU haltige Therapie beschrieben (Aschele et al., 1999; Bathe et al., 1999; Davies et al., 1999; Leichman et al., 1997; Lenz et al., 1996, 1998a, 1998b; Salonga et al., 2000; Shirota et al., 2001). Längere Überlebenszeiten wurden bei Patienten mit niedrigen TS-Spiegeln im Tumor festgestellt. Eine Überexpression von TS korrelierte hingegen positiv mit

Therapieversagen, mit der Häufigkeit von p53-Mutationen und einer schlechten Prognose, da ein hoher TS-Spiegel auch mit einer Kreuzresistenz zu Adriamycin, Cisplatin, Vincristin und Doxorubicin assoziiert ist.

Mehrere Arbeitsgruppen fanden, dass eine hohe TS-Expression bei MK eine schlechte Prognose anzeigt, dass aber mittlere und hohe TS-Spiegel im Tumor mit einem guten Ansprechen auf eine fluoropyrimidinhaltige Chemotherapie korrelieren und somit TS ein prädiktiver Marker für einen guten klinischen Verlauf nach 5-FU-Behandlung ist (Foekens et al., 2001; Johnston et al., 1994, 1995; Nishimura et al., 1999; Pestalozzi et al., 1997; Romain et al., 1997, 2000).

Edler et al. (2002) zeigten an ausschliesslich chirurgisch behandelten Patienten mit kolorektalem Karzinom, dass die TS-Expression auch einen prognostischen Wert für das Überleben von Patienten unabhängig vom Dukes' Stadium hat, was von anderen Autoren bestätigt wurde (Edler et al., 2000a,b, 2002; Takenoue et al., 2000; Yamachika et al., 1998). Bei Plattenepithelkarzinomen im Hals-Kopf-Bereich wurden in zwei voneinander unabhängigen Studien widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der TS-Expression und des Ansprechens auf 5-FU mit jeweils grenzwertiger statistischer Signifikanz gefunden (Johnston et al., 1997; Posner et al., 1998).

Araki et al. (2001) fanden, dass TS und DPD allein keine prädiktive Bedeutung bei 5-FU behandelten kolorektalen Karzinomen hatten, dass die Effektivität aber sehr viel grösser war, wenn beide Enzyme niedrig exprimiert waren. Collie-Duguid et al. (2001) fanden erhöhte TP/DPD Ratios in Tumoren und Metastasen verglichen mit Normalgewebe und vermuteten eine koordinierte Regulation zwischen den beiden Enzymen. Salonga et al. (2000) zeigten, dass niedrige Genexpressionen (mRNA) aller drei Enzyme, TS, TP und DPD, in Tumorlysaten von Patienten mit kolorektalem Karzinom mit einem sehr guten Ansprechen auf eine 5-FU-Therapie und verbessertem Überleben hoch signifikant positiv korrelieren. Mori et al. (2000) empfiehlt die Messung aller drei Enzyme TP, DPD und TS vor einer Therapie-Entscheidung mit einer Vorstufe von 5-FU (5-FU „prodrug“, das erst zu 5-FU metabolisiert werden muss).

### 1.3 Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine Analyse der diagnostischen Bedeutung von prognostischen und prädiktiven Biomarkern bei Patientinnen mit MK, die mit CMF (Cyclophosphamid / Methotrexat/ 5-FU) behandelt wurden und deren Verlauf über 6 Jahre zurückverfolgt werden konnte.

Die Ergebnisse sollen dazu dienen, Patientinnen vor Therapiebeginn zu identifizieren, die von der Standardtherapie CMF nicht oder nicht ausreichend profitieren, um für diese Patientinnen alternative Therapieoptionen mit besserer Wirkung auszuwählen.

Für das Medikament 5-FU sind mit den Enzymen Thymidinphosphorylase (TP), Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) und Thymidylatsynthase (TS) prädiktive Biomarker zur Vorhersage einer Therapieresistenz im Tumorgewebe beschrieben worden.

Die Enzyme wurden in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Schnitten des Tumorgewebes (Primärtumor) von Patientinnen mit MK der Stadien I bis III vor adjuvanter 5-FU haltiger Therapie analysiert.

Zwei analytische Methoden wurden durchgeführt: Immunhistologie an Gewebeschnitten, wobei nur die Färbung der Tumorzellen bewertet wurde und quantitative „real time“ RT-PCR von mRNA, die aus mikrodisszierten Tumorzellen als Gesamt-RNA extrahiert wurde.

Die Ergebnisse der Enzymanalysen mit beiden Methoden wurden verglichen, mit dem Verlauf der Patienten korreliert, statistisch ausgewertet und diskutiert.

Zusätzlich wurden verschiedene in der Literatur beschriebene und teilweise bereits routinemässig angewendete prognostische Biomarker (ER, PR, p53, MiB1, bcl2) immunhistologisch im vorliegenden Tumormaterial analysiert und ebenfalls mit dem Patientenverlauf sowie mit den ermittelten Enzymwerten korreliert und statistisch ausgewertet.

Im Kontext der Arbeit werden verschiedene Therapieoptionen bei MK, wichtige prognostische Faktoren und prädiktive Biomarker und ihre bisherige Anwendung für Patientenselektion und Therapieauswahl bei MK diskutiert. Die vorliegende Arbeit soll ein Beitrag dazu liefern, Therapien bei MK Patientinnen individueller zu gestalten und damit Überlebenszeiten und Heilungschancen schrittweise zu verbessern.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Für die Analyse selektierter Biomarker wurde eine erst kürzlich erarbeitete neue PCR-Technologie angewendet, die eine Quantifizierung von mRNA aus FFPE-Gewebe ermöglicht. Zusätzlich wurden diese und andere Biomarker in den Geweben immunhistochemisch untersucht. Die Analysen der prädiktiven Biomarker geschah verblindet in Bezug auf die klinischen Daten.

### 2.1 Charakterisierung des Patientengutes

Die Untersuchung bezieht sich auf 91 Patientinnen, die im Elisabeth-Krankenhaus, Kassel im Zeitraum von 1992-1999 behandelt worden sind. Alle Patientinnen (Altersmedian: 47 Jahre) hatten Brustkrebs im frühen Stadium und waren zum Zeitpunkt der Operation frei von Fernmetastasen (M0). Alle Patientinnen erhielten postoperativ eine adjuvante CMF-Chemotherapie. Die Daten hinsichtlich Wahl des Operationsverfahrens, der postoperativen Therapie sowie des Behandlungsverlaufes wurden aus den im Elisabeth-Krankenhaus archivierten Krankenakten entnommen.

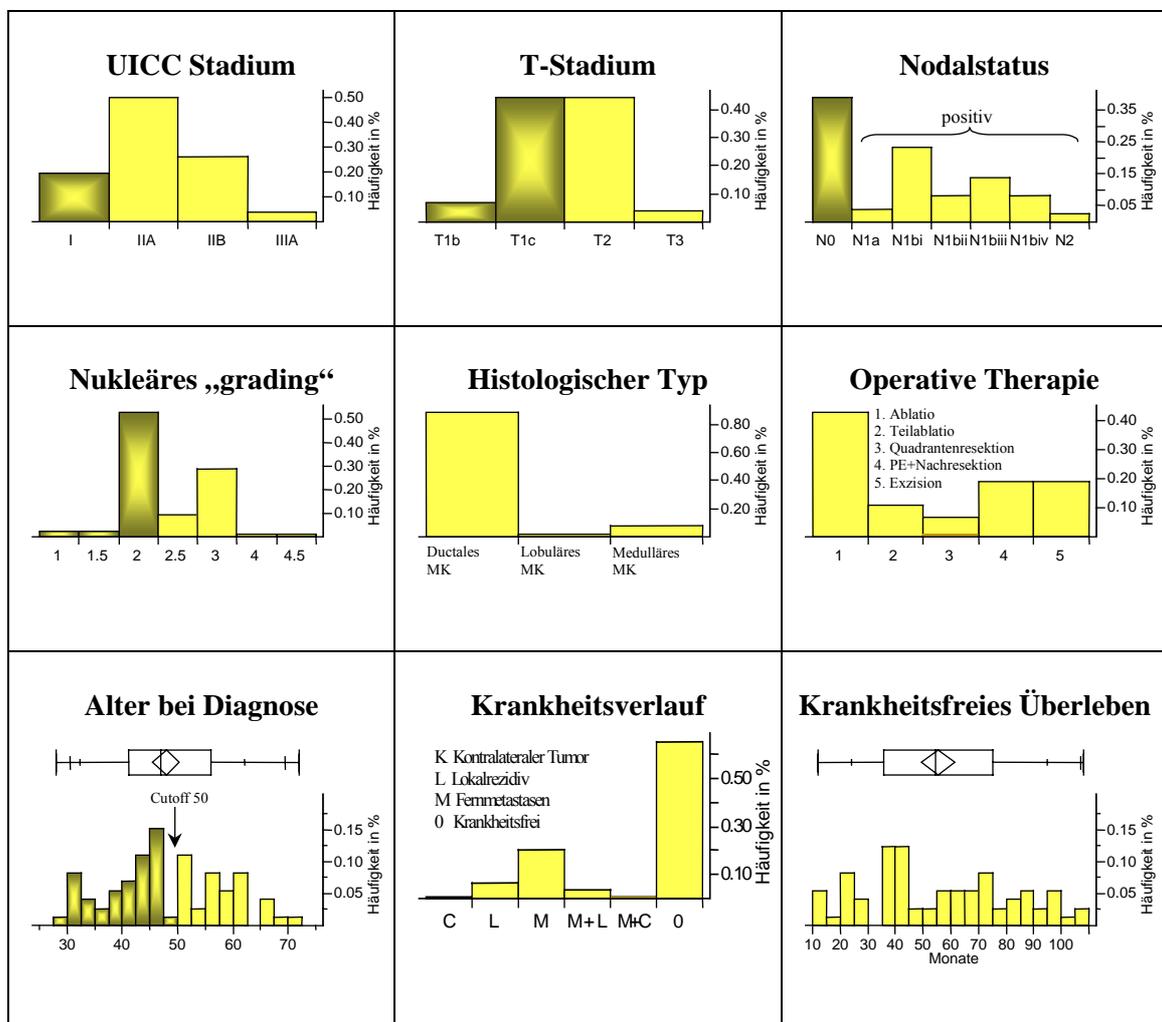
Der Primärtumor wurde operativ jeweils durch Lumpektomie, bzw. Exzision (n= 14), Probeexzision mit nachfolgender Nachresektion (n= 14), Quadrantenresektion (n= 5), Teilablatio (n= 8) und Ablatio (n= 31) behandelt. 41 Patientinnen (ohne Ablatio) erhielten zusätzlich eine postoperative Strahlenbehandlung. Die adjuvante CMF-Therapie wurde wie folgt verabreicht: Cyclophosphamid  $600 \text{ mg/m}^2$  Körperoberfläche i.v., Methotrexat  $40 \text{ mg/m}^2$  i.v., 5-Fluorouracil (5-FU)  $600 \text{ mg/m}^2$  i.v. mit einer Zyklusfrequenz von 3 Wochen. 12 Patientinnen erhielten 6 Zyklen, 59 Patientinnen 3 Zyklen und 1 Patientin 2 Zyklen CMF. Bis 1993 wurden in der Regel 6 Zyklen CMF verabreicht. Nachdem grosse Meta-Analysen jedoch keinen signifikanten Vorteil gegenüber drei Zyklen CMF aufweisen konnten, wurden ab 1993 in der Regel nur noch 3 Zyklen CMF verabreicht (EBCTCG 1992, 1998a). Eine Patientin aus dem Gesamtkollektiv lehnte wegen Nebenwirkungen den dritten Zyklus CMF ab und erhielt somit nur zwei Zyklen. Zusätzlich erhielten 13 Patientinnen Tamoxifen (30 mg/d über durchschnittlich 5 Jahre) und 3 Patientinnen Goserelin (3,6 mg subkutan alle 28 Tage für 2 Jahre).

Alle Patientinnen wurden bis zum 01.01.2002 nachverfolgt (mittlere Beobachtungszeit = 71,1 Monate; Spannweite der Beobachtungszeit: 36-112 Monate).

Die FFPE-Gewebeproben der MK wurden von allen Patientinnen nach diagnostischer Routineuntersuchung im Institut für Pathologie des Klinikums Kassel archiviert. Das Einverständnis der Patientinnen für wissenschaftliche Untersuchungen an ihrem Tumormaterial lag in allen Fällen vor.

Da verlässliche mRNA-Werte nur für 72 Patientinnen erzielt werden konnten, sollen auch nur diese hier charakterisiert und in die Auswertung einbezogen werden.

In Abb. 2.1 sind wesentliche Parameter in Säulendiagrammen dargestellt.



**Abb. 2.1** Häufigkeiten und Verteilungen klinisch-pathologischer Parameter (n=72 Patientinnen).

In den Säulen-Diagrammen sind zwei Subklassen durch gelbe und dunkelgelbe Farbe gekennzeichnet, wenn im folgenden damit univariate Überlebenskurven korreliert wurden. Im Kastendiagramm zeigt die Spitze des Rhombus den Mittelwert an, der vertikale Strich im Rhombus den Median.

Eine tabellarische Übersicht über die Charakteristika der Patientinnen zeigt Tab. 2.1. Es handelte sich überwiegend um invasiv duktales MK (89%), die zum Zeitpunkt der Diagnose zu 61% noch nicht in die regionalen Lymphknoten metastasiert hatten.

<b>Charakteristika der Patientinnen</b>	<b>Zahl</b> (Gesamt: n=72)	<b>Prozent</b> (Gesamt: 100)
<b>Alter</b>		
Maximum	72	
Minimum	28	
Median	47	
Mittelwert	48	
<b>Histologischer Typ</b>		
Duktales invasives Karzinom	64	89
Lobuläres invasives Karzinom	2	3
Medulläres Karzinom	6	8
<b>Nukleärer Differenzierungsgrad („grading“)</b>		
Grad 1	2	3
Grad 2	40	55
Grad 3	30	42
<b>Regionale Lymphknotenmetastasen</b>		
Positiv	28	39
Negativ	44	61
<b>T-Stadium</b>		
T1	37	55
T2	32	40
T3	3	5
<b>UICC</b>		
Stadium I	14	19,5
Stadium IIA	36	50
Stadium IIB	19	26,5
Stadium IIIA	3	4
<b>Fälle mit Krankheitsrückfall</b>	25	35
<b>Lokalrezidiv/Fernmetastasen/kontralateraler Brustkrebs</b>	8 / 19 / 2	
<b>Davon Lokalrezidiv und Fernmetastasen</b>	3	3
<b>Davon kontralateraler Brustkrebs und Fernmetastasen</b>	1	1
<b>Mittlere krankheitsfreie Überlebenszeit (DFS) in Monaten</b>	55,5	
<b>Tumorbedingte Todesfälle</b>	5	5
<b>Mittlere Beobachtungszeit (follow-up) in Monaten</b>	71,1	
<b>Spannweite der Beobachtungszeit in Monaten</b>	36-112	

**Tab. 2.1** Charakteristika der Patientinnen in der Übersicht.

## 2.2 Geräte und Chemikalien für Immunhistochemie

Geräte und Verbrauchsmaterial	Herkunft
Objektträger	Sigma (Steinheim)
Silanisierte Objektträger	Sigma (Steinheim)
Objektträger-Halterungen („coverplates“)	ThermoShandon (Frankfurt/Main)
Dampfkochtopf	Handelsübliches Produkt
Trockenschrank	Heraeus (Osterode)
Immunostainer (Färbeautomat)	TECAN-Deutschland (Crailsheim)
<i>Chemikalien:</i>	
Destilliertes Wasser	Braun (Melsungen)
Aceton, reinst	Merck (Darmstadt)
NaOH	Merck (Darmstadt)
„Anti-Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Antibody, Formalin-Grade“ (enthält: anti-DPD-Antikörperlösung, 100x und Antikörper-Verdünnungspuffer 10x)	Roche Diagnostics (Mannheim), Beipackzettel Version 1, April 2001 Cat.No. 3 183 645
„Anti-Thymidine Phosphorylase (TP) Antibody, Formalin-Grade“ (enthält: anti-TP Antikörperlösung, 100x und Antikörper-Verdünnungspuffer, 10x)	Roche Diagnostics (Mannheim), Beipackzettel Version 1, April 2001 Cat.No. 3 183 653
„Anti-Thymidylate Synthase (TS) Antiserum, Formalin-Grade“ (enthält: anti-TS-Antiserumlösung, 100x und Antikörper-Verdünnungspuffer, 10x)	Roche Diagnostics (Mannheim), Beipackzettel Version 1, April 2001 Cat.No. 3 186 008
Xylol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	Recycling-Anlage des Klinikum Kassel
Zitronensäuremonohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·xH <sub>2</sub> O)	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure, Disodiumsalz: Dihydrat, 99% (EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Sigma (Steinheim)
Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)

Dinatriumhydrogenphosphat x 2 Wasser (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl), p.a.	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH), p.a.	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30%	Merck (Darmstadt)
Methanol, reinst	Merck (Darmstadt)
„Normal Goat Serum“	DAKO (Glostrup, Dänemark)
„Link Antibody Solution“ (enthält Kaninchen-anti-Ratte- Immunglobulin als Brücken-Antikörper für DPD-Färbung)	DAKO (Glostrup, Dänemark)
„HRP, anti-mouse“ (Meerrettichperoxidase-anti-Maus-Konjugat im DAKO EnVision™ 2-Schritt- Detektionssystem)	DAKO (Glostrup, Dänemark)
„HRP, anti-rabbit“ (Meerrettichperoxidase-anti-Kaninchen- Konjugat im DAKO EnVision™ 2-Schritt- Detektionssystem)	DAKO (Glostrup, Dänemark)
„DAKO Liquid DAB + Large Volume Substrate Chromogen Solution“ (enthält Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) und Wasserstoffperoxid)	DAKO (Glostrup, Dänemark)
„Substrate-Chromogen-Solution“	DAKO (Glostrup, Dänemark)
Hämatoxylin nach Harris	Merck (Darmstadt)
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), absolut	Merck (Darmstadt)
Aquatex	Merck (Darmstadt)
„Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor“, Clone 1D5, Code No. M7047 (Arbeitsverdünnung: 1:50)	DAKO (Glostrup, Dänemark)
„Monoclonal Mouse Anti-Human Progesteron Receptor“, Clone PgR 636, Code No. M3569 (Arbeitsverdünnung: 1:20)	DAKO (Glostrup, Dänemark)

<p>“Epitope Retrieval Solution”                  DAKO HercepTest™, Code No. K5204                  (enthält u.a. Kaninchen-anti-Human-HER2-Antikörper)                  „bcl-2 Oncoprotein“                  (enthält IgG1 monoklonalen Maus-Antikörper, Arbeitsverdünnung: 1:30)                  „p53 Protein (DO-7)”                  (enthält IgG2b monoklonalen Maus-Antikörper, Arbeitsverdünnung: 1:30)                  „Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen”, Clone MIB-1, Code. M7240                  (Arbeitsverdünnung: 1:50)                  „Vim 3B4“, Cat. No.: 61013                  (enthält IgG2a monoklonalen Maus-Antikörper, Arbeitsverdünnung: 1:500)                  „Mouse Monoclonal Antibody to Human CD34”, Code CBL 496                  (enthält IgG1 monoklonalen Maus-Antikörper, Arbeitsverdünnung: 1:200)                  „ChemMate™ Antibody Diluent“, Code S2022                  Trypsin (für „antigen retrieval“)                  Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)</p>	<p>DAKO (Glostrup, Dänemark)                  DAKO (Glostrup, Dänemark)                    Novocastra Laboratories Ltd (Newcastle upon Tyne, England)                    Novocastra Laboratories Ltd (Newcastle upon Tyne, England)                    DAKO (Glostrup, Dänemark)                    Progen Biotechnik (Heidelberg)                    Cymbuy Biotechnology Ltd (Hants, England)                    DAKO (Glostrup, Dänemark)                    Sigma-Aldrich (Steinheim)                  Sigma-Aldrich (Steinheim)</p>
--	--

**Tab. 2.2** Geräte und Verbrauchsmaterial für die Immunhistochemie.

**Puffer und Arbeitslösungen für Immunhistochemie**

10 mM Zitratpuffer pH 6,0 („antigen retrieval“ für TS, DPD, p53, bcl2, MIB1):

21,01 g Zitronensäure x 2H<sub>2</sub>O in 1 l dest. Wasser lösen (Lösung A)

29,41 g Natriumzitrat x 2H<sub>2</sub>O in 1 l dest. Wasser lösen (Lösung B)

9 ml Lösung A + 41 ml Lösung B, mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen  
(Arbeitslösung)

EDTA-Puffer, 1 mM, pH 8,0:

0,37 g EDTA in 800 ml dest. Wasser lösen, mit 1 N NaOH pH 8,0 einstellen, auf 1 l  
auffüllen

PBS-Puffer (Phosphat Buffered Saline ) pH 7,4 (als Waschpuffer):

12,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 43,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O + 42,5 g NaCl, in 5 l dest. Wasser lösen, mit  
1 N NaOH auf pH 7,4 einstellen + 2,5 ml Tween 20

Peroxidase-Blocking-Reagenz (für „antigen retrieval“):

0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absol. Methanol (kurz vor Gebrauch ansetzen)

20 %-iges Normal-Ziegen Serum (für Färbung und Detektion):

200 µl Normal-Ziegen Serum + 100 µl 10x Antikörper-Verdünnungspuffer + 700 µl dest.  
Wasser (kurz vor Gebrauch ansetzen, ausreichend für 10 Objektträger)

1x Antikörper-Verdünnungspuffer (für Herstellung der Antiserumlösung):

100 µl 10x Antikörper-Verdünnungspuffer + 900 µl dest. Wasser (kurz vor Gebrauch  
ansetzen, ausreichend für 10 Objektträger)

1x Anti-TP/DPD/TS-Antikörper(bzw.-serum)lösung (für Färbung und Detektion):

10 µl 100 x Anti-TP/DPD/TS-Antikörper(bzw.-serum)lösung + 990 µl 1x Antikörper-  
Verdünnungspuffer

(Abzentrifugieren der 100x Anti-TP/DPD/TS-Antikörper(bzw.-serum)lösung vor dem  
Pipettieren, kurz vor Gebrauch ansetzen, ausreichend für 10 Objektträger)

1x Brückenantikörper-Lösung (für DPD Färbung und Detektion):

<p>10 µl Kaninchen-anti-Ratten-Immunglobuline + 990 µl 1x Antikörper-Verdünnungspuffer</p> <p>Substrat-Chromogen-Lösung (DAKO, Inc.; K3467; für Färbung und Detektion): 1 ml gepuffertes Substrat (flüssiges DAB+, Flasche A) + 20 µl (1 Tropfen) flüssiges DAB+Chromogen (flüssiges DAB+, Flasche B) (Arbeitslösung, ausreichend für 10 Objektträger)</p>
--

**Tab. 2.3** Puffer und Arbeitslösungen für die Immunhistochemie.

### 2.3 Geräte und Chemikalien für die molekularbiologische Analytik

Geräte und Verbrauchsmaterial	Herkunft
Objektträger	Sigma (Steinheim)
Folien für LMD	Leica Microsystems (Wetzlar)
Leica AS LMD – Laser Mikrodisektions System	Leica Microsystems (Wetzlar)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Trockenschrank	Heraeus (Osterode)
Vortexer	IKA Labortechnik (Staufen)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Gilson/Abimed (Langenfeld)
Pipettenspitzen	Sorenson Bio Science (West Salt Lake City, USA)
Thermoschüttler für Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Thermoblock-Cycler	Eppendorf (Hamburg)
LightCycler Kapillaren	Roche Diagnostics (Mannheim)
LightCycler	Roche Diagnostics (Mannheim)
LightCycler Software Version 3.5	
RelQuant Software Version 1.00	
<i>Chemikalien :</i>	
Xylol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	Recycling-Anlage des Klinikum Kassel

Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), absolut, p.a.	Merck (Darmstadt)
Wasser (reinst)	MilliPore-Anlage
PBS (“Phosphat Buffered Saline”) 10x, pH 7,4	Life Technology (Paisley, Scotland)
HighPure RNA Isolation Kit (Lyse-Binde-Puffer, Waschpuffer I und II, DNase-Lyophilisat, Verdünnungspuffer, Filter mit Auffanggefässen, Elutionspuffer)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Laurylsulfat (=Sodiumdodecylsulfat, SDS)	Sigma (Steinheim)
HighPure RNA Paraffin Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
LightCycler TPmRNA Quantifikations Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
LightCycler DPDmRNA Quantifikations Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
LightCycler TS mRNA Quantifikations Kit enthalten jeweils für die Reverse Transkription:	Roche Diagnostics (Mannheim)
Desoxynucleotidtriphosphate 2 mM (dATP, dCTP, dGTP), 6 mM (dUTP)	
Spezifische Primer für TP, DPD, TS, G6PDH	
Steriles Wasser	
AMV-reverse Transkriptase 20 U/μl sowie Puffer	
Kalibrator-RNA (Total-RNA aus Zelllinien, die TP, DPD, TS exprimieren)	
LightCycler TP Quantifikation	Roche Diagnostics (Mannheim)
cDNA Synthese Module für FFPE-Gewebe	
LightCycler DPD Quantifikation	Roche Diagnostics (Mannheim)
cDNA Synthese Module für FFPE-Gewebe	
LightCycler TS Quantifikation	Roche Diagnostics (Mannheim)
cDNA Synthese Module für Formalin- fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe	
enthalten jeweils spezifische DNA-Primer TP, DPD, TS	

spezifische DNA-Primer Referenz (G6PDH) 10x cDNA-Synthese Stabilisationspuffer “fast start” Taq DNA-Polymerase dNTP Mix (dUTP anstatt dTTP) Puffer Magnesiumchlorid 25 mM TP-, DPD- oder TS-Detektions-Mix G6PDH-Detektions-Mix	
--	--

**Tab. 2.4** Geräte und Verbrauchsmaterial für die molekularbiologische Analytik.

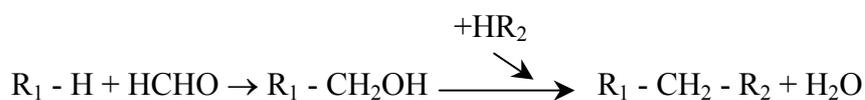
<p><b>Puffer und Arbeitslösungen für molekularbiologische Methoden</b></p> Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 70 %: 70 ml Ethanol + 30 ml dest. Wasser 10 % SDS (w/v): 10 g SDS auf 50 ml dest. Wasser, Endvolumen von 100 ml mit dest. Wasser einstellen
---

**Tab. 2.5** Puffer und Arbeitslösungen für die molekularbiologische Analytik.

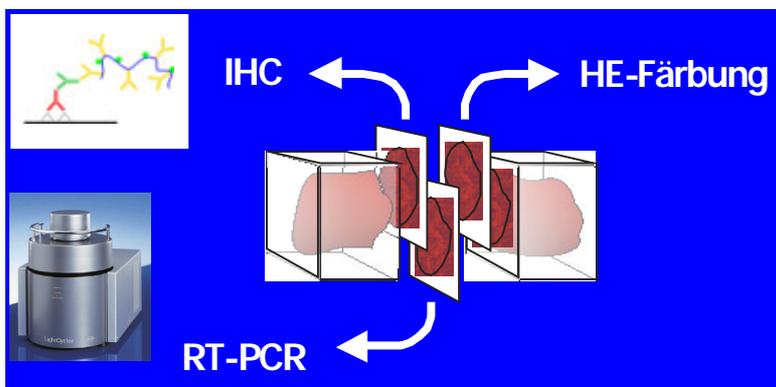
## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Gewebebehandlung

Das native (frische) Brustkrebsgewebe war in ca. 4 mm dicken, ca. 1x1 cm grossen Gewebelöcken zur Konservierung in 4 %iger gepufferter Formalinlösung für 18-24 h fixiert worden. Der Fixierungsvorgang beruht auf einer Vernetzung der Proteine durch die Bildung von Methylenbrücken zwischen den Seitenketten der Eiweisse:



Nukleinsäuren und Proteine werden bei der Formalinfixierung durch Blockierung wichtiger Seitengruppen vor dem Abbau durch Nukleasen bzw. Proteasen geschützt. Das Gewebe wurde für die Untersuchungen durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert, gefolgt von einer Einbettung in geschmolzenes Paraffin (nicht heißer als 60° C), um so Paraffinblöcke herzustellen. Von diesen Blöcken wurden jetzt mit einem Handmikrotom ca. 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen, die zur mikroskopischen Untersuchung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt bzw. ungefärbt zur Laser-Mikrodissektion und RNA-Extraktion verwendet wurden (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2** Direkt aufeinanderfolgende, sehr ähnliche Gewebeschnitte werden verschiedenen Untersuchungen zugeführt.

Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte zunächst für etwa 20 min bei 80° C im Wärmeschrank inkubiert. Durch eine absteigende Xylol/ Ethanolreihe wurde das verflüssigte Paraffin aus dem Gewebe entfernt. Dazu wurden die Schnitte nach 10- und 5-minütiger Inkubation in 100 %igem Xylol für jeweils 1 min in 96 %ige, 80 %ige und zweimal in 70 %ige Ethanollösung überführt. Abschliessend wurden sie kurz in destilliertem Wasser gespült.

#### 2.4.2 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

Zur Herstellung von gefärbten Präparaten wurden Schnitte mit einer Dicke von ca. 4 µm verwendet. Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) wurde wahlweise von Hand oder mit einem Färbeautomat durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten entparaffinierte Gewebeschnitte, die nach dem Spülen mit destilliertem Wasser 5 min in Hämatoxylin inkubiert wurden. Der Farbstoff bindet an das negativ geladene Gerüst von Nukleinsäuren. Die blaue Färbung des als (pH-) Indikator wirksamen Stoffes

entsteht bei einem pH über 3, der durch kurzes Spülen und 5-minütige Inkubation in warmem Leitungswasser eingestellt wird.

Zur Kontrastierung erfolgte eine weitere Färbung mit Eosin. Dieser Farbstoff bindet an interstitielle Strukturen und färbt das Gewebe in rötlichen Tönen. Zur Färbung wurden die Schnitte 1 min in der Färbelösung inkubiert und dann kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Zuletzt wurde die Färbung durch Eintauchen in 70 %iges und 96 %iges Ethanol und Xylol fixiert.

HE-Routineschnitte wurden anschliessend mit Eukitt versiegelt und mit einem Deckglas versehen.

### **2.4.3 Immunhistochemischer Nachweis von TP, DPD, TS**

#### *Durchführung:*

Mit Hilfe eines Handmikrotoms wurden von den Paraffingewebeblöcken der zu untersuchenden Tumore ca. 4 µm dicke Schnitte auf Objektträger gezogen. Die Gewebeschnitte wurden anschliessend entparaffiniert: Ablaufen des Paraffins im Wärmeschrank (30 min bei 60° C), Trocknen (über Nacht bei 37° C), chemisches Entparaffinieren (zweimal je 5 min in Xylol, Aceton und Wasser).

Anschliessend wurden die Präparate einer Antigen-Wiedergewinnungsprozedur („antigen retrieval“) unterzogen. Bei dieser Prozedur werden Aldehydvernetzungen, die bei der Fixation mit quervernetzenden Fixativa wie Formalin entstehen und das Antigen maskieren, beseitigt. Die Gewebeschnitte wurden im Dampfkochtopf in Puffer bedampft: für DPD- und TS-Färbungen 20 bzw. 30 min in Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0), für TP-Färbungen 20 min in EDTA-Puffer (1 mM, pH 8,0). Danach kühlten die Schnitte 20 min bei Raumtemperatur ab und wurden in destilliertem Wasser gespült.

Es folgte ein 20-minütiges Wasserstoffperoxid-Methanolbad (0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase in den Geweben.

Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte zweimal 5 min in 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Nach dem Einsetzen der Objektträger in die Objektträgerhalterungen („coverplates“) wurde wiederholt mit 1x PBS (pH 7,4) gespült. Um die unspezifischen Bindungsstellen in den Präparaten (Kollagen- und Bindegewebeelemente) zu blockieren, wurden die Schnitte mit 20 %igem Normal-Ziegenerum (als Non-Immuneserum) 20 min lang bei Raumtemperatur behandelt. Die

Gewebeschnitte für die TP- und die TS-Färbungen wurden mit den verdünnten Primärantikörper-Lösungen 4 h bei 20° C inkubiert. Es folgten zwei 5-minütige Waschschrte mit 1x PBS (pH 7,4).

DPD-Färbungen erforderten zusätzlich die 30-minütige Einwirkzeit einer Brücken-Antikörper-Lösung (Kaninchen-anti-Ratten-Immunglobuline) auf den Gewebeschnitten, um den Ratten-Primärantikörper zu binden. Nach weiteren zwei 5-minütigen Waschschrten mit 1x PBS (pH 7,4) war dann auch für die DPD-Färbungen die Voraussetzung für die Anwendung des DAKO EnVision 2-Schritt-Detektionssystems gegeben.

Es kamen zwei verschiedene Meerrettichperoxidase (HRP)-Sekundärantikörper-Konjugate zur Anwendung: für TP HRP-anti-Maus IgG und für DPD sowie TS HRP-anti-Kaninchen IgG. Die 30-minütige Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Bei diesem Detektionssystem tragen Dextran-Polymere die Sekundärantikörper und Enzymmoleküle. Ein Antigenmolekül wird so bei der Substratreaktion durch sehr viele Enzymmoleküle detektiert; die Sensitivität ist entsprechend hoch.

Es folgten zwei 5-minütige Waschschrte mit 1x PBS (pH 7,4).

Für die Substratreaktion wurde DAKO Liquid DAB + Large Volume Substrate-Chromogen Solution eingesetzt. Bei diesem System ist Wasserstoffperoxid (in Imidazol-Puffer, pH 7,5, mit einem antimikrobiellen Wirkstoff) das Substrat; Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid dient als Chromogen (Elektronendonator).

Die Inkubation mit der Substrat-Chromogen-Lösung dauerte 10 min.

Anschliessend wurde 5 min mit destilliertem Wasser gespült.

Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde mit Hämatoxylin nach Harris (10 s, anschliessendes Bläuen in warmen Wasser für 5 min) gegengefärbt. So waren die Zellstrukturen auch dann erkennbar, wenn die Immunfärbung negativ ausfiel.

Nach dem Bläuen wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit Aquatex eingedeckt und das Färbeergebnis mikroskopisch kontrolliert.

### *Auswertung:*

Die immunhistochemisch untersuchten Tumorzellen einer Gewebeprobe wurden sowohl über die Anzahl gefärbter Tumorzellen als auch die Färbeintensität charakterisiert.

Der Anteil gefärbter Tumorzellen an der Zahl der Gesamttumorzellen eines Gewebeschnittes wurde in Prozent angegeben. Gleichzeitig wurde an diesem

Gewebeschnitt die Färbeintensität eingeschätzt und mit 0, 1+, 2+ und 3+ angegeben (Tab.2.6).

TP, DPD, TS		TP, DPD, TS	
Prozentanteil der gefärbten Tumorzellen	Bewertung des Färbemusters	Färbeintensität der Tumorzellen	Bewertung der Färbeintensität
0 %	Negativ	Keine	0
1-10 %	Niedrig	Schwach	1+
11-25 %	Mittel	Stark	2+
26-50 %	Hoch	Sehr stark	3+
>50 %	Sehr hoch		

**Tab. 2.6** Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für TP, DPD und TS.

Um sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl gefärbter Tumorzellen einer Probe zu berücksichtigen, wurde ein Gesamtscore durch Multiplikation der beiden Werte ermittelt (Prozentsatz positiv gefärbter Zellen (absolut) x geschätzte Färbeintensität).

Die Variationsbreite dieses für die Auswertung entscheidenden Wertes lag für die Gewebeproben der Patientinnen zwischen 0 und 300.

#### 2.4.4 Immunhistochemische Darstellung der tumorbiologischen Parameter

##### *Durchführung:*

Die Entparaffinierung der aufgezogenen Schnitte erfolgte für die ER-, PR-, MiB1-, p53- und bcl2-Färbungen durch 2x 5 min Xylol, 2x 5 min Aceton und 2x 5 min Wasser. Die Gewebeschnitte für die Vimentin-, CD34- und Her2-Färbung wurden etwas schonender in 20 min Xylol und nachfolgender absteigender Ethanolreihe entparaffiniert (2x abs., 2x 96 %ig, 1x 70 %ig). Um die Anfärbbarkeit des Gewebes zu verbessern, wurden die Schnitte (mit Ausnahme der CD34-Färbung) einem „antigen retrieval“ unterzogen:

ER,PR: 20 min in 10 mM Zitratpuffer (Epitop Retrieval Solution DAKO) bei 98° C im Dampfkochtopf

MiB1: 30 min in 10 mM Zitratpuffer, pH 6,0 bei 98° C im Dampfkochtopf

Her2: 40 min in 10 mM Zitratpuffer („epitope retrieval“ Lösung aus Kit) im Ölbad (98 °C)

Bcl2: 30 min in 10 mM Zitratpuffer, pH 6,0 Mikrowelle 250 W

P53: 30 min in 10 mM Zitratpuffer, pH 6,0 Mikrowelle 250 W

Vim: 20 min Wasserstoffperoxid-Methanol-Bad, Spülen in 2xH<sub>2</sub>O, 20 min Trypsin bei 38 °C

Danach wurden die Schnitte 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt, in destilliertem Wasser gespült und 20 min im Methanol-Wasserstoffperoxid-Bad inkubiert, um die Gewebeperoxidase zu blockieren. Die Schnitte wurden im Färbeautomaten noch einmal mit Waschpuffer gespült, ehe sie für 1 h mit dem spezifischen Primärantikörper inkubiert wurden. Die Visualisierung des Färbeergebnisses erfolgte mittels einer Polymer-Prozedur (DAKO EnVision™ System) mit markierten Meerrettichperoxidase-anti-Kaninchen-Konjugat für 30 min. Nach Spülen mit Waschpuffer wurden die Schnitte zur Visualisierung des Färbeergebnisses für 10 min mit DAB inkubiert.

Nach Spülen in Waschpuffer erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Bei jedem Färbevorgang liefen für die spezifischen Färbungen jeweils Positiv- und Negativ-Kontrollen mit.

*Auswertung:*

**Vim:** Vimentin ist ein Intermediärfilament-Protein mesenchymaler Zellen und wurde als präanalytische Kontrolle für zuverlässige Gewebeaufarbeitung eingesetzt. Die Färbeintensität wurde mit negativ (=0), schwach (=1+), mittel (=2+) und stark (=3+) bewertet.

**ER:** Mit den ER-Antikörpern werden Zellkerne der Brustkrebszellen ohne zytoplasmatische Färbung gefärbt. Nur an Frischgewebe wurde auch eine zytoplasmatische Färbung gefunden. Es werden sowohl der Prozentsatz positiver Zellen als auch die Färbeintensität der Tumorzellen bewertet (Tab 2.7). Der immunhistochemische ER-Befund, auch Immunreaktiver Score (IRS) genannt, nach Vorschrift des Herstellers (DAKO) ergibt sich aus dem Produkt von Färbemuster und Färbeintensität und nimmt auf einer Skala die Werte 0-12 an.

ER-Färbung		ER-Färbung	
Prozentanteil der Tumorzellen	Bewertung des Färbemusters	Färbeintensität der Tumorzellen	Bewertung der Färbeintensität
0 %	0	Negativ	0
<10 %	1	Schwach	1+
10-50 %	2	Mässig	2+
50-80 %	3	Stark positiv	3+
>80 %	4		

**Tab. 2.7** Auswertung der immunhistochemischen Färbung für ER.

**PR, bcl2, p53, MiB1:** Die Färbungen für PR, bcl2, p53 und MiB1 werden wie folgt beurteilt: Negativ (=0): weniger als 20 % der Tumorzellen sind angefärbt; schwach/fokal positiv (=1): 20 % der Tumorzellen sind angefärbt; positiv (=2): mehr als 25 % der Tumorzellen sind angefärbt (Tab. 2.8).

PR-, p53- und MiB1-Positivität resultieren aus immunhistochemisch nukleärer Färbung der Tumorzellen, bcl2-Positivität aus Färbung der Zellmembranen.

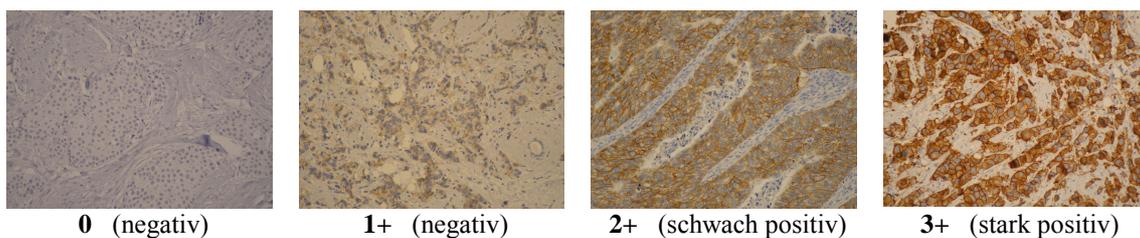
PR, p53, MiB1, bcl2		
Bewertung des Färbemusters	Prozentanteil der gefärbten Tumorzellen	Score
Negativ	<20 %	0
Schwach, fokal	20 %	1+
Positiv	>25 %	2+

**Tab. 2.8** Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für PR, p53, MiB1 und bcl2.

**Her2:** Für die Bestimmung der Her2-Überexpression sollte nur die Zellmembran-Färbeintensität beurteilt werden, da die zytoplasmatische Färbung als unspezifisch gilt. Als Positiv-Kontrolle und zur Überexpressions-Analyse wurden „multi-tissue“ Gewebeblöcke bei jeder Färbung mitgeführt (Tab.2.9 und Abb. 2.3).

Her2-Färbung		
Färbemuster	Score	Überexpressions Auswertung nach Vorschrift des Herstellers (DAKO)
Keine Zellmembranfärbung sichtbar oder nur in <10 % der Tumorzellen	0	Negativ
Schwache, kaum wahrnehmbare Zellmembranfärbung in mehr als 10 % der Tumorzellen. Die Zellmembranen sind nur teilweise gefärbt	1+	Negativ
Schwache bis moderate komplette Zellmembranfärbung in mehr als 10 % der Tumorzellen	2+	Schwach positiv
Starke komplette Zellmembranfärbung in mehr als 10 % der Tumorzellen	3+	Stark positiv

**Tab. 2.9** Auswertung der immunhistochemischen Färbung für Her2.



**Abb. 2.3** Her2 „multi-tissue“-Gewebeblock, der als Positiv-Kontrolle und zur Überexpressions-Auswertung bei jeder Färbung mitgeführt wurde.

**CD34:** CD34 ist ein glykosyliertes transmembranes Protein (gp 105-120 kDa), welches u.a. von kapillären Endothelzellen exprimiert wird. Die Beurteilung der Neovaskularisation („microvessel count“) eines Tumors wurde unter dem 40x Mikroskop-Objektiv durchgeführt (anlehnend an Honkopp et al., 1997):

CD34-Färbung		
Bewertung des Färbemusters	Score	„microvessel count“
Negativ	0	0-5/mm <sup>2</sup>
Schwach	1+	5-10/mm <sup>2</sup>
Mittel	2+	10-20/mm <sup>2</sup>
Stark	3+	>20/mm <sup>2</sup>

**Tab. 2.10** Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für CD34.

### **2.4.5 RNA-Isolierung aus FFPE-Geweben**

Ziel unserer Untersuchungen war es, das Expressionsverhalten in Tumorzellen invasiver Tumoranteile quantitativ zu charakterisieren. Dazu musste RNA spezifisch aus Tumorzellen des invasiven Tumoranteils isolieren werden, um Expressionen der prädiktiven Biomarker in Entzündungs- und anderen Stromazellen als auch Expressionen in Tumorzellen nichtinvasiver Tumoranteile nicht mit zu erfassen.

Zunächst wurde daher von jedem Probenblock ein HE-Routineschnitt angefertigt, auf dem das zu untersuchende Tumorareal markiert und anhand dessen im Vorfeld die Entscheidung für eine Laser-Mikro- bzw. Makrodissektion der Tumorzellen gefällt wurde. Kriterien für die methodisch aufwendigere, aber wesentlich präzisere Laser-Mikrodissektion waren eine dichte Infiltration des Tumors mit Entzündungszellen, wenige oder diffus im Bindegewebe verstreut liegende Tumorzellen oder schlecht abgrenzbare „carcinoma in situ“-Anteile.

#### **2.4.5.1 Laser-Mikrodissektion**

Drei serielle, ca. 4 µm dicke Gewebeschnitte des Probenblocks wurden auf Kunststofffolie-beschichtete Objektträger aufgezogen, entparaffiniert und HE gefärbt.

Der präparierte Objektträger wurde in die abnehmbare Objektträgerhalterung des Leica Mikroskops so eingespannt, dass die dünne Kunststofffolie mit dem montiertem histologischen Schnitt nach unten zeigt.

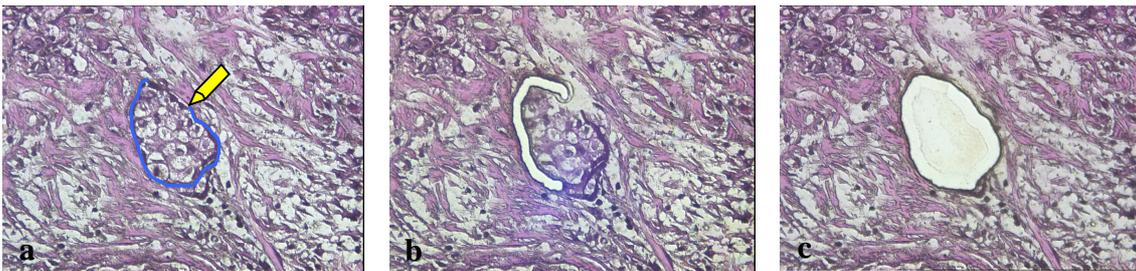
Am automatisierten Labormikroskop des Leica Systems wurden die Tumorzellen des Gewebeschnitts eingestellt, wobei ein Arbeiten in verschiedenen Vergrößerungen, wie an einem herkömmlichen Mikroskop möglich war. Das mikroskopische Bild wurde durch eine 3CCD-Kamera auf dem PC-Monitor dargestellt.

Mit dem dazugehörigen Software-Programm wurde die Laser-Schnittlinie vorgezeichnet. Der Schneidevorgang liess sich sowohl am Bildschirm als auch am Mikroskop verfolgen (Abb. 2.4).



**Abb. 2.4** Das Leica AS LMD für die Laser-Mikrodissektion von kleinen Probenarealen mit (von links nach rechts) Elektronikbox, LMD-Modul mit Beobachtungstubus und Kamera, Bedienelement, Laser und PC-Monitor.

Das Ausschneiden von kleinen Zellverbänden, bzw. von Einzelzellen, erfolgte mittels eines gepulsten UV-Lasers, dessen fokussierter Strahl entlang der Kontur des interessierenden Areals geführt wird (Abb. 2.5).



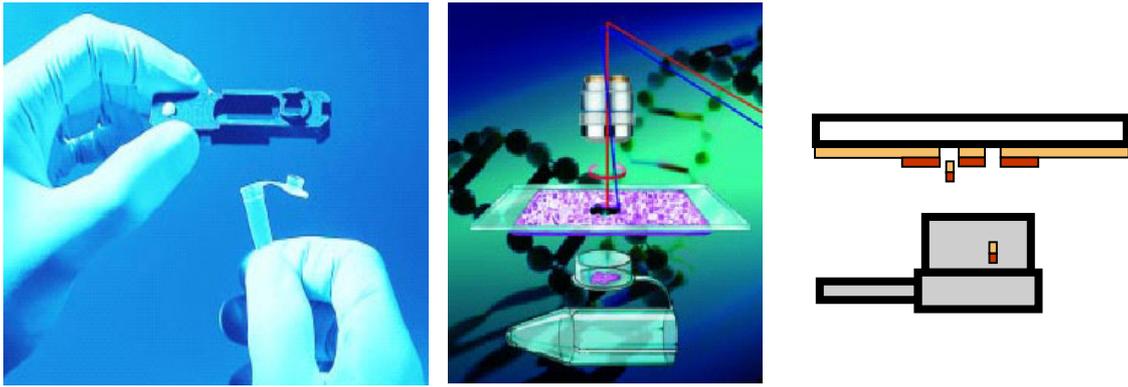
**Abb. 2.5** Laser-Ablation an einem Beispiel: a) Auswahl von ca. 20 Tumorzellen eines invasiv duktales MK der Probe 37 unter dem Mikroskop und vorzeichnen der Laser-Schneidlinie am Monitor. b) Momentaufnahme während des Schneidevorgangs mittels Laserstrahl. c) Loch im Gewebeschnitt, nachdem das Areal ablatiert und aufgefangen wurde.

Der Schwerkraft folgend fielen die ausgeschnittenen Tumorzellareale in den darunter angebrachten Reaktionsgefäß-Deckel, der vorher mit 20 µl Lysepuffer beschickt worden war (Abb. 2.6).

Mit Hilfe eines Kontrollobjektives wurde die erfolgreiche Isolierung von Zellen kontinuierlich überprüft.

Insgesamt wurden je Gewebeprobe einer Patientin ca. 7000 Zellen isoliert.

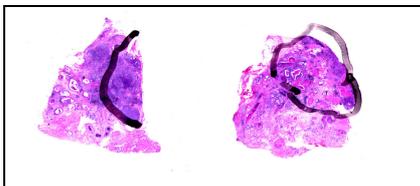
Nach Abzentrifugation des Deckelinhalts in das Reaktionsgefäß wurden weitere 80 µl Lysepuffer hinzugegeben.



**Abb. 2.6** Einspannen des Reaktionsgefäßes in dafür vorgesehene Halterung des Leica AS LMD. Schematische Darstellung der Laser-Ablation. Auffangen des ablatierten Gewebeareals im direkt darunter befindlichen Reaktionsgefäßdeckel.

#### 2.4.5.2 Makrodissektion

Zwei serielle Schnitte (etwa 3  $\mu\text{m}$ ) des Probenblocks wurden auf Objektträger gezogen und entparaffiniert. Der korrespondierende HE-Schnitt mit der Tumormarkierung wurde deckungsgleich unter den vorbereiteten Objektträger gelegt (Abb. 2.7).



**Abb. 2.7** Gewebeschnitt (HE-Färbung) mit Deckglas und Filzstiftmarkierung des Tumorareals für die Makrodissektion.

Mit Hilfe einer sterilen Skalpellklinge wurde das entsprechende Tumorareal vom Objektträger gekratzt und in ein Reaktionsgefäß mit 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer überführt. Die Makrodissektion wurde unter einem Mikroskop durchgeführt. Etwa 40 % der Fälle mit soliden tumorzellreichen (Tumorzellen >80% der Gesamtzellen auf dem Gewebeschnitt) Anteilen ohne DCIS oder LCIS wurden auf diese Weise präpariert.

#### 2.4.5.3 RNA-Isolierung mit HighPure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics)

Dem Reaktionsgefäß mit dissezierten Tumorzellen und 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer wurden 16  $\mu\text{l}$  SDS sowie 40  $\mu\text{l}$  Proteinase K zupipettiert. Der Ansatz wurde kurz gemischt, über Nacht bei 55° C auf einem Thermomixer inkubiert und anschliessend mit 325  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer und Ethanol abs. versetzt, um die RNA-Bindung an die Oberfläche des Silica-Filters zu verbessern. Das Lysat wurde in ein Gefäß mit Filtervlies gegeben.

Durch eine Reihe von Reinigungsschritten (Tab. 2.11) wurden Proteine und DNA aus dem Lysat entfernt. Die gereinigte Gesamt-RNA wurde in 50 µl Nuklease-freiem, sterilen bidest. Wasser aufgenommen und bei  $-80^{\circ}$  C gelagert.

Schritt	Reinigungsschritte zur Präparation von Gesamt-RNA aus Paraffingewebe
1	30 s Zentrifugation bei 8000 rpm. Das Filtrat wird verworfen. Erneute Zentrifugation des Filtervlies-Gefäßes bei 13000 rpm.
2	Zugabe von 500 µl Waschpuffer I, Zentrifugation 15 s bei 8000 rpm und Verwerfen des Filtrats.
3	Zugabe von 500 µl Waschpuffer II, Zentrifugation 15 s bei 8000 rpm und Verwerfen des Filtrats.
4	Zugabe von 300 µl Waschpuffer II, Zentrifugation 15 s bei 8000 rpm und Verwerfen des Filtrats.
5	2 min Zentrifugation bei 13000 rpm.
6	Überführung des Filtervlies-Gefäßes in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß und Zugabe von 90 µl Elutionspuffer.
7	1 min Zentrifugation bei 8000 rpm, Zugabe von 10 µl DNase-Inkubationspuffer und 1 µl DNase I.
8	Inkubation 45 min bei $37^{\circ}$ C auf dem Thermomixer.
9	Zugabe von 20 µl Lysepuffer, 18 ml 10% SDS, 40 µl Proteinase K.
10	Inkubation 1 h bei $55^{\circ}$ C auf dem Thermomixer.
11	Zugabe von je 325 µl Binding Buffer und Ethanol abs., Überführung in neues Filtervlies-Gefäß.
12	30 s Zentrifugation bei 8000 rpm. Das Filtrat wird verworfen. Erneute Zentrifugation des Filtervlies-Gefäßes bei max. 13000 rpm.
13	Zugabe von 500 µl Waschpuffer I, Zentrifugation 15 s bei 8000 rpm und Verwerfen des Filtrats.
14	Zugabe von 500 µl Waschpuffer II, Zentrifugation 15 s bei 8000 rpm und Verwerfen des Filtrats.
15	Zugabe von 300 µl Waschpuffer II, Zentrifugation 15 s bei 8000 rpm und Verwerfen des Filtrats.
16	2 min Zentrifugation bei 13000 rpm.
17	Überführung des Filtervlies-Gefäßes in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß und Zugabe von 90 µl Elutionspuffer.
18	Nach 1 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 1 min Zentrifugation bei 8000 rpm.

**Tab. 2.11** Reinigungsschritte zur RNA-Isolierung aus Paraffingewebe mit dem HighPure-RNA Paraffin-Kit (Roche Diagnostics).

## 2.4.6 Real-Time Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

### 2.4.6.1 Reverse Transkription der mRNA: erster Schritt der RT-PCR

Zur Gewinnung von cDNA als Template für die PCR wurde die mit dem HighPure RNA Paraffin Kit extrahierte RNA revers transkribiert. Eingesetzte Komponenten stammten aus dem AMV-RT-PCR-Kit der Firma Roche Diagnostics (Tab. 2.12). Die verwendete reverse Transkriptase des „Avian Myoblastosis Virus“ besitzt neben Aktivitäten als RNA-abhängige DNA-Polymerase und DNA-abhängige DNA-Polymerase eine RNase-H-Nebenaktivität, die in einem RNA-cDNA-Hybrid zum spezifischen Abbau der RNA führt. Bei der folgenden PCR werden dadurch Störfaktoren durch RNA-Verunreinigungen minimiert.

Durch Verwendung Sequenz-spezifischer Oligonucleotid-Primer wurden während der reversen Transkription nur die Zielsequenzen transkribiert, die Bildung unspezifischer cDNA-Produkte, (wie es bei Verwendung von Hexamer-Primern der Fall ist) hingegen reduziert.

Volumen	Substanz
2 µL	10x Reaktionspuffer
1 µL	10x MS2-RNA verd. Puffer
2 µL	Desoxynucleotide
2 µL	Spezifische Primer (jeweils TP, DPD, TS, G6PDH)
2 µL	Wasser
10 µL	Gesamt-RNA
1 µL	AMV reverse Transkriptase

**Tab. 2.12** Zusammensetzung eines Ansatzes zur Reversen Transkription.

Pro RNA-Extrakt einer Probe ergaben sich insgesamt vier RT-Ansätze mit jeweils spezifischen Primern für TP, DPD, TS und G6PDH. Zusätzlich wurde eine Kalibrator-RNA revers transkribiert, die statt der diagnostischen Tumorprobe im RT-PCR-Ansatz enthalten war.

Bei jeder reversen Transkription wurden zwei Negativ-Kontrollen mitgeführt, um die Reinheit der verwendeten Kit-Komponenten, die DNA-freie RNA-Präparation sowie die saubere Arbeitsweise beim Ansetzen des RT-PCR-Mixes (Kontaminationskontrolle) zu

überprüfen: statt des Enzyms AMV-Reverse Transkriptase wurde steriles Wasser pipettiert; statt RNA wurde steriles Wasser pipettiert.

Bei der anschließenden PCR durfte in diesen Ansätzen kein Produkt nachweisbar sein. Nach Mischen und Zentrifugieren wurde der Ansatz im Thermocycler inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei 25° C (Primer-Annealing) fand die Elongation durch die AMV-Reverse Transkriptase bei 42° C (60 min) statt. Anschliessend wurde das Enzym durch einen 5-minütigen Hitzeschock (95° C) inaktiviert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20° C gelagert.

### **2.4.6.2 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion mit dem LightCycler: zweiter Schritt der RT-PCR**

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression der drei Enzyme wurde als zweiter Schritt die Zahl der zuvor synthetisierten cDNA-Moleküle über Amplifikation im LightCycler bestimmt (Abb. 2.8).



**Abb. 2.8** LightCycler der Firma Roche Diagnostics. Darstellung des LightCycler Karussells mit den Kapillaren, in denen die Reaktion stattfindet.

#### *Reaktionsansatz*

Ein PCR-Ansatz enthielt die in Tab. 2.13 aufgeführten Komponenten mit jeweils nur einem Primer/Sonden-Paar entweder für TP, DPD, TS oder G6PDH. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung unter Mitführung der Kalibrator-cDNA und der 2 Negativ-Kontrollen (Kapitel 2.4.6.1) untersucht.

Volumen	Kit-Komponente
6 µl	TS, DPD, TS, G6PDH Detection Mix (Spezifische Primer und Hybridisierungs-Sonden)
4 µl	cDNA-Template
2 µl	“fast start”- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Desoxynucleotide (dUTP anstatt dTTP)
1,6 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
6,4 µl	Aq. Bidest. (steril)

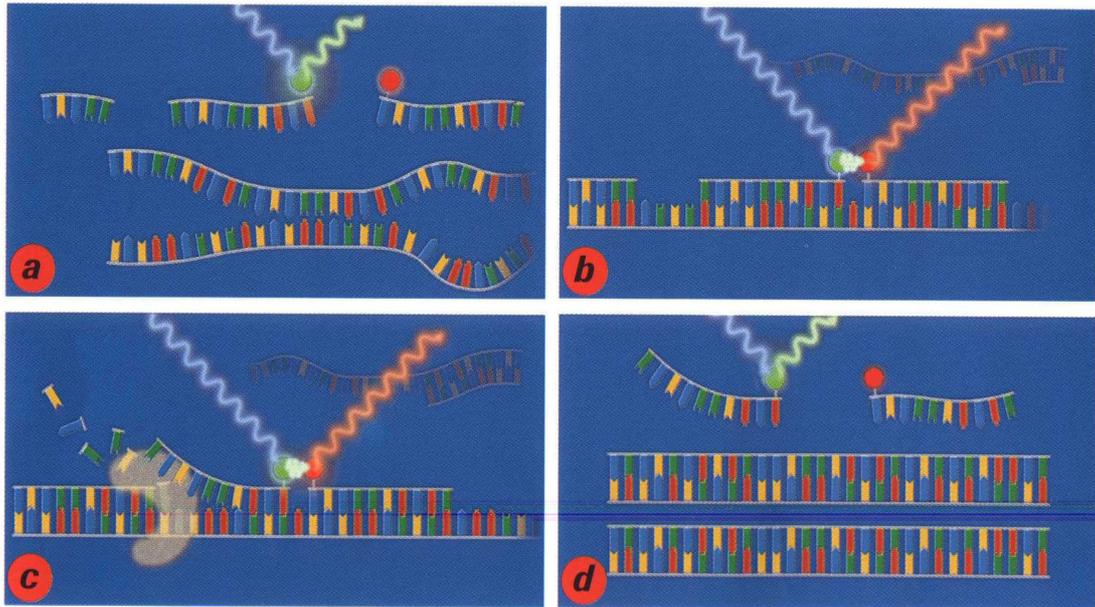
**Tab. 2.13** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Im Gegensatz zu herkömmlichen PCR-Maschinen arbeitet der LightCycler nicht mit einem beheizten Metallblock, sondern erhitzt und kühlt die in Glaskapillaren befindlichen Proben durch heisse bzw. kalte Luft. Hierdurch kann mit dem System eine PCR mit deutlich verringertem Zeitaufwand durchgeführt werden. 30 bis 40 Zyklen können in 20 bis 30 min durchgeführt werden (Tab. 2.14). Die revers transkribierten mRNAs wurden mit spezifischen Primern amplifiziert, wobei die Fragmentlängen der Amplicons für TP 108, für DPD 148, für TS 111 und für G6PDH 123 Basenpaare betragen.

PCR-Schritt	Dauer/ Temperatur	Wiederholung
Denaturierung	5 min 95° C	1 x
Amplifikation	10 s 95° C Denaturierung 10 s 62° C Primer-Annealing 10 s 72° C Elongation	40 x
Abkühlen	Zieltemperatur: 40° C (30 s)	1 x

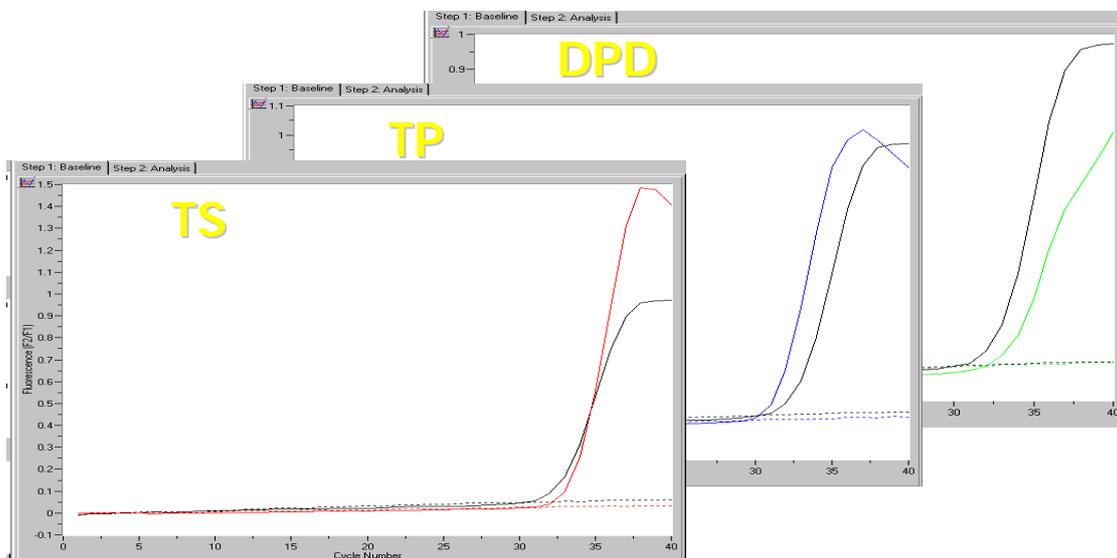
**Tab. 2.14** Verlauf der PCR im LightCycler

Der LightCycler ermöglicht durch Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden, den Verlauf der PCR (Amplifikation und Detektion des PCR-Produkts) in Echtzeit („real-time“) auf einem Bildschirm zu verfolgen. Die Hybridisierungs-Sonden binden sequenzspezifisch an einen Abschnitt der DNA, der innerhalb des Amplicons liegt. PCR-Artefakte, wie Primer-Dimere, werden somit nicht detektiert. Die Messung erfolgt einmal pro Zyklus. Proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produktes nimmt auch die Intensität des Fluoreszenzsignals über Bindung der Sonden zu. Auf diese Weise kann die Zunahme an PCR-Produkt über den gesamten Lauf verfolgt werden. Das „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) dient zur Emissionserzeugung (Abb. 2.9).



**Abb. 2.9** Funktionsprinzip des FRET. Das System besteht aus zwei fluoreszierenden Sonden. Die erste („Anchor“) ist am 3'-Ende Fluorescein- markiert und emittiert bei Anregung grünes Licht (a). Die zweite Sonde („Red“) ist am 5'-Ende mit dem Marker LightCycler Red 640 gelabelt. Binden beide in direkter Nachbarschaft (max. 4 bp) zueinander, wird die Energie von der ersten auf die zweite Sonde übertragen, die daraufhin langwelliges rotes Licht mit  $\lambda = 640 \text{ nm}$  emittiert (b). Die Intensität des Lichtes wird von einem Photosensor registriert. Die gebundenen Sonden werden während der Elongationsphase von der DNA-Polymerase verdrängt (c).

Für jede Probe entsteht ein charakteristischer Kurvenverlauf (Abb. 2.10).



**Abb. 2.10** Beispielhafte Kurvenverläufe für TS, TP, DPD von drei verschiedenen Gewebeproben sowie Kurven der G6PDH der jeweiligen Probe. Mitführen der zwei Negativ-Kontrollen (Linien am unteren Monitorbildrand).

Als Qualitätskontrolle dienten Schmelzkurvenanalysen aller RT-PCR-Produkte mit dem LightCycler, anhand derer eine Amplifikation unspezifischer Produkte erkannt werden konnte. TP, DPD, TS und G6PDH haben spezifische, unterschiedliche Schmelzpunkte (Abb. 2.11).

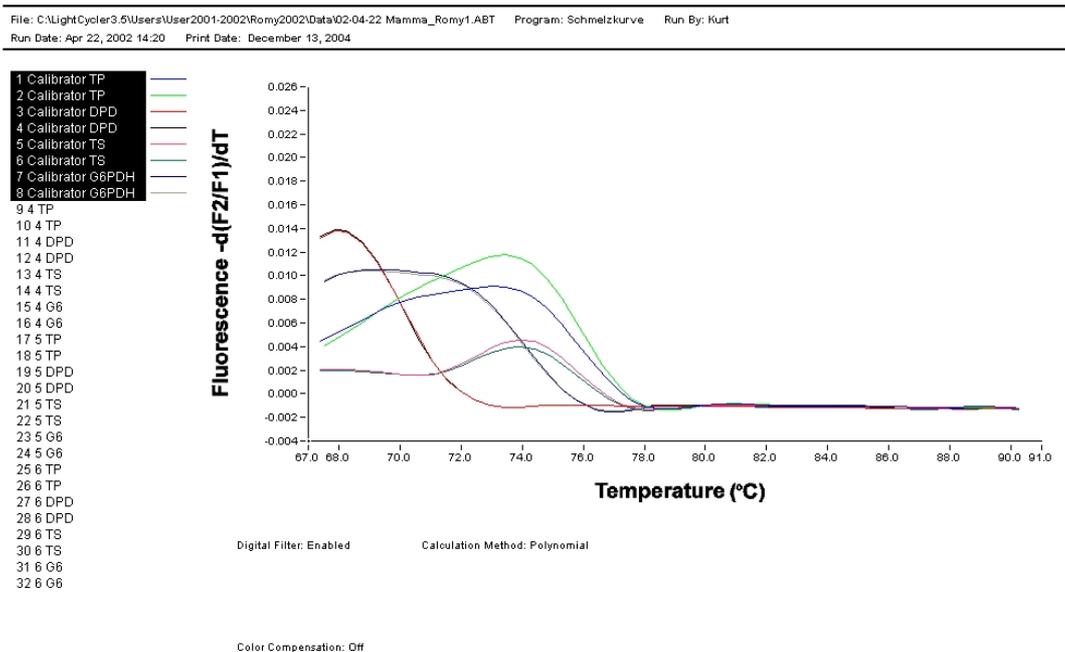


Abb. 2.11 Schmelzkurvenanalyse für TP, DPD, TS und G6PDH

### 2.4.6.3 Grundlage der Quantifizierung mit Referenzen: Datenauswertung mit Kalibrator und Haushaltsgen

Die Datenauswertung unbekannter Patientenproben erfolgte an einem Referenzsystem mit einem Kalibrator. Über Kalibratoren wird auch die PCR-Effizienz normiert. Kalibratoren stammen nach Herstellerhinweisen aus einer immortalen Zellkultur, welche unter anderem die drei „target“-Sequenzen TP, DPD und TS exprimiert. Die aus dieser Kultur isolierten bekannten Mengen an mRNA dienen als Standard für die Quantifizierung unbekannter Proben und werden parallel mitgeführt.

Zur Normierung der unterschiedlichen Ausgangsmengen an Patientenprobe (abhängig von der Qualität und der Verarbeitung der Gewebeproben, der Schnittdicke der FFPE-Gewebe, der dissezierten Zellzahl etc.) und zur Normierung unterschiedlicher präanalytischer Einflüsse auf die mRNA der Probe wird die Quantifizierung von G6PDH-mRNA (Haushaltsgen) mitgeführt. Im Rechenprogramm der Software werden daraus relative quantitative Werte für die mRNA-Mengen der drei Enzyme ermittelt, die einen Vergleich zwischen den untersuchten Proben ermöglichen.

Die Menge der PCR-Produkte, mittels Fluoreszenz im LightCycler gemessen, ergibt logarithmisch zu den Zyklenzahlen aufgetragen eine S-förmige Kurve. Der theoretische Schnittpunkt des linear verlaufenden Abschnitts der Reaktionskurve mit einer Abszisse, die den Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz darstellt, wird als „crossing point“ (cp) bezeichnet. Der cp-Wert gibt die notwendige PCR-Zyklenzahl für eine Probe an, um eine vom Hintergrund differente Fluoreszenz zu generieren. Der cp-Wert korreliert invers zu der in der Probe ursprünglich vorhandenen mRNA.

Das RelQuant Software Programm Version 1 des LightCyclers ermittelt aus den cp-Werten (Mediane bei Mehrfachbestimmungen) normalisierte Ratios:

$$\frac{\text{Cp Marker aus Patientenprobe} / \text{cp G6PDH aus Patientenprobe}}{\text{Cp Marker aus Kalibrator} / \text{cp G6PDH aus Kalibrator}} \times \text{Korrekturfaktor}^* \times \text{Faktor}^*$$

\*Faktoren sind Chargen-spezifisch und werden vom Hersteller der Kits angegeben.

Proben- und Kalibratoren-RNA wurden in Doppelbestimmungen quantifiziert. Bei Unterschieden von mehr als 1,0 „crossing point“ zwischen den Einzeldaten wurden diese nicht gewertet.

## 2.5 Statistik

Die qualitativen klinisch-prognostischen Parameter der 72 Patientinnen, wie Alter, histologischer Tumortyp, TNM-Stadium, Differenzierungsgrad, Krankheitsverlauf und Beobachtungszeit wurden mittels Frequenz-Tabellen ausgewertet. Andere, das Patientengut charakterisierende Merkmale, wie Tumorlokalisation, Operationstechnik, Therapieschemata wurden ebenfalls durch Angaben der Häufigkeiten beschrieben.

Die Verteilungen der IHC- und PCR-Ergebnisse wurden durch Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte beschrieben. Die grafische Darstellung erfolgte in Säulendiagrammen. Kastendiagramme stellen 50% der Beobachtungen eines kontinuierlichen Parameters (Nominalskala) zwischen erstem und dritten Quartil dar, wobei der Median durch einen Rhombus, hingegen Maxima, Minima und Streuung der restlichen 50% der Werte durch seitlich ansetzende Schnurrhaare („whiskers“) markiert werden. Die Einteilung der jeweiligen Parameter in Subgruppen (Tab. 2.15) für Berechnungen von krankheitsfreiem Überleben (Kaplan-Meier-Kurven) wurde in diesen Diagrammen farblich unterschieden und markiert. Bei der Bestimmung von Schwellenwerten oder „cutoff“-Werten wurde sich an Mittelwerten und Medianen der Parameterverteilungen orientiert.

Die Interobserver-Variabilität (IHC) sowie die methodischen Doppelbestimmungen von Proben mit Laser-Mikrodissektion und Makrodissektion wurden mittels Variationskoeffizienten (VK, Streuung der paarweisen Werte um den Mittelwert/Mittelwert) beschrieben.

Zur Analyse von Korrelationen und Überlebenszeiten wurden nichtparametrische statistische Tests verwendet, die keine definierbare Verteilung der Werte voraussetzen.

Beim Vergleich von zwei Gruppen wurden p-Werte ermittelt, welche die Wahrscheinlichkeit angeben, mit der sich unter der Nullhypothese die gefundenen Ergebnisse einstellen (Überschreitungs-Wahrscheinlichkeit). Die Nullhypothese besagt, dass in der Grundgesamtheit kein Effekt (z.B. kein Zusammenhang zwischen zwei Parametern) besteht, dass also ein beobachteter Effekt in der Stichprobe nur zufallsbedingt ist. Es wurde unterschieden zwischen Trend ( $p \leq 0,1$ ), signifikant ( $p \leq 0,05$ ), hoch signifikant ( $p \leq 0,01$ ) und höchst signifikant ( $p < 0,001$ ).

Die Ergebnisse der mittels IHC und RT-PCR analysierten prädiktiven Biomarker TP, DPD und TS und der TP/DPD sowie der TS/DPD Ratio wurden untereinander (Methodenvergleich) als auch mit den immunhistochemischen Tumormarkern und den klinisch prognostischen Faktoren korreliert. Das geschah durch den Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten in Bezug auf die Nullhypothese.

Der zur Interkorrelation der Gruppen errechnete Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient  $r$  wurde in Abhängigkeit von den dazugehörigen  $p$ -Werten wie folgt bewertet: „keine Korrelation“ ( $r < 0,25$ ); „niedrige Korrelation“ ( $0,25 \leq r < 0,45$ ); „mittlere Korrelation“ ( $0,45 \leq r < 0,60$ ); „hohe Korrelation“ ( $r > 0,6$ ).

Für die grafische Darstellung von krankheitsfreien Überlebenszeitverteilungen wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt. Als „Krankheitsereignis“ wurde das Auftreten von Fernmetastasen (M1) gewertet, unabhängig vom Vorliegen eines Lokalrezidivs ( $n=3$ ). Fälle, bei denen ausschliesslich ein Lokalrezidiv ( $n=5$ ) oder kontralateraler Brustkrebs ( $n=2$ ) vorlag, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die krankheitsfreien Überlebenszeiten der Patientinnen, die den Beobachtungszeitraum ohne Krankheitsereignis überlebt haben, wurden als „zensiert“ behandelt. Als zensierte Daten bei der Analyse von Überlebenszeiten werden Daten mit zunächst vorläufigem Charakter verstanden, weil die betreffenden Patienten noch nicht verstorben sind / noch kein Krankheitsrezidiv hatten oder nicht mehr beobachtet wurden. Ob beobachtete Unterschiede in den Überlebenszeitkurven statistisch signifikant waren, wurde mit dem Log-Rank und dem Wilcoxon Chi Square Test überprüft. Der Log-Rank Test eignet sich besser für längere, der Wilcoxon Chi Square Test für kürzere Überlebenszeiten. In den grafischen Darstellungen wird für beide Teste die Wahrscheinlichkeit angegeben, durch Zufall allein den errechneten Chi Square Wert zu erhalten, unter der Annahme, dass die Überlebenszeitfunktionen für beide Gruppen gleich sind (Interpretation der  $p$ -Werte s.o.).

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der SAS<sup>®</sup> Software, Version 8.02 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina) und der JMP<sup>®</sup> Software, Version 4 (SAS Institute, Heidelberg) durchgeführt.

Parameter		Subklasse A bzw. „negativ“	Subklasse B bzw. „positiv“
Stadium		I	> I
T-Stadium		1	> 1
Nodalstatus		0	> 0
Nukleäres „grading“		≤ 2	> 2
Alter bei Diagnose		≤ 50	> 50
Östrogenrezeptorstatus		≤ 2	> 2
Progesteronrezeptorstatus		0	> 0 (1+, 2+)
Her2		≤ 2 (0, 1+, 2+)	> 2 (3+)
MiB1		0	> 0 (1+, 2+)
P53		0	> 0 (1+, 2+)
Bcl2		0	> 0 (1+, 2+)
Vimentin		< 2 (0-1,5+)	≥ 2 (2-3+)
CD34		< 2 (0-1,5+)	≥ 2 (2-3+)
IHC	TP	≤ 120	> 120
	DPD	≤ 150	> 150
	TS	≤ 30	> 30
	TP/DPD	≤ 0,7	> 0,7
	TS/DPD	≤ 0,2	> 0,2
RT-PCR	TP	≤ 30	> 30
	DPD	≤ 5	> 5
	TS	≤ 0,9	> 0,9
	TP/DPD normiert	≤ 16	> 16
	TS/DPD normiert	≤ 0,15	> 0,15

**Tab. 2.15** Einteilung der Parameter in Subklassen für die Berechnung der univariaten Überlebenszeiten nach Kaplan-Meier

Da aus methodischen Gründen nur bei 72 der 91 Patientinnen RT-PCR-Ergebnisse vorlagen, wurden in dieser Arbeit auch nur die klinischen-prognostischen und immunhistologischen Ergebnisse dieser 72 Patientinnen ausgewertet.

### 3. ERGEBNISSE

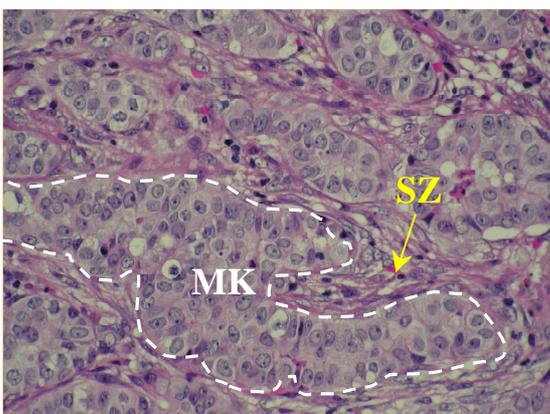
#### 3.1 Häufigkeiten und Verteilungen

##### 3.1.1 Häufigkeiten und Verteilungen der klinisch pathologischen Charakteristika

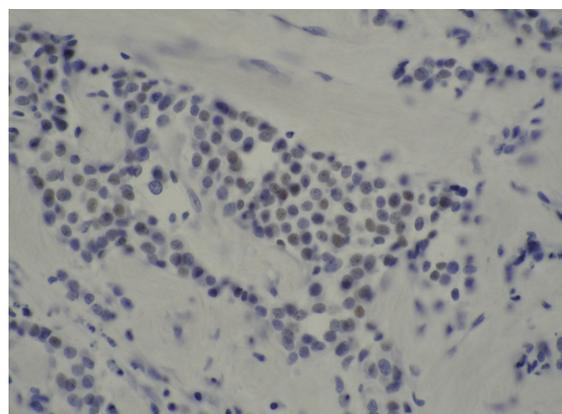
Ursprünglich gingen in die Studie n=91 Patientinnen ein. Nur an n=72 Tumorproben waren auch zuverlässige RT-PCR-Ergebnisse für mindestens zwei der Enzyme TP, DPD oder TS zu erzielen. Daher wurde darauf verzichtet, das Gesamtkollektiv (n=91) zu charakterisieren, die Auswertung der klinisch-pathologischen und tumorbiologischen Charakteristika wurde auf die 72 Patientinnen beschränkt, deren Gewebeproben auch erfolgreich in der PCR untersucht werden konnten (siehe Kapitel 2.1).

##### 3.1.2 Häufigkeiten und Verteilungen der tumorbiologischen Parameter analysiert mittels Immunhistochemie

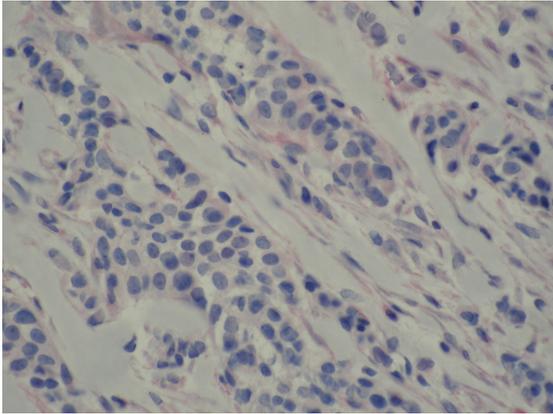
In den Tumorgewebeproben von 72 Patientinnen wurden mittels IHC die in Kapitel 2.4.4 aufgeführten prognostischen Parameter analysiert. In Abb. 3.1 sind exemplarisch die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an Gewebeschnitten des Tumors einer Patientin dargestellt (Auswertung der Färbeergebnisse siehe auch Kapitel 2.4.3 und 2.4.4).



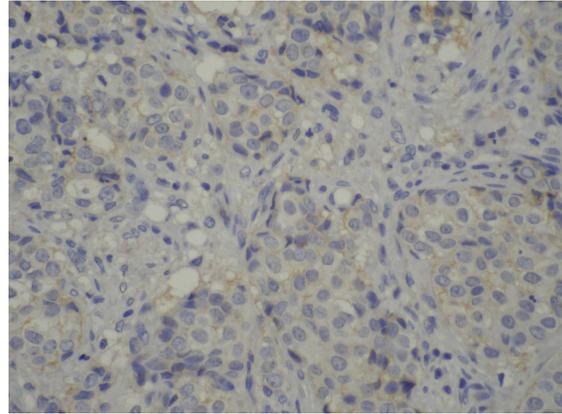
**a) HE-Färbung, 40x.** Invasiv duktales MK mit zahlreichen Mitosen und prominenten Nukleolen. Nukleäres „grading“ 2,5. MK=Mammakarzinomzellen, SZ=Stromazellen



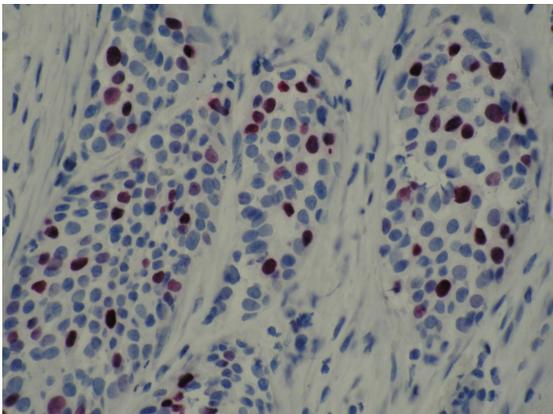
**b) ER-Färbung, 40x.** Östrogenrezeptoren positiv (Gesamtscore 3+): 50% der MK-Zellen schwach positiv.



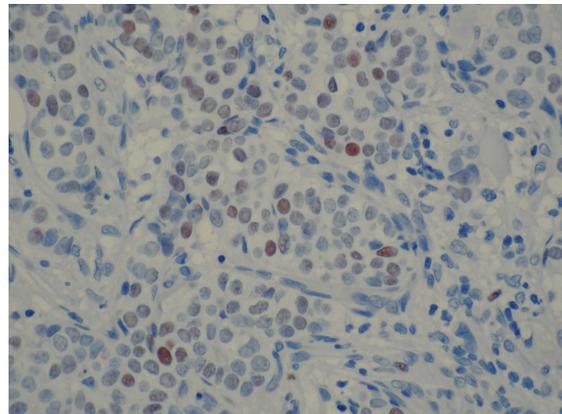
**c) PR-Färbung**, 40x. Progesteronrezeptoren negativ (Score 0): <20% der MK-Zellen angefärbt.



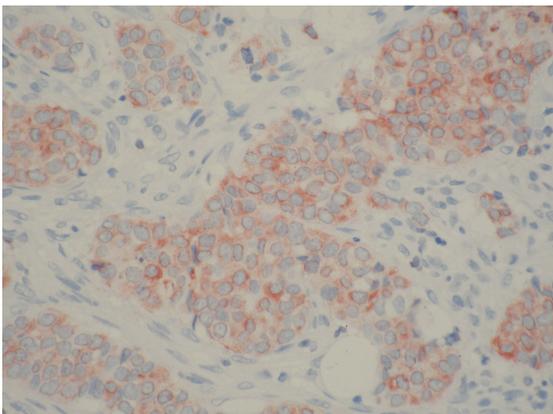
**d) Her2-Färbung**, 40x. Her2 negativ (Score 1+): unspezifische zytoplasmatische Färbung und nur teilweise schwach angefärbte Zellmembranen der MK-Zellen.



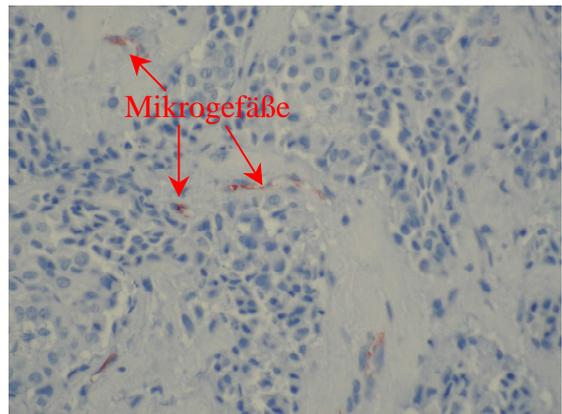
**e) MiB1-Färbung**, 40x. MiB1 schwach fokal positiv (Score 1+): 20% der MK-Zellkerne schwach fokal angefärbt.



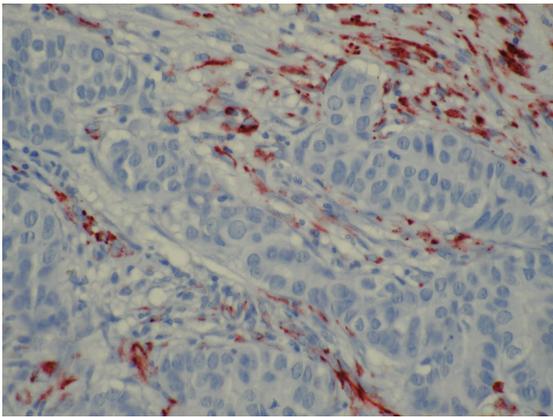
**f) p53-Färbung**, 40x. p53 positiv (Score 2+): mehr als 25% der MK-Zellkerne angefärbt.



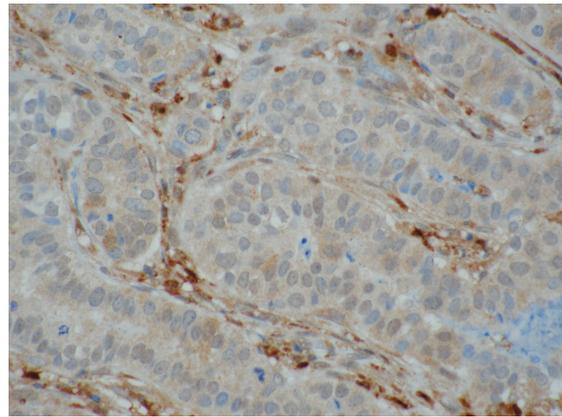
**g) bcl2-Färbung**, 40x. bcl2 (Score 2+): mehr als 25% der MK-Zellmembranen angefärbt.



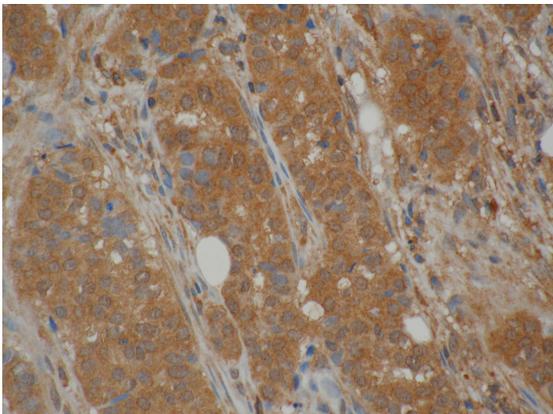
**h) CD34-Färbung**, 40x. CD34 positiv (Score 2+): 10-20 Mikrogefäße pro mm<sup>2</sup>.



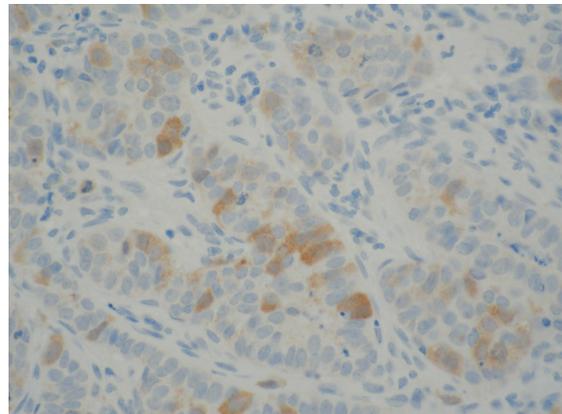
**i) Vimentin-Färbung**, 40x. Vimentin positiv (Score 3+): starke Färbeintensität der Intermediärfilamente mesenchymaler und myoepithelialer Zellen (MK-Zellen negativ).



**k) TP-Färbung**, 40x. Gesamtscore 140: 70% der MK-Zellen stark angefärbt (vorwiegend Zytoplasma), ebenfalls sehr starke Färbung der Stromazellen.



**l) DPD-Färbung**, 40x. Gesamtscore 270: 90% der MK Zellen sehr stark angefärbt (Zytoplasma).

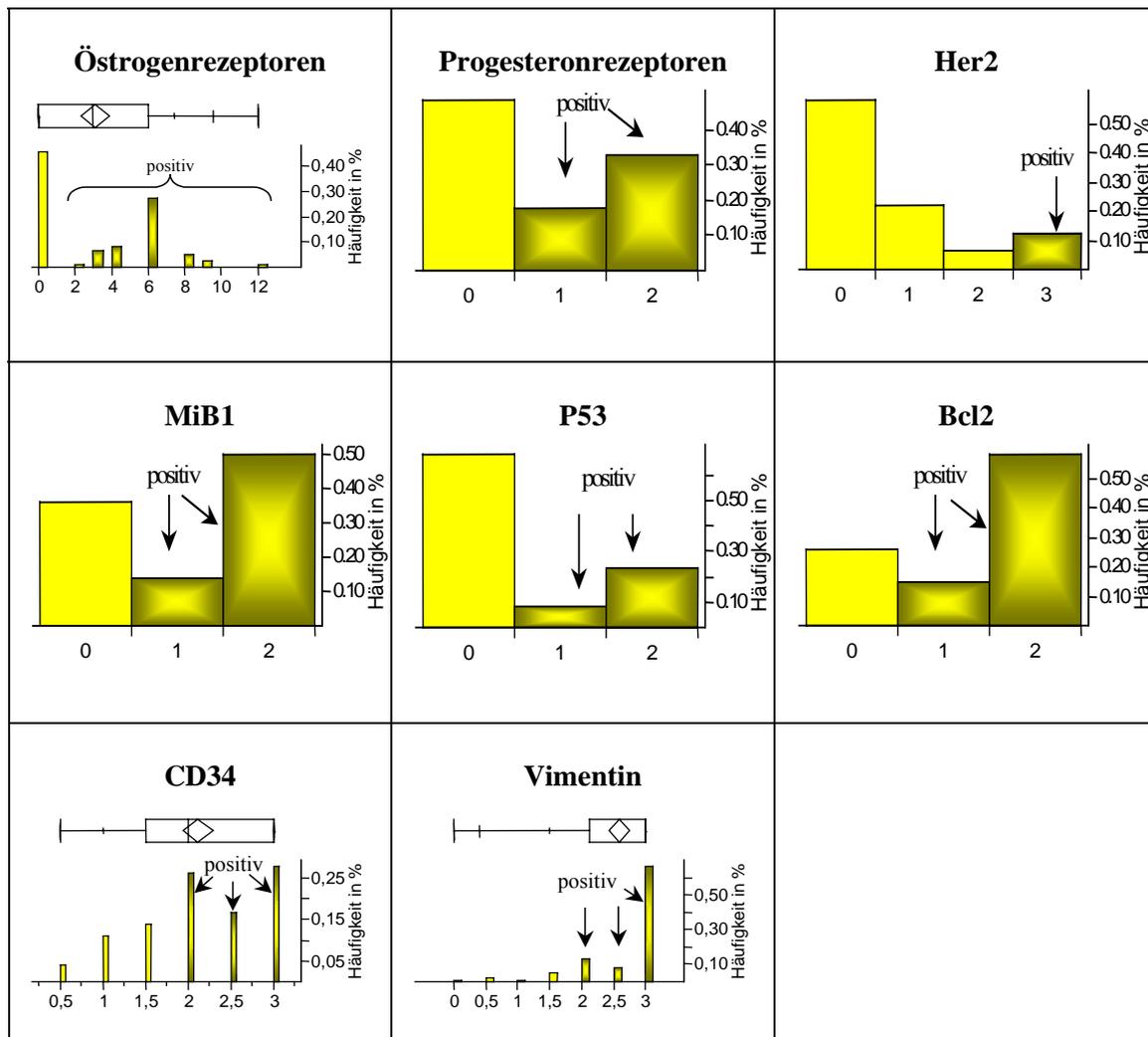


**m) TS-Färbung**, 40x. Gesamtscore 10: 5% der MK-Zellen stark angefärbt (Zytoplasma).

**Abb. 3.1** Immunhistochemische Beurteilung von Parametern an Paraffingewebeschnitten eines MK (Studienprobe Nr. 8).

Im folgenden ist die Verteilung der mittels IHC analysierten Parameter dargestellt (Abb. 3.2). Die Subklassen „positiv“ vs. „negativ“ für die univariate Überlebensanalyse wurden farblich differenziert (hell- und dunkelgelb).

Die Verteilung der Parameter wird in jeweils 2 gekennzeichneten Subklassen (z.B. positiv oder negativ, siehe Kapitel 2.5) dargestellt. Die Subklassen werden in der univariaten Überlebensanalyse korreliert (Kapitel 3.3).



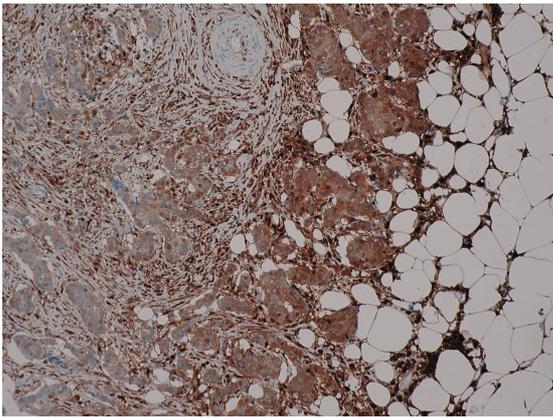
**Abb. 3.2** Häufigkeiten und Verteilungen der mittels IHC analysierten Parameter bei n = 72 Patientinnen.

In den Säulen- sowie dazugehörigen Mosaik-Diagrammen sind die Subklassen „positiv“ und „negativ“ zur Durchführung der univariaten Überlebensanalysen gelb bzw. dunkelgelb markiert. Im Kastendiagramm zeigt die Spitze des Rhombus den Mittelwert an, der vertikale Strich im Rhombus den Median.

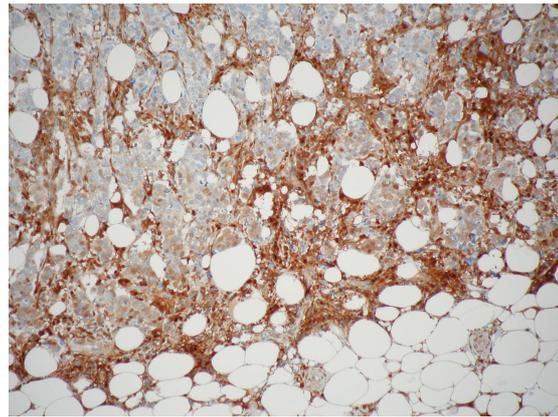
### 3.1.3 Häufigkeiten und Verteilungen der prädiktiven Biomarker TP, DPD und TS analysiert mittels Immunhistochemie

Die immunhistochemischen semi-quantitativen Analysen von TP, DPD und TS wurden nach dem Anteil positiv gefärbter MK-Zellen sowie der Färbeintensität beurteilt (siehe Kapitel 2.4.3).

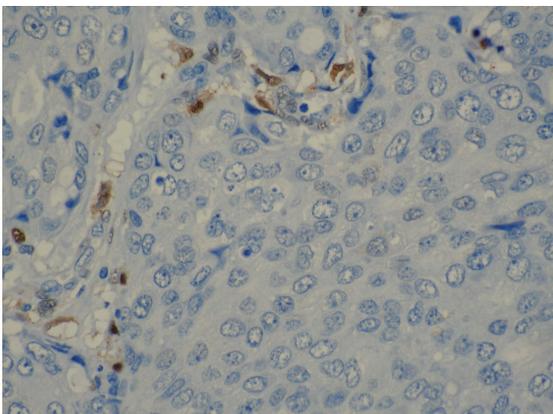
Abb. 3.3 zeigt beispielhaft typische immunhistochemische Färbemuster für TP, DPD und TS.



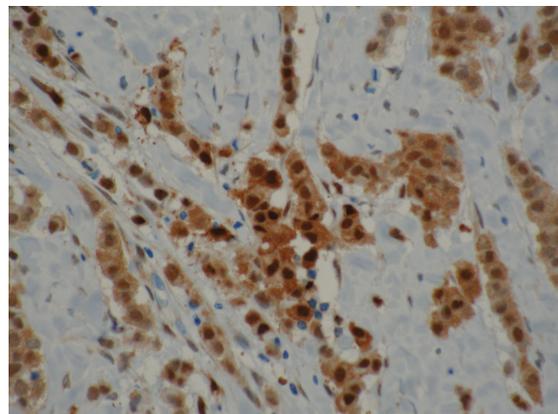
**a) TP-Färbung** Invasionsfront, 10x. Stärkere Färbung der MK-Zellen an der Invasionsfront im Vergleich zur Tumormitte (Studienprobe 39, Gesamtscore 50).



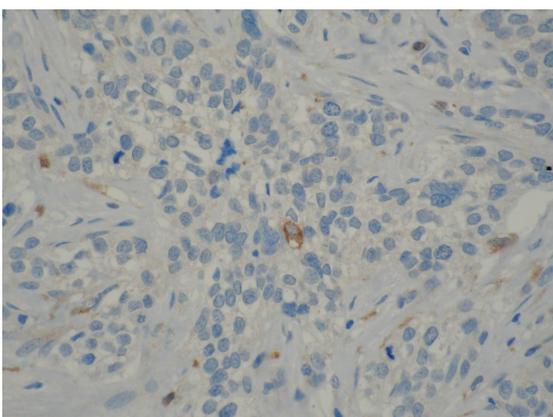
**b) TP-Färbung** Invasionsfront, 10x. Starke Färbung der Stromazellen (Studienprobe 39, andere Stelle).



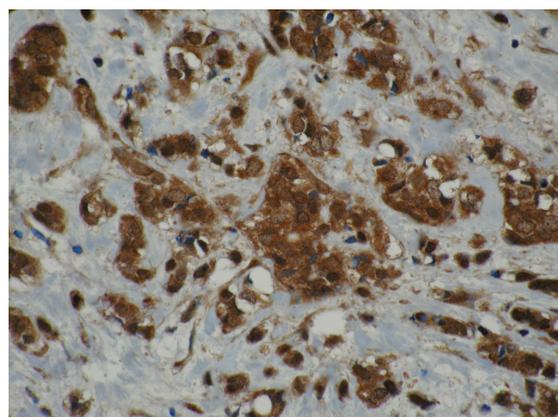
**c) Schwache TP-Färbung**, 40x. Gesamtscore 5: 5% der Zellen färben schwach an. Einzelne Stromazellen färben positiv (Studienprobe 36).



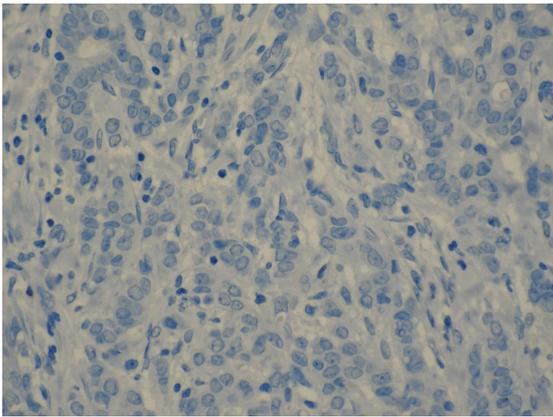
**d) Starke TP-Färbung**, 40x. Gesamtscore 270: 90% der Zellen mit zytoplasmatischer und partiell nukleärer Färbung (Studienprobe 62).



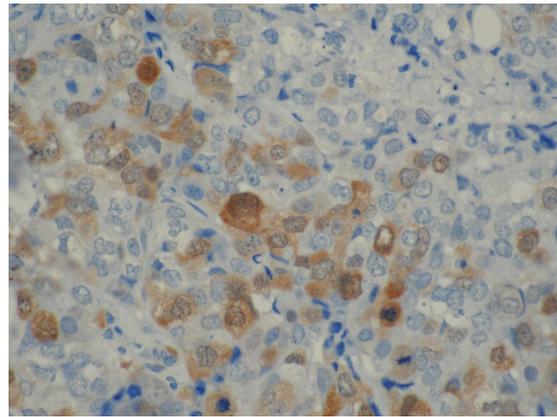
**e) Schwache DPD-Färbung**, 40x. Gesamtscore 2: 2% der Zellen färben schwach an (Studienprobe 69).



**f) Starke DPD-Färbung**, 40x. Gesamtscore 270: 90% der Zellen färben sehr stark an (Studienprobe 42).



**g) TS-Färbung**, 40x. Gesamtscore 0:  
Tumorzellen färben nicht an (Studienprobe 16).



**h) Starke TS-Färbung**, 40x. Gesamtscore 90:  
30% der MK-Zellen färben sehr stark an.  
Stromazellen färben nicht an (Studienprobe 30).

**Abb. 3.3** Immunhistochemische Beurteilung von TP, DPD und TS.

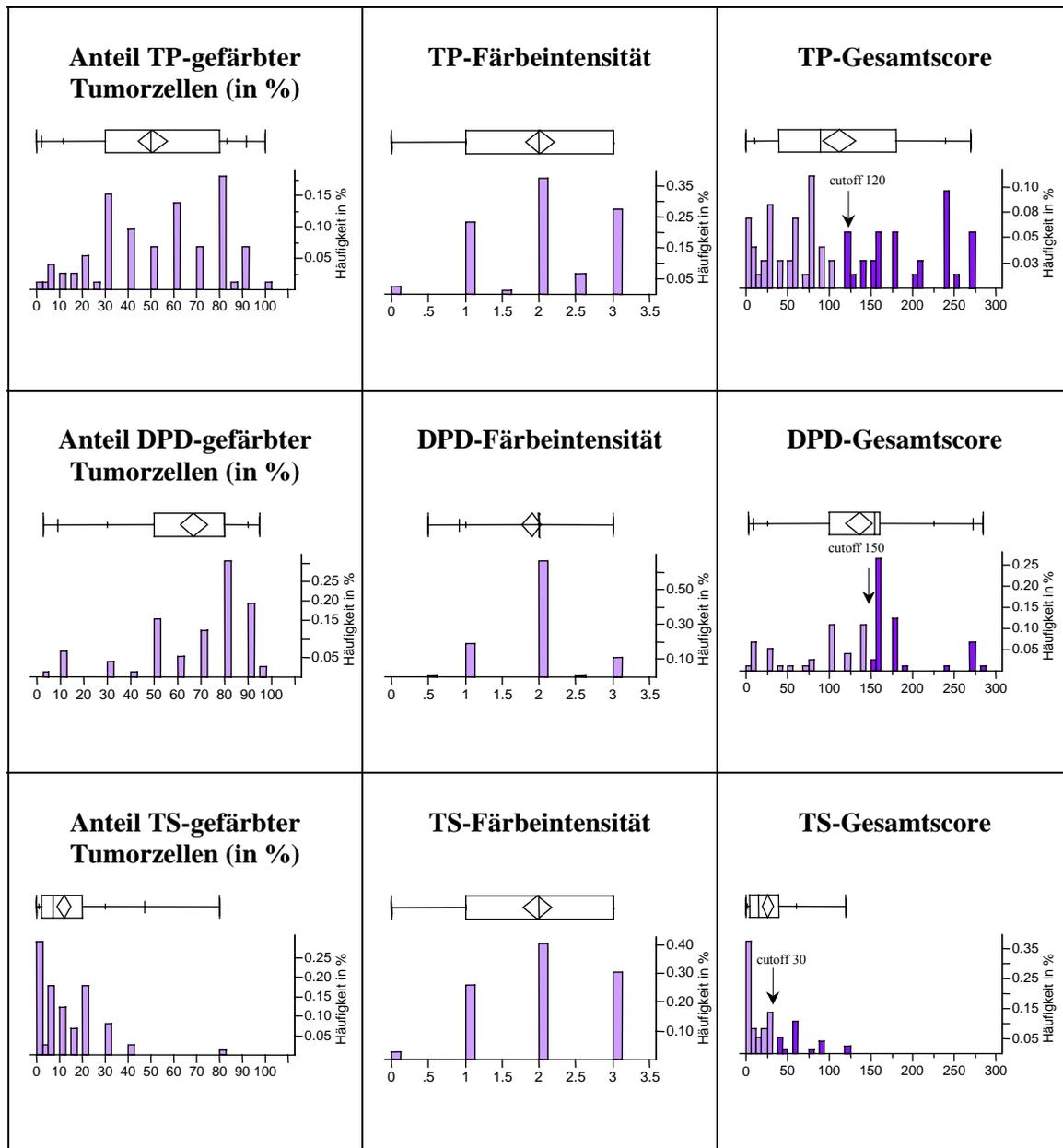
Die Gewebeproben zeigten einen hohen Prozentanteil (Mittelwert: 50%) von MK-Zellen mit positiver TP-Färbung. Die Färbeintensität für TP war im Mittel „stark“ (2+). Die Spannweite für den TP-Gesamtscore lag zwischen 0 und 270, der Mittelwert betrug 113 (liegt bei 42% der Spannweite), der Median 90 (liegt bei 33 % der Spannweite).

Die Gewebeproben zeigten für DPD einen sehr hohen Anteil positiver MK-Zellen (Mittelwert: 80%). Die Färbeintensität war hier im Mittel „stark“ (2+). Die Spannweite für den DPD-Gesamtscore lag zwischen 3 und 285, der Mittelwert betrug 136 (liegt bei 48% der Spannweite), der Median 155 (liegt bei 55% der Spannweite).

Die Gewebeproben zeigten in der TS-Färbung nur einen niedrigen Prozentanteil positiv gefärbter MK-Zellen (Mittelwert 7,5). Die Färbeintensität für TS war im Mittel „stark“ (2+). Die Spannweite für den Gesamtscore lag zwischen 0 und 120, der Mittelwert betrug 26 (liegt bei 20% der Spannweite), der Median 15 (liegt bei 11% der Spannweite).

Insgesamt waren die TP-Ergebnisse gleichmässig breit über die gesamte Spannweite verteilt, während die DPD-Ergebnisse dichter um den Mittelwert lagen. Die Mehrzahl der TS-Ergebnisse lag in einem sehr niedrigen Bereich und die Scores repräsentieren eine rechtsschiefe Verteilung (siehe Abb. 3.4). Negative Ergebnisse gab es bei TP (n=2) sowie bei TS (n=2).

Für die immunhistochemisch ermittelte TP/DPD Ratio lag die Spannweite zwischen 0,01 und 20, der Mittelwert bei 1,55, der Median bei 0,69. Für die TS/DPD Ratio lag die Spannweite zwischen 0 und 6, der Mittelwert bei 0,36, der Median bei 0,13.



**Abb. 3.4** Häufigkeiten und Verteilungen der mittels IHC analysierten Enzyme TP, DPD und TS in den Tumoren von n=72 Patientinnen mit MK.

In den Säulen-Diagrammen für den Gesamtscore ist die Aufteilung in zwei Subklassen mittels eines „cutoff“ – Wertes (für die univariate Überlebensanalysen) farblich gekennzeichnet. Im Kastendiagramm zeigt die Spitze des Rhombus den Mittelwert an, der vertikale Strich im Rhombus den Median.

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden von zwei Pathologen unabhängig voneinander begutachtet, um die Inter-Observer-Varianz zu beurteilen.

Der VK (in % vom Mittelwert) betrug für die Beurteilung des Gesamtscores 29 (TP), 26 (DPD) und 46 (TS). Für den Anteil der gefärbten Tumorzellen als auch für die Färbeintensität waren die Unterschiede geringer als für den Gesamtscore (Tab. 3.1). Die grösste Übereinstimmung wurde bei der Beurteilung der Färbeintensität erzielt.

Absolut übereinstimmende Ergebnisse für alle drei Enzyme (VK=0) wurden in 15-22% der Fälle für den Gesamtscore ermittelt, in 24-30% für die Beurteilung des Anteils der gefärbten Tumorzellen und in 55-67% für die Färbeintensität.

In 52% (TP und DPD) und 22% (TS) der Doppelanalysen betragen die VK 0 bis 20 %.

In 48% (TP und DPD) und 78% (TS) der Doppelanalysen überschritten die VK 20 %.

	TP			DPD			TS		
	PT	FI	Score	PT	FI	Score	PT	FI	Score
<b>VK gesamt</b>	24	12	29	18	12	26	43	16	46
<b>VK = 0</b>	30% (n=21)	55% (n=40)	22% (n=16)	28% (n=20)	67% (n=48)	21% (n=15)	24% (n=17)	67% (n=48)	15% (n=11)
<b>0 &lt; VK ≤ 20</b>			30% (n=21)			31% (n=22)			7% (n=5)
<b>VK &gt; 20</b>			48% (n=35)			48% (n=35)			78% (n=56)

**Tab. 3.1** Interobserver-Varianz der immunhistochemischen Analyse.

„VK“=Variationskoeffizient, Angabe in %; „PT“=Prozent der angefärbten Tumorzellen;

„FI“=Färbeintensität der Tumorzellen; „Score“=Gesamtscore (PTx FI)

Ausgewertet wurden nur die IHC-Ergebnisse eines Beobachters (R.P.).

### 3.1.4 Häufigkeiten und Verteilungen der prädiktive Biomarker TP, DPD und TS analysiert mittels RT-PCR

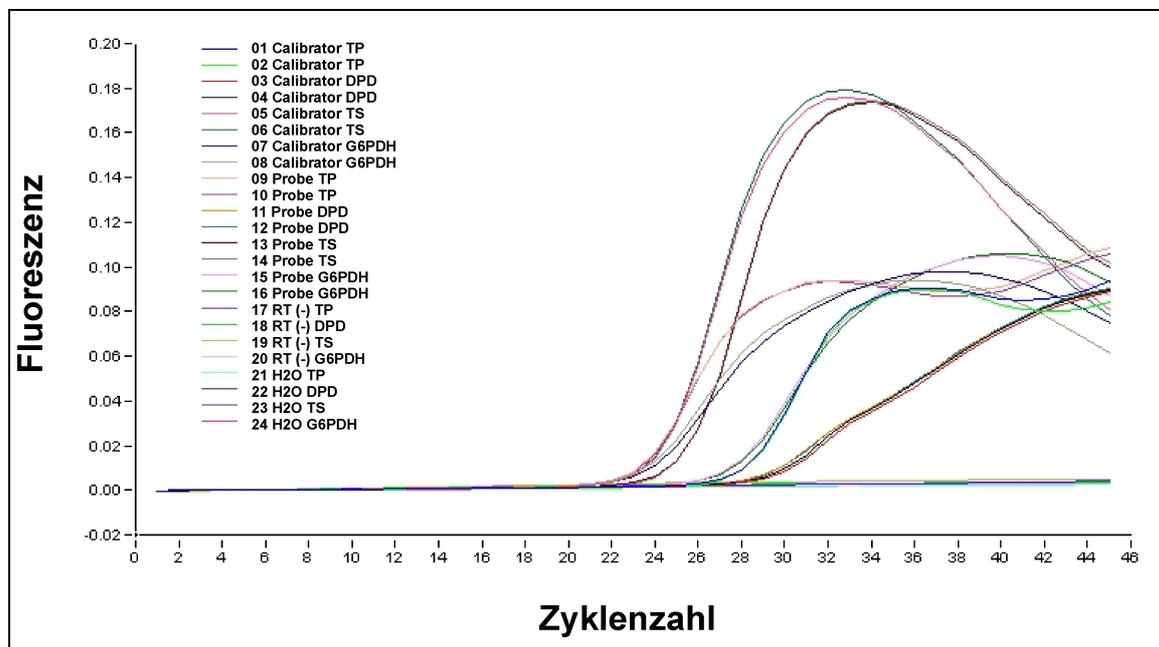
Von 91 mit Lasermikrodissektion oder Makrodissektion untersuchten Gewebeproben konnten in 80% (n=72) der Proben Messergebnisse in der RT-PCR für mindestens zwei der drei untersuchten Enzyme erzielt werden (für TP n=69, für DPD n=62 und für TS n=72).

Die RT-PCR-Ergebnisse von 17 Laser-mikrodissezierten Patientenproben aus den Jahren 1992 bis 1998 (unabhängig vom Jahrgang) mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden, da die Messwerte für alle Enzyme ausserhalb der linearen Messbereiche lagen (zu wenig oder keine mRNA detektierbar). Auch eine Makrodissektion oder die Analyse einer anderen Probe desselben Tumors blieben in diesen Fällen erfolglos.

Bei 2 Proben war der Anteil an invasivem Karzinom zu gering (weniger als 200 Zellen/Gewebeschnitt). Trotz Bearbeitung mehrerer Gewebeschnitte desselben Paraffinblocks war die Ausbeute an Zellen durch Laser-Mikrodissektion, die etwa 7000 Zellen betragen sollte, unzureichend und die extrahierte RNA war für eine erfolgreiche Analyse in nachfolgender RT-PCR-Reaktion zu gering.

Von den 72 Gewebeproben wurden, abhängig vom Ausmass des invasiven Tumorzellanteils in der Probe, 33 Laser-mikrodisseziert und 39 makrodisseziert.

Abb. 3.5 zeigt ein typisches Monitorbild der RT-PCR einer Probe mit dem LightCycler System.



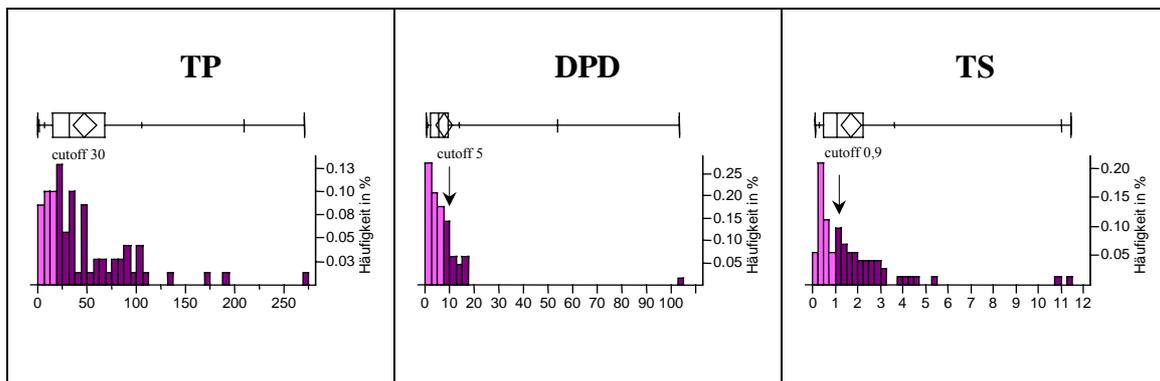
**Abb. 3.5** Quantifikation von TP, DPD und TS mRNA aus FFPE-Gewebe mit dem LightCycler.

Kurvenverlauf der RT-PCR aus Probe 7 mit Doppelbestimmungen der Enzyme und des Kalibrators sowie Einfachbestimmungen der Kontrollen (RT(-), H<sub>2</sub>O).

Häufigkeiten und Verteilungen der mittels RT-PCR analysierten Enzyme aus Gewebeproben sind in Tab. 3.2 und Abb. 3.6 dargestellt.

	TP	DPD	TS	TP/DPD normiert	TS/DPD normiert
n (gesamt)	69	62	72	58	62
Median	31,56	5,38	1,09	15,54	0,25
Mittelwert	47,95	7,76	1,69	24,39	0,51
Minimum	0,61	0,30	0,14	0,22	0,004
Maximum	270,80	103,45	11,4	254,80	3,14

**Tab. 3.2** RT-PCR Messwerte der Enzyme TP, DPD und TS im Verhältnis zum Kalibrator (normalisierte Ratios).



**Abb. 3.6** Häufigkeiten und Verteilungen der mittels RT-PCR analysierten Enzyme TP, DPD und TS im Verhältnis zum Kalibrator (normalisierte Ratios).

In den Säulen-Diagrammen ist die Aufteilung in zwei Subklassen durch den „cutoff“-Wert (für die univariate Überlebensanalysen) farblich gekennzeichnet. Die Spannweiten der Ergebnisse sind für die Enzyme sehr unterschiedlich (verschiedene Einteilungen der X-Achse). Im Kastendiagramm zeigt die Spitze des Rhombus den Mittelwert an, der vertikale Strich im Rhombus den Median.

Zur Analyse der biologischen Reproduzierbarkeit wurde von drei Gewebeproben aus dem gleichen Tumoreal sowohl RNA aus Laser-mikrodissezierten (LM) als auch makrodissezierten (MD) Zellen vergleichsweise untersucht (Tab. 3.3). Weiterhin wurden von zwei Gewebeproben (A und B) von Patientinnen, die der Studie nicht angehörten, Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass mit Ausnahme der TP-Bestimmung bei Probe A die Abweichung maximal 10 Einheiten (Ratio von Zielgen zu Referenzgen) betrug (bei

TP-Messung der Probe A: 19 Einheiten), der Median lag bei 2,6 Einheiten. Tendentiell lagen also auch bei Wiederholung die Ergebnisse im vorher ermittelten Messbereich.

Beim Vergleich von Laser-Mikrodissektion und Makrodissektion betragen die mittleren VK 27% (TP), 63% (DPD) und 20% (TS).

Der Vergleich der doppelten Laser-Mikrodissektion der Proben A und B ergab mittlere VK von 4 % (TP), 41% (DPD) und 16% (TS), der Vergleich der doppelten Makrodissektion beider Proben VK von 16% (TP), 61% (DPD) und 47% (TS).

Die Reproduzierbarkeit war damit höher, wenn gelaserte Tumorzellen statt nur Areale mit angereicherten Tumorzellen (Makrodissektion) verwendet wurden.

	<b>Proben- nummer</b>	<b>TP</b>	<b>DPD</b>	<b>TS</b>
	52 (LM)	5,86	0,88	0,39
	52 (MD)	11,48	1,88	0,43
	68 (LM)	8,38	2,52	0,14
	68 (MD)	7,68	12,07	0,10
	87 (LM)	14,24	3,77	0,36
	87 (MD)	20,99	6,63	0,30
	A (LM)	20,84	1,96	0,49
	A (LM 2)	21,12	2,32	0,53
	A (MD)	31,37	4,24	0,68
	A (MD 2)	49,06	8,47	1,65
	B (LM)	3,40	1,93	0,36
	B (LM 2)	3,06	0,66	0,25
	B (MD)	3,87	0,41	0,22
	B (MD 2)	3,78	1,31	0,36
<b>LM vs. MD</b>	<b>VK</b>	<b>27%</b>	<b>63%</b>	<b>20%</b>
<b>LM vs. LM</b>	<b>VK</b>	<b>4%</b>	<b>40%</b>	<b>16%</b>
<b>MD vs. MD</b>	<b>VK</b>	<b>16%</b>	<b>61%</b>	<b>47%</b>

**Tab. 3.3** Varianzanalyse der RT-PCR-Ergebnisse (normalisierte Ratios) nach Zellgewinnung durch Laser-Mikrodissektion im Vergleich zu Makrodissektion (n=5).

Einige Proben von invasivem MK wiesen zusätzlich ausgeprägte duktales Carcinoma in situ (DCIS) Anteile auf, also Vorstufen eines invasiven MK.

Bei vier Tumorproben wurden die Enzyme TP, DPD und TS sowohl im invasiven als auch im DCIS-Anteil untersucht (Tab. 3.4).

Invasives Carcinom vs. DCIS	TP	DPD	TS	TP/DPD normiert
Probe 54 (invasives MK)	32,48	9,87	0,27	10,14
Probe 54 (DCIS)	9,26	2,13	1,89	37,54
Probe 58 (invasives MK)	24,7	4,62	0,75	12,47
Probe 58 (DCIS)	25,66	3,70	0,62	16,18
Probe 80 (invasives MK)	22,89	103,5	0,35	0,52
Probe 80 (DCIS)	8,49	7,15	0,15	2,77
Probe 81 (invasives MK)	46,25	15,12	0,21	7,14
Probe 81 (DCIS)	46,73	319,04	0,39	0,34
<b>Spannweite der Abweichung (Faktor)</b>	<b>1-3,5</b>	<b>1,2-21</b>	<b>1,2-7</b>	<b>1,3-21</b>

**Tab. 3.4** Vergleichende Analyse der Enzyme TP, DPD und TS mittels RT-PCR im invasiven sowie im DCIS-Anteil der gleichen Tumorprobe (n=4).

Bereits in diesen vier Studienproben ist eine deutliche Heterogenität erkennbar. Während in der Studienprobe 58 nur kleine Differenzen der Werte aller drei Enzyme zwischen invasivem und DCIS Anteil bestehen (maximal bei DPD mit 1,3-fachem Unterschied), bestehen bei den anderen Studienproben mehr als 20-fache Unterschiede bei einem der Enzyme oder der TP/DPD Ratio. Es ist auch kein Trend erkennbar, dass entweder invasiver oder DCIS-Anteil höhere Expressionen eines oder mehrerer Enzyme aufweisen.

### 3.2 Korrelation der Ergebnisse von selektierten Parametern

Die Korrelation der Ergebnisse basiert auf dem Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten  $r$  und wurde nur für diejenigen Gewebeproben ( $n=59$ ) durchgeführt, für welche Ergebnisse aller Parameter vorlagen (limitierender Faktor waren fehlende RT-PCR-Ergebnisse für alle Enzyme bei insgesamt 32 Proben).

#### 3.2.1 Korrelation der klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter

Je grösser der Primärtumor war, desto eher war er ER- ( $r=-0,29$ ;  $p=0,0251$ ) und PR-negativ ( $r=-0,36$ ;  $p=0,0052$ ) sowie MiB1 hochproliferativ ( $r=0,25$ ;  $p=0,0558$ ). Das gleiche galt für den Tumordifferenzierungsgrad, je niedriger das MK differenziert war desto eher war es ER- ( $r=-0,46$ ;  $p=0,0002$ ) und PR-negativ ( $r=-0,40$ ;  $p=0,0019$ ) sowie MiB1 hochproliferativ ( $r=0,51$ ;  $p<0,0001$ ). Ferner waren niedrig differenzierte Karzinome eher p53-positiv ( $r=0,28$ ;  $p=0,0340$ ). MiB1 hochproliferative MK waren eher fortgeschrittene Karzinome und gering differenziert, sie waren eher PR- ( $r=-0,39$ ;  $p=0,0020$ ) und vor allem ER-negativ ( $r=-0,61$ ;  $p<0,0001$ ) sowie p53-positiv ( $r=0,43$ ;  $p=0,0005$ ) und bcl2-negativ ( $r=-0,30$ ;  $p=0,0221$ ). P53-positive MK waren häufiger gering differenziert, hochproliferativ, ER- ( $r=-0,32$ ;  $p=0,0129$ ) und PR-negativ ( $r=-0,25$ ;  $p=0,0558$ ) sowie Her2 positiv ( $r=0,40$ ;  $p=0,0016$ ). Bcl2-positive MK waren eher niedrig proliferativ ( $r=-0,30$ ;  $p=0,0221$ ), Her2- ( $r=-0,35$ ;  $p=0,0074$ ) und p53-negativ ( $r=-0,41$ ;  $p=0,0011$ ) sowie ER-positiv ( $r=0,38$ ;  $p=0,0030$ ).

Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie das UICC-Stadium zeigten keinerlei Korrelation mit den anderen Parametern. Ebenso wenig war CD34 zu anderen Parametern korreliert.

Tab. 3.5 gibt den Spearmanschen Korrelationskoeffizienten und den p-Wert für die Korrelation der klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter wieder.

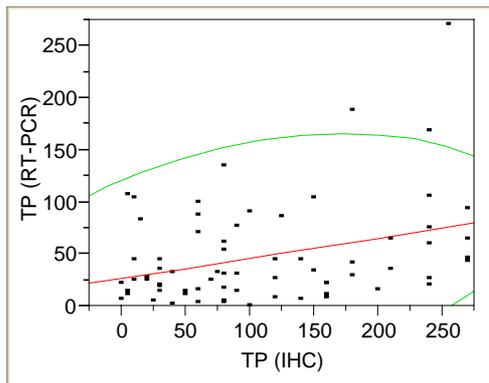
	UICC	T	N	G	Alter	ER	PR	MiB1	Her2	p53	bcl2	CD34
<b>UICC</b>	1,000											
<b>T</b>	0,48 0,0001	1,000										
<b>N</b>	0,61 <,0001	-0,04 0,7512	1,000									
<b>G</b>	0,04 0,7547	0,15 0,2602	-0,21 0,1123	1,000								
<b>Alter</b>	0,22 0,0953	0,14 0,2957	0,19 0,1606	-0,03 0,8232	1,000							
<b>ER</b>	-0,11 0,4067	-0,29 0,0251	0,30 0,0195	-0,46 0,0002	-0,04 0,7830	1,000						
<b>PR</b>	-0,19 0,1402	-0,36 0,0052	0,17 0,2114	-0,40 0,0019	0,01 0,9412	0,66 <,0001	1,000					
<b>MiB1</b>	-0,006 0,9638	0,25 0,0558	-0,30 0,0203	0,51 <,0001	0,05 0,7226	-0,61 <,0001	-0,39 0,0020	1,000				
<b>Her2</b>	0,06 0,6781	-0,03 0,7994	0,09 0,4958	0,08 0,5280	0,23 0,0866	-0,03 0,7994	0,18 0,1821	0,041 0,7562	1,000			
<b>p53</b>	-0,08 0,5324	0,04 0,7840	-0,28 0,0307	0,28 0,0340	0,14 0,3019	-0,32 0,0129	-0,25 0,0558	0,43 0,0005	0,40 0,0016	1,000		
<b>bcl2</b>	0,05 0,7045	0,005 0,9695	0,16 0,2296	-0,24 0,0649	-0,14 0,2874	0,38 0,0030	0,08 0,5468	-0,30 0,0221	-0,35 0,0074	-0,41 0,0011	1,000	
<b>CD34</b>	-0,21 0,1044	-0,11 0,4181	-0,04 0,7667	-0,13 0,3324	-0,31 0,0156	0,12 0,3587	0,05 0,7334	-0,12 0,3554	-0,01 0,9282	0,004 0,9759	0,20 0,1265	1,000

**Tab. 3.5** Spearmanscher Korrelationskoeffizient r (obere Zahl im Quadranten) sowie p-Wert unter Annahme der Nullhypothese (untere Zahl im Quadranten) für die Korrelation der klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter. Bestehende Korrelationen gelb unterlegt. Inverse Korrelationen sind mit (-) gekennzeichnet.  
 UICC=Stadium; T=Tumorgrösse; N=Nodalstatus; G=Tumor-Differenzierungsgrad („grading“)

### 3.2.2 Methodenvergleich RT-PCR und IHC für TP, DPD und TS

#### TP

Die TP-Werte aus den RT-PCR-Analysen zeigen nur eine niedrige positive Korrelation mit den IHC-Ergebnissen ( $r=0,37$ ,  $p=0,0045$ ). Abb. 3.7 veranschaulicht die bivariate Regressionsanalyse. Weitere Korrelationsergebnisse zwischen TP und TS bzw. DPD sowie den TP/DPD Ratios analysiert mittels IHC und RT-PCR finden sich in Tab. 3.6.



**Abb. 3.7** Regression von **TP** (IHC vs. RT-PCR)

Die Dichte-Ellipse (grün) zeigt den Bereich an, in den 95% der Werte fallen.

Lineare Beziehung (rot):  
 $TP (RT-PCR) = 26,957946 + 0,1908799 TP (IHC)$   
 $r=0,37, p=0,0045$   
 $n=69$

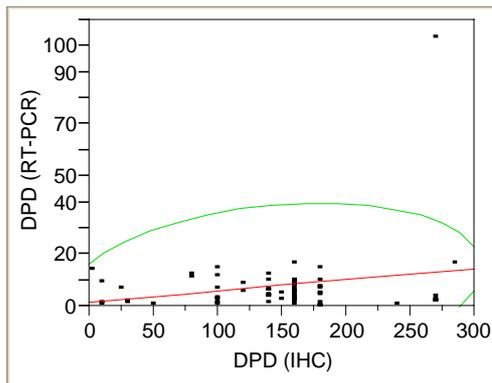
<b>TP (RT-PCR) Korrelation</b>		
<b>Niedrig</b> <b>(<math>0,25 \leq r &lt; 0,45</math>)</b>	<b>Mittel</b> <b>(<math>0,45 \leq r &lt; 0,6</math>)</b>	<b>Hoch</b> <b>(<math>r \geq 0,6</math>)</b>
<b>TP (IHC)</b> ( $p=0,0045$ )	<b>DPD (RT-PCR)</b> ( $p<0.0001$ )	<b>TS (RT-PCR)</b> ( $p<0.0001$ )
<b>TP/DPD (IHC)</b> ( $p=0,0289$ )	<b>TP/DPD (RT-PCR)</b> ( $p<0.0001$ )	

**Tab. 3.6** Korrelation von **TP (RT-PCR-Werte)** mit: TP (IHC-Werte), DPD und TS (RT-PCR-Werte) und TP/DPD Ratio (IHC- und RT-PCR-Werte).

### DPD

Die Ergebnisse der IHC- und RT-PCR-Analysen waren für DPD nicht untereinander korreliert ( $r=0,05$ ;  $p=0,6953$ ), vgl. Abb. 3.8.

Die TP/DPD Ratios beider Methoden ( $r=0,02$ ;  $p=0,8552$ ) korrelieren ebenfalls nicht. Weitere Ergebnisse zu Korrelationen der DPD (RT-PCR) mit den anderen Enzymen finden sich in Tab. 3.7.



**Abb. 3.8** Regressionsanalyse von DPD (IHC vs. RT-PCR)

Die Dichte-Ellipse (grün) zeigt den Bereich an, in den 95% der Werte fallen.

Lineare Beziehung (rot):

$$\text{DPD (RT-PCR)} = 1,2884658 + 0,0443856 \text{ DPD (IHC)}$$

$r=0,05$ ;  $p=0,6953$

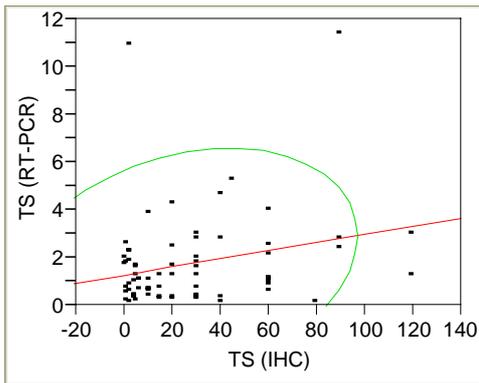
$n=62$

<b>DPD (RT-PCR) Korrelation</b>	
<b>Niedrig</b> <b>(0,25 ≤ r &lt; 0,45)</b>	<b>Mittel</b> <b>(0,45 ≤ r &lt; 0,6)</b>
<b>TP (IHC)</b> ( $r=0,39$ ; $p=0,0024$ )	<b>TP (RT-PCR)</b> ( $r=0,57$ ; $p<0,0001$ )
<b>TS (RT-PCR)</b> ( $r=0,30$ ; $p=0,0219$ )	<b>TS/DPD (RT-PCR)</b> ( $r=-0,52$ ; $p<0,0001$ )
<b>TP/DPD (IHC)</b> ( $r=0,29$ ; $p=0,0268$ )	
<b>TP/DPD (RT-PCR)</b> ( $r=-0,32$ ; $p=0,0126$ )	

**Tab. 3.7** Korrelation (niedrig und mittel) von **DPD ( RT-PCR-Werte)** mit: TP (IHC- und RT-PCR-Werte), TS (RT-PCR-Werte), TS/DPD Ratios (RT-PCR-Werte) und TP/DPD Ratios (IHC- und RT-PCR-Werte).

### TS

Die TS-Ergebnisse aus IHC und RT-PCR zeigten nur eine niedrige positive Korrelation ( $r=0,28$ ;  $p=0,0343$ ), vgl. Abb. 3.9. Die TS/DPD Ratios beider Methoden ergaben eine mittlere positive Korrelation ( $r=0,48$ ;  $p<0,0001$ ). Weitere Ergebnisse zu Korrelationen der TS (RT-PCR) mit den anderen Enzymen finden sich in Tab. 3.8.



**Abb. 3.9** Regressionsanalyse von TS (IHC vs. RT-PCR)

Die Dichte-Ellipse (grün) zeigt den Bereich an, in den 95% der Werte fallen.

Lineare Beziehung (rot):  
 $TS (RT-PCR) = 1,2620778 + 0,0170994 TS (IHC)$   
 $r=0,28; p=0,0343$   
 $n=72$

TS (RT-PCR) Korrelation	
Niedrig ( $0,25 \leq r < 0,45$ )	Hoch ( $r \geq 0,6$ )
<p><b>TS (IHC)</b> (<math>r=0,30; 0,0191</math>)</p> <p><b>DPD (RT-PCR)</b> (<math>r=0,30; 0,0219</math>)</p> <p><b>TP/DPD (RT-PCR)</b> (<math>r=0,36; 0,0050</math>)</p> <p><b>TS/DPD (IHC)</b> (<math>r=0,37; p=0,0041</math>)</p>	<p><b>TS/DPD (RT-PCR)</b> (<math>r=0,60; p&lt;0,0001</math>)</p> <p><b>TP (RT-PCR)</b> (<math>r=0,61; p&lt;0,0001</math>)</p>

**Tab. 3.8** Korrelation (niedrig und hoch) von **TS (RT-PCR-Werte)** mit: TS (IHC-Werte), DPD (RT-PCR-Werte), TP/DPD Ratios (RT-PCR-Werte), TS/DPD Ratios (IHC- und RT-PCR-Werte) und TP (RT-PCR-Werte).

### 3.2.3 Korrelation der klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter mit den Enzymen TP, DPD und TS

#### TP (IHC)

MK mit hohen TP-Werten in der IHC waren eher nodalpositiv ( $r=0,29; p=0,0247$ ) sowie bcl2-positiv ( $r=0,29; p=0,0256$ ).

**TP (RT-PCR)**

Die durch RT-PCR ermittelten TP-Werte der MK-Proben zeigten eine niedrige positive Korrelation mit dem Tumor-Differenzierungsgrad ( $r=0,38$ ;  $p=0,0033$ ). Das heisst, TP-exprimierende Tumoren waren geringer differenziert.

**DPD (IHC)**

Je höher die durch IHC ermittelten DPD-Werte der MK-Proben waren, desto eher waren sie ER- ( $r=0,42$ ;  $p=0,0009$ ) und PR-positiv ( $r=0,34$ ;  $p=0,0094$ ).

**DPD (RT-PCR)**

Die durch RT-PCR ermittelten DPD-Werte der MK-Proben zeigten eine niedrige positive Korrelation zum Nodalstatus ( $r=0,28$ ;  $p=0,0313$ ). Tumore mit höherer DPD-Expression waren eher MiB1 niedrig proliferativ ( $r=-0,33$ ,  $p=0,0101$ ) und p53-negativ ( $r=-0,33$ ;  $p=0,0107$ ).

**TP/DPD Ratio (IHC)**

Patientinnen mit einer höheren TP/DPD Ratio der MK waren eher nodalpositiv ( $r=0,33$ ;  $p=0,0114$ ) und hatten ein fortgeschritteneres Krankheitsstadium ( $r=0,27$ ;  $p=0,0353$ ).

Je höher die TP/DPD Ratio in der IHC desto grösser war die CD34-Mikrogefässdichte ( $r=-0,27$ ;  $p=0,0404$ ).

**TP/DPD Ratio (RT-PCR)**

MK mit grosser TP/DPD Ratio in der RT-PCR waren niedrig differenziert ( $r=0,53$ ;  $p<0,0001$ ) und höher MiB1-proliferativ ( $r=0,39$ ;  $p=0,0021$ ).

**TS (IHC)**

MK mit hohen TS-Werte in der IHC waren niedrig differenziert ( $r=0,45$ ;  $p=0,0003$ ) und MiB1 höher proliferativ ( $r=0,37$ ;  $p=0,0035$ ) sowie eher p53-positiv ( $r=0,31$ ;  $p=0,0156$ ).

TS-exprimierende MK waren eher bcl2-negativ ( $r=-0,31$ ;  $p=0,0173$ ) und ER-negativ ( $r=-0,34$ ;  $p=0,0078$ ).

**TS (RT-PCR)**

MK mit hoher TS-Expression waren niedrig differenziert ( $r=0,38$ ;  $p=0,0029$ ) sowie MiB1 höher proliferativ ( $r=0,28$ ;  $p=0,0306$ ) und eher ER- ( $r=-0,32$ ;  $p=0,0132$ ) und PR-negativ ( $r=-0,34$ ;  $p=0,0087$ ).

**TS/DPD (IHC)**

MK mit höheren TS/DPD Ratios in der IHC waren eher niedrig differenziert ( $r=0,44$ ;  $p=0,0005$ ), MiB1 höher proliferativ ( $r=0,39$ ;  $p=0,0021$ ) und p53-positiv ( $r=0,31$ ;  $p=0,0184$ ). Tumoren mit höheren TS/DPD Ratios waren eher ER- ( $r=-0,44$ ;  $p=0,0006$ ) und PR-negativ ( $r=-0,26$ ;  $p=0,0492$ ) sowie bcl2-negativ ( $r=-0,33$ ;  $p=0,0105$ ).

**TS/DPD (RT-PCR)**

Die durch RT-PCR ermittelte TS/DPD Ratios der MK waren MiB1 höher proliferativ ( $r=0,51$ ;  $p<0,0001$ ) und niedriger differenziert ( $r=0,41$ ;  $p=0,0014$ ) sowie eher p53-positiv ( $r=0,29$ ;  $p=0,0236$ ). Diese MK waren eher ER- ( $r=-0,52$ ;  $p<0,0001$ ) und PR-negativ ( $r=-0,36$ ;  $p=0,0045$ ), aber auch eher nodalnegativ ( $r=-0,32$ ;  $p=0,0141$ ).

Tab. 3.9 gibt einen Überblick über alle Korrelationen der mittels IHC und RT-PCR analysierten Enzyme TP, DPD, TS sowie der TP/DPD und TS/DPD Ratios mit den klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parametern.

	UICC	T	N	G	Alter	ER	PR	MiB1	Her2	p53	bcl2	CD34
<b>TP</b> (IHC)	0,20	0,05	0,29	-0,02	-0,05	0,17	-0,01	-0,16	0,05	-0,09	0,29	-0,08
	0,1300	0,6906	0,0247	0,8804	0,7238	0,1961	0,9521	0,2197	0,7280	0,5206	0,0256	0,5546
<b>TP</b> (PCR)	0,13	0,06	0,04	0,38	0,02	-0,15	-0,13	0,02	-0,24	-0,15	0,12	-0,12
	0,3134	0,6746	0,7490	0,0033	0,8652	0,2617	0,3243	0,8931	0,0707	0,2524	0,3797	0,3707
<b>DPD</b> (IHC)	-0,11	-0,16	0,01	-0,05	-0,16	0,42	0,34	-0,24	-0,005	-0,22	0,25	0,20
	0,3897	0,2154	0,9323	0,7261	0,2158	0,0009	0,0094	0,0699	0,9719	0,0947	0,0590	0,1249
<b>DPD</b> (PCR)	0,17	-0,09	0,28	-0,07	-0,08	0,24	0,04	-0,33	-0,22	-0,33	0,16	0,04
	0,2098	0,50	0,0313	0,6040	0,5671	0,0657	0,7644	0,0101	0,1012	0,0107	0,2216	0,7812
<b>TP/DPD</b> (IHC)	0,27	0,08	0,33	0,04	-0,06	-0,07	-0,21	-0,03	-0,02	-0,002	0,13	-0,27
	0,0353	0,5582	0,0114	0,7868	0,6610	0,5890	0,1047	0,7941	0,9079	0,9874	0,3234	0,0404
<b>TP/DPD</b> (PCR)	-0,03	0,15	-0,23	0,53	0,09	-0,45	-0,19	0,39	0,03	0,21	-0,08	-0,16
	0,8380	0,2649	0,0811	<,0001	0,4985	0,0004	0,1466	0,0021	0,8350	0,1136	0,5404	0,2292
<b>TS</b> (IHC)	0,03	0,07	-0,11	0,45	0,09	-0,34	-0,17	0,37	0,13	0,31	-0,31	-0,05
	0,8446	0,6086	0,3988	0,0003	0,4875	0,0078	0,1950	0,0035	0,3272	0,0156	0,0173	0,7162
<b>TS</b> (PCR)	0,11	0,15	-0,07	0,38	-0,09	-0,32	-0,34	0,28	-0,19	0,003	-0,05	-0,04
	0,4120	0,2682	0,5935	0,0029	0,4830	0,0132	0,0087	0,0306	0,1510	0,9811	0,70	0,7554
<b>TS/DPD</b> (IHC)	0,07	0,10	-0,09	0,44	0,17	-0,44	-0,26	0,39	0,09	0,31	-0,33	-0,21
	0,6022	0,4616	0,5018	0,0005	0,1924	0,0006	0,0492	0,0021	0,4939	0,0184	0,0105	0,1038
<b>TS/DPD</b> (PCR)	-0,06	0,11	-0,32	0,41	0,005	-0,52	-0,36	0,51	0,02	0,29	-0,19	-0,03
	0,6419	0,4259	0,0141	0,0014	0,9697	<,0001	0,0045	<,0001	0,8531	0,0236	0,1566	0,8399

**Tab. 3.9** Spearmanscher Korrelationskoeffizient r (obere Zahl im Quadranten) sowie p-Wert unter Annahme der Nullhypothese (untere Zahl im Quadranten) für die Korrelation der Enzyme **TP, DPD, TS** sowie der **TP/DPD und TS/DPD Ratios (IHC- und RT-PCR-Werte)** mit den klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter. Bestehende Korrelationen gelb unterlegt. Inverse Korrelationen sind mit (-) gekennzeichnet.

UICC=Stadium; T=Tumorgrösse; N=Nodalstatus; G=Tumor-Differenzierungsgrad

### 3.3 Analyse der krankheitsfreien Überlebenszeit

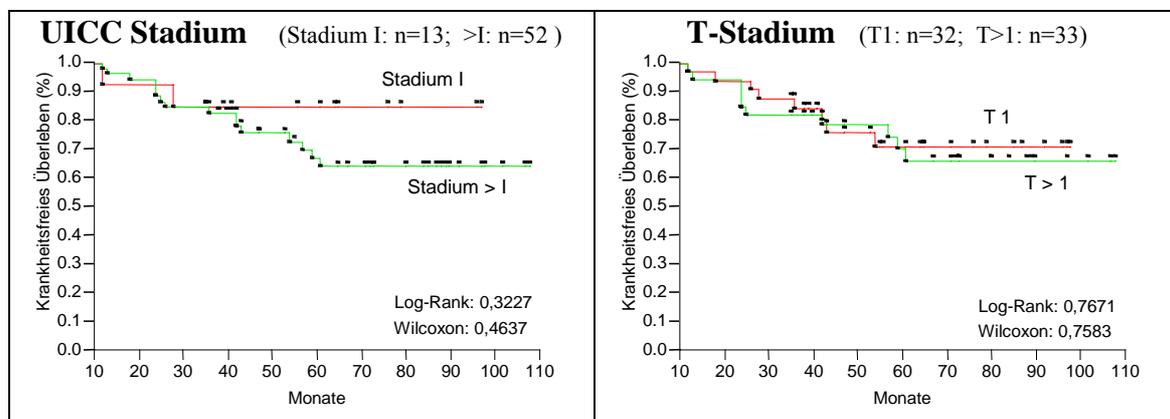
Als krankheitsfreie Überlebenszeit galt die Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen (mit oder ohne Lokalrezidiv), bzw. die krankheitsfreie Zeit bis zum Ende der Beobachtungszeit. Die Überlebenszeitanalysen wurden, wie im Kapitel 2.5 „Statistik“ beschrieben, mit Hilfe von Kaplan-Meier Kurven dargestellt.

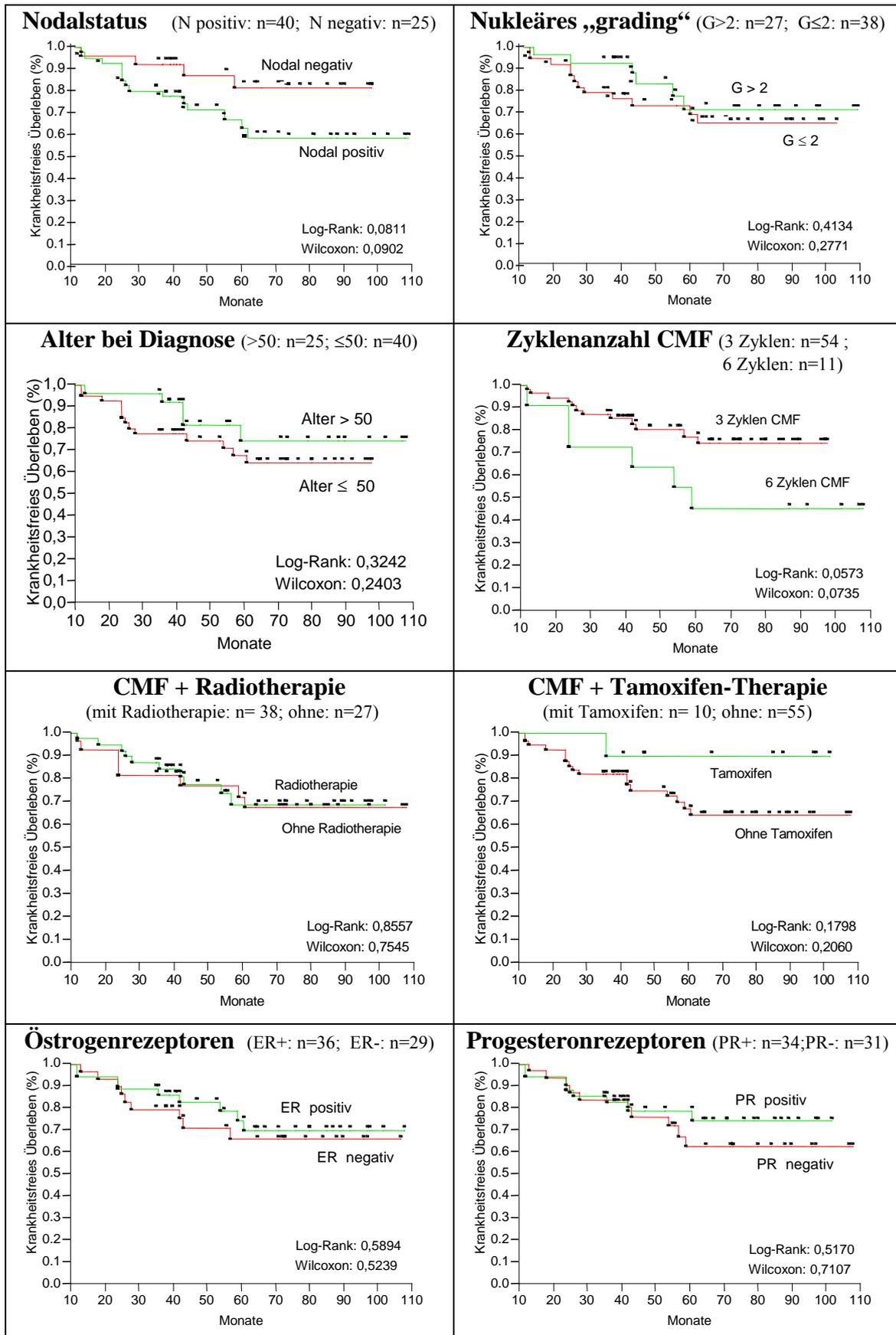
#### 3.3.1 Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit von den klinisch pathologischen und tumorbiologischen Parameter

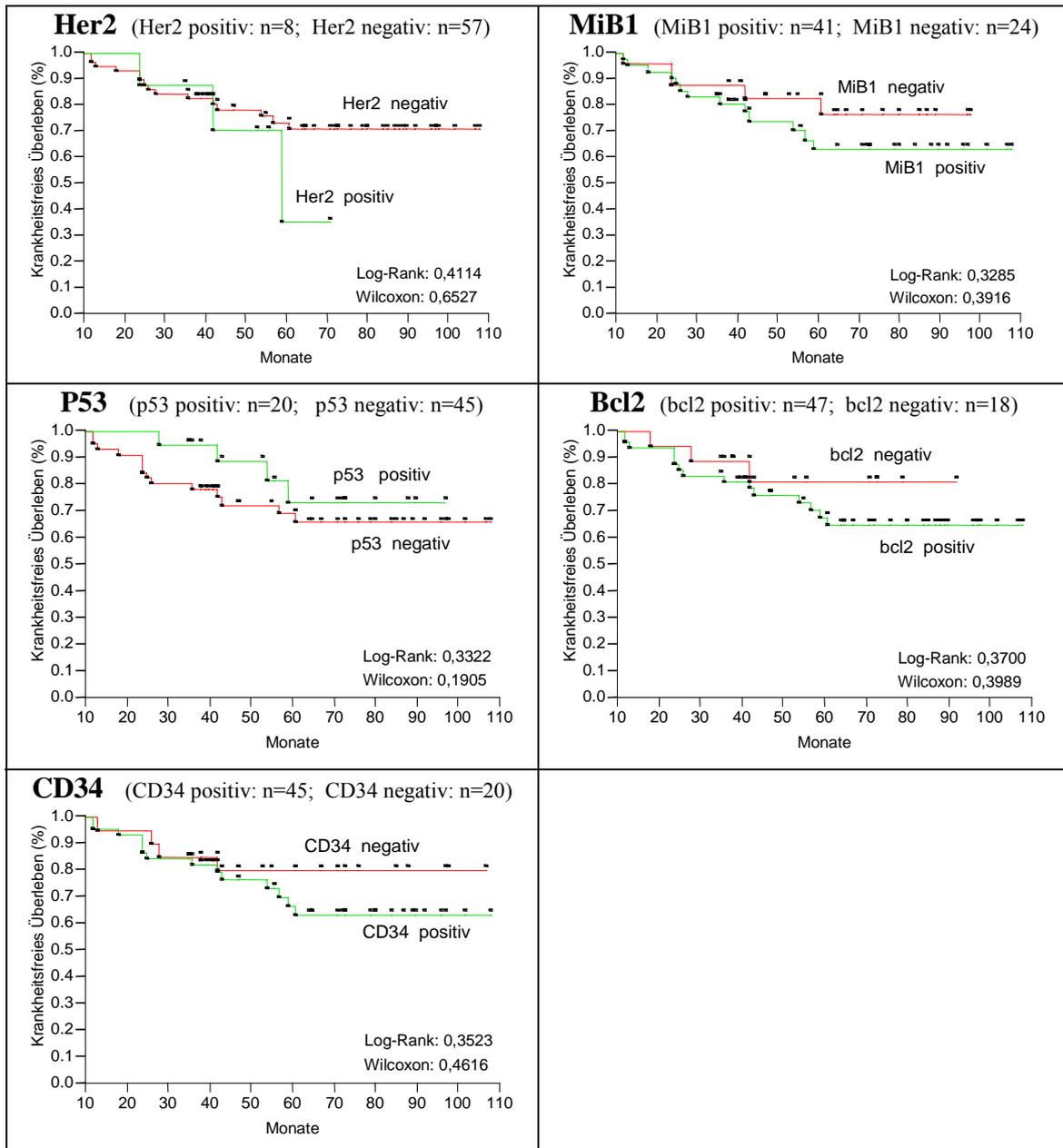
Ein Trend in der krankheitsfreien Überlebenszeit zeigte sich nur in Abhängigkeit vom Nodalstatus (Abb. 3.10; Log-Rank-p= 0,0811; Wilcoxon-p= 0,0902). Von den nodalnegativen Patientinnen überlebten in dem gegebenen Beobachtungszeitraum 80% ohne Krankheitsrezidiv, von den nodalpositiven jedoch nur 56% (Unterschied von 24%).

Unterschiede in den Therapieschemata (Radiotherapie, Tamoxifen-Therapie) führten nicht zu signifikanten Unterschieden im krankheitsfreien Überleben. Wird die Goserelin Therapie zusätzlich berücksichtigt, ergeben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientinnen mit (Tamoxifen oder Goserelin) oder ohne antihormonelle Therapie (Log-Rank-p= 0,2282; Wilcoxon-p= 0,1771).

Es bestand ein Trend, dass Patientinnen mit 3 Zyklen CMF ein besseres krankheitsfreies Überleben hatten als mit 6 Zyklen (siehe Kapitel 4.2).



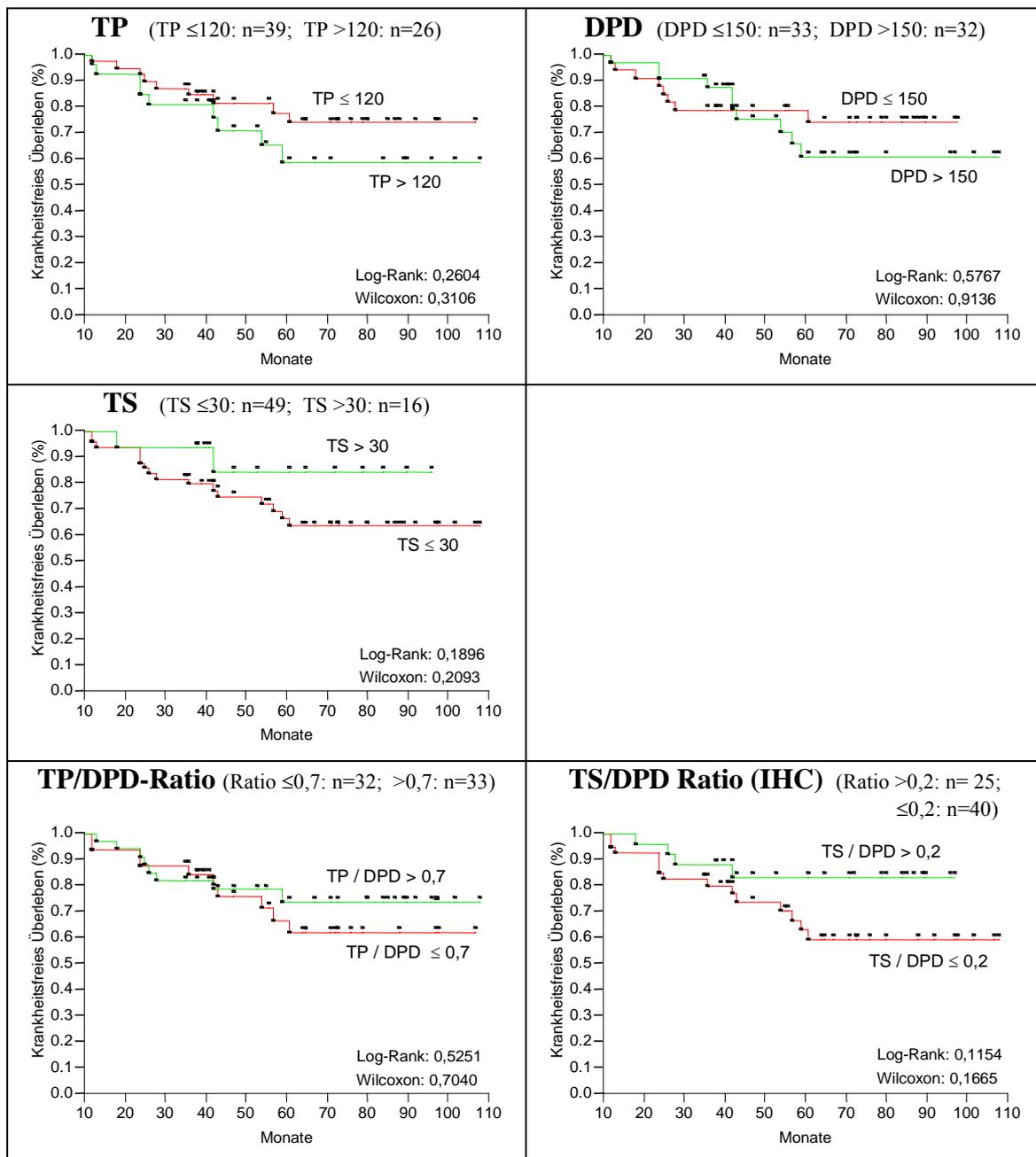




**Abb. 3.10** Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von klinisch morphologischen und tumorbiologischen Parametern (*analysiert mittels IHC*).

### 3.3.2 Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit von der Expression der Enzyme TP, DPD und TS (analysiert mit IHC)

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von den TP-, DPD- und TS-Werten im Tumor, analysiert mit IHC. Die TP/DPD und TS/DPD Ratios beeinflussen das krankheitsfreie Überleben ebenfalls nicht (Abb. 3.11).

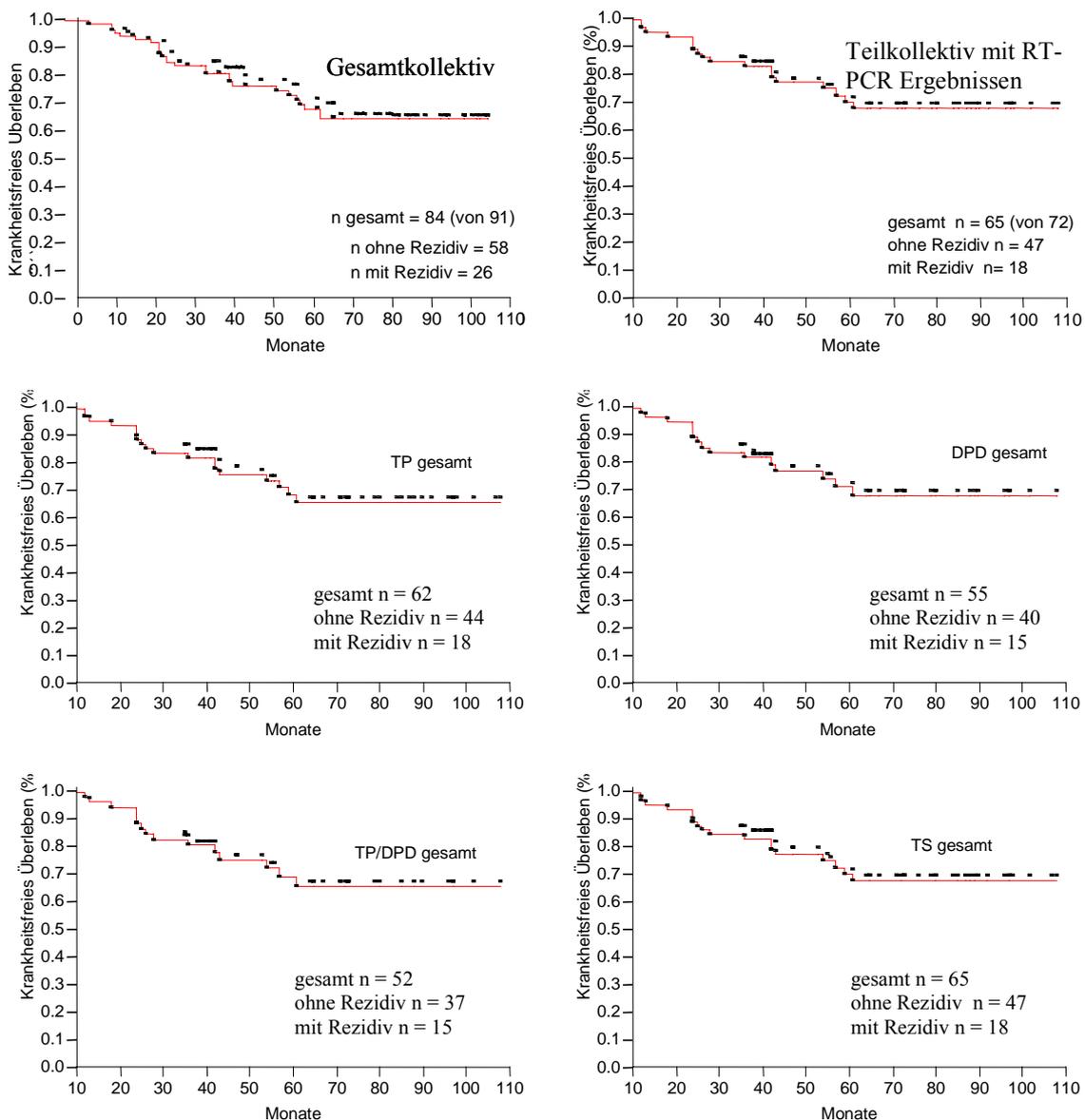


**Abb. 3.11** Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit von den Werten der Enzyme TP, DPD und TS und deren Ratios (*analysiert mit IHC*).

### 3.3.3 Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit von der Expression der Enzyme TP, DPD und TS (analysiert mit RT-PCR)

#### *Verkleinerung der Patientenkollektive durch methodisches Versagen der RT-PCR und Einfluss auf die Überlebenszeiten des Restkollektivs*

Von insgesamt 91 MK-Proben konnten nur für 72 Proben verlässliche RT-PCR-Ergebnisse erzielt werden (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12** Überlebenskurven für das Gesamtkollektiv aller Patientinnen (n=91) und für das Teilkollektiv, für welches verlässliche RT-PCR-Werte für mindestens 2 Enzyme vorlagen (n=72). 7 Patientinnen mit kontralateralem Brustkrebs und mit Lokalrezidiven ohne Fernmetastasen wurden von den Überlebensanalysen ausgeschlossen. Im Vergleich dazu Überlebenskurven für die Kollektive, bei welchen eines der genannten Enzyme oder eine berechnete Ratio vorlagen.

Die Gesamtüberlebensanalyse zeigt, dass sich das krankheitsfreie Überleben nach 60 Monaten für die Gruppe von 91 Patientinnen mit 65% im Vergleich zur Gruppe von 72 Patientinnen mit 68% nicht signifikant unterscheidet. Die methodisch bedingte Verkleinerung des Gesamtkollektivs von  $n = 91$  auf  $n = 72$  verursacht damit keine systematische Veränderung der Überlebensanalyse im kleineren Kollektiv.

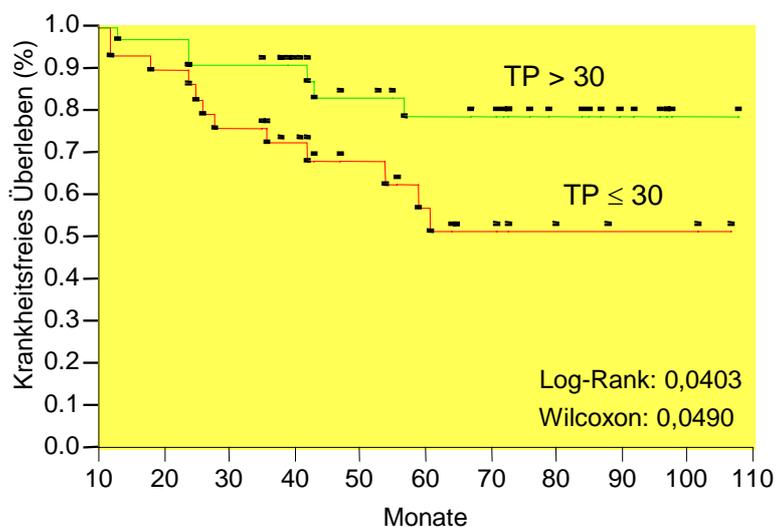
Von den 72 Patientinnen mit RT-PCR-Ergebnissen wurden 7 Patientinnen, die Lokalrezidive ohne Fernmetastasen oder ein kontralaterales MK entwickelten, von der Überlebensanalyse ausgeschlossen.

Die Überlebenskurven der Patientengruppen, für die Enzymwerte experimentell ermittelt werden konnten, unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant. Damit ist gesichert, dass durch die methodisch bedingten fehlende Ergebnisse für alle oder einzelne Enzyme in einigen Patientenproben keine Verschiebung der Überlebenskurven in den jeweilig verbleibenden Patientenkollektiven zu beobachten war.

### *Einfluss der Enzymwerte auf die Überlebenszeit*

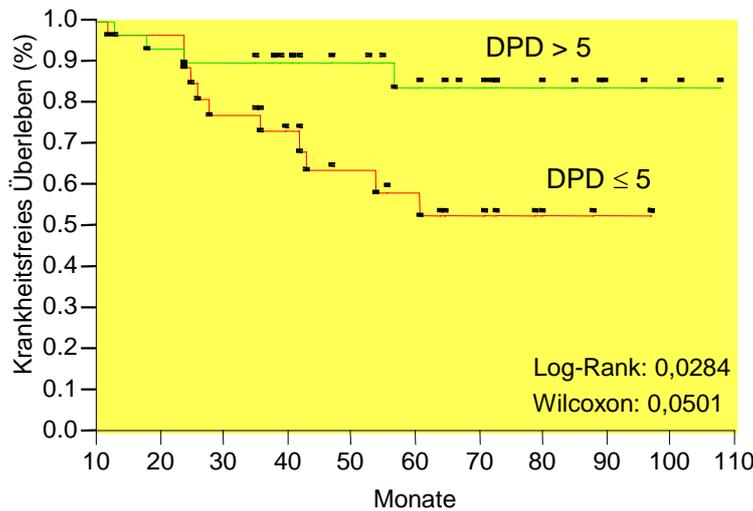
Das krankheitsfreie Überleben der Patientinnen ist signifikant abhängig von den Enzymwerten, wenn sie mittels RT-PCR analysiert werden.

Patientinnen mit TP-Werten  $> 30$  überlebten zu 78% rezidivfrei, wohingegen nur 50% der Patientinnen mit TP-Werten  $\leq 30$  rezidivfrei überlebten (Abb. 3.13, signifikanter Unterschied von 28% nach 60 Monaten Beobachtungszeit; Log-Rank- $p = 0,0403$ ; Wilcoxon- $p = 0,0490$ ).



**Abb. 3.13 TP analysiert mit RT-PCR.** Kaplan-Meier-Überlebenskurven (TP  $> 30$ :  $n = 33$ ; TP  $\leq 30$ :  $n = 29$ )

83% der Patientinnen mit DPD-Werten  $> 5$  hatten kein Rezidiv in der Beobachtungszeit, während von den Patientinnen mit DPD-Werten  $\leq 5$  nur 52% krankheitsfrei überlebten (Abb. 3.14, signifikanter Unterschied von 32% nach 60 Monaten Beobachtungszeit; Log-Rank-p= 0,0284; Wilcoxon-p= 0,0501).

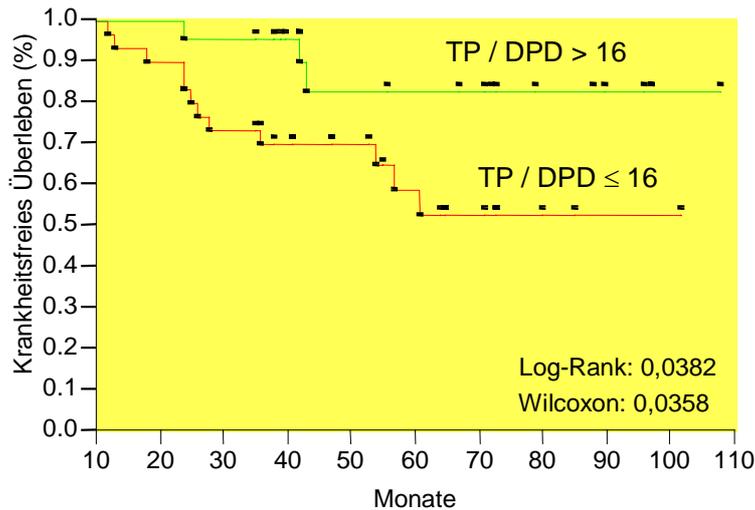


**Abb. 3.14 DPD analysiert mit RT-PCR.**  
Kaplan-Meier-Überlebenskurven  
(DPD  $> 5,0$ : n=29;  
DPD  $\leq 5,0$ : n=26)

Patientinnen mit einer TP/DPD Ratio  $> 16$  überlebten zu 82% rezidivfrei, wohingegen nur 52% der Patientinnen mit einer TP/DPD Ratio  $\leq 16$  rezidivfrei überlebten (Abb. 3.13, signifikanter Unterschied von 30% nach 60 Monaten Beobachtungszeit; Log-Rank-p= 0,0403; Wilcoxon-p= 0,0490).

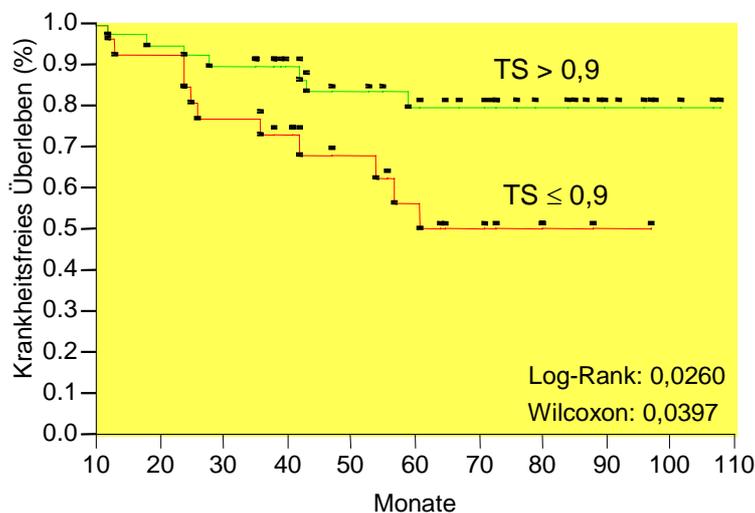
Die TP/DPD Ratios lassen erkennen, dass Patientinnen mit einer Ratio  $> 16$  einen signifikanten 30% grösseren krankheitsfreien Überlebensvorteil hatten als Patientinnen mit Ratios  $\leq 16$  (Abb. 3.15, Log-Rank-p= 0,0382; Wilcoxon-p= 0,0358). In beiden Subgruppen finden sich sowohl Tumore mit niedrigen als auch hohen Enzymwerten für DPD und TP, die Ratio der Werte war hier nur entscheidend für den Unterschied im Überleben.

Die Trennung in krankheitsfreies Überleben vs. Rezidiventstehung wurde nicht signifikant grösser durch die Bestimmung der TP/DPD Ratio im Vergleich zur Bestimmung der beiden Enzyme.



**Abb. 3.15 TP/DPD normiert analysiert mit RT-PCR.** Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Ratio >16: n=22; ≤16: n=30)

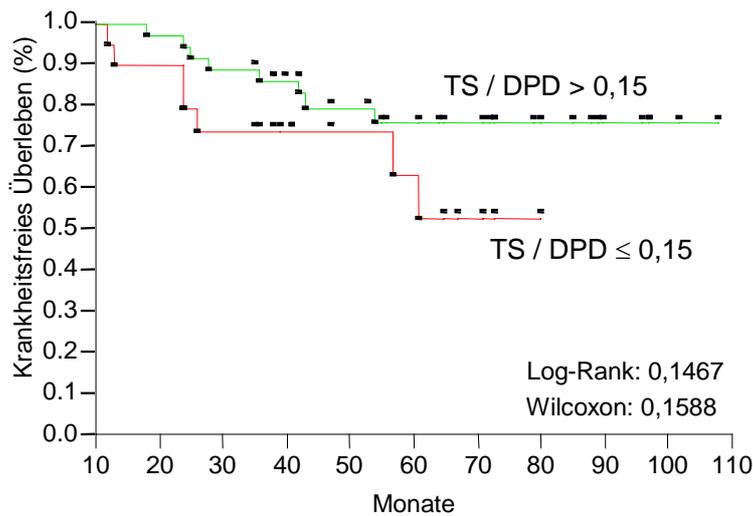
Patientinnen mit TS-Werten > 0,9 überlebten zu 80% die Beobachtungszeit ohne Rezidiv, hingegen mit TS-Werten ≤ 0,9 nur zu 50% (Abb. 3.16, signifikanter Unterschied von 30%; Log-Rank-p= 0,0260; Wilcoxon-p= 0,0397).



**Abb. 3.16 TS analysiert mit RT-PCR.** Kaplan-Meier-Überlebenskurven (TS >0,9: n=39; TS ≤0,9: n=26)

Damit erreicht die prognostische/prädiktive Aussage jedes einzelnen Enzyms den Wert des Nodalstatus und übersteigt diesen sogar.

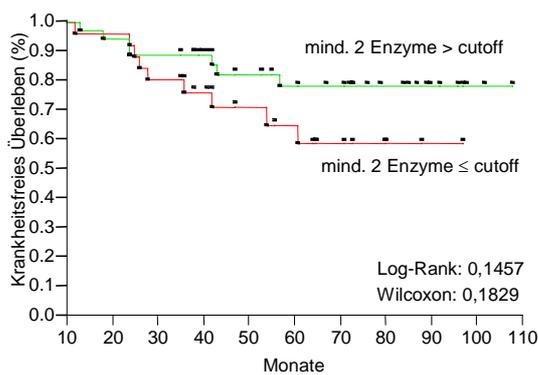
Die TS/DPD Ratio liess keine signifikanten Unterscheidungen zu (Abb. 3.17).



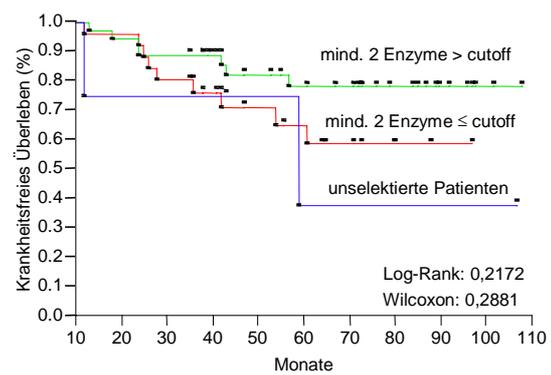
**Abb. 3.17 TS/DPD normiert analysiert mit RT-PCR.** Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Ratio >0,15: n= 19; ≤0,15: n=36)

Es gab keinen signifikanten Unterschied, wenn jeweils zwei der drei Enzyme TP, DPD und TS über bzw. unter den jeweiligen „cutoffs“ lagen (Abb. 3.18a; Log-Rank- $p= 0,1457$ ; Wilcoxon- $p= 0,1829$ ).

Abb. 3.18b zeigt zusätzlich diejenigen Patientinnen (n=4), die durch diese Klassifikation nicht erfasst wurden, da nur zwei der drei Enzyme messbar waren und diese nicht beide jeweils über bzw. unter den „cutoff“-Werten lagen (Log-Rank- $p= 0,2172$ ; Wilcoxon- $p= 0,2881$ ).



a



b

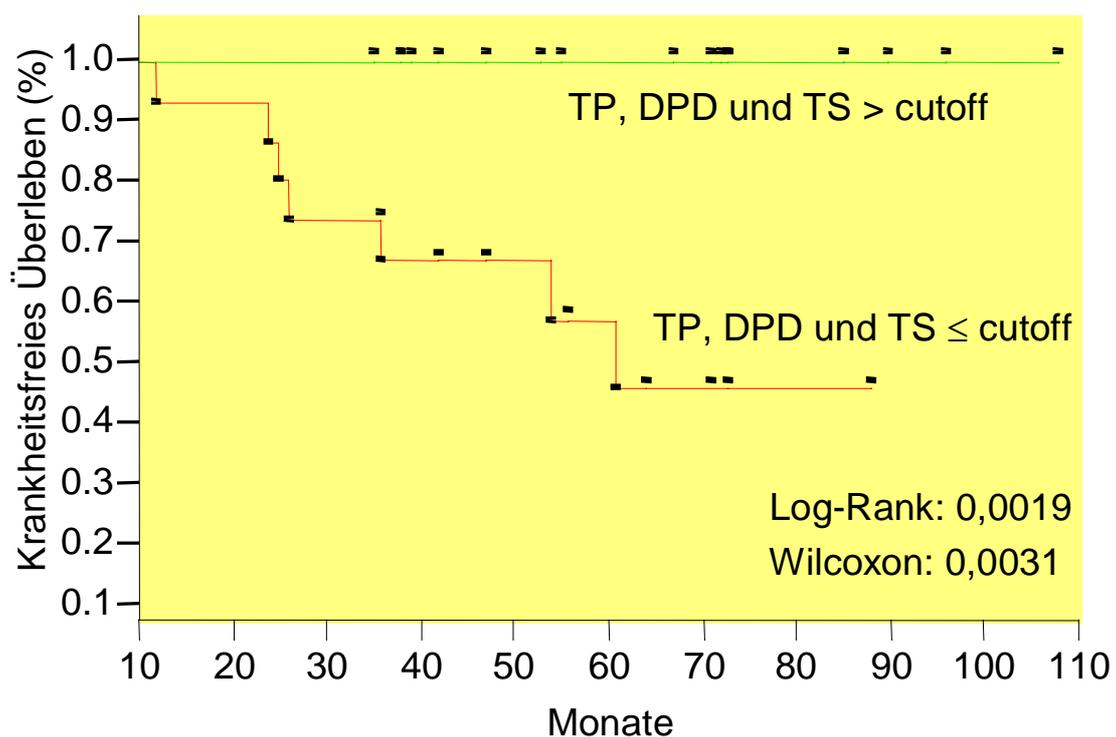
**Abb. 3.18a Mindestens 2 Enzyme > vs. ≤ „cutoff“-Wert analysiert mit RT-PCR.**

**a)** Kaplan-Meier-Überlebenskurven (>„cutoff“: n=43; ≤ „cutoff“: n=19)

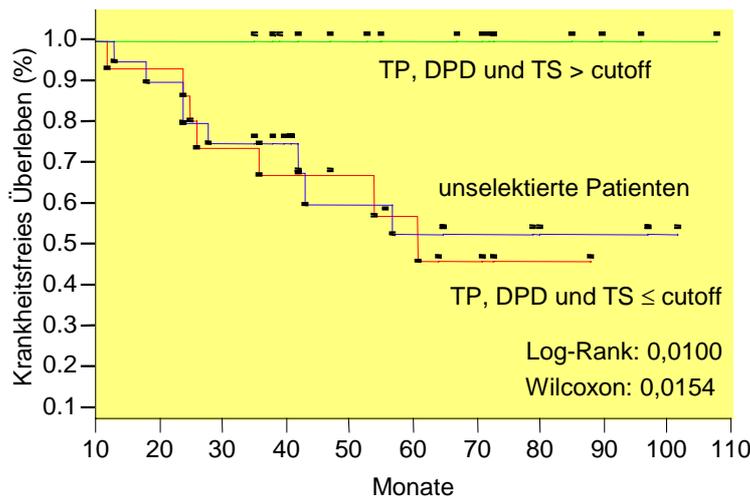
**b)** zusätzlich Patientinnen dargestellt (blau), von welchen nur 2 Enzymwerte vorlagen, von denen einer über und der andere unter dem „cutoff“-Wert lagen (n=4 unselektierte Patientinnen, davon erlitten 2 ein Rezidiv)

Die Gruppe von Patientinnen, bei welcher alle drei Enzymwerte über dem jeweiligen „cutoff“-Wert lagen (n=17), hatte ein signifikant besseres krankheitsfreies Überleben im Vergleich zur Gruppe mit Werten aller Enzyme unterhalb des gesetzten „cutoff“-Wertes (Abb. 3.19a, Log-Rank-p= 0,0019; Wilcoxon-p= 0,0031). In der gesamten Beobachtungszeit hatte keine der Patientinnen, deren drei Enzyme hoch exprimiert waren, ein Rezidiv. In der Gruppe mit allen drei Enzymwerten unterhalb des gesetzten „cutoff“-Wertes (n=15 Patientinnen) überlebten nur n=8 (53%) krankheitsfrei über 70 Monate und n=7 erlitten ein Rezidiv.

In Abb. 3.19b werden zusätzlich diejenigen Patientinnen dargestellt, die nicht zugeordnet werden konnten (n=20), da nicht alle drei Enzyme ober- oder unterhalb des „cutoff“-Wertes lagen sondern nur ein oder zwei Enzymwerte (unselektierte Patienten). Von diesen 20 Patientinnen überlebten etwa 60% (n=12) ebenso krankheitsfrei über 70 Monate.



a



**b**

**Abb. 3.19 TP, DPD und TS > vs. ≤ „cutoff“-Wert analysiert mit RT-PCR**

- a) Kaplan-Meier-Überlebenskurven (> „cutoff“: n=17; ≤ „cutoff“: n=15)
- b) Nicht selektierbare Patientengruppe blau markiert aufgenommen ( n=20, davon erlitten n=8 ein Rezidiv)

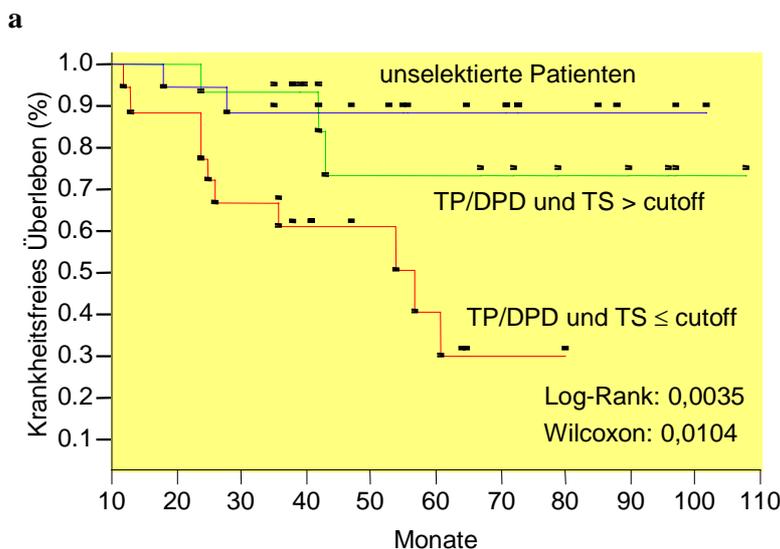
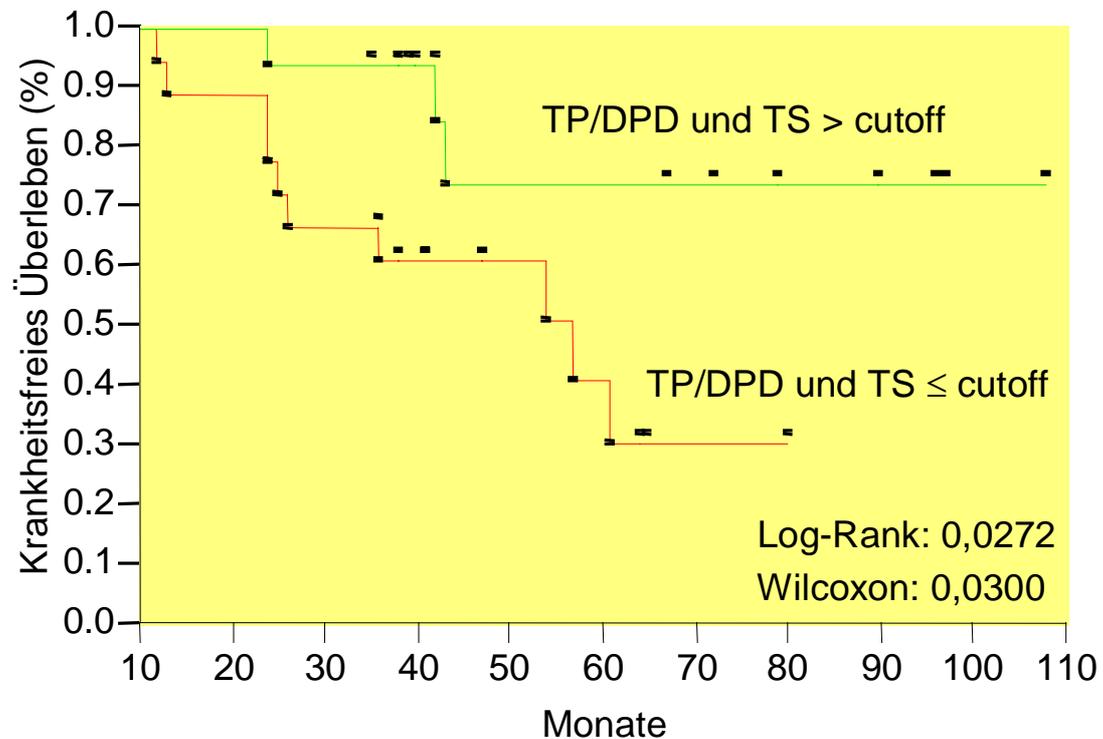
Mit dieser Klassifikation (alle drei Enzyme über einem definierten „cutoff“-Wert) werden somit insgesamt n=20 Patientinnen von n=37 mit krankheitsfreiem Überleben > 70 Monate nicht erfasst.

Hohe Expression aller drei Enzyme in der RT-PCR lässt damit eine Gruppe von Patientinnen selektieren, die zu 100% ein krankheitsfreies Überleben > 70 Monate hat (n=17). Im Restkollektiv (selektiert nach „cutoff“-Wert oder nicht selektierbar) beträgt das krankheitsfreie Überleben nur etwa 55%. Im Untersuchungsgut können mit der beschriebenen Klassifikation somit etwa 46% der Patientinnen mit MK im frühen Stadium, die adjuvant mit CMF behandelt wurden und ein krankheitsfreies Überleben > 70 Monate haben, selektiert werden. Diese haben entweder eine gute Prognose oder wurden richtig therapiert.

Patientinnen mit **TP/DPD Ratio und TS über dem jeweiligen „cutoff“-Wert** haben ebenso ein signifikant besseres krankheitsfreies Überleben als Patientinnen, deren Werte im Tumor unter den „cutoff“-Werten lagen (Abb. 3.20a; Log-Rank-p= 0,0272; Wilcoxon-p= 0,0300), die Trennschärfe erreicht jedoch nicht 100% wie bei der Kombination der Einzelenzyme.

In der Gruppe TP/DPD und TS ≤ „cutoff“-Wert (n=18) erlitten n=10 Patientinnen (55%) ein Rezidiv (45% überlebten krankheitsfrei > 70 Monate). 5 Patientinnen mit schlechtem Verlauf (33%), deren Expressionswerte für TP/DPD und TS oberhalb des

jeweiligen „cutoff“-Wertes lagen, werden bei dieser Klassifikation nicht erfasst. Damit kann diese Kombination (TP/DPD und  $TS \leq$  „cutoff“-Wert) am besten Patientinnen mit schlechtem Verlauf (66%) selektieren, die entweder eine schlechte Prognose haben oder keine optimale Therapie erhielten.



**b**

**Abb. 3.20 TP/DPD und  $TS >$  vs.  $\leq$  „cutoff“-Wert analysiert mit RT-PCR**

**a)** Kaplan-Meier-Überlebenskurven ( $>$ „cutoff“: n=16;  $\leq$  „cutoff“: n=18)

**b)** Nicht selektierbare Patientengruppe blau markiert aufgenommen (n=16, davon erlitten 3 ein Rezidiv)

In Abb. 3.20b werden zusätzlich die mit diesen Kriterien nicht selektierbaren Patientinnen gezeigt, bei denen entweder nur TS oder nur TP/DPD über- bzw. unterhalb des „cutoffs“ lagen. Diese hatten sogar signifikant weniger Rezidive in der Beobachtungszeit als die in Abb.3.19a gezeigten Gruppen.

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich somit die Biomarker TP, DPD und TS als geeignete Faktoren zur Vorhersage eines guten oder schlechteren klinischen Verlaufes. Alle Patientinnen (100% !) mit hohen Werten aller drei Enzyme (n=17) hatten ein medianes krankheitsfreies Überleben von mehr als 70 Monaten, damit ist der prognostische/ prädiktive Wert hoher Enzymwerte für krankheitsfreies Überleben sehr hoch (100%). Die Verwendung der Ratio TP/DPD plus TS (mit Werten unter definierten „cutoff“-Werten) ist am besten geeignet, Patientinnen mit schlechterem klinischen Verlauf zu identifizieren (mit nur 30% Wahrscheinlichkeit, den Beobachtungszeitraum krankheitsfrei zu überleben). Damit hat die Kombination der Ratio mit TS den höchsten prognostischen/prädiktiven Wert für die Entwicklung von Rezidiven.

Eine akkuratere Auftrennung der Patientengruppen gelingt wahrscheinlich nur unter Einbeziehung weiterer Biomarker.

Die bisher in der Literatur beschriebenen und im Routinealltag verwendeten prognostischen Faktoren wie Tumorstadium, Tumorgröße, Tumor-Differenzierungsgrad, Alter, HR-Status, p53, bcl-2, MIB1 und Her2 zeigten in unserem Patientenkollektiv keine signifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben unter CMF-Therapie.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Methoden der Enzymanalytik, präanalytische, analytische und biologische Faktoren

Die quantitative Analyse der Enzyme TP, DPD und TS ist mit verschiedenen Methoden möglich. Jede Technologie hat Vor- und Nachteile. Goldstandard unter allen Methoden ist die Enzym-Aktivitätsbestimmung. Diese benötigt jedoch grössere Mengen an Gewebe (3-5 g Gewebe für alle drei Enzyme erforderlich) und dazu Frischgewebe, das sofort nach Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden muss. Da die spezifische Aktivität der Enzyme (Substratverbrauch pro mg Enzymeiweiss) sehr niedrig ist, sind extrem aufwendige und zeitintensive Methoden mit radioaktiven Substraten und Produkten notwendig, die z.B. für TS nur in 30-50% aller Tumorgewebe überhaupt ein Resultat bringen, da die Aktivität sehr niedrig ist. Zuverlässige Analysen aus mikrodisseziertem Gewebe sind somit ausgeschlossen. Ähnliche Nachteile treffen auch für Enzymimmunoassays (ELISA) zu, obwohl diese Technologie schon relativ einfach ist und das Ergebnis bereits nach wenigen Stunden vorliegt.

Die Notwendigkeit der Korrelation von Langzeitdaten des Patientenverlaufes mit tumoranalytischen Ergebnissen schränkt die anwendbaren Testmethoden erheblich ein, da meist nur FFPE-Gewebe archiviert wird.

Zu den anwendbaren Methoden in FFPE-Geweben gehört in erster Linie die IHC. Sie ermöglicht die qualitative/semiquantitative visuelle Einschätzung der Proteinexpression von Biomarkern und deren zelluläre und subzelluläre Lokalisation. Komplexe Expressionsmuster wie bei den vorliegenden Enzymen (variable Expression in Stroma- und Tumorzellen) reduziert jedoch erheblich die Reproduzierbarkeit visueller Analysen. Zudem ist die IHC in der gesamten Präanalytik noch nicht standardisiert, was die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stark beeinträchtigt.

Die Analyse von mRNA war bisher auch nur auf Frischgewebe beschränkt. Roche Diagnostics entwickelte kürzlich Kits für die mRNA-Extraktion aus FFPE-Gewebe sowie für die quantitative Bestimmung verschiedener spezifischer mRNAs aus FFPE-Gewebe. Dazu gehören die Testkits zur Quantifizierung der mRNA von TP, DPD und TS, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Korrelation von Enzymaktivität, ELISA und quantitativer RT-PCR aus Frischgewebe und IHC an FFPE-

Gewebe wurde in zahlreichen Arbeiten beschrieben. Die Ergebnisse aus ELISA und Aktivitätsbestimmungen der genannten Enzyme korrelieren sehr gut (Ishikawa et al., 1999; Mimori et al., 1999; Mori et al., 2000; Takebayashi et al., 1996).

Es gibt bislang keine Literaturangaben zu Korrelationen von RT-PCR aus Frisch- und FFPE-Geweben in systematischen Untersuchungen. Im Institut für Pathologie, Kassel war eine gute Korrelation zwischen Frisch- und FFPE-Geweben gezeigt worden (Schmidtgen, 2002, Promotionsarbeit).

Beim Vergleich der mRNA-Daten verschiedener Arbeitsgruppen muss berücksichtigt werden, dass jeweils verschiedene Referenzgene und Protokolle zur reversen Transkription sowie PCR verwendet wurden. Die RT-PCR-Methode ist relativ neu und es bedarf mehr Daten aus standardisierten Analyseverfahren, um zu belegen, dass mRNA- und Proteinexpression eines spezifischen Markers korrelieren oder nicht korrelieren.

Alle für Tumoranalysen relevante Methoden können nur einen Einblick in das zur Untersuchung gelangte Areal des Tumors ermöglichen. Bisher ist auch weitestgehend unklar, wie die akkurate Vorhersage des Charakters eines Tumors mittels Biomarkeranalyse durch die Tumorheterogenität beeinflusst wird.

### **Präanalytische Faktoren, die das Testergebnis beeinflussen**

Die hier verwendeten Paraffinblöcke von Geweben wurden vor Jahren (1992-1998) unter Routinebedingungen hergestellt. Zahlreiche systematische und zufällige Fehler (Varianzen) bei der Herstellung der Blöcke sowie Aufarbeitung von Schnitten für IHC oder RT-PCR sind für die Richtigkeit und Präzision der vorliegenden Ergebnisse mit verantwortlich:

#### **Formalinfixierung**

Grösse, Solidität und Fettgehalt eines Gewebepräparates beeinflussen die Penetrationsgeschwindigkeit des Fixativs und damit die Qualität der Fixierung und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen an äusseren und inneren Teilen eines Geweberesektates. Art und Eigenschaften des Fixativs wie Konzentration, pH-Wert und Fixierungsdauer unterliegen Schwankungen im klinischen Alltag und beeinflussen die Veränderung von Biomolekülen und die Reproduzierbarkeit ihrer Analyse ebenso wie Hitze und Alkohole, die beim Entparaffinieren der Gewebe eingesetzt werden. Damit

unterliegen Ergebnisse aller Analysemethoden aus FFPE-Gewebe enormen Schwankungen, deren Ausmass im Einzelfall noch unbekannt ist.

Macabeo-Ong et al. (2002) zeigten, dass RNA mit guter Zuverlässigkeit aus FFPE-Geweben isoliert und analysiert werden kann und auch reproduzierbare Ergebnisse in der quantitativen RT-PCR liefert. Allerdings waren die Ergebnisse verschiedener Marker wie VEGF und MMP-1 unterschiedlich stark von der Formalin-Fixierungszeit abhängig.

### **Lagerung und Schneiden der Gewebe**

Lagerungsdauer und -bedingungen (sehr warme Temperatur, Lichteinfluss) können die Stabilität von Proteinen und Nukleinsäuren verändern (Masuda et al., 1999; Mizuno et al., 1998).

Beim Schneiden des Paraffinblockes mit dem Handmikrotom werden keine identischen Schnittdicken erreicht. Damit variiert die Menge an Zellen bzw. extrahierter RNA, die aus den Schnitten gewonnen und der molekularbiologischen Untersuchung zugeführt werden. Specht et al. (2002) erzielten jedoch vergleichbare Ergebnisse in der RT-PCR bei Ausgangszellzahlen zwischen 100 und  $10^6$ .

### **Laser Mikrodissektion und RT-PCR**

Die Laser-Ablation ist ein sehr eleganter Präparationsschritt, um saubere molekulare Analysen aus Lysaten von spezifischen homogenen Zellpopulationen zu erhalten, die aus heterogenem Gewebe isoliert werden (Simone et al., 1998).

Während Houze et al. (1997) noch etwa 250 mg FFPE-Gewebe benötigen, genügte bei Verwendung des HighPure Kits der Firma Roche die Aufarbeitung von zwei bis drei 2-3  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten, um ein valides Ergebnis mit RT-PCR zu erzielen.

Für die mRNA-Quantifizierung der Enzyme TP, DPD, und TS mit den dafür verfügbaren Kits erwies sich eine Mindestzellzahl von ca. 7000 als erforderlich. Die Isolation dieser Zellen benötigt etwa 2 Stunden Arbeitszeit eines geübten Pathologen. Einige der in der vorliegenden Studie verwendeten histologischen Präparate enthielten nur sehr geringe invasive Tumorzellanteile, so dass in 2 von 92 Proben aus diesem Grund eine molekulare Enzymanalyse nicht möglich war. Andere Autoren berichten über deutlich kleinere Zellmengen bis hin zur Isolierung von Einzelzellen aus FFPE-Geweben, die zur Analyse von verschiedenen Parametern ausreichten (Becker et al.,

1996; Schütze und Lahr, 1998; Specht et al., 2001). Allerdings verwendeten sie z.T. eine nested-PCR oder untersuchten kleinere Amplicons.

Specht et al. (2001) fanden bei der Expressionsanalyse verschiedener krebsrelevanter Gene, u.a. Her2, eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus lasermikrodisseziertem und mittels RT-PCR analysiertem FFPE-Gewebe einerseits sowie FISH- und IHC-Analysen andererseits.

Die RT-PCR ist eine quantitative Methode für mRNA („message“) von Biomarkern. Posttranskriptionelle und posttranslationale Regulationen, die einen Einfluss auf die Proteinaktivität haben können, werden damit jedoch nicht erfasst.

So wurden beispielsweise im Promotor des TS-Gens Polymorphismen zu repetitiven Elementen beschrieben, die sehr häufig sind und für eine individuelle TS-Basisaktivität in allen Organen verantwortlich sind. Die Aktivitätsunterschiede zwischen Individuen sind bis zu 3-fach und wurden mit einer Resistenz gegenüber 5-FU in Zusammenhang gebracht (Dolnick und Black, 1996).

Mit der Verwendbarkeit von Paraffinblöcken für RT-PCR wurde es möglich, sequenzielle Gewebeschnitte einer Probe mit IHC und RT-PCR zu analysieren, damit den Einfluss der Tumorerogenität zu reduzieren und eine Basis der Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Methoden zu schaffen.

Unter Verwendung des LightCycler-Instrumentes war eine automatisierte quantitative Analytik der mRNA aus extrahierter Gesamt-RNA möglich.

### **Variabilität des Haushalts- bzw. Referenzgens**

Die mRNA-Konzentrationen der Enzyme wurden durch Normalisierung auf das Referenzgen G6PDH, einem sogenannten „Haushaltsgen“, erhalten, um den Einfluss der variablen RNA-Menge, die in der PCR zum Einsatz kommt, zu eliminieren.

Bisher wurde kein Haushaltsgen im Tumorgewebe beschrieben, das keiner Regulation unterliegt (z.B. gleiche Expression wie im Normalgewebe bei schnell oder langsam wachsenden, weniger oder stark invasiven Tumoren). Individuell schwankende Expressionen solcher Gene im Tumor sind die Ursache für unterschiedliche Werte der zu quantifizierenden Biomarker, die aus der Normalisierung resultieren (Harrison et al., 2000; Kanzaki et al., 2002; Metzger et al., 1998; Suzuki et al., 2000; Thellin et al., 1999; Yuan et al., 1999; Zhong und Simons, 1999). Blanquicett et al. (2002) fanden metabolische Enzyme wie GAPDH und G6PDH in malignen Tumoren überexprimiert,

während strukturelle Enzyme wie  $\beta$ -Aktin geringere Variation aufwiesen. G6PDH war in Lebermetastasen bis zu 8-fach und in Kolonkarzinomen bis zu 1,5-fach höher exprimiert als in Normalgewebe. Geringe Variationen wiesen ribosomale Haushaltsgene wie 18S und S9 auf. Die Erforschung zuverlässiger Haushaltsgene ist erst am Anfang. Der weltweite Anstieg von Expressionsanalysen in Tumoren mit DNA-Chips wird dazu beitragen, zuverlässigere Haushaltsgene zu finden und anzuwenden als es heute möglich ist.

Das in den Kits für TP, DPD und TS der Firma Roche verwendete Haushaltsgen ist G6PDH. Eine Verfälschung der Werte für TP, DPD und TS durch variable Expression von G6PDH ist nicht auszuschließen. Die meistgenutzten Haushaltsgene anderer Arbeitsgruppen sind GAPDH und  $\beta$ -Aktin, was eine studienübergreifende Vergleichbarkeit von Ergebnissen bereits einschränkt.

### **RNA-Extraktion**

Von 92 Proben konnte bei 17 Proben aufgrund zu geringer RNA-Extraktion kein PCR-Ergebnis generiert werden. In 2 Proben war die Zahl an Tumorzellen zu gering, in 15 Proben konnte nicht genügend RNA extrahiert werden.

Weiterhin war in 11 Proben DPD und in 3 Proben TP nicht messbar (die ermittelten Werte lagen unterhalb des angegebenen Messbereichs). Damit war in 14 Proben keine TP/DPD Ratio bestimmbar. In 11 Fällen war TS in wiederholten Ansätzen nicht messbar, während die dazugehörigen TP- und DPD-Werte aus dem gleichen RNA-Extrakt im linearen Messbereich lagen. Tumore mit nicht messbaren Enzymwerten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht in die Auswertung einbezogen.

### **Präanalytische und analytische Fehler der IHC**

Nachteile der IHC sind nicht standardisierte Reagenzien und Verfahren für Fixierung, Lagerung, Antigen-Wiedergewinnung, Färbung sowie subjektive Interpretation der Färbung. Die genannten Faktoren beeinflussen in unterschiedlichem Ausmass die IHC-Ergebnisse und sind verantwortlich für hohe Varianz und schlechte Reproduzierbarkeit. Durch Anwendung standardisierter Färbereagenzien und -Protokolle sowie Mitführung diverser Kontrollen wurde versucht, die methodische Variabilität der IHC zu reduzieren. Negativ-Kontrollen der Färbung wurden mitgeführt. Innerhalb eines Schnitts konnte

anhand von positiv gefärbten Entzündungszellen (Positiv-Kontrolle) ein negatives Färbeergebnis der Tumorzellen validiert werden.

Die Bewertung der Färbung eines Schnitts unter Einsatz von Antikörpern gegen TP, DPD und TS kann extrem unterschiedlich erfolgen. Einige Arbeitsgruppen ermittelten „Scores“ durch Multiplikation von Intensität der Färbung und Prozent der positiven Zellen (Fox et al., 1996; Kojima et al., 2002). Andere Autoren legten Schwellenwerte basierend auf dem Anteil der gefärbten Zellen fest (Toi et al., 1995a; Yamamoto et al., 1996). Takebayashi et al. (1996) bewerteten einen Tumor als „TP-positiv“, wenn mehr als 5% der Zellen angefärbt waren, da Normalgewebe mit Ausnahme der Leber weniger als 5% positive Zellen aufwies. Andere Autoren unterschieden Kategorien der Färbeintensität von 0 bis 4 vs. 5, die dann zu den Bewertungen „niedrig“ und „hoch“ zusammengefasst wurden (Aschele et al., 2000; Edler et al., 2000b). Der Anteil gefärbter Zellen im Gewebe wurde dabei nicht berücksichtigt. Wieder andere Gruppen entschieden sich für den Anteil TP positiver Zellen als Bewertungsgrundlage ohne Berücksichtigung der Färbeintensität (Findlay et al., 1997; Ohi und Miki, 2000).

Entscheidend scheint auch zu sein, welcher Zelltyp (Karzinom-, Bindegewebe- oder Entzündungszellen) die jeweilige Tumoreigenschaft (Aggressivität oder Therapieresistenz) determiniert.

Saito et al. (2000) fanden eine inverse Korrelation zwischen der TP-Expression eines Tumors (vorwiegend in Stromazellen) und der Häufigkeit hämatogener und lymphatischer Metastasen. Man schlussfolgerte, dass infiltrierende Makrophagen TP produzieren und eher eine Immunantwort auf den Tumor verbessern als eine erhöhte Tumor-Angiogenese zu fördern. Die Ergebnisse hierzu sind sehr widersprüchlich.

Dem Problem der Gewebheterogenität und der damit verbundenen fokal unterschiedlichen Färbung wurde auf verschiedene Weise Rechnung getragen. Während in der vorliegenden Arbeit Durchschnittswerte des jeweils gesamten Gewebeschnitts ermittelt wurden, sind bei Aschele et al. (2000) und Edler et al. (2000b) in stark heterogenen Tumoren nur jene Areale mit der stärksten Färbung berücksichtigt worden.

Toi et al. (1999) haben die TP-Expression in tumorassoziierten Monozyten („TAM“) an fünf verschiedenen Stellen der Invasionsfront untersucht und den Mittelwert der exprimierenden Monozytenzahlen („TAM count“) der drei stärksten Felder („hotspots“) ermittelt. Es bleibt offen, ob die Bewertung der Färbung über den ganzen Gewebeschnitt oder nur fokal (in invasiven oder nicht invasiven Bereichen, im Zentrum oder in der

Peripherie des Tumors) erfolgen sollte und ob Färbemuster wie zytoplasmatisch vs. nukleär, diffus vs. fokal mit in die Beurteilung eingehen sollten, um einen Tumor optimal zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzym-Expressionen nur in Tumorzellen analysiert und sowohl als Protein visuell mittels IHC bewertet sowie als mRNA aus dem Lysat mikrodissasierter Tumorzellen quantifiziert.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Proben wurden von zwei Beobachtern anhand derselben IHC-Präparate analysiert, die Variationen waren z.T. erheblich. Nur in 15-22% der Fälle stimmten die ermittelten Gesamtscore-Ergebnisse der einzelnen Enzyme überein. Die Variation war bei DPD am kleinsten, bei TS am grössten (Kapitel 3.1.3). Die Übereinstimmungen waren für die Färbeintensität am grössten, in 55-67% der Fälle stimmten diese Ergebnisse vollständig überein. Eingang in die Statistik haben nur die Ergebnisse von einem Beobachter (R.P.) gefunden.

Entscheidend für eine gute Interobserver-Konkordanz scheinen einfache und gut reproduzierbare Beurteilungskriterien zu sein. So erreichten Aschele et al. (2000) und Pestalozzi et al. (1997) mit einer Beurteilung der TS-Färbeintensität (0 bis 3+ vs. 4+) und mit einer nachfolgenden Zusammenfassung in zwei Gruppen mit niedriger und hoher Expression eine 90%ige Übereinstimmung zwischen zwei Beobachtern. Bei der Beurteilung der gefärbten Tumorzellanteile entstehen hingegen grössere Abweichungen, die durch Multiplikationen mit der Färbeintensität die Variabilität des Gesamtscores wesentlich bestimmen.

### **Korrelation von Immunhistochemie und RT-PCR**

Die TP-Gesamtscore-Werte der IHC waren gleichmässig über die gesamte Spannweite verteilt. Die DPD-Färbung wies einen Gipfel bei der Verteilung der Gesamtscores auf, da die Tumorzellen meist zu einem hohen Prozentsatz und dann auch homogen gefärbt waren. In der TS-Färbung hingegen waren nur wenige Zellen positiv, so dass der Gesamtscore kumuliert im niedrigen Bereich lag.

Auch in der RT-PCR lagen die TS-Werte im niedrigen Bereich (die Mittelwerte waren für DPD etwa 10-fach und für TS etwa 50-fach höher). Eine ähnliche Verteilung der RT-Werte wie in der IHC liess sich nicht nachweisen.

Die IHC- und RT-PCR-Ergebnisse für TP und TS zeigten nur eine geringe positive Korrelation und wiesen nur angedeutet eine lineare Beziehung auf. Die DPD-Ergebnisse beider Methoden korrelierten nicht.

Andere Autoren fanden z.T. deutliche Diskrepanzen zwischen TS-Proteinmenge und TS mRNA. Die TS-Expression wird auf transkriptionaler und auf translationaler Ebene autoreguliert mit negativer „feedback“-Regulation der TS mRNA auf die TS-Proteintranslation (Chu et al., 1991, 1993a, 1996).

In der Literatur wurden kontroverse Ergebnisse zur Korrelation beider Methoden publiziert. Metzger et al. (1998) fanden eine gute positive Korrelation für TP, DPD und TS, hingegen Miyamoto et al. (2001) für TS und DPD und Takenoue et al. (2000) für DPD keine Korrelation. Insgesamt ist einzuschätzen, dass auch in der Literatur beide Methoden eher unterschiedliche als gleiche Ergebnisse liefern. Ursachen können biologischer Natur sein (mRNA und Proteinexpression korrelieren nicht) oder sind Folge technisch bedingter Artefakte und folglich hoher Varianzen der Ergebnisse.

TP und DPD wurden in verschiedenen Tumoren mittels ELISA quantifiziert. Die Proteinwerte korrelieren sehr gut mit der TP-Enzymaktivität (Mori et al., 2000).

## **4.2 Klinisch prognostische Marker und tumorbiologische Marker**

In unserem Kollektiv gab es keine Korrelation von bekannten klinisch prognostischen und tumorbiologischen Markern mit dem krankheitsfreiem Überleben. Allerdings konnten wir Korrelationen der Parameter untereinander aufzeigen, damit sind diese keine voneinander unabhängige Faktoren.

### **Tumorgröße, Nodalstatus, Stadium, Differenzierungsgrad**

In unserer Studie korrelierten diese etablierten prognostischen Parameter nicht mit dem krankheitsfreiem Überleben unter Therapie. Nur für den Nodalstatus war ein Trend zu finden: nodalpositive Patientinnen erlitten etwas früher und häufiger Rezidive als nodalnegative.

Tumorgröße, Nodalstatus, UICC-Stadium und Differenzierungsgrad sind Prognosefaktoren und keine prädiktiven Faktoren für ein Ansprechen auf eine CMF-Therapie. Die Unterscheidung zwischen prognostischen und prädiktiven Faktoren

einerseits, aber auch die vergleichsweise kleine Patientinnenanzahl andererseits erklären diese Ergebnisse.

Die Tumorgrosse und der Tumordifferenzierungsgrad korrelierten allerdings mit MiB1 und p53 (nur „grading“) sowie invers mit dem HR-Status. Diese Ergebnisse passen in das Konzept des aggressiveren Tumorwachstums bei Entdifferenzierung.

Hingegen korrelierte ein positiver Nodalstatus niedrig mit positivem ER-Status und niedrig invers mit MiB1 und p53. Der Nodalstatus in unserem Kollektiv korrelierte nicht mit der Tumorgrosse. Diese fehlenden Zusammenhänge sind vermutlich wieder durch die relativ kleine Patientinnenanzahl zu erklären.

### **Alter**

Die jährliche Inzidenz von MK steigt mit dem Alter der Frauen an: in den USA von 5/100.000 im Alter von 25 auf 150/100.000 im Alter von 50 und mehr als 200/100.000 im Alter von 75 Jahren. Wir wollten u.a. untersuchen, ob Altern nicht nur die Brustkrebsinzidens sondern auch die Biologie des Brustkrebses verändert. In unserer Studie korrelierte das Alter der Patientinnen bei Diagnose nicht mit anderen prognostischen und tumorbiologischen Parametern. Eppenberger-Castori et al. (2002) fanden jedoch in einer grossen Brustkrebskohorte (n=3800), dass die Tumorbiologie signifikant vom Alter der Patientinnen bei Diagnose abhing: mit steigendem Alter bei Diagnose niedrigere Wachstumsraten, eher ER-positiv, weniger oft p53- oder Her2-positiv.

### **Therapie**

Das krankheitsfreie Überleben in unserem Patientinnenkollektiv war nicht abhängig von einer zusätzlichen Radiotherapie zur üblichen CMF-Chemotherapie. Patientinnen mit Brustamputation ohne Radiatio hatten kein unterschiedliches krankheitsfreies Überleben im Vergleich zu Teilexzision mit Radiatio. Die Ergebnisse einer Meta-Analyse haben einen Überlebensvorteil von 2-4% und eine signifikante Reduktion der Brustkrebsmortalität in den folgenden 20 Jahren für die Frauen mit frühem Brustkrebs gefunden, die zusätzlich eine postoperative Radiotherapie erhielten (EBCTCG, 2000, 2002a).

Eine zusätzliche Hormontherapie brachte in unserem Kollektiv ebenfalls keinen signifikanten Unterschied für das krankheitsfreie Überleben. In Meta-Analysen wurde

ein signifikanter, wenn auch geringer Vorteil einer Tamoxifen-Therapie in Kombination mit CMF vs. CMF allein gezeigt (EBCTCG, 1992, 1998b).

Diese in Meta-Analysen ermittelten Therapievorteile liessen sich an unserem vergleichsweise kleinen Kollektiv mit relativ kurzer Beobachtungszeit nicht nachweisen.

Patientinnen unserer Studie mit 6 Zyklen CMF hatten tendentiell mehr Rezidive als Patientinnen mit 3 Zyklen. Allerdings waren es insgesamt nur 11 Patientinnen in unserem Kollektiv mit 6 Zyklen CMF, von denen dann bei 6 Patientinnen Fernmetastasen auftraten. Diese 6 Patientinnen waren alle im Stadium IIA bzw. IIB mit Lymphknotenmetastasen diagnostiziert worden und deren Mammaexzidate zeigten z.T. DCIS-Anteile bzw. Lymphangiosis carcinomatosa. Das fortgeschrittenere Stadium bei Diagnose könnte häufigere Rezidive in dieser Gruppe erklären. Die EBCTCG (1998a, 2002b) konnte an grossen Kollektiven keinen Unterschied zwischen 3 oder 6 Zyklen adjuvanter CMF-Therapie nachweisen, so dass in der Praxis im Regelfall nur noch 3 Zyklen CMF verabreicht werden.

## **Bcl2**

Die bcl2-Proteinfamilie spielt eine Rolle in der Regulation der Apoptose. Während bcl2 und bcl-xl die Apoptose inhibieren, fördern andere wie bcl-xs und bax den Zelltod.

Bcl2 war in unserer Studie niedrig korreliert mit dem ER-Status und niedrig invers korreliert mit dem PR-Status, MiB1 und Her2.

Kymionis et al. (2001) fanden an MK im frühen Stadium (n=130), dass bcl2 mit Faktoren für eine gute Prognose assoziiert war: niedrigem Tumor-Differenzierungsgrad, ER- und PR-Positivität sowie krankheitsfreies Überleben. Bax hingegen war mit dem Ansprechen der nodalnegativen Patientinnen auf die Chemotherapie assoziiert.

Wir fanden keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von bcl2 und dem krankheitsfreiem Überleben. Auch Itaya et al. (1999) konnten keine Korrelation zur Chemosensitivität in Abhängigkeit zur bcl2-Expression finden. Schiller et. al. (2002) fanden, dass eine positive bcl2-Expression signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben und dass die bcl2/bclxs mit dem krankheitsfreiem Überleben assoziiert war.

Möglicherweise kommt bax eher als prognostischer Marker bei MK in Frage und sollte im Zusammenhang mit bcl2 unter Bildung einer bcl2/bax Ratio untersucht werden. Die

Ratios spiegeln möglicherweise die Regulation der Apoptose und die Chemosensitivität gegenüber 5-FU besser wieder als die Bestimmung von Einzelmarkern (Mirjolet et al., 2000).

### **MiB1**

Der Antikörper MiB1 (Ki-67) weist das Protein p345 nach, ein wichtiges Proliferationsprotein.

Wir konnten eine mittlere positive Korrelation mit dem Differenzierungsgrad und der Tumorgösse, eine niedrige bis mittlere inverse Korrelation mit dem HR-Status sowie dem Nodalstatus zeigen. MiB1 wurde auch in zahlreichen anderen Studien an MK mit einem hohen mitotischen Index, hohem Differenzierungsgrad und schlechter Prognose assoziiert (Weidner et al., 1994). Wir konnten keine Assoziation mit dem krankheitsfreiem Überleben zeigen.

### **Hormonrezeptor-Status**

Nach Maass et al. (1983) ist der HR-Status sowohl ein prognostischer als auch ein prädiktiver Faktor für die Therapie. Das Überleben von HR-positiven vs. HR-negativen MK in einem bestimmten Zeitraum wurde insgesamt mit 90% vs. 60% beschrieben (Reiner et al., 1988). Eine adjuvante hormonantagonistische Tamoxifen-Therapie bei HR-positiven MK reduzierte das Auftreten von Rezidiven eines MK um 21-47% in den 10 folgenden Jahren (EBCTCG, 1998a) und senkte signifikant die Mortalität. In unserer Studie erhielten nur 13 Patientinnen Tamoxifen und 3 Patientinnen Goserelin, welches als Gonadoliberin-Analogon den Sexualhormonspiegel auf Kastrationsniveau senkt. Wir konnten an dieser kleinen Gruppe keine Assoziation von HR-Status und krankheitsfreiem Überleben unter der zusätzlichen Therapie zeigen.

### **Her2**

Her2 gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren. Das Gen ist in etwa 25% aller MK amplifiziert. Wir konnten keine Assoziation zwischen Her2 und dem krankheitsfreiem Überleben zeigen. Her2 war mit keinen anderen prognostischen oder tumorbiologischen Markern in unserem Kollektiv korreliert. Auch Kolar et al. (2002) konnte keine Korrelation zwischen Her2, HR-Status oder anderen immunhistochemischen Markern und Patientencharakteristika feststellen.

Andere Autoren zeigten an grösseren Kollektiven, dass Her2-positive und nodalpositive MK eine schlechtere Prognose hatten als Her2-negative (Pegram et al., 1998; Slamon et al., 1987, 1989).

### **P53**

P53 spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des MK (Levine et al., 1991). Immunhistochemisch nachgewiesene p53-Mutationen korrelierten in unserer Studie niedrig mit MiB1, Her2 und dem Differenzierungsgrad, invers jedoch mit dem HR-Status.

In unserem Kollektiv (n=72) konnte keine Assoziation von p53 mit dem Patientenverlauf nachgewiesen werden. Diesbezügliche Ergebnisse in der Literatur sind sehr widersprüchlich. In den meisten Studien konnte gezeigt werden, dass mutiertes p53 kein unabhängiger prognostischer Faktor ist (Pietilainen et al., 1995). Beenken et al. (2001) zeigten an Brustkrebspatientinnen, die mit CMF behandelt wurden, dass p53 signifikant mit der Prognose korrelierte.

In kolorektalen Karzinomen waren p53-Mutationen prädiktiv für ein schlechtes Ansprechen gegenüber einer 5-FU basierten Chemotherapie (Ahn et al., 1998; Lenz et al., 1998a). Andere Studien hingegen konnten keinen Zusammenhang zwischen p53-Expression und einem Ansprechen auf eine 5-FU-Therapie aufzeigen (Yeh et al., 1999; Cascinu et al., 2000). Paradiso et al. (2000) konnten zeigen, dass p53 allein keine prädiktive Aussage bzgl. Ansprechens auf eine Methotrexat/5-FU-Behandlung bei kolorektalen Karzinomen hat. Longley et al. (2002) fanden, dass in vitro eine induzierbare TS-Expression p53 und dessen Zielgene moduliert (z.B. als Folge einer Antifolat-Therapie). Wir haben nur die Primärtumoren vor Therapie untersucht und somit solche Modulationen nicht erfasst.

### **Statistik**

Wir haben Tests gewählt, die auf eine nichtparametrische nicht lineare Verteilung angewendet werden können, da im einzelnen die Beziehungen zwischen den untersuchten Parametern nicht bekannt sind. So wurde für die Korrelation der Daten der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient verwendet. Log-Rank und Wilcoxon Test zur Analyse der krankheitsfreien Überlebenszeit berücksichtigen ferner Daten von

Patienten, die zum Zeitpunkt des Beobachtungsendes noch kein Rezidiv entwickelt hatten („zensierte Daten“).

Andere Arbeitsgruppen haben verschiedene statistische Methoden angewendet, wie z.B. den Student-t-Test, der eine lineare Verteilung voraussetzt. Bestehen tatsächlich lineare Beziehungen, lassen sich mit diesem Test eher Signifikanzen ermitteln. Ausserdem wurde in der Literatur oft mit noch kleineren Fallzahlen gearbeitet, in denen schnell zufällige Fehler auftreten können (Salonga et al., 2000). Selten wurde das Kollektiv dargestellt, welches durch gegebene Schwellenwerte nicht charakterisiert werden konnte („unselektierte Patienten“).

### **4.3 TP, DPD und TS Analyse – Wertung der Testergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit sollten die Enzyme TP, DPD und TS mittels IHC und RT-PCR aus FFPE-Gewebe analysiert werden. Es sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse beider Methoden miteinander korrelieren. Ferner sollten die Ergebnisse beider Methoden mit anderen prognostischen und tumorbiologischen Parametern bei CMF behandelten Patienten mit frühem MK sowie mit dem klinischen Langzeitverlauf korreliert werden, um zu zeigen, dass TP, DPD und TS zusätzliche wertvolle prädiktive oder prognostische Marker darstellen und welcher Analysenmethode der Vorzug zu geben ist.

#### **Bestimmung von TP, DPD und TS im peripheren Blut**

Für die klinische Routinediagnostik wäre eine Analyse prognostischer/ prädiktiver Marker im peripheren Blut bequemer als die Messung im Tumor.

Shimada et al. (2002) zeigten eine positive Korrelation zwischen Serum TP-Konzentration und Tumorinvasionstiefe sowie Therapieansprechen bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

Zunehmend werden Mutationsanalysen des DPD-Gens empfohlen, um Träger einer klinisch relevanten Mutation von einer 5-FU-Therapie auszusparen. Die Auswirkung von vererbten Mutationen im DPD-Gen auf die Therapieeffizienz von 5-FU wurde noch nicht untersucht.

Die prätherapeutische Analyse der PBMNC-DNA mittels PCR oder Sequenzierung zur Suche nach definierten Mutationen in der DPD hält bereits Einzug in die Routinediagnostik, um die Toxizität von 5-FU durch Aussparen von Patienten mit relevanten Mutationen zu reduzieren. Ob die DNA-Analytik durch mRNA- oder Proteinbestimmung der DPD in PBMNC ersetzt werden kann, bedarf weiterer grosser Studien (Chazal et al., 1996; Fleming et al., 1992).

Für TS-Bestimmungen im Serum gibt es keine Literaturangaben.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Enzyme und prognostischen Biomarker im Primärtumor untersucht.

### **Analytik von Primärtumor vs. Metastasen**

Primärtumor und Metastasen können sehr heterogen bzgl. ihres Genexpressionsmusters sein. Sie können verschieden auf eine Therapie ansprechen. Ausgedehnte Untersuchungen dazu fehlen noch, da Metastasen schwer für Untersuchungen zugänglich sind. Nukatsuka et al. (2002) fanden eine höhere DPD- und eine niedrigere TS-Aktivität in MK-Metastasen verglichen mit dem Primärtumor.

Aschele et al. (2000) fanden eine niedrigere TS-Expression in Metastasen kolorektaler Tumore im Vergleich zum Primärtumor. Sie fanden, dass niedrige TS-Spiegel in den Metastasen mit einem Ansprechen auf 5-FU und hohe TS-Spiegel mit einem Therapieversagen einhergehen. Die TS-Spiegel im Primärtumor schienen jedoch keinen Einfluss auf den Therapieerfolg zu haben. Marsh et al. (2002) fanden keine signifikante Korrelation zwischen der TS-Expression (IHC) in kolorektalen Karzinomen und in Lymphknotenmetastasen, sie fanden aber einen Trend zu höheren TS-Werten in den Metastasen.

Untersuchungen an gastrointestinalen Karzinomen und deren Metastasen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen bzgl. der prädiktiven Bedeutung der drei Enzyme, gemessen entweder im Primärtumor oder in den Metastasen (Aschele et al., 1999, 2000; Davies et al., 1999; Findlay et al., 1997; Johnston et al., 1994; Salonga et al., 2000; Paradiso et al., 2000).

Komaki et al. (1995) fanden eine höhere TS-Expression in den axillären Lymphknoten im Vergleich zum Primärtumor bei Brustkrebspatientinnen, äusserten sich aber nicht zur Prognose unter Therapie.

Braun et al. (2001) haben anhand immunhistochemischer Analysen mit monoklonalen Anti-Cytokeratin (CK) Antikörpern an gezeigt, dass ca. 29% aller nodalnegativen MK (n=150) bereits Mikrometastasen im Knochenmark und 9% in den axillären Lymphknoten haben, wobei nur die Disseminierung in das Knochenmark mit einer schlechteren Prognose assoziiert war.

Es wäre interessant, in einer zukünftigen Studie zu überprüfen, ob der Therapieerfolg bei Brustkrebspatientinnen im Frühstadium ebenso von der Expression der Enzyme TP, DPD und TS in den späteren Metastasen abhängt.

## **TP**

Wir fanden für TP eine niedrige positive Korrelation zwischen RT-PCR und IHC.

Mit Hilfe der RT-PCR konnten wir eine niedrige positive Korrelation der TP-Expression mit dem Nodalstatus, mit bcl2 (IHC) und der Tumorgröße nachweisen. Diese Ergebnisse werden durch publizierte Studien an Tumoren anderer Lokalisation bestätigt, die eine Assoziation zwischen hoher TP-Expression und schlechter Prognose der Patienten zeigten (Imazano et al., 1997; Koukourakis et al., 1997, 1998; Metzger et al., 1998; Miwa et al., 1998; Takao et al., 1998).

Yang et al. (2000) demonstrierten bei Patientinnen mit invasivem MK eine Korrelation von TP zu bcl2 und Tumor-Differenzierungsgrad. Eine Korrelation zum Nodalstatus und zur Tumorgröße hingegen war in einer grösseren Kohorte nicht nachzuweisen (Yang et al., 2002). Andere Studien konnten bei MK keine Assoziation zwischen TP-Expression in den Tumorzellen einerseits und Menopausenstatus, Alter, Tumorgröße, Nodalstatus, Fernmetastasen, HR-Status, Her2, oder p53-Expression andererseits finden (Fox et al., 1997; Kanzaki et al., 2002; Toi et al., 1995a). Ebenso wenig fand sich in diesen Studien eine Korrelation von TP-Expression mit dem krankheitsfreiem Überleben, dem Auftreten eines Rezidivs oder dem Gesamtüberleben der Patientinnen, die keine adjuvante Therapie erhielten. Die TP-Proteinexpression in Tumorzellen (IHC) konnte damit nicht als prognostischer Marker bei frühem MK ohne adjuvante Therapie bestätigt werden.

Wir fanden eine positive Korrelation zwischen hoher mRNA-Expression von TP in Tumorzellen („cutoff“=30) und dem krankheitsfreiem Überleben von Patientinnen mit MK unter CMF-Therapie (s.u.). Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren überein, die grosse Kohorten von CMF behandelten Brustkrebspatientinnen in frühem

Stadium untersucht hatten und ein signifikant längeres krankheitsfreies und gesamtes Überleben bei TP-positiven Tumoren fanden (Fox et al., 1997; Gasparini et al., 1999; Yang et al., 2002).

Eine hohe TP-Expression in MK-Zellen könnte danach ein Faktor für Vorhersage einer schlechten Prognose ohne Therapie und ein Faktor zur Vorhersage eines guten Ansprechens auf CMF-Therapie sein. Gute Vergleichskollektive fehlen jedoch. TP kann unter Kulturbedingungen 5-FU in Anwesenheit von dR-1-P in FdUMP umwandeln, welches die Inhibition von TS bewirkt (siehe Kapitel 2.2.2). TP steigert damit die 5-FU-Wirkung. Morita et al. (1999) haben für Nierenzellkarzinom-Zelllinien gezeigt, dass IFN- $\alpha$  die TP-Expression in den Karzinomzellen erhöht und damit die 5-FU-Sensitivität steigt. Eine Transfektion von TP DNA in Krebszellen erhöhte deren 5-FU-Sensitivität (Evrard et al., 1999; Schwartz et al., 1992). Zusätzlich fördernd könnte eine verbesserte Methotrexat-Wirkung durch den vermehrten Abbau des Hemmstoffes Thymidin durch TP in Thymin sein. Thymidin ist als Antidot bei Methotrexat-Toxizität bekannt (Rots et al., 1999; Schornagel et al., 1984).

Eine prognostische Rolle wird auch der TP-Expression in den Stromazellen zugeschrieben. Nagaoka et al. (1998) konnten eine Korrelation zwischen der TP-Expression in den Stromazellen und anderen prognostischen Faktoren zeigen sowie einen Zusammenhang mit dem krankheitsfreiem Überleben und dem Gesamtüberleben bei Patientinnen mit MK.

Möglicherweise sind diese Ergebnisse spezifisch für das MK und nicht übertragbar auf andere Tumore. Bei kolorektalen Karzinomen (n=38) zeigten Metzger et al. (1998) eine Assoziation zwischen hoher TP-Expression in Tumoren (RT-PCR in nicht-mikrodissezierten Gewebelysaten von Tumoren) und schlechtem Patientenverlauf nach einer Therapie mit 5-FU. Ob TP, DPD und TS in dieser Arbeit auf eine schlechte Prognose oder ein schlechtes Ansprechen auf 5-FU hinweisen, kann nicht geschlussfolgert werden, da auch hier der Vergleich zu einer nicht behandelten Vergleichsgruppe fehlt.

### **Ist TP assoziiert mit angiogenen Tumoreigenschaften?**

Einige Autoren konnten zwischen der TP-Expression in MK-Zellen und der Gefässdichte des umgebenden Stromas keine Korrelation finden (Fox et al., 1996; Yang et al., 2002). Diese Ergebnisse stimmen mit unseren überein. Auch wir fanden keine

Korrelation zwischen der TP-Expression in MK-Zellen gemessen mit IHC bzw. RT-PCR und der Gefässdichte im Stroma, welche immunhistochemisch mit CD34 analysiert wurde.

Diese Ergebnisse stimmen jedoch nicht mit denen von Toi et al. (1995a, 1999) überein, die in der IHC bei MK-Zellen eine positive Korrelation zwischen TP-Expression (positive TP-Färbung definiert durch „Färbeintensität“) und der Gefässdichte fanden, die mit Faktor-VIII Antigen Färbung (IHC) bestimmt wurde. Andere Autoren zeigten eine positive Korrelation zwischen TP-Expression in Tumorgewebe, z.B. Kolon- und Zervixkarzinomen, und der Gefässdichte, bestimmt mittels IHC-Färbung von CD34 oder Faktor-VIII (Fujimoto et al., 1999; Matsuura et al., 1999). Diskrepanzen dieser Art sind schwer zu erklären. Nagaoka et al. (1998) zeigten, dass die TP-Expression in MK-Zellen nicht, in den Stromazellen hingegen signifikant mit der Angiogenese korreliert war. Auch Lee et al. (1999) demonstrierten, dass die TP-Expression in den perivaskulären Entzündungszellen von DCIS bzw. invasiven MK mit der Gefässdichte des Stromas korrelierte.

Es ist wahrscheinlich, dass zum einen die Stroma TP-Expression eine wesentliche Rolle in der Angiogenese beim MK spielt, zum anderen aber auch noch andere angiogenetische Faktoren ausser TP eine Rolle spielen, wie z.B. VEGF, bFGF, Angiogenin und andere Faktoren (Toi et al., 1995b). Andererseits untersuchten Kitazono et al. (1998) die Beziehung zwischen TP-Expression und Apoptose an humanen Zellkulturen und konnten zeigen, dass TP eine hypoxieinduzierte Apoptose verhindert. TP ist möglicherweise direkt in die intrazelluläre Signaltransduktion der Apoptose involviert. Dies könnte auch erklären, warum Brustkrebszellen, die TP überexprimieren, ein gesteigertes Wachstum ohne höhere Gefässdichte aufweisen (Moghaddam et al., 1995). Auch wir konnten eine positive Korrelation von TP-Expression mit der Tumorgrösse zeigen und keine Korrelation mit der Gefässdichte.

### **DPD**

DPD ist das katabolisierende Enzym von 5-FU, ist am höchsten in der Leber exprimiert und katabolisiert hier den überwiegenden Teil (80-90%) von 5-FU.

In der IHC konnten wir eine niedrige positive Korrelation von DPD in MK-Zellen mit dem ER- und PR-Status zeigen. Die RT-PCR hingegen ergab eine niedrige positive

Korrelation mit dem Nodalstatus sowie eine niedrige inverse Korrelation zu MiB1 und p53. Diese Ergebnisse erscheinen widersprüchlich, denn zum einen war DPD tendenziell höher exprimiert in nodalpositiven MK, zum anderen korrelierte DPD aber auch mit prognostisch günstigen Parametern bzw. invers mit prognostisch schlechten Faktoren.

In anderen Studien konnte keine Assoziation von DPD im Tumor mit anderen prognostischen oder tumorbiologischen Parametern gezeigt werden. Bei Tumoren der Kopf-Hals Region war DPD stadienunabhängig exprimiert (Etienne et al., 1995).

Ob DPD bei MK mit anderen prognostischen Markern assoziiert ist, sollte in Studien mit grösseren Kohorten überprüft werden.

Die Expression von DPD in verschiedenen Tumoren korrelierte in mehreren Studien signifikant invers mit dem Ansprechen gegenüber 5-FU (Beck et al., 1994; Etienne et al., 1995; Ishikawa et al., 1999; Salonga et al., 2000). Niedrige DPD mRNA-Konzentrationen in Magenkarzinomen korrelierten mit einem besseren Ansprechen auf 5-FU (Takabayashi et al., 2000). Milano et al. (1995) zeigten, dass mit 5-Ethynyluracil, einem Inhibitor von DPD (Specter et al., 1993; Porter et al., 1992), die 5-FU-Zytotoxizität in fünf humanen Krebszelllinien mit ursprünglich hoher basaler DPD-Expression gesteigert werden konnte.

In unserer Studie korrelierte hohe DPD-Expression in Tumorzellen, bestimmt mittels RT-PCR, mit langem krankheitsfreien Überleben, wohingegen niedrige DPD-Expressionen ( $\leq$  „cutoff“-Wert 5) signifikant mit einem frühen Krankheitsrezidiv korrelierten. Die in unserer Studie gefundene positive Korrelation von hohen DPD-Werten mit günstigem Patientenverlauf kann eine Folge der Kombinationstherapie und der dadurch noch nicht verstandenen überlagerten Regulationsmechanismen der 3 Medikamente im Tumor sein. Eine profunde Erklärung fehlt zur Zeit.

Hohe TP- und niedrige DPD-Expressionen, bestimmt als TP/DPD Ratio in Karzinomen des Ovars, waren mit einer schlechten Prognose unter Cisplatin-haltiger und Fluoropyrimidin-freier Therapie assoziiert (Fujiwaki et al., 2000).

Die TP/DPD Ratios in unserem Patientengut zeigen, dass Patientinnen mit hohen Ratios ( $\geq$  „cutoff“-Werte 16) ein signifikant besseres krankheitsfreies Überleben aufwiesen als die  $\leq 16$  und zwar unabhängig von den jeweiligen Einzelenzymwerten. Dies ergibt sich aus der TP-katalysierten Umsetzung von 5-FU in TS-Inhibitoren und dem Abbau von 5-FU dur

ch DPD. Die TP/DPD Ratio verbessert jedoch nicht die Trennschärfe zwischen den Patientinnen mit und ohne Rezidiv im weiteren Verlauf im Vergleich zu den Einzelwerten der Enzyme ohne Ratiobildung.

### **Bedeutung der TP/DPD Ratio für Capecitabin**

Capecitabin ( $N^4$ -pentoxycarbonyl-5'-5-Fluorocytidin) ist ein neues orales Fluoropyrimidin-Analogon mit klinischer Anwendung bei Kolorektalkarzinomen und MK. Capecitabin ist ein orales 5-FU „prodrug“, es wird im Verdauungstrakt zu 5-Desoxy-5-Fluorouridin (5-DFUR) metabolisiert und in Tumorzellen aufgenommen, wo der letzte Aktivierungsschritt zu 5-FU durch TP erfolgt (Miwa et al., 1998). Tumore, die hohe Spiegel an TP und niedrige and DPD haben, sprechen besonders gut auf Capecitabin an. Yamamoto et al. (1996) zeigten eine prädiktive Bedeutung der TP bei adjuvanter Therapie des MK mit 5-DFUR (Handelsname des Medikamentes: Furtulon®), eine Substanz, die auch die letzte metabolische Vorstufe vor der Aktivierung von Capecitabin zu 5-FU durch TP ist.

Einige experimentelle Studien an Kolonkarzinomen und MK zeigten eine positive Korrelation zellulärer TP-Aktivität und -Sensitivität gegenüber Capecitabine, bzw. dessen Metaboliten, jedoch nicht gegenüber 5-FU (Kato et al., 1997; Marchetti et al., 1999; Patterson et al., 1995).

Möglicherweise ist ein Ansprechen gegenüber Capecitabin nicht nur von der TP-Expression der Tumorzellen, sondern auch der begleitenden Entzündungs- und Stromazellen abhängig (Kono et al., 2001). Bei einer Therapie mit Capecitabin scheinen die TP/DPD Ratios einen höheren prädiktiven Wert zu haben als die alleinigen DPD- oder TP-Werte (Ishikawa et al., 1998) und mit einer besseren Trennschärfe Ansprechen oder Nichtansprechen vorhersagen zu lassen als für 5-FU.

In Xenograftmodellen erhöhen Paclitaxel, Docetaxel und Mitomycin die TP-Spiegel in Tumorzellen über Induktion von TNF- $\alpha$ . Taxane potenzieren die Wirkung von Capecitabin auch bei der Behandlung von metastatischem MK und führen in der Kombination zu einem Überlebensvorteil gegenüber der Verwendung der Einzelsubstanzen. Eine Kombination von Taxanen mit 5-FU zeigt solche Effekte nicht (Sawada et al., 1998).

**TS**

TS spielt eine zentrale Rolle im Pyrimidinstoffwechsel sowie in der Biosynthese und Replikation der DNA. Es ist das Zielmolekül von 5-FU.

Wir fanden für TS eine niedrige positive Korrelation zwischen RT-PCR und IHC.

Wir konnten eine niedrige Korrelation von TS mRNA- und Proteinexpression (gemessen jeweils mit RT-PCR und IHC), MiB1 und dem Differenzierungsgrad zeigen sowie eine inverse Korrelation mit dem ER-Status. Es zeigte sich auch eine niedrige inverse Korrelation mit dem PR-Status (RT-PCR) und mit bcl2 (IHC) sowie eine niedrige positive Korrelation mit p53 (IHC). Zusammenfassend korrelierten die TS-Werte mit prognostisch schlechten und invers mit prognostisch günstigen Parametern.

Pestalozzi et al. (1997) hingegen fanden an einem grösserem Kollektiv (n=488) keine Assoziation von TS-Expression mit anderen Parametern wie Tumorgrösse, Differenzierungsgrad, HR-Status, Her2 und MiB1. Wir konnten eine signifikante positive Korrelation zwischen hoher TS-Expression („cutoff“-Wert = 0,9) und krankheitsfreiem Überleben zeigen.

Nishimura et al. (1999) zeigten, dass MK mit extrem hoher TS-Expression eine schlechte Prognose unter Therapie hatten, während Tumore mit moderat hohen TS-Spiegeln mit einem Ansprechen auf eine 5-FU haltige Therapie und einer besseren Prognose assoziiert waren. Ähnliche Ergebnisse fanden Pestalozzi et al. (1997), sie zeigten ferner, dass bei MK mit hoher TS-Expression 6 statt 1 Zyklus CMF effektiver waren und die Prognose verbesserten.

Adjuvante 5-FU haltige Therapie war effektiver bei MK mit hohen TS-Expressionen (Foekens et al., 2001; Johnston et al., 1994, 1995; Romain et al., 1997, 2000), bei kolorektalen Karzinomen und Magenkarzinomen (Johnston et al., 1995). Kontroverse Resultate diesbezüglich stammen von Studien an Magenkarzinomen (Lenz et al., 1996) und an Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf Bereichs (Johnston et al., 1997), die niedrige TS-Spiegel mit Therapieansprechen assoziierten. Findlay et al. (1997) konnten hingegen in primären kolorektalen Karzinomen keinen Zusammenhang zwischen TS-Expression und Ansprechen auf Chemotherapie finden.

Wir konnten also alle bisherigen Studien an MK bestätigen, die ein gutes Ansprechen auf eine Chemotherapie bei hoher TS-Expression im Tumor fanden.

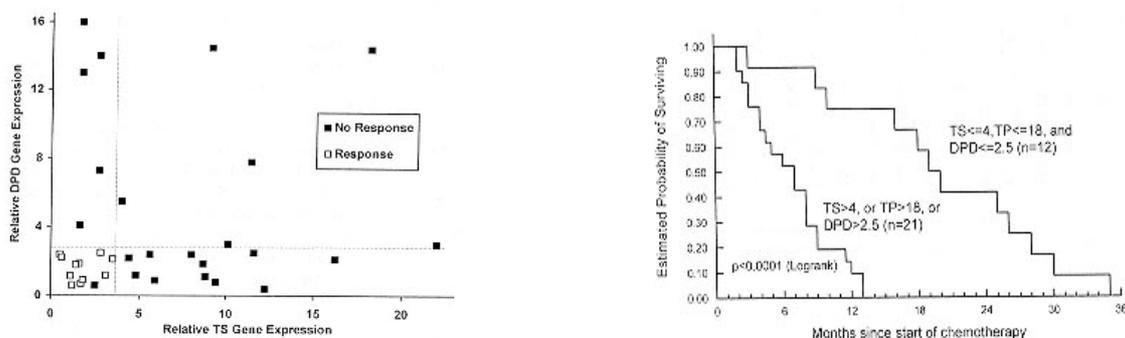
Unsere Ergebnisse zeigen, dass mit den Enzymen TP, DPD und TS die beste Stratifizierung der Patienten hinsichtlich krankheitsfreiem Überleben möglich ist.

Überschreiten alle Enzyme gesetzte Schwellenwerte (TP: 30; DPD: 5; TS: 0,9), überleben 100% der Patienten rezidivfrei eine mittlere Beobachtungszeit von 6 Jahren. Die Ratio TP/DPD plus TS selektiert am besten Patienten mit schlechter Prognose (30% Überlebenschancen im mittleren Beobachtungszeitraum), wenn die Werte unterhalb der gesetzten Schwellenwerte liegen.

Die Enzyme sind damit in der Prädiktion allen pathologischen Kriterien sowie bekannten Biomarkern aus der Literatur, die hier mit getestet und verglichen wurden, überlegen.

TP, DPD und TS, gemessen mit RT-PCR, waren zudem untereinander niedrig bis hoch korreliert. Möglicherweise sind die drei Enzyme in MK co-reguliert. Da die Korrelationen aber nicht generell hoch sind und die Beziehungen nicht notwendigerweise linear, empfiehlt es sich, für die Vorhersage des Patientenverlaufes alle drei Enzyme zu bestimmen.

Salonga et al. (2000) fanden in kolorektalen Karzinomen umgekehrte Verhältnisse: Patienten mit niedrigen mRNA-Werten aller drei Enzyme im Tumor zeigten einen guten Verlauf nach 5-FU-Therapie.



**Abb 4.1** Ergebnisse der RT-PCR-Analyse von TP, DPD und TS in kolorektalen Karzinomen (Kopie aus Salonga et al., 2000): Niedrige Werte aller drei Enzyme lassen Patienten mit gutem Verlauf selektieren.

Die Autoren untersuchten in kleinen Fallzahlen (n=33) Tumorblöcke mit hohem Tumorzellanteil und führten keine Mikrodissektion durch. Sie verwendeten als Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin. Als Therapie wurde nur 5-FU verwendet, bei unseren Patientinnen CMF. Das klinische Korrelat in der Studie von Salonga war die Ansprechrate (weiteres Wachstum der Metastase), in unserer Studie der Langzeitverlauf der Patientinnen. Möglicherweise unterscheiden sich Kolonkarzinome und MK auch in

Biologie und Therapieverhalten. Sehr viele Faktoren sind damit unterschiedlich und können die gegensätzlichen Befunde mit beeinflussen.

In weiterführenden Untersuchungen ist zu klären, ob hohe Werte des Enzymprofils in Tumorzellen von MK günstige prognostische Faktoren darstellen und auch unabhängig von einer CMF-Therapie auf einen gutartigen klinischen Verlauf hinweisen oder ob die Enzyme prädiktive Marker für das Ansprechen auf CMF darstellen. Dazu bedarf es der Untersuchung eines unbehandelten Kontrollkollektives, das hier nicht vorlag. Nach den dargelegten Ergebnissen profitieren Patientinnen mit niedrigen mRNA Spiegeln aller drei Enzyme in Tumorzellen von MK optimal von CMF. Patientinnen mit Enzymprofilwerten unterhalb des gesetzten Schwellenwertes sollten eine alternative Therapie erhalten.

Diese Ergebnisse sind in einem grösseren Patientenkollektiv und vor klinischer Einführung in einer randomisierten prospektiven Studie zu bestätigen.

### **Ausblick**

Einzelmarker oder kleine Markerprofile sind nur begrenzt in der Lage, Tumore hinreichend zu charakterisieren.

Auch andere Enzyme und Gene spielen im Metabolismus von 5-FU eine wichtige Rolle und wurden in der Literatur als prognostische oder prädiktive Marker bei Fluopyrimidintherapien beschrieben.

*Thymidinkinase (TK)* katalysiert die Phosphorylation von Desoxythymidin im DNA-Katabolismus und spielt eine wichtige Rolle im alternativen „salvage pathway“ der Pyrimidinsynthese. Erhöhte TK-Spiegel wurden mit schnell proliferierenden MK assoziiert und mit häufigeren Rezidiven sowie mit einer schlechten Prognose in nodalnegativen Brustkrebspatientinnen ohne adjuvante Therapie (Spyratos et al., 1992; Romain et al., 2000). In rezidierten MK war eine hohe TK-Aktivität ein signifikanter Marker für ein schlechtes Ansprechen auf Tamoxifen (Foekens et al., 2001). Chan et al. (2002) zeigten, dass eine Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase in DCIS der Brust mittels ZD1839 (Iressa) unabhängig vom ER-Status eine Reduktion der epithelialen Proliferationen bewirkte.

**Uridinphosphorylase (UP)** katalysiert die Phosphorolyse von Uridin und Thymin in ihre korrespondierenden Basen und ist damit wie TP in die Degradierung der Pyrimidinnukleotide involviert. UP spielt ebenso eine Rolle bei der 5-FU-Aktivierung. UP-Aktivität ist in Tumoren 2-3-fach höher als im Normalgewebe. Kanzaki et al. (2002) fanden, dass Patientinnen mit höherer UP-Expression in MK eine schlechtere Prognose hatten als die mit niedrigerer. Dagegen war die TP-Expression nicht mit Rezidiven oder Überleben der Patientinnen korreliert.

**ERCC1** (excision repair cross-complementing gene) verhindert DNA-Schäden durch Ausschneiden von Nukleotiden und Reparatur. Hohe ERCC1-Expression (RT-PCR) in kolorektalen Karzinomen war assoziiert mit 5-FU-Resistenz (Shirota et al., 2001).

Mit DNA-Mikroarray-Technologien wird es möglich werden, Markerprofile für Therapieprädiktionen nicht nur für 5-FU und CMF zu identifizieren, die eine akkuratere Voraussage des Therapieerfolges voraussagen lassen, als es mit Einzelmarkern der Fall ist (Scherf et al., 2000; Zembutsu et al., 2002).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Der klinische Verlauf von Tumorerkrankungen ist durch eine starke individuelle Komponente geprägt. Als molekulare Ursachen werden unterschiedliche genomische Veränderungen im Tumor und individuelle genetische Konstitution der Patienten diskutiert. Maligne Tumore entstehen durch Akkumulation von zufälligen somatischen Mutationen, Genmethylierungen und genomischer Instabilität in Körperzellen. Die unterschiedliche Genkonstellation bedingt individuelle Unterschiede in Tumorwachstum, Bildung von Metastasen und Therapieresistenz.

Individuelle Tumoreigenschaften erfordern eine individuell zugeschnittene Behandlung, um dem einzelnen Patienten eine optimale Therapieeffizienz zukommen zu lassen.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Literaturübersicht zu bekannten prognostischen und prädiktiven Faktoren und Biomarkern des Mammakarzinoms gegeben.

Prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit Cyclophosphamid/Methotrexat/5-FU (CMF) bei Patientinnen mit Mammakarzinom wurden experimentell untersucht. Es war zu prüfen, ob Subgruppen, basierend auf klinischen, pathologischen Parametern oder Biomarkern im Tumor, besser oder schlechter von CMF profitieren. Dazu wurden routinemässig in Paraffin eingebettete Proben von Mammakarzinomen untersucht, die von 91 Patientinnen der UICC Stadien I bis III (nodalnegativ oder nodalpositiv ohne Fernmetastasen) operativ chirurgisch entfernt und archiviert worden waren. Alle Patientinnen wurden adjuvant mit CMF behandelt, klinische Verlaufsdaten lagen über eine mittlere Beobachtungszeit von 6 Jahren vor.

Untersucht wurden mittels Immunhistochemie die in der Literatur beschriebenen prognostischen und prädiktiven Marker wie Hormonrezeptoren ER/PR, p53, Her2, bcl2, MiB1 sowie die Enzyme Thymidinphosphorylase (TP), Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) und Thymidylatsynthase (TS). Mittels „real time“ RT-PCR wurde die mRNA der Enzyme TP, DPD und TS in Laser-mikrodissezierten und makrodissezierten Tumorzellen quantifiziert und die Ergebnisse wurden mit der immunhistochemischen Analyse verglichen. Die drei Enzyme (TP, DPD und TS) spielen eine wichtige Rolle bei der Wirkung von 5-FU im Tumor und wurden in der Literatur als prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf 5-FU beschrieben. Traditionelle pathologische Kriterien wie Lymphknotenstatus, Tumorgrosse, Tumor-Differenzierungsgrad und Tumor-

vaskularisierung sowie die Ergebnisse der Biomarkeranalyse in archivierten Tumoren wurden mit dem krankheitsfreien Überleben über einen mittleren Zeitraum von 6 Jahren korreliert und statistischen Signifikanzanalysen unterzogen.

Die Ergebnisse zeigen, dass von allen genannten Parametern ausser den Enzymen lediglich der Nodalstatus trendmässig mit dem Patientenverlauf korreliert (Log-Rank-p= 0,0811; Wilcoxon-p= 0,0902).

Signifikante Korrelationen mit dem Patientenverlauf zeigen die Expressionen der Enzyme TP, DPD und TS bestimmt mittels RT-PCR aus Lysaten mikro- und makrodissezierter Tumorzellen.

Wenn lediglich eines der drei Enzyme TP, DPD oder TS Extremwerte aufweist (über/unter einem definierten Schwellenwert), ist die Korrelation mit dem Patientenverlauf signifikant (Log-Rank-p= 0,026-0,0403; Wilcoxon-p= 0,0397-0,0501).

Wenn alle drei Enzyme gleichzeitig (Enzymprofil TP, DPD und TS) in Tumorzellen hoch exprimiert sind, überleben 100% aller Patienten krankheitsfrei über 6 Jahre.

Unterhalb des Schwellenwertes des Enzymprofils ist das krankheitsfreie Überleben der Patientinnen hoch signifikant schlechter (Log-Rank-p= 0,0019; Wilcoxon-p= 0,0031).

Liegt die Ratio von TP/DPD in Kombination mit TS unterhalb eines definierten Schwellenwertes, leben nach 6-7 Jahren nur noch 15% der Patienten krankheitsfrei. Die Kombination der Enzyme definiert am besten die Patientengruppe, die einer alternativen Therapie zugeführt werden sollte (Log-Rank= 0,0035; Wilcoxon= 0,0104). Nach den dargelegten Ergebnissen profitieren Patientinnen mit hohen mRNA-Spiegeln aller drei Enzyme in Tumorzellen von Mammakarzinomen optimal von CMF. Patientinnen mit Enzymwerten unterhalb des gesetzten Schwellenwertes sollten eine alternative Therapie erhalten.

In weiterführenden Untersuchungen ist zu klären, ob hohe Werte des Enzymprofils in Tumorzellen von Mammakarzinomen günstige prognostische Faktoren darstellen und auch unabhängig von einer CMF-Therapie auf einen gutartigen klinischen Verlauf hinweisen oder ob die Enzyme prädiktive Marker für das Ansprechen auf CMF darstellen. Dazu bedarf es der Untersuchung eines unbehandelten Kontrollkollektives, das hier nicht vorlag. Die Ergebnisse sind in einem grösseren Patientenkollektiv und vor klinischer Einführung in einer randomisierten prospektiven Studie zu bestätigen.

## LITERATURVERZEICHNIS

**Ackland SP**, Peters GJ. Thymidine phosphorylase: its role in sensitivity and resistance to anticancer drugs. *Drug Resistance Updates* 2: 205-214, 1999.

**Ahnen DJ**, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA Jr, Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, Meyskens FL Jr. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 58: 1149-1158, 1998.

**Anan K**, Mitsuyama S, Tamae K, Suehara N, Nishihara K, Ogawa Y, Abe Y, Iwashita T, Toyoshima S: Increased dihydropyrimidine dehydrogenase activity in breast cancer. *J Surg Oncol* 82: 174-179.

**Araki Y**, Isomoto H, Shirouzu K. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and thymidylate synthase level are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal cancer. *Kurume Medical J* 48: 93-98, 2001.

**Aschele C**, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C, Lionetto R, Maley F, Sobrero A. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 17: 1760-1770, 1999.

**Aschele C**, Debernardis D, Tunesi G, Maley F, Sobrero A. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 6: 4797-4802, 2000.

**ATAC Trialists Group**. Pharmacokinetics of anastrozole and tamoxifen alone, and in combination, during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer in postmenopausal women: a subgroup of the "Arimidex" and Tamoxifen Alone or in Combination (ATAC) trial. *Br J Cancer* 85: 317-324, 2001.

**Bathe OF**, Franceschi D, Livingstone AS, Moffat FL, Tian E, Ardalán B. Increased thymidylate synthase gene expression in liver metastases from colorectal carcinoma: Implications for chemotherapeutic options and survival. *Cancer J Sci Am* 5: 34-40, 1999.

**Beck A**, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Renee N, Milano G. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 30A: 1517-1522, 1994.

**Becker I**, Becker KF, Rohrl MH, Minkus G, Schutze K, Höfler H. Single-cell mutation analysis of tumors from stained histologic slides. *Lab Invest* 75: 801-807, 1996.

**Beenken SW**, Grizzle WE, Growe DR, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, Krontiras H, Urist MM, Band KI. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Ann Surg* 233 : 630-638, 2001.

**Berger SH**, Jenh CH, Johnson LF, Berger FG. Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. *Mol Pharmacol* 28: 461-467, 1985.

**Bezwođa WR**, Esser JD, Dansey R, Kessel I, Lange M. The value of estrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. *Cancer* 68: 867-872, 1991.

**Black AR**, Dolnick BJ. Expression of rTS correlates with altered growth regulation of thymidylate synthase. *Cancer Res* 56: 700-705, 1996.

**Blanquicett C**, Johnson MR, Heslin M, Diasio RB. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Anal Biochem* 3003: 209-214, 2002.

**Braun S**, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kentenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F. Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 19: 1468-1475, 2001.

**Canman CE**, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281: 1677-1679, 1998.

**Carmeliet P**, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257, 2000.

**Cascinu S**, Catalano V, Aschele C, Barni S, Debernardis D, Gallo L, Bandelloni R, Staccioli MP, Baldelli AM, Brenna A, Valenti A, Muretto P, Catalano G. Immunohistochemical determination of p53 protein does not predict clinical response in advanced colorectal cancer with low thymidylate synthase expression receiving a bolus 5-fluorouracil-leucovorin combination. *Ann Oncol* 11: 1053-1056, 2000.

**Chan KC**, Knox WF, Gee JM, Morris J, Nicholson RI, Potten CS, Bundred NJ. Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition on epithelial proliferation in normal and premalignant breast. *Cancer research* 62: 122-128, 2002.

**Chazal M**, Etienne MC, Renee N, Bourgeon A, Richelme H, Milano G. Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin Cancer Res* 10: 217-223, 1996.

**Chu E**, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, Zinn S, Allegra CJ. Autoregulation of human thymidylate synthase mRNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8977-8981, 1991.

**Chu E**, Koeller D, Johnston PG, Zinn S, Allegra CJ. Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon  $\gamma$ . *Mol Pharmacol* 43: 527-533, 1993a.

**Chu E**, Voeller D, Koeller DM, Drake JC, Takimoto CH, Maley GF, Maley F, Allegra CJ. Identification of an RNA binding site for human thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 517-521, 1993b.

**Chu E**, Takechi T, Jones KL, Voeller DM, Copur SM, Maley GF, Maley F, Segal S, Allegra CJ. Thymidylate synthase binds to c-myc RNA in human colon cancer cells and in vitro. *Mol Cell Biol* 15: 179-185, 1995.

**Chu E**, Cogliati T, Copur SM, Borre A, Voeller DM, Allegra CJ, Segal S. Identification of in vivo target RNA sequences bound by thymidylate synthase. *Nucleic Acids Res* 24: 3222-3228, 1996.

**Chu E**, Copur SM, Ju J, Chen TM, Khleif S, Voeller DM, Mizunuma N, Patel M, Maley GF, Maley F, Allegra CJ. Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex. *Mol Cell Biol* 19: 1582-1594, 1999.

**Clark GM**, Dressler LG, Owens MA Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 320: 627-633, 1989.

**Collie-Duguid ESR**, Etienne UC, Milano G, McLeod HL. Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* 10: 217-223, 2000.

**Collie-Duguid ESR**, Johnston SJ, Boyce L, Smith N, Cowieson A, Cassidy J, Murray GI, McLeod HL. Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase protein expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 94: 297-301, 2001.

**Crafts-Lighty A**. Dawn of a golden age for diagnostics? *Bio Venture Views* 03/01, 2000.

**Danenberg PV**. Thymidylate synthetase: A target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochem Biophys Acta* 473: 73-92, 1977.

**Danenberg KD**, Danenberg PV. Activity of thymidylate synthase and its inhibition by 5-fluorouracil in highly enzyme-overproducing cells resistant to 10-propargyl-5,8-dideazafolate. *Mol Pharmacol* 36: 219-223, 1989.

**Davies MM**, Johnston PG, Kaur S, Allen-Mersh TG. Colorectal liver metastasis thymidylate synthase staining correlates with response to hepatic arterial floxuridine. *Clin Cancer Res* 5: 325-328, 1999.

**Diasio RB**, Beavers TL, Carpenter JT. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil induced toxicity. *J Clin Invest* 81: 47-51, 1988.

**Dolnick BJ**. Cloning and characterization of a naturally occurring antisense RNA to human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res* 21: 1747-1752, 1993.

**Dolnick BJ**, Black AR. Alternate splicing of the rTS gene product and its overexpression in a 5-fluorouracil-resistant cell line. *Cancer Res* 56: 3207-3210, 1996.

**Dotto GP**. P21<sup>WAF/Cip1</sup>: more than a brake in the cell cycle? *Biochem Biophys Acta* 1471: 43-56, 2000.

**EBCTCG** (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. 133 randomised trials involving 31.000 recurrences and 24.000 death among 75.000 women. *Lancet* 339: 71-85, 1992.

**EBCTCG** (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 352: 930-942, 1998a.

**EBCTCG** (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 351: 1451-1467, 1998b.

**EBCTCG** (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 355: 1757-1770, 2000.

**EBCTCG** (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). Tamoxifen for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. CD 000486, 2001.

**EBCTCG** (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). Radiotherapy for early breast cancer, *Cochrane Database Syst Rev*. CD 003647, 2002a.

**EBCTCG** (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). Multi-agent chemotherapy for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. CD 000487, 2002b.

**Edler D**, Hallstrom M, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression: An independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 6: 1378-1384, 2000a.

**Edler D**, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B, Pahlman L, Lindmark G, Blomgren H. Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: An independent prognostic factor of survival. *Clin Cancer Res* 6: 488-492, 2000b.

**Edler D**, Glimelius B, Hallstrom M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: A prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 20: 1721-1728, 2002.

**Eidtmann H**, Jonat W. Therapie des Mammakarzinoms. *Onkologe* 8: 11-14, 2002.

**Endo M**, Shinbori N, Fukase Y, Sawada N, Ischikawa T, Ishitsuka H, Tanaka Y. Induction of thymidine phosphorylase expression and enhancement of efficacy of capecitabine or 5-deoxy-5-fluorouridine by cyclophosphamide in mammary tumor models. *Int J Cancer* 83: 127-134, 1999.

**Eppenberger-Castori S**, Moore DH Jr, Thor AD, Edgerton SM, Kuen W, Eppenberger U, Benz CC. Age-associated biomarker profiles of human breast cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1318-1330, 2002.

**Etienne MC**, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renee N, Schneider M, Thyss A, Demard F, Milano G. Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol* 13: 1663-1670, 1995.

**Evrard A**, Cuq P, Ciccolini J, Vian L, Cano JP. Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *Proc Am Assoc Cancer Res* 40: 592, 1999.

**Fleming RA**, Milano G, Thyss A, Etienne MC, Renee N, Schneider M, Demard F. Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res* 52: 2899-2902, 1992.

**Findlay MP**, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aheme GW. Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumours and subsequent response to chemotherapy. *Brit J Cancer* 75: 903-909, 1997.

**Fisher B**, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 90: 1371-1388, 1998.

**Foekens JA**, Romain S, Look MP, Martin PM, Klijn JG. Thymidine kinase and thymidylate synthase in advanced breast cancer: response to tamoxifen and chemotherapy. *Cancer Res* 61: 1421-1425, 2001.

**Fox SB**, Moghaddam A, Westwood M, Turley H, Bicknell R, Gatter KC, Harris AL. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J Pathol* 176: 183-190, 1995.

**Fox SB**, Westwood M, Moghaddam A, Comley M, Turley H, Whitehouse RM, Bicknell R, Gatter KC, Harris AL. The angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase is up-regulated in breast cancer epithelium and endothelium. *Brit J Cancer* 73: 275-280, 1996.

**Fox SB**, Engels K, Comley M, Whitehouse RM, Turley H, Gatter KC, Harris AL. Relationship of elevated tumour thymidine phosphorylase in node-positive breast carcinomas to the effects of adjuvant CMF. *Ann Oncol* 8: 271-275, 1997.

**Freebairn AJ**, Last AJ, Illidge TM. Trastuzumab: designer drug or fashionable fad? *Clin Oncol* 13: 427-433, 2001.

**Fujimoto J**, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its mRNA in uterine cervical cancers. *Brit J Cancer* 79: 1249-1254, 1999.

**Fujiwaki R**, Hata K, Nakayama K, Fukumoto M, Miyazaki K. Gene expression for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase influences outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 18: 3946-3951, 2000.

**Gasparini G**, Toi M, Miceli R, Vermeulen PB, Dittadi R, Biganzoli E, Morabito A, Fanelli M, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T, Dirix LY, Gion M. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* 2: 101-111, 1999.

**Galea MH**, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO. The Nottingham prognostic index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22: 207-219, 1992.

**Grem JL**. 5-fluorouracil plus leucovorin in cancer therapy. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.), *Principles and Practice of Oncology Update Series*, Vol.2. Philadelphia: Lippincott JB Co., 1988.

**Gonzalez FJ**, Fernandez-Salguero P. Diagnostic analysis, clinical importance and molecular basis of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Trends Pharmacol Sci* 16: 325-327, 1995.

**Hakamada Y**, Arima M, Misaka T, Yasuda D, Matsungaga T, Kusama M, Aoki T, Sekiguchi N, Koyanagi Y. Significance of thymidylate synthase (TS) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity in breast cancer tissue. *Gan To Kagaku Ryoho* 27 : 1003-1010, 2000.

**Hamaji M**, Miyazaki S, Nishida Y, Izukura M, Nishijima J, Oka Y, Seshimo I, Olwari M : A preliminary study on dihydropyrimidine dehydrogenase activity in breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 27 : 1719-1724, 2000.

**Haqqani AS**, Cowling RT, Maroun JA, Birnboim HC. Characterization of a polyclonal antibody to human thymidylate synthase suitable for the study of colorectal cancer specimens. *J Histochem Cytochem* 47: 1563-1574, 1999.

**Harrap KR**, Jackman AL, Newell DR, Taylor GA, Hughes LR, Calvert AH. Thymidylate synthase: a target for anticancer drug design. *Adv Enzyme Regul* 29: 161-179, 1989.

**Harris JR**, Lippman ME, Veronesi U, Willet W. Breast Cancer (first of three parts). *N Engl J Med* 327: 319-328, 1992.

**Harrison DC**, Medhurst AD, Bond BC, Campbell CA, Davis RP, Philpott KL. The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia-caspase-3 as a case study. *Mol Brain Res* 75: 143-149, 2000.

**Haskell CM**, Casciato DA. Breast Cancer. In: Casciato DA, Lowitz BB (eds.), *Manual of clinical oncology*. Philadelphia: Lippincott W&W: 218-237, 2000.

**Hermeking H**, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. Protein 14-3-3 $\sigma$  is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1: 3-11, 1997.

**Ho DH**, Townsend L, Luna MA, Badey GP. Distribution and inhibition of dihydrouracil dehydrogenase activities in human tissues using 5-fluorouracil as a substrate. *Anticancer Res* 6: 781-784, 1986.

**Honkoop AH**, Pinedo HM, De Jong JS, Verheul HM, Linn SC, Hoekman K, Wagstaff J, van Diest PJ. Effects of chemotherapy on pathologic and biologic characteristics of locally advanced breast cancer. *Am J Clin Pathol* 107: 211-218, 1997.

**Houze TA**, Larsson L, Larsson P-A, Hansson G, Gustavsson B: Detection of thymidylate synthase gene expression levels in formalin-fixed paraffin embedded tissue by semiquantitative, nonradioactive reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Tumor Biol* 18: 53-68, 1997.

**Imazano Y**, Takebayashi Y, Nishiyama K, Akiba S, Miyadera K, Yamada Y, Akiyama S, Ohi Y. Correlation between thymidine phosphorylase expression and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 15: 2570-2578, 1997.

**Ishikawa T**, Sekiguchi F, Fukase Y, Sawada N, Ishitsuka H. Positive correlation between the efficacy of capecitabine and doxifluridine and the ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase activities in tumors in human cancer xenografts. *Cancer Res* 58: 685-690, 1998.

**Ishikawa Y**, Kubota T, Otani Y. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and mRNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 5: 883-889, 1999.

**Itaya M**, Yoshimoto J, Kojima K, Futagawa S. Usefulness of p53 protein, Bcl2 and Ki-67 as predictors of chemosensitivity of malignant tumors. *Oncol Rep* 6: 675-682, 1999.

**Johnston PG**, Liang CM, Henry S, Chabner BA, Allegra CJ. Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res* 51: 6668-6676, 1991.

**Johnston PG**, Drake JC, Trepel J, Allegra CJ. Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 4306-4312, 1992.

**Johnston PG**, Fisher E, Rockette H, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, Chabner BA, Allegra CJ. The role of thymidylate synthase expression in the prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 12: 2640-2647, 1994.

**Johnston PG**, Lenz HJ, Leichman CG, Dannenberg KD, Allegra CJ, Dannenberg PV, Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55: 1407-1412, 1995.

**Johnston PG**, Mick R, Recant W, Behan KA, Dolan ME, Ratain MJ, Beckmann E, Weichselbaum RR, Allegra CJ, Vokes EE. Thymidylate synthase expression and response to neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 89: 308-313, 1997.

**Kanzaki A**, Takebayashi Y, Bando H, Eliason JF, Watanabe Si S, Miyashita H, Fujikimoto M, Toi M, Uchida T. Expression of uridine and thymidine phosphorylase genes in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 97: 631-635, 2002.

**Kato Y**, Matsukawa S, Muraoka R, Tanigawa N. Enhancement of drug sensitivity and a bystander effect in PC-9 cells transfected with a platelet-derived endothelial cell growth factor thymidine phosphorylase cDNA. *Br J Cancer* 75: 506-511, 1997.

**Kim JA**.. Targeted therapies for the treatment of cancer. *Am J Surg* 186: 264-268, 2003.

**Kitazono M**, Takebayashi Y, Ishitsuka K, Takao S, Tani A, Furukawa T, Miyadera K, Yamada Y, Aikou T, Akiyama S. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 797-803, 1998.

**Kojima H**, Shijubo N, Abe S. Thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in patients with stage I lung adenocarcinoma. *Cancer* 94: 1083-1093, 2002.

**Kolar Z**, Murray PG, Zapletalova J. Expression of c-erbB-2 in node negative breast cancer does not correlate with estrogen receptor status, predictors of hormon responsiveness, or PCNA expression. *Neoplasma* 49: 110-113, 2002.

**Komaki K**, Kamamura Y, Ohmine Y, Sasa M, Tanaka K, Inoue H, Uyama T, Morimoto T, Monden Y. Difference in thymidylate synthetase activity in involved nodes compared with primary tumor in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2: 157-162, 1995.

**Kono T**, Nishida M, Inagaki N, Tanaka Y, Yoneda M, Kasai S. Development and characterization of 1C6-203, a new monoclonal antibody specific to the human thymidine phosphorylase. *J Histochem Cytochem* 1: 131-138, 2000.

**Koscielny S**, Tubiana M, Le MG, Valleron AJ, Mouriessie H, Contesso G, Sarrazin D. Breast cancer: Relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 49: 709-715, 1984.

**Koukourakis MI**, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, Cox J, Krammer B, Gatter KC, Harris AL. Platelet-derived endothelial cell growth factor expression correlates with tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 75: 477-481, 1997.

**Koukourakis MI**, Giatromanolaki A, Kakolyris S, O'Byrne KJ, Apostolikas N, Skarlatos J, Gatter KC, Harris AL. Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non-small-cell lung cancer: impact on tumour neoangiogenesis and survival. *Br J Cancer* 77: 1696-1703, 1998.

**Kymionis GD**, Dimitrakakis CE, Konstadoulakis MM, Arzimanoglou I, Leandros E, Chalkiadakis G, Keramopoulos A, Michalas S. Can expression of apoptosis genes, bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients? *J Surg Res* 99: 161-168, 2001.

**van Kuilenburg ABP**, Vreken P, Abeling NGGM, Bakker HD, Meinsma R, van Lenthe H, De Abreu RA, Smeitink JAM, Kayserili H, Apak MY, Christensen E, Holopainen I, Pulkki K, Riva D, Botteon G, Holme E, Tulinius M, Kleijer WJ, Beemer FA, Duran M, Niezen-Koning, KE, Smit GPA, Jakobs C, Smit LME, Moog U, Spaapen LJM, van Gennip AH. Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 104: 1-9, 1999.

**Lane DP**. P53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.

**Lee AHS**, Dublin EA, Bobrow LG. Angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase by inflammatory and carcinoma cells in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 187: 285-290, 1999.

**Leichman CG**, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, Boswell W, Metzger R, Tan M, Danenberg PV. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 15: 3223-3229, 1997.

**Lenz HJ**, Leichman C, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Garcia Y, Li J, Leichman L. Thymidylate synthase mRNA levels in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumour response and overall survival. *J Clin Oncol* 14: 176-182, 1996.

**Lenz HJ**, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R, Banerjee D, Bertino JR, Groshen S, Leichman LP, Leichman CG. P53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal carcinoma: an analysis of response and survival. *Clin Cancer Res* 4: 1243-1250, 1998a.

**Lenz HJ**, Danenberg KD, Leichman CG, Florentine B, Johnston PG, Groshen S, Zhou L, Xiong YP, Danenberg PV, Leichman LP. P53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: association with recurrence, survival and site. *Clin Cancer Res* 4: 1227-1234, 1998b.

**Levine AJ**, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991.

**Levine AJ**, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 69: 409-416, 1994.

**Longley DB**, Boyer J, Allen WL, Latif T, Ferguson PR, Maxwell PJ, McDermott U, Lynch M, Harkin DP, Johnston PG. The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates. *Cancer Res* 62: 2644-2649, 2002.

**Lowe SW**, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967, 1993.

**Maass H**, Jonat W. Steroid receptors as a guide for therapy of primary and metastatic breast cancer. *J Steroid Biochem* 19: 833-837, 1983.

**Maass H**. Mammakarzinom: Epidemiologie. *Gynäkologie* 27: 3-6, 1994.

**Macabeo-Ong M**, Ginzinger DG, Dekker N, McMillan A, Regezi JA, Wong DTW, Jordan RCK. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis. *Mod Pathol* 15: 979-987, 2002.

**Masuda N**, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology application for such samples. *Nucleic Acids Res* 27: 4436-4443, 1999.

**Maeda K**, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Onoda N, Kato Y, Sowa M. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 73: 884-888, 1996.

**Marchetti S**, Fischel JL, Pierrefite V. Thymidine phosphorylase (TP): a dual role in the pharmacology of fluoropyrimidine prodrugs and tumoral neoangiogenesis. *Proc Am Assoc Cancer Res* 40: 518, 1999.

**Marsh S**, McKay J, Curran S, Murray G, Cassidy J, McLeod H. Primary colorectal tumour is not an accurate predictor of thymidylate synthase in lymph node metastasis. *Oncology Reports* 9: 231-234, 2002.

**Matsushita S**, Nitanda T, Furukawa T, Sumizawa T, Tani A, Nishimoto K, Akiba S, Miyadera K, Fukushima M, Yamada Y, Yoshida H, Kanzaki T, Akiyama S. The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors. *Cancer Res* 59: 1911-1916, 1999.

**Matsuura T**, Kuratate I, Teramachi K, Osaki M, Fukuda Y, Ito H. Thymidine phosphorylase expression is associated with both increase of intratumoral microvessels and decrease of apoptosis in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 59: 5037-5040, 1999.

**McLeod HL**, Sludden J, Hardy SC, Lock RE, Hawksworth GM, Cassidy J. Autoregulation of 5-fluorouracil metabolism. *Eur J Cancer* 34: 1623-1627, 1998.

**Metzger R**, Danenberg KD, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, Lenz HJ, Groshen S, Leichman L, Danenberg PV. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 4: 2371-2376, 1998.

**Milano G**, Fischel JL, Spector T, Etienne MC, Formento P. Enhancement of fluorouracil cytotoxicity by inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase activity with 5-ethynyluracil. *Proc Am Assoc Cancer Res* 36: 292, 1995.

**Milano G**, McLeod HL. Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil-based treatment? *Eur J Cancer* 36: 37-42, 2000.

**Mimori K**, Ueo H, Shirasaka C, Shiraishi T, Yamagata M, Haraguchi M, Mori M: Up-regulated pyrimidine nucleoside phosphorylase in breast carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Anal of Oncology* 10: 111-113, 1999.

**Minckwitz G**, Kaufmann M. Primäre und adjuvante systemische Therapie beim operablen Mammakarzinom. *Onkologie* 8 : 847-852, 2002.

**Mirjoleit JF**, Barberi-Heyob M, Didelot C, Peyrat JP, Abecassis J, Millon R, Merlin JL. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *Br J Cancer* 83: 1380-1386, 2000.

**Miwa M**, Nishimura J, Kamiyama T, Ishitsuka H. Conversion of 5-deoxy-5-fluorouridine to 5-FU by pyrimidine nucleoside phosphorylase in normal and tumor tissues from rodents bearing tumors and cancer patients. *Jpn J Cancer Chemother* 14: 2924-2929, 1987.

**Miwa M**, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H. Design of a novel fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumors by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 34: 1274-1281, 1998.

**Miyadera K**, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, Yamada Y, Akiyama S. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* 55: 1687-1690, 1995.

**Miyamoto S**, Ochiai A, Boku N, Ohtsu A, Tahara M, Yoshida S, Okabe H, Takechi T, Fukushima M. Discrepancies between the gene expression, protein expression and enzymatic activity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human gastrointestinal cancers and adjacent normal mucosa. *Int J Oncology* 18: 705-713, 2001.

**Miyashita T**, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805, 1994a.

**Miyashita T**, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 54: 3131-3135, 1994b.

**Mizuno T**, Nagamura H, Iwamoto KS, Ito T, Fukuhara T, Tokunaga M, Tokuoka S, Mabuchi K, Seyama T. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn Mol Pathol* 7: 202-208, 1998.

**Moertel CG**. Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 330: 1136-1142, 1994.

**Moghaddam A**, Bicknell R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry* 31: 12141-12146, 1992.

**Moghaddam A**, Zhang HT, Fan TPD, Hu DE, Lees VC, Turley H, Fox SB, Gatter KC, Harris AL, Bickneel R. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 988-1002, 1995.

**Mori K**, Hasegawa M, Nishida M, Toma H, Fukuda M, Kubota T, Nagasue N, Yamana H, Hirakawa YS, Chung K, Ikeda T, Takasaki K, Oka M, Kameyama M, Toi M, Fujii H, Kitamura M, Murai M, Sasaki H, Ozono S, Makuuchi H, Shimada Y, Onishi Y, Aoyagi S, Mizutani K, Ogawa M, Nakao A, Kinoshita H, Tono T, Imamoto H, Nakashima Y, Manabe T. Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tumor tissues. *Int J Oncol* 17: 33-38, 2000.

**Morita T**, Tokue A. Biomodulation of 5-fluorouracil by interferon-alpha in human renal carcinoma cells: relationship to the expression of thymidine phosphorylase. *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 91-96, 1999.

**Mutschler E**. Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 7.Auflage. S. 739-762, 1996.

**Nagaoka H**, Iino Y, Takel H, Morishita Y. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in macrophages correlates with tumor angiogenesis and prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* 13: 449-454, 1998.

**Naguib FNM**, El Kouni MH, Cha S. Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic human tissues. *Cancer Res* 45: 5402-5412, 1985.

**National Center for Health Statistics**. Siehe cancer statistics review, 1973-1995, 2000. Bethesda, MD: United States National Cancer Institute, 1998.

**Nishimura R**, Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K, Matsuoka Y, Yamashita H, Fukuda M, Higuchi A, Satoh A, Mizumoto T, Hamamoto R. Thymidylate synthase levels as a therapeutic and prognostic predictor in breast cancer. *Anticancer Res* 19: 5621-5626, 1999.

**Nukatsuka M**, Fujioka A, Nakagawa F, Ohshimo H, Fukushima M. Antimetastatic and antitumor effects of fluoropyrimidines alone and combined with taxanes in a murine model of breast cancer metastatic to the lung. *Gan To Kagaku Ryoho* 29: 95-101, 2002.

**O'Brien TS**, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 55: 510-513, 1995.

**Ohi M**, Miki C. Tissue concentration of platelet-derived endothelial cell growth factor in colorectal cancer. *Scan J Gastroenterology* 4: 413-418, 2000.

**Okabe H**, Koizumi K, Tsujimoto H, Fukushima M. Epitope analysis and utility of monoclonal antibodies to native and recombinant human thymidylate synthase. *Int J Mol Med* 5: 133-138, 2000.

**Owen-Schaub LB**, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15: 3032-3040, 1995.

**Paradiso A**, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallerjo C, Lacava J, Romero A, Machiavelli M, DeLena M, Allegra CJ, Johnston PG. Thymidylate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 82: 560-567, 2000.

**Park DJ**, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Human thymidylate synthase gene polymorphism determines response to capecitabine chemotherapy in advanced colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 1: 46-49, 2002.

**Parsels LA**, Kowalski MP, Wagner LM, Parsels JD, Maley F, Maybaum J. Escherichia coli thymidylate synthase expression protects human cells from the cytotoxic effects of 5-fluorodeoxyuridine more effectively than human thymidylate synthase overexpression. *Cancer Gene Ther* 7: 1179-1187, 2000.

**Parwaresch R**, Rudolph P. The cellcycle – theory and application to cancer. *Onkologe* 19: 464-472, 1996.

**Patterson AV**, Zhang H, Moghaddam A, Bicknell R, Talbot DC, Stratford IJ, Harris AL. Increased sensitivity to the prodrug 5-deoxy-5-fluorouridine and modulation of 5-fluoro-2-deoxyuridine sensitivity in MCF-7 cells transfected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer* 72: 669-675, 1995.

**Pauly JL**, Schuller MG, Zelcer AA, Kirss TA, Gore SS, Germain MJ. Identification and comparative analysis of thymidine phosphorylase in the plasma of healthy subjects and cancer patients: brief communication. *J Natl Cancer Inst* 58: 1587-1590, 1977.

**Pauly JL**, Paolini NS, Ebarb RL, Germain MJ. Elevated thymidine phosphorylase activity in the plasma and ascitic fluids of tumor-bearing animals. *Exp Biol Med* 157: 262-267, 1978.

**Pegram MD**, Pauletti G, Slamon DJ. HER2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat* 52: 65-77, 1998.

**Pestalozzi BC**, Peterson HF, Gelber RD, Goldhirsch A, Gusterson BA, Trihia H, Lindtner J, Cortes-Funes H, Simmoncini E, Byrne MJ, Golouh R, Rudenstam CM, Castiglione-Gertsch M, Allegra CJ, Johnston PG. Prognostic importance of thymidylate synthase expression in early breast cancer. *J Clin Oncol* 15: 1923-1931, 1997.

**Peters GJ**, van der Wilt CL, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Johnston PG, van Groeningen CJ, Pinedo HM. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 31A: 1299-1305, 1995.

**Peters GJ**, von Triest B, Blaauwgeers JL, van Diest PJ, Schoenmakers PS, Voom DA, Smid K, Hoekman K, Hoitsma HF, Peters GJ. Prognostic significance of thymidylate synthase (TS), thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor (TP/PDEC-GF) and proliferation markers in patients with colorectal cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 40: 338, 1999.

**Pietilainen T**, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjanen K. Expression of p53 protein has no independent prognostic value in breast cancer. *J Pathol* 177: 225-232, 1995.

**Pinedo H**, Peters G. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6: 1653-1664, 1988.

**Piper AA**, Tattersall MH, Fox RM. The activities of thymidine metabolising enzymes during the cell cycle of a human lymphocyte cell line LAZ-007 synchronised by centrifugal elutriation. *Biochim Biophys Acta* 633: 400-409, 1980.

**Porter DJT**, Chestnut WG, Merrill BM, Specter T. Mechanism-based inactivation of dihydropyrimidine dehydrogenase by 5-ethynyluracil. *J Biol Chem* 267: 5236-5242, 1992.

**Posner MR**, Johnston PG, Tishler RB, Andersen J, Fiorentino M, Busse PM, Cavacini LA, Colevas AD, Clark J, Norris CM. The prognostic value of thymidylate synthase and p53 expression in patients treated with induction chemotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *The Oncologist* 3: 424-431, 1998.

**Powles TJ**. Anti-oestrogenic prevention of breast cancer – the make or break point. *Nat Rev Cancer* 2: 787-794, 2002.

**Raida M**, Schwabe M, Häusler P, van Kuilenburg ABP, van Gennip AH, Behnke D, Höffken K. Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 7: 2832-2839, 2001.

**Reiner A**, Reiner G, Spona J, Schemper M, Holzner IH. Histopathologic characterization of human breast cancer in correlation with estrogen receptor status. *Cancer* 61: 1149-1154, 1988.

**Ribatti D**, Vacca A, Dammacco F. The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review. *Neoplasia* 1: 293-302, 1999.

**Robbins P**, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, Elston C. Histological grading of breast carcinomas: A study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 26: 873-879, 1995.

**Romain S**, Martin PM, Klijn JG, van Putten WL, Look MP, Guirou O, Foekens JA. DNA-synthesis enzyme activity: a biological tool useful for predicting anti-metabolic drug sensitivity in breast cancer? *Int J Cancer* 74: 156-161, 1997.

**Romain S**, Spyrtatos F, Descotes F, Daver A, Rostaing-Puissant B, Bougnoux P, Colonna M, Bolla M, Marin PM. Prognostic of DNA-synthesizing enzyme activities (thymidine kinase and thymidylate synthase) in 908 T1-T2, N0-N1, M0 breast cancers: a retrospective multicenter study. *Int J Cancer* 87: 860-868, 2000.

**Rots MG**, Pieters R, Kaspers GJ, van Zantwijk CH, Noordhuis P, Mauritz R, Veeman AJ, Jansen G, Peters GJ. Differential methotrexate resistance in childhood T-versus common/pre-B acute lymphoblastic leukemia can be measured by an in situ thymidylate synthase inhibition assay, but not by the MTT assay. *Blood* 93: 1067-1074, 1999.

**Saito S**, Tsuno N, Nagawa H, Sunami E, Zhengxi J, Osada T, Kitayama J, Shibata Y, Tsuruo T, Muto T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 88: 42-49, 2000.

**Salonga D**, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB. Colorectal tumours responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6: 1322-1327, 2000.

**Sawada N**, Ishikawa T, Fukase Y, Nishida M, Yoshikubo T, Ishitsuka H. Induction of thymidine phosphorylase activity and enhancement of capecitabine efficacy by taxo/taxotere in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 4: 1013-1019, 1998.

**Sawada N**, Ishikawa T, Sekiguchi F, Tanaka, Y, Ishitsuka H. X-ray irradiation induces thymidine phosphorylase and enhances the efficacy of capecitabine (Xeloda) in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 5: 2948-2953, 1999.

**Sayer HG**, Classen J, Budach W, Höffken K. Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. *Onkologie* 8: 874-879, 2002.

**Scherf U**, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24: 236-244, 2000.

**Schiller AB**, Clark WS, Cotsonis G, Lawson D, DeRose PB, Cohen C. Image cytometric bcl-2:bax and bcl-2 ratios in invasive breast carcinoma: correlation with prognosis. *Cytometry* 50: 203-209, 2002.

**Schmidtgen C**. Expressionsanalyse von Prädiktoren der Chemoresponse bei Karzinomen - ein Methodenvergleich. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. Rer. Nat.) des Fachbereiches Biologie/Chemie der Universität Gesamthochschule Kassel. 2002.

**Schornagel JH**, Leyva A, Pinedo HM. Methotrexate with thymidine protection or rescue in advanced head and neck cancer: a phase II study. *Cancer Treat Rep* 68: 543-545, 1984.

**Schütze K**, Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nature Biotech* 16: 737-742, 1998.

**Schwartz EL**, Hoffman M, O'Connor CJ, Wadler S. Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 1232-1239, 1992.

**Shimada H**, Takeda A, Shiratori T, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Kobayashi S, Suzuki T, Ochiai T. Prognostic significance of serum thymidine phosphorylase concentration in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 94: 1947-1954, 2002.

**Shirota Y**, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, Groshen S, Tsao-Wei DD, Danenberg PV, Lenz HJ. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 19: 4298-4304, 2001.

**Simone NL**, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet* 14: 272-276, 1998.

**Slamon DJ**, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182, 1987.

**Slamon DJ**, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-712, 1989.

**Slamon DJ**, Leyland-Jones B, Shak S, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Baselga J, Norton L. Addition of herceptin (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC) markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial. *ASCO Proc*: 377, 1998.

**Spears CP**, Gustavsson BG, Berne M, Frosing R, Bernstein L, Hayes AA. Mechanism of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. *Cancer Res* 48: 5894-5900, 1988.

**Specht K**, Richter T, Müller U, Walch A, Werner M, Höfler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol* 158: 419-429, 2001.

**Specter T**, Harrington JA, Porter DJT. 5-Ethynyluracil (766C85): inactivation of dihydropyrimidine dehydrogenase in vivo. *Biochem Pharmacol* 46: 2243-2248, 1993.

**Spyratos F**, Martin PM, Hacene K, Romain S, Andrieu C, Ferrero-Po M, Deytieux S, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Brunet M. Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 84: 1266-1272, 1992.

**Suzuki T**, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29: 332-337, 2000.

**Takabayashi A**, Iwata S, Kawai Y, Kanai M, Taki Y, Takechi T, Fukushima M. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and mRNA expression in advanced gastric cancer analysed in relation to effectiveness of preoperative 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Int J Oncol* 17: 889-895, 2000.

**Takahashi Y**, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, Ellis LM. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Nat Cancer Inst* 88: 1146-1151, 1996.

**Takao S**, Takebayashi Y, Che X, Shinchi H, Natsugoe S, Miyadera K, Yamada Y, Akiyama S, Aikou T. Expression of thymidine phosphorylase is associated with a poor prognosis in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 4: 1619-1624, 1998.

**Takebayashi Y**, Yamada K, Ohmoto Y, Sameshima T, Miyadera K, Yamada Y, Akiyama S, Aikou T. The correlation of thymidine phosphorylase activity with the expression of interleukin I alpha, interferon alpha and interferon gamma in human colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 95: 57-62, 1995.

**Takebayashi Y**, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Furukawa T, Kinoshita F, Aoki D, Okumura H, Yamada Y, Akiyama S, Aikou T. The activity and expression of thymidine phosphorylase in human solid tumours. *Eur J Cancer* 7: 1227-1232, 1996.

**Takenoue T**, Nagawa H, Matsuda K, Fujii S, Nita ME, Hatano K, Kitayama J, Tsuruo T, Muto T. Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 7: 193-198, 2000.

**Tan-Chiu E**, Piccart M. Moving forward: herceptin in the adjuvant setting. *Oncology* 63: 57-63, 2002.

**Theissig F**, Kunze KD, Haroske G, Meyer W. Histological grading of breast cancer. Interobserver reproducibility and prognostic significance. *Pathol Res Pract* 186: 732-736, 1990.

**Thellin O**, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295, 1999.

**Toi M**, Hoshina S, Taniguchi T, Yamamoto Y, Ishitsuka H, Tominaga T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast cancer. *Int J Cancer* 64: 79-82, 1995a.

**Toi M**, Inada K, Hoshina S, Suzuki H, Kondo S, Tominaga T. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor are frequently coexpressed in highly vascularized human breast cancer. *Clin Cancer Res* 9: 961-964, 1995b.

**Toi M**, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 14: 2513-2519, 1996.

**Toi M**, Ueno T, Matsumoto H, Saji H, Funata N, Koike M and Tominaga T. Significance of thymidine phosphorylase as a marker of protumor monocytes in breast cancer. *Clin Cancer Res* 5 : 1131-1137, 1999.

**van Triest B**, Loftus BM, Pinedo HM, Backus HH, Schoenmakers P, Telleman F, Tadema T, Aherne GW, van Groeningen, Zoetmulder FA, Taal BG, Johnston PG, Peters GJ. Thymidylate synthase expression in patients with colorectal carcinoma using a polyclonal thymidylate synthase antibody in comparison to the TS 106 monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 48: 755-760, 2000.

**Tumorzentrum München**. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. 7. Auflage, 1998.

**Valagussa P**, Bonadonna G, Veronesi U. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Analysis of 716 consecutive patients. *Cancer* 41: 1170-1178, 1978.

**Vetter C**. Bluttest ermöglicht Therapiekontrolle - der HER-2/neu-Serumtest liefert einen quantitativen Befund zur Effektivität der Behandlung mit dem Antikörper Trastuzumab. *Dt Ärzteblatt* 46: 2429, 2002.

**Washtein WL**. Increased levels of thymidylate synthase in cells exposed to 5-fluorouracil. *Mol Pharmacol* 25: 171-177, 1984.

**Weidner N**, Moore D, Vartanian R. Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MiB1 antibody. *Hum Pathol* 25: 337-342. 1994.

**Wickerham L**. Tamoxifen – an update on current data and where it can how be used. *Breast Cancer Res Treat* 75: 7-12, 2002.

**Willett WC**, Rockhill B, Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA. Epidemiology and nongenetic causes of breast cancer. In: *Diseases of the breast*, 2<sup>nd</sup> ed JR Harris (ed): pp 175-220. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia 2000.

**Wittekind C**, Meyer HJ, Bootz F. TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 6.Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2002.

**Wei X**, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest* 98: 610-615, 1996.

**Yang Q**, Sakurai T, Shan L, Yoshimura G, Yu Z, Suzuma T, Tamaki T, Umemura T, Nakamura Y, Nakamura M, Utsunomiya H, Mori I, Kakudo K. Thymidine phosphorylase expression correlates with tumor differentiation and bcl-2 in invasive breast cancer. *Breast Cancer* 7: 210-214, 2000.

**Yang Q**, Barbareschi M, Mori I, Mauri F, Muscara M, Nakamura M, Nakamura Y, Yoshimura G, Sakurai T, Caffo O, Galligioni E, Palma PD, Kakudo K. Prognostic value of thymidine phosphorylase expression in breast carcinoma. *Int J Cancer* 97: 512-517, 2002.

**Yamachika T**, Nakanishi H, Inada K, Tsukamoto T, Shimizu N, Kobayashi K, Fukushima S, Tatematsu M. A new prognostic factor for colorectal carcinoma, thymidylate synthase, and its therapeutic significance. *Cancer* 82: 70-77, 1998.

**Yamamoto Y**, Toi M, Tominaga T. Prediction of the effect of 5-deoxy-5-fluorouridine by the status of angiogenic enzyme thymidine phosphorylase expression in recurrent breast cancer patients. *Oncol Rep* 3: 863-865, 1996.

**Yeh KH**, Shun CT, Chen CL, Lin JT, Lee WJ, Lee PH, Chen YC, Cheng AL. Overexpression of p53 is not associated with drug resistance of gastric cancers to 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy. *Hepatogastroenterology* 46: 610-615, 1999.

**Yuan S**, Rosenberg L, Ilieva A, Agapitos D, Duguid WP. Early changes of gene expression during cerulein supramaximal stimulation. *Pancreas* 19: 45-50, 1999.

**Zembutsu H**, Ohnishi Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Katagiri T, Ueyam Y, Tamaoki N, Nomura T, Kitahara O, Yanagawa R, Hirata K, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res* 62: 518-527, 2002.

**Zhan Q**, Chen IT, Antinore MJ, Fornace AJ Jr. Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding. *Mol Cell Biol* 18: 2768-2778, 1998.

**Zhou X**, Wang XW, Xu L, Hagiwara K, Nagashima M, Wolkowicz R, Zurer I, Rotter V, Harris CC. COOH-terminal domain of p53 modulates p53-mediated transcriptional transactivation, cell growth, and apoptosis. *Cancer Res* 59: 843-848, 1999.

**Zhong H**, Simons JW. Direct comparison of GAPDH,  $\beta$ -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 523-526, 1999.

## ANHANG

### TNM-Klassifikation

Stadieneinteilung des MK, angelehnt an: American Joint Commission on Cancer Staging Manual, 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. Seit 2002 gibt es eine neue, geringfügig veränderte TNM-Klassifikation für MK, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll (Wittekind et al., 2002)

<b>Primärtumor (T)</b>									
T1	≤ 2cm (T1mic ≤ 0,1cm, T1a ≤ 0,5cm ; T1b ≤ 1cm, T1c ≤ 2cm)								
T2	>2cm, ≤ 5cm								
T3	>5cm								
T4	mit Infiltration von Haut oder Brustwand								
	T4a	Infiltration der Brustwand							
	T4b	mit Ödem/Orangenhaut/Ulceration oder Haut-Satelliten-Metastasen ipsilateral							
	T4c	Kriterien von T4a + T4b							
	T4d	Inflammatorisches Mamma-Ca							
<b>Lymphknoten (N)</b>									
N1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten; (mind. 10 Lk.untersucht)								
	pN1a	Mikrometastasen ≤ 0,2cm							
	pN1bi	1-3 Lk.-Metastasen > 0,2 - < 2cm							
	pN1bii	≥ 4 Lk.-Metastasen > 0,2 - < 2cm							
	pN1biii	≤ 2cm mit Lk.-Kapseldurchbruch							
	pN1biv	Lk.-Metastasen > 2cm							
N2	fixierte Lk.-Metastasen (untereinander oder an axillären Strukturen)								
N3	Lk.-Metastasen entlang der A.mammaria interna								
<b>Fernmetastasen (M)</b>									
M0	keine Fernmetastasen								
M1	Fernmetastasen (dazu zählen auch die supraklavikulären Lk.)								
<b>Stadium</b>									
I	T1	N0	M0						
IIA	T0	N1	M0	T1	N1	M0	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0	T3	N0	M0			
IIIA	T0-2	N2	M0	T3	N1-2	M0			
IIIB	T4	N0-3	M0	T1-4	N3	M0			
IV	T1-4	N0-3	M1						

## DANKSAGUNG

Prof. Dr. J. Rüschoff danke ich für die Überlassung des Themas und Übernahme des Referats.

Prof. Dr. med. J. Rüschoff gilt zudem mein Dank dafür, dass er mir die Arbeit in den Laboren der Pathologie Kassel ermöglichte, für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und die verständnisvolle, beratende und motivierende Unterstützung während der experimentellen als auch der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation.

Herrn R. Ziegler danke ich sehr für das Zusammentragen der klinischen Patientinnendaten. An dieser Stelle möchte ich auch Frau Dr. Conrad, Abteilung Chirurgie des Elisabeth-Krankenhauses zu Kassel danken, die sehr hilfsbereit Auskunft zu fehlenden klinischen Daten gab.

Herzlich danken möchte ich meiner Kollegin Frau Dr. K. Gloeckner-Hofmann, die mir bei der Zusammenstellung der klinischen Daten half und die immunhistochemischen Auswertungen der Tumorproben wesentlich unterstützte.

Dr. rer. nat. K. Beyser und Dr. rer. nat. T. Brodegger danke ich für die Einarbeitung und die fachliche Unterstützung im Labor.

Den technischen Assistentinnen des molekularbiologischen und immunhistochemischen Labors verdanke ich Einführungen in die methodischen Schritte der Immunhistochemie und experimentelle Unterstützung.

Bei Datenaufarbeitung und statistischer Auswertung waren Beratung und Hilfe von Dr. rer. nat. F. Krause (Statistik und Biometrie, Roche Diagnostics Penzberg) essentiell. Auch Dr. rer. nat. Grunert aus der gleichen Abteilung gebührt Dank für die Unterstützung.

Ich möchte mich hier ebenso ganz herzlich bei Dr. V. rer. nat. Lutz (Programm Managerin Pharmaco-Diagnostics, Roche Diagnostics Penzberg) für die Unterstützung und Beratung bedanken.

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG:

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

“Biomarker zur Vorhersage des klinischen Verlaufes von Patientinnen mit Mammakarzinom nach adjuvanter Therapie mit CMF unter besonderer Betrachtung der Enzyme Thymidinphosphorylase, Dihydropyrimidindehydrogenase und Thymidylatsynthase”

im Institut für Pathologie des Klinikum Kassel unter Leitung von Prof. Dr. med. J. Rüschoff ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Mannheim, am

Romy Porstmann