

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**GDF-15-Spiegel bei Patienten mit HER2/neu positivem Mammakarzinom
im frühen Stadium: eine klinische Pilotstudie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tanja Leyh
aus Sindelfingen

Würzburg, Dezember 2020

Referent: Prof. Dr. med. Volker Kunzmann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Mammakarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2	Prädiktive und prognostische Faktoren.....	2
1.1.3	HER2/neu.....	5
1.1.4	Anti-HER2/neu Therapie.....	7
1.1.5	Trastuzumab-Resistenz.....	8
1.2	GDF-15.....	10
1.2.1	Grundlagen: Welche Rolle spielt GDF-15?	10
1.2.2	Auswirkungen von GDF-15 auf Tumorgewebe	11
1.3	Zielsetzung.....	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Patientenkollektiv	16
2.2	Ablauf der Studie.....	16
2.3	Probengewinnung und Aufbereitung	19
2.3.1	Probengewinnung.....	19
2.3.2	Material.....	19
2.3.3	Aufbereitung	19
2.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	20
2.4.1	Materialien	21
2.4.1.1	ELISA-Kit	21
2.4.1.2	Verwendete Reagenzien	21
2.4.1.3	Geräte und Verbrauchsgegenstände.....	22
2.4.2	Durchführung des Immunoassays	22
2.5	Statistische Analyse	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Patientencharakteristika	25
3.2	GDF-15-Spiegel bei HER2/neu positiven Mammakarzinomen	29
3.3	Korrelation von GDF-15 mit klinischen Variablen	31
3.4	Korrelationen der erhobenen Variablen.....	34
3.5	Nachbeobachtung.....	35

4	Diskussion	36
4.1	GDF-15-Spiegel beim Mammakarzinom	37
4.2	GDF-15 als prädiktiver Marker	38
4.3	GDF-15 und prognostische Faktoren	39
4.4	GDF-15 und Alter	40
4.5	GDF-15, BMI und Östrogenrezeptor	41
4.6	Limitationen und Ausblick.....	43
5	Zusammenfassung	45
6	Anhang.....	46
6.1	Patienteninformation	46
6.2	Einwilligungserklärung	48
6.3	TNM-Klassifikation	50
6.4	Regressionsgrad nach Sinn	51
7	Literaturverzeichnis	52
I	Abbildungsverzeichnis	
II	Tabellenverzeichnis	
III	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Adjuvante Chemotherapie
ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
AKT	entspricht Protein Kinase B
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CDK	Cyclin-dependent kinase
CRP	C-reaktives Protein
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGR-1	Early growth response protein-1
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ER	Östrogenrezeptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GDF-15	Growth differentiation factor 15
GDF-15_0	Erste Probe von GDF-15
GDF-15_3	Zweite Probe von GDF-15
GDNF	Glial-derived neurotrophic factor
GFRAL	GDNF-family receptor α -like
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2/neu
HIF-1 α	Hypoxia induced factor-1 α
HR	Hazard ratio
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1-receptor
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin-6
IRS	Immunreaktiver Score
M	Median
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MIC-1	Macrophage inhibitory cytokine-1
mTOR	Mammalian target of rapamycin

n	Anzahl
NACT	Neoadjuvante Chemotherapie
NAG-1	Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene -1
PBS	Phosphate buffered saline
P	Phosphorylierung
p	Statistische Signifikanz
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTGFB	Placental transforming growth factor beta
r	Korrelationskoeffizient
TGF- β	Transforming growth factor beta
TK	Thyrosinkinase
TMB	Tetramethylbenzidine
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Hinweis:

In dieser Arbeit werden aus Gründen der besseren Lesbarkeit nur die maskulinen Formen von geschlechtsspezifischen Begriffen verwendet. Soweit nicht anders angegeben, sind damit stets beide Geschlechter gemeint.

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom stellt in Deutschland mit circa 69 000 Neuerkrankungen pro Jahr das häufigste Karzinom der Frau dar (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut, 2019). Doch nicht nur Frauen, sondern auch Männer können davon betroffen sein. Etwa 1 % der Tumore werden bei Männern diagnostiziert (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut, 2019).

Während die Inzidenz jahrelang stetig gestiegen ist, hat sie in den letzten Jahren wieder etwas abgenommen (siehe Abbildung 1). Der extreme Anstieg in den Jahren 2005 bis 2009 ist wahrscheinlich auf die Einführung des Mammographie-Screenings sowie verbesserte diagnostische Nachweismethoden zurückzuführen (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut, 2019). Die Mortalität mit circa 18 000 Sterbefällen pro Jahr ist im Verhältnis zur Inzidenz gesunken (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut, 2019).

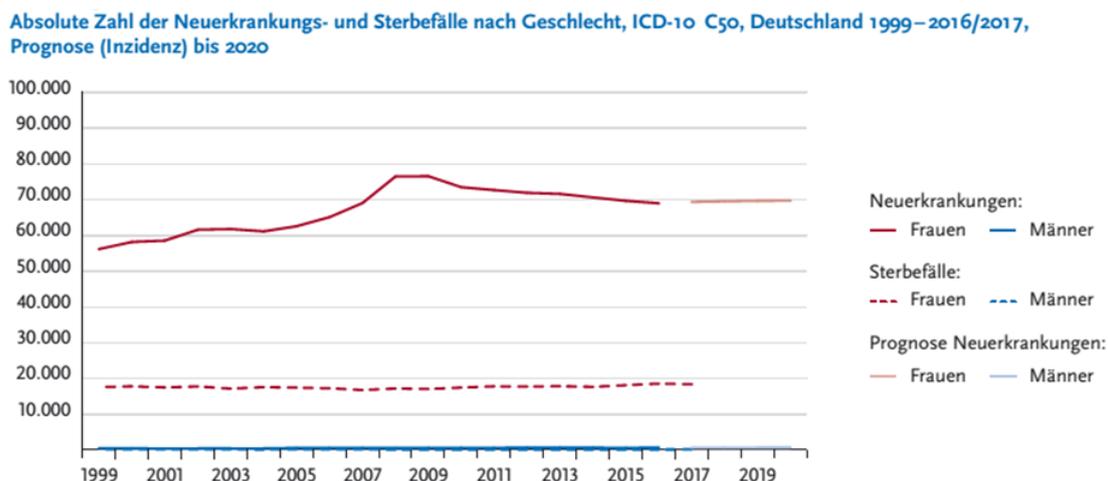


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität beim Mammakarzinom in Deutschland

Quelle: (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut, 2019), mit freundlicher Genehmigung.

Für die Entstehung eines Mammakarzinoms gibt es keine eindeutige Ursache. Nach heutigem Wissensstand sind jedoch einige Risikofaktoren bekannt, die die Entstehung begünstigen. Wie bei vielen anderen Karzinomen, gehört vor allem das Alter zu einem der wichtigsten Risikofaktoren (McPherson et al., 2000). Beim Mammakarzinom spielen aber auch körpereigene und exogen zugeführte Hormone eine große Rolle, so führen beispielsweise eine frühe Menarche und eine späte Menopause zu einem erhöhten Risiko (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, 2012). Des Weiteren spielen modifizierbare Faktoren die den Lebensstil betreffen eine wichtige Rolle, insbesondere Übergewicht, erhöhter Alkoholkonsum und verminderte körperliche Aktivität (Tamimi et al., 2016; van Gemert et al., 2015). Zu diesen Risikofaktoren wird auch das Rauchen gezählt (Gaudet et al., 2013).

Ebenfalls nicht außer Acht zu lassen, sind genetische Faktoren. Ein relevanter Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms ist das hereditäre Mammakarzinom, welches größtenteils auf einer Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 beruht (Ford et al., 1998; King et al., 2003). Die Gene sind auf Chromosom 17q21 und Chromosom 13q12-13 lokalisiert (Hall et al., 1990; Wooster et al., 1994). Von einem hereditären Mammakarzinom sind allerdings nur etwa 5 bis 10 % aller Mammakarzinome betroffen (Rojas & Stuckey, 2016). Mutationsträgerinnen haben jedoch eine über 80-prozentige Wahrscheinlichkeit bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken (Ford et al., 1998). Frauen mit Verwandten ersten Grades mit einem Mammakarzinom in der Anamnese haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko (Stuckey, 2011).

1.1.2 Prädiktive und prognostische Faktoren

Vor einer Therapie von Mammakarzinomen werden heutzutage einige prädiktive und prognostische Faktoren bestimmt. Daraufhin angepasste Therapieschemata sollen das für die Patienten bestmögliche Outcome erzielen.

Zu den prädiktiven Faktoren werden der Hormonrezeptorstatus (Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR)) sowie das Vorhandensein von human epidermal growth factor Rezeptorproteinen (HER2/neu) gezählt (Kaufmann et al., 2013). Die Bestimmung dieser Größen kann helfen das Ansprechen auf eine

Therapie abzuschätzen. So zeigen beispielsweise HER2/neu positive Mammakarzinome ein schlechteres Ansprechen auf Chemo- und Hormontherapien (Houston et al., 1999). Für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie wird der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner zum immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis, welcher Werte zwischen 0 und 12 annehmen kann, angewandt (Remmele & Stegner, 1987). Ab einem Wert von 2 wird der Tumor als Hormonrezeptor positiv angesehen (Stierer et al., 1993).

Einer der wichtigsten Prognosefaktoren ist die Tumorgöße. Eine Metaanalyse von Carter et al. mit 24 740 eingeschlossenen Fällen konnte eine lineare Beziehung zwischen Tumorgöße und dem Gesamtüberleben von Patienten mit Mammakarzinom herstellen (Carter et al., 1989). Je größer der Tumor zum Diagnosezeitpunkt ist, desto geringer ist das Fünf-Jahres-Überleben (Carter et al., 1989). Zum Beispiel konnte in der Studie ein prozentualer Abfall des Fünf-Jahres-Überlebens von 96,3 auf 82,2 % bei einer Zunahme des Tumordurchmessers von kleiner 2 cm auf größer 5 cm für Fälle ohne Lymphknotenbefall gezeigt werden (Carter et al., 1989).

Prognostisch am aussagekräftigsten scheint die Anzahl der befallenen axillären Lymphknoten zu sein. Laut Carter et al. liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei einer Tumorgöße kleiner 2 cm bei 96,3 %, wenn keine Lymphknoten befallen sind, wohingegen sie nur bei 66 % liegt, wenn mehr als vier Lymphknoten positiv sind (Carter et al., 1989). Tumorgöße und Lymphknotenstatus sind eigenständige Prognosefaktoren, die sich aber additiv auf das Outcome auswirken (Carter et al., 1989). Michaelson et al. konnten die Ergebnisse von Carter et al. bestätigen und zeigten ergänzend, dass jeder positiv diagnostizierte Lymphknoten zusätzlich etwa 6 % zur Mortalität beiträgt (Michaelson et al., 2003).

Das Alter bei Diagnose ist nicht nur ein Risikofaktor, sondern besitzt auch prognostischen Wert. Mammakarzinome bei Patientinnen, die jünger als 40 Jahre sind, weisen in der Regel prognostisch ungünstigere Faktoren auf und verlaufen dementsprechend aggressiver (Erić et al., 2018). Eine Anpassung der Therapie wäre erforderlich.

Histologisch kann der Tumor anhand seiner Zelldifferenzierung in drei Grade eingeteilt werden (siehe Tabelle 1). Für das Grading werden die Kriterien nach

Elston und Ellis herangezogen: Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate (Elston & Ellis, 1991). Das Grading korreliert mit dem Auftreten von Rezidiven, der Mortalität und infolgedessen mit der Prognose (Rakha et al., 2008). Eine peritumorale Lymph- und/oder Gefäßinvasion ist ebenfalls von prognostischer Relevanz (Cianfrocca & Goldstein, 2004).

Tabelle 1: Einteilung des Gradings nach Elston und Ellis

Malignitätsgrad	Grading	Definition
Gering	G1	Gut differenziert
Mäßig	G2	Mäßig differenziert
Hoch	G3	Schlecht differenziert

Quelle: modifiziert nach (Elston & Ellis, 1991)

Als wichtiger Proliferationsmarker dient das Ki-67 Protein, welches sich im Nukleus von sich proliferierenden Zellen befindet und somit die Mitoserate des Tumors widerspiegelt (Gerdes et al., 1983). Ki-67 wird in Prozent angegeben und kann Werte zwischen 0 und 100 annehmen. Gesundes Brustgewebe weist in der Regel Werte unter 3 % auf (Clarke et al., 1997). In der Literatur variieren die Grenzwerte für Ki-67 zwischen 15 und 25 %, ein einheitlicher Wert ist bis dato nicht bekannt (Denkert et al., 2013; Goldhirsch et al., 2013; "Leitlinienprogramm Onkologie," 2017). Während Ki-67 unter anderem als Prognosefaktor aufgelistet wird, zeigten Denkert et al., dass Ki-67 als prädiktiver Faktor für das Ansprechen einer neoadjuvanten Therapie (NACT) eingesetzt werden kann (Denkert et al., 2013).

Für das Ansprechen einer NACT kann der Regressionsgrad nach Sinn herangezogen werden, welcher anhand des resezierten Tumorgewebes vom Pathologen bestimmt wird. Grad 0 entspricht keinem Effekt der Therapie auf den Tumor, wohingegen bei Grad 4 kein Tumor mehr nachweisbar ist (für Details siehe Tabelle 15 im Anhang) (Sinn et al., 1994).

1.1.3 HER2/neu

Der transmembrane Tyrosinkinase-Rezeptor HER2/neu gehört zu den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR = epidermal growth factor receptor) (Rubin & Yarden, 2001). Er liegt auf Chromosom 17q21-q22 (Coussens et al., 1985).

HER2/neu kann als Monomer oder Dimer, entweder Homo- oder Heterodimer, an der Zelloberfläche vorliegen (Alroy & Yarden, 1997; Graus-Porta et al., 1997). Eine Dimerisierung kann mit anderen Rezeptoren der EGFR-Familie (HER1, HER3 und HER4) erfolgen (Goldman et al., 1990; Graus-Porta et al., 1997). Die Phosphorylierung der Tyrosinkinasen führt zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege. Durch die Aktivierung des Phosphoinositid-3-kinase/AKT- (PI3K/AKT) und des Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase-Signalwegs (Ras/Raf/MAPK) wird die Tumorgenese durch Proliferation der Zellen und Verhinderung der Apoptose vorangetrieben (siehe Abbildung 2) (Feng et al., 2018; Ono & Kuwano, 2006). HER2/neu ist unter allen EGF-Rezeptoren der bevorzugte Dimerisierungspartner (Graus-Porta et al., 1997). Eine Überexpression von HER2/neu führt dementsprechend zu einem überschießenden Zellwachstum und maligner Entartung (Hynes & Stern, 1994; Slamon et al., 1987). HER2/neu wird hauptsächlich in Mamma-, Ovarial- und Magenkarzinomen überexprimiert und spielt therapeutisch eine Rolle (Hynes & Stern, 1994). Es kommt deutlich häufiger beim duktalem Carcinoma in situ (DCIS) als beim invasiven Mammakarzinom vor (Liu et al., 1992; van de Vijver et al., 1988).

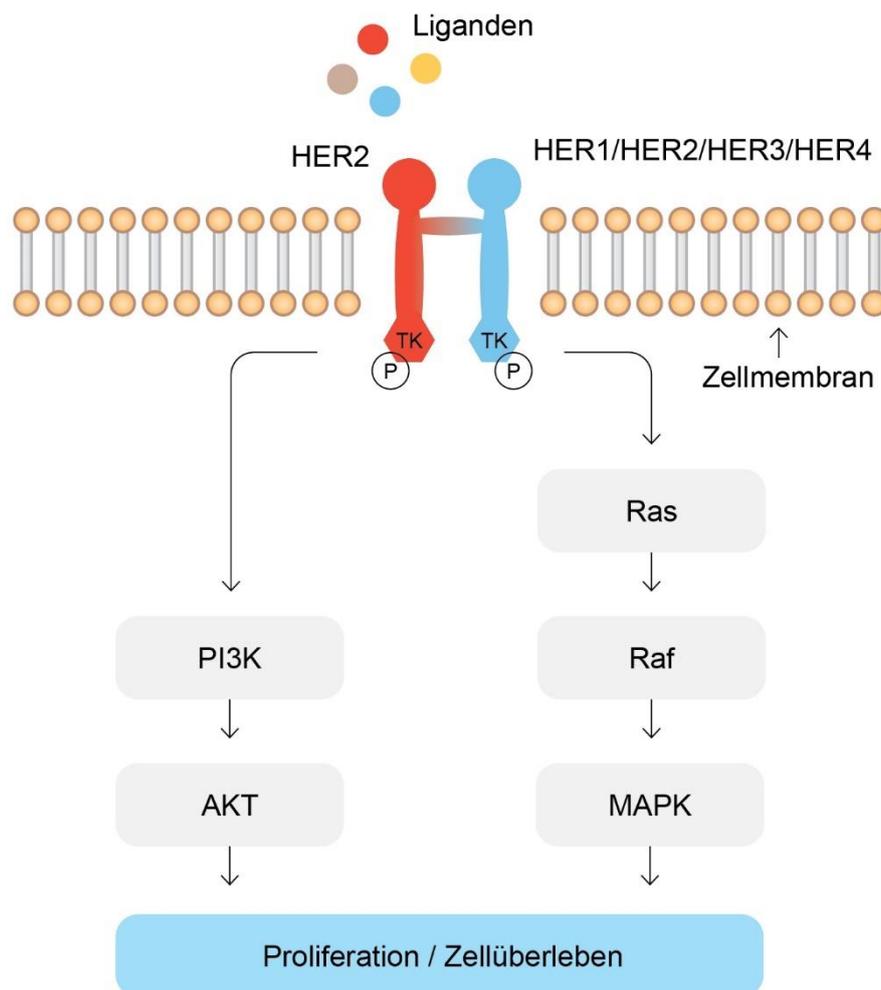


Abbildung 2: HER2/neu Signalkaskade

Die Dimerisierung von HER2/neu kann mit sich selbst oder mit anderen Rezeptoren der EGFR-Familie erfolgen. Durch die Phosphorylierung (= P) der Tyrosinkinassen (= TK) kommt es zur Aktivierung des PI3K/AKT- und des Ras/Raf/MAPK-Signalwegs. Dies resultiert in Zellüberleben und Proliferation.

Quelle: modifiziert nach (Feng et al., 2018)

Die HER2/neu Überexpression beruht in der Regel auf einer Genamplifikation (Hynes & Stern, 1994). In einer Studie von Slamon et al. konnten bei circa 30 % der Tumore der Mamma eine 2- bis 30-fache Genamplifikation aufgezeigt werden (Slamon et al., 1987). Es gibt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der HER2/neu Genamplifikation und der Zeit bis zum erneuten Progress des Tumors sowie dem Gesamtüberleben (Houston et al., 1999; Slamon et al., 1987).

Das Ansprechen auf eine endokrine Therapie bei HER2/neu positiven (ER positiven) Tumoren scheint signifikant geringer als bei HER2/neu negativen (ER positiven) Tumoren (Houston et al., 1999).

1.1.4 Anti-HER2/neu Therapie

Bei einem nicht unerheblichen Anteil von 20 bis 30 % der Patienten mit Mammakarzinom wird eine HER2/neu Überexpression diagnostiziert (Rubin & Yarden, 2001). Diese Patienten zeigen in der Regel einen aggressiveren Krankheitsverlauf mit schlechterer Prognose (Gullick et al., 1991; Slamon et al., 1987). Die Assoziation von HER2/neu mit der Tumorentstehung erfordert eine zielgerichtete systemische Therapie. Für diese Subgruppe gilt die in Tabelle 2 aufgelistete postoperative Therapieempfehlung. Bei der Notwendigkeit einer systemischen Therapie erfolgt diese bei HER2/neu positiv diagnostizierten Tumoren auch häufig neoadjuvant (Coates et al., 2015).

Tabelle 2: Postoperative Therapieempfehlung für HER2/neu positive Mammakarzinome

T1a, N0	Keine Systemtherapie
T1 b, c, N0	Chemotherapie (Taxan) plus Trastuzumab für 12 Monate
T ≥ 2 oder N > 0	Chemotherapie (Anthrazyklin + Taxan) plus Trastuzumab für 12 Monate
ER positiv	Zusätzlich endokrine Therapie

Quelle: modifiziert nach (Coates et al., 2015)

Der rekombinante, humane, monoklonale HER2/neu-Antikörper – Trastuzumab (Herceptin®) – wird beim Mammakarzinom eingesetzt, wenn dieses HER2/neu überexprimiert (Boekhout et al., 2011). Durch die Bindung an die extrazelluläre Domäne des HER2/neu-Rezeptors verhindert es dessen Spaltung (Boekhout et al., 2011). Die intrazelluläre Signalkaskade kann daraufhin nicht aktiviert werden (Boekhout et al., 2011). Dadurch kommt es zur Hemmung von Proliferation und zur Apoptose der Tumorzellen.

Pertuzumab, ein neuer, humanisierter, monoklonaler HER2/neu-Antikörper, bindet an die extrazelluläre Dimerisierungsdomäne von HER2/neu und verhindert

somit die für die Aktivierung nötige Heterodimerisierung mit einem anderen Rezeptor (Agus et al., 2002; Pohlmann et al., 2009).

Beide Antikörper vermitteln zusätzlich eine zielgerichtete Immunantwort, die sogenannte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC = antibody dependent cell-mediated cytotoxicity), welche eine Lyse der Zielzellen induziert (Boekhout et al., 2011; Deng et al., 2018). Die Studien NSABP-B31 und NCCTG-N9831 evaluierten die Kombination einer adjuvanten Chemotherapie mit Trastuzumab und konnten in einer Langzeit-Follow-up Analyse eine Reduktion der Mortalitätsrate von 39 % zeigen (Perez et al., 2011). In einer Studie von Swain et al. erbrachte die duale Blockade von HER2/neu mit Trastuzumab und Pertuzumab eine relative Reduktion des Mortalitätsrisikos von 34 % im Vergleich zu einer Therapie ohne Pertuzumab (Swain et al., 2013). Mammakarzinome, die HER2/neu positiv und ER negativ charakterisiert werden, profitieren am stärksten von der dualen Blockade mit einer pathologisch kompletten Remission von 71 % (Curigliano & Goldhirsch, 2017). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Trastuzumab mit einem Risiko für Kardiotoxizität verbunden ist und deshalb eine engmaschige kardiale Überwachung erfordert (Cobleigh et al., 1999; Slamon et al., 2001; Vogel et al., 2002). Durch eine duale Blockade wird dieses Risiko nicht erhöht (Schneeweiss et al., 2013; Swain et al., 2013).

1.1.5 Trastuzumab-Resistenz

Trastuzumab in Kombination mit Chemotherapie konnte im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie die Prognose für Patienten mit HER2/neu positivem Mammakarzinom verbessern (Slamon et al., 2001). Die Ansprechrate, die Zeit zum Progress und die Überlebenszeit konnten durch die 1998 eingeführte Therapie signifikant gesteigert werden (Menyhart et al., 2015; Slamon et al., 2001). Bis heute gehört die Anti-HER2/neu-Therapie zum Goldstandard in der Behandlung der HER2/neu positiven Mammakarzinome. Dennoch gibt es Patienten, die initial nicht auf die Therapie ansprechen oder sekundär eine Resistenz gegen Trastuzumab entwickeln. Die alleinige Trastuzumab-Therapie über ein Jahr erzielte in verschiedenen Studien eine Ansprechrate von 11,6 oder 26 % bei Patienten im metastasierten Stadium (Baselga et al., 1996; Vogel et al., 2002).

Unter Kombination von Trastuzumab mit einer Chemotherapie sprechen hingegen etwa 50 bis 63 % initial an (Esteva et al., 2002; Slamon et al., 2001). Die Frage nach den Mechanismen einer Trastuzumab-Resistenz war Forschungsgegenstand einiger Studien. Im Folgenden werden beispielhaft einige Ansätze, die zur Resistenzentstehung führen könnten, erläutert.

Das p95HER2, ein gekürztes HER2/neu Protein, kann bei einer Vielzahl an HER2/neu positiv erkrankten Tumorpatienten nachgewiesen werden (Pohlmann et al., 2009). Dem p95HER2 fehlt die extrazelluläre Domäne und somit die Bindungsstelle von Trastuzumab (Pohlmann et al., 2009). Trastuzumab ist daher wirkungslos und die Kinase ist aktiv (Pohlmann et al., 2009).

Der Tumorsuppressor, phosphatase and tensin homolog (PTEN), inhibiert die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs und wird durch Trastuzumab aktiviert (Nagata et al., 2004). Bei circa 50 % der Mammakarzinome wird ein Funktionsverlust von PTEN festgestellt, woraus ein Wirkverlust für Trastuzumab und folglich ein schlechteres Ansprechen der Antikörpertherapie resultiert (Pandolfi, 2004). Durch PI3K-Inhibitoren kann die Sensitivität gegenüber Trastuzumab wieder hergestellt werden (Nagata et al., 2004).

Die Mutation im PI3KCA-Gen, die zu etwa 23 % in Mammakarzinomen (HER2/neu positiv) vorkommt, kann zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs führen und somit zur Tumorresistenz (Majewski et al., 2015).

Nahta et al. konnten die Phosphorylierung von HER2/neu durch den insulin-like growth factor 1-receptor (IGF-1R), einen Tyrosinkinase-rezeptor, welcher die Zellproliferation stimuliert, nachweisen und in diesem Zusammenhang eine Trastuzumab-Resistenz (Nahta et al., 2005).

Andere Studien machen die Tyrosinkinase Src hauptverantwortlich für das Auftreten einer Trastuzumab-Resistenz (Peiro et al., 2014; Zhang et al., 2011). Src kann unter anderem durch die Überexpression von EGFR und IGF-1R sowie durch Mangel an PTEN aktiviert werden (Zhang et al., 2011). Nachfolgend werden daraufhin der PI3K/AKT- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg aktiviert (Peiro et al., 2014; Zhang et al., 2011). Die Folge ist eine Proliferation der Tumorzellen und das Überleben dieser. Tumorpatienten mit einer hohen Expression von phosphoryliertem Src (aktives Protein) zeigen eine niedrigere Ansprechrate auf

Trastuzumab sowie ein schlechteres Gesamtüberleben (Zhang et al., 2011). Mittels Saracatinib, einem Src-Inhibitor, konnte eine Re-Sensibilisierung von Trastuzumab-resistenter Zellen nachgewiesen werden (Zhang et al., 2011).

In der Literatur werden noch viele weitere Forschungsansätze bezüglich der Resistenzentwicklung diskutiert. Wahrscheinlich handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. Die Resistenz aufgrund der erhöhten Expression von growth differentiation factor-15 (GDF-15), welches HER2/neu phosphoryliert und darüber die entsprechenden Signalkaskaden aktiviert, wurde 2011 erstmalig in diesem Zusammenhang diskutiert und war mitunter Gegenstand dieser Arbeit (Joshi et al., 2011).

1.2 GDF-15

1.2.1 Grundlagen: Welche Rolle spielt GDF-15?

GDF-15 ist ein Zytokin, welches als 25 kDa schweres Dimer sezerniert wird (Fairlie et al., 1999). Es gehört zur transforming growth factor-beta (TGF- β) Superfamilie und ist auf Chromosom 19p12-13.1 lokalisiert (Bootcov et al., 1997; Lawton et al., 1997).

GDF-15 (Bottner et al., 1999) wird in der Literatur auch macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) (Bootcov et al., 1997), nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) (Baek et al., 2001) oder placental transforming growth factor beta (PTGFB) (Lawton et al., 1997) genannt. Verschiedene Forschungsgruppen haben das Protein in unterschiedlichen Zusammenhängen erstmalig beschrieben. Schon aus der Namensgebung geht hervor, dass GDF-15 eine multifunktionelle Rolle einnimmt.

Physiologisch liegt GDF-15 bei einem Serumspiegel zwischen 0,20 ng/ml und 1,15 ng/ml und kommt vor allem im Plazentagewebe vor (Brown et al., 2003; Fairlie et al., 1999). Unter anderem wird es während der Schwangerschaft in großen Mengen ausgeschüttet (Breit et al., 2017). Ein niedriger GDF-15-Spiegel geht mit einem erhöhten Risiko für eine Fehlgeburt einher (Tong et al., 2004). Akute Ereignisse wie Verletzungen, aber auch Entzündungen oder Krebserkrankungen können erhöhte GDF-15-Spiegel hervorrufen (Eling et al., 2006; Kempf

et al., 2007). GDF-15 spielt ferner auch eine Rolle in der Adipozytenfunktion, bei Diabetes mellitus, kardiovaskulären Erkrankungen und renaler Dysfunktion (Ding et al., 2009; Kempf et al., 2007; Wallentin et al., 2013). Generell steigt GDF-15 infolge einer inflammatorischen Reaktion an. Korrelationen mit dem Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (CRP) oder Interleukin-6 (IL-6) konnten diesbezüglich nachgewiesen werden (Arfsten et al., 2019). Unter normalen Umständen wird GDF-15 in den meisten Geweben schwach oder gar nicht exprimiert (Bootcov et al., 1997; Bottner et al., 1999; Fairlie et al., 1999).

Lange Zeit war nicht bekannt, an welchen Rezeptor GDF-15 bindet und bei welchen Signalwegen GDF-15 eine relevante Rolle spielt. Emmerson et al. identifizierten 2017 den glial-derived neurotrophic factor (GDNF) family receptor α -like (GFRAL-Rezeptor) in der Area postrema des Hirnstamms, an welchen GDF-15 bindet (Emmerson et al., 2017). GDF-15 wurde schon in mehreren Studien als Auslöser für Tumorkachexie verantwortlich gemacht (Baek et al., 2006; Johnen et al., 2007). Durch die Bindung an den GFRAL-Rezeptor kann GDF-15 den Appetit zentral steuern und somit eine Kachexie hervorrufen (Emmerson et al., 2017).

1.2.2 Auswirkungen von GDF-15 auf Tumorgewebe

Die Rolle von GDF-15 erscheint komplex und ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht im Ganzen verstanden. Vor allem in Bezug auf Tumorentstehung und Tumorstadium gibt es kontroverse Meinungen. Einerseits konnten einige Studien eine anti-tumorigene Wirkung von GDF-15 aufzeigen (Baek et al., 2006; Eling et al., 2006; Husaini et al., 2012). Beispielsweise wird GDF-15 durch p53, einem Tumorsuppressorgen, hochreguliert und reagiert auf DNA-Schäden mit einem Zellzyklusarrest oder mit der Einleitung der Apoptose (P. X. Li et al., 2000). Andererseits besteht eine Assoziation mit dem Progress verschiedener Tumoren, wie beispielsweise dem Prostatakarzinom, dem Glioblastom, dem Melanom, dem kolorektalen Karzinom oder dem Mammakarzinom (Brown et al., 2003; Joshi et al., 2011; Roth et al., 2010; Weide et al., 2016; Welsh et al., 2003). Die meisten Studien beziehen sich hierbei auf metastasierte Tumorstadien. Es gibt Hinweise, dass GDF-15 vor allem die Invasion und Migration von Tumorzellen beeinflusst

(C. Li et al., 2016; Peake et al., 2017). Es korreliert mit dem Vorhandensein von Metastasen und schlechtem Gesamtüberleben (C. Li et al., 2016; Selander et al., 2007; Weide et al., 2016).

GDF-15 erscheint in seiner Funktion wandelbar, sodass man zu Beginn der Tumorentstehung von einem anti-tumorigenen Effekt ausgeht, der sich in späten Erkrankungsstadien in einen pro-tumorigenen Effekt umkehrt (Baek et al., 2006; Bauskin et al., 2006). In fortgeschrittenen Tumorerkrankungen können GDF-15-Werte von bis zu 50 ng/ml gemessen werden (physiologisch bis 1,15 ng/ml) (Johnen et al., 2007). Bestimmte Tumore scheinen mehr GDF-15 zu sezernieren als andere. So zeigte eine Studie von Welsh et al. erhöhte Serumspiegel bei metastasierten Karzinomen der Prostata, der Brust und des Kolons (Welsh et al., 2003). Dabei waren die GDF-15-Spiegel deutlich erhöht bei kolorektalen Karzinomen, nur gering erhöht oder sogar im physiologischen Bereich bei Mammakarzinomen (Welsh et al., 2003). Andere Studien bestätigten den Befund von niedrigeren Werten bei Mammakarzinomen im Vergleich zu anderen soliden Malignomen, betonten aber dennoch dessen Relevanz in der Tumorprogression (Arfsten et al., 2019; Wang et al., 2014).

Die Überexpression von GDF-15 stimuliert verschiedene Signalwege, die unter anderem auch von HER2/neu stimuliert werden. GDF-15 aktiviert die Signalwege PI3K/AKT und Ras/Raf//MAPK, welche die Zelldifferenzierung und Proliferation beeinflussen (Joshi et al., 2011; Kim et al., 2008; S. Li et al., 2018; Sasahara et al., 2017). Li et al. zeigten beispielsweise an humanen Zervixkarzinom-Zellen, dass GDF-15 über HER2/neu diese Signalwege aktiviert, welche dann wiederum die Expression von p21, cycline dependent kinase (CDK4)/Zyclin D1 und CDK2/Zyclin E1 so modifizieren, dass es zu einer Beschleunigung des Zellzyklus kommt. (S. Li et al., 2018).

In einer Studie von Joshi et al. konnte ebenfalls eine Phosphorylierung von HER2/neu und die Aktivierung nachfolgender Signalwege durch GDF-15 bei HER2/neu überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden (Joshi et al., 2011). Die Sensitivität gegenüber Trastuzumab wurde durch GDF-15 gemindert und konnte durch Ausschalten von GDF-15 (Knockdown) wieder hergestellt werden (Joshi et al., 2011). GDF-15 scheint jedoch nicht nur die

PI3K/AKT- und Ras/Raf/MAPK-Signalwege zu aktivieren, sondern auch hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) (Kim et al., 2008). Der über die Kinase mammalian target of rapamycin (mTOR) aktivierte Faktor HIF-1 α induziert nachfolgend unter anderem die Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) (Kim et al., 2008). VEGF fördert die Angiogenese des Tumors und somit das Tumorgewachstum. Abbildung 3 veranschaulicht vereinfacht einige Signalwege von GDF-15 und wie sich diese auf das Tumorgewebe auswirken.

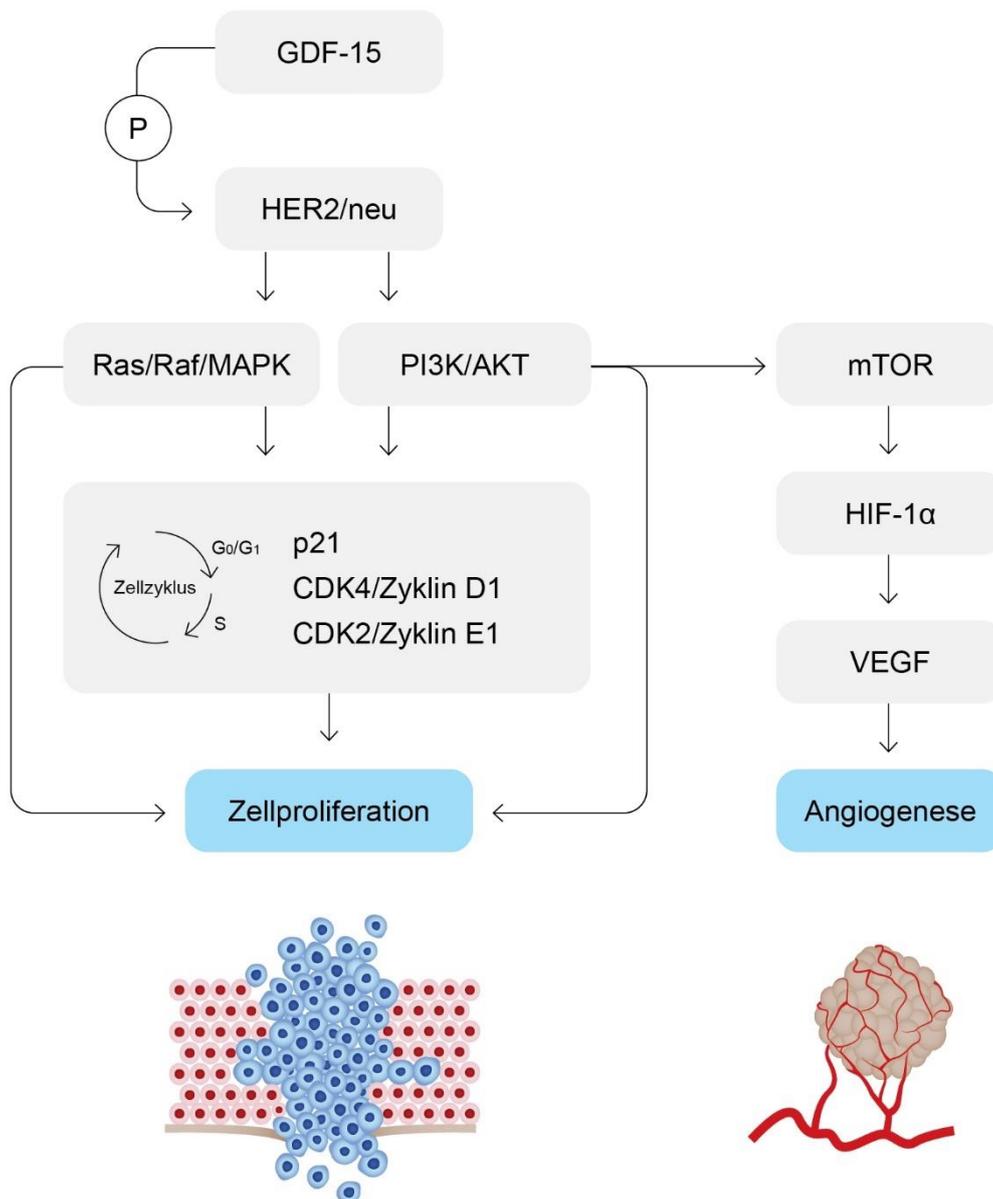


Abbildung 3: Einfluss von GDF-15 auf das Tumorgewebe über verschiedene Signalwege

Durch die Phosphorylierung (= P) von HER2/neu durch GDF-15 kommt es zur Aktivierung des Ras/Raf/MAPK- und PI3K/AKT-Signalwegs. Die wiederum führen durch Modifizierung von p21, CDK4/Zyclin D1 und CDK2/Zyclin E1 zur Beschleunigung des Zellzyklus. Daraus resultiert eine Proliferation der Zellen. PI3K/AKT kann ebenso mTOR aktivieren, was über HIF-1 α und VEGF zur Angiogenese des Tumors führt.

Quelle: modifiziert nach (S. Li et al., 2018)

1.3 Zielsetzung

Welche Rolle genau GDF-15 bei verschiedenen Erkrankungen einnimmt und inwiefern es eine Rolle für Therapien spielt, konnte bis zum jetzigen Wissensstand noch nicht vollständig geklärt werden. Sicher ist jedoch, dass GDF-15 bei einigen Tumoren, vor allem in späten Tumorstadien, in hohem Maße exprimiert wird und dies mit einem frühzeitigen Progress und kürzerem Überleben assoziiert ist. Früh diagnostizierte Karzinome wurden diesbezüglich noch wenig untersucht. Ob sich erhöhte GDF-15-Spiegel auch schon bei Patienten in frühen Tumorstadien des Mammakarzinoms nachweisen lassen, war ein Ziel dieser Pilotstudie.

Einige Untersuchungen konnten eine Überexpression von GDF-15 beim Mammakarzinom zeigen. Die Subgruppe HER2/neu positiver Mammakarzinome wird als prognostisch ungünstig eingestuft und benötigt eine spezifische Antikörpertherapie. Erhöhte GDF-15-Spiegel korrelierten in experimentellen Studien mit HER2/neu positiven Mammakarzinom-Zelllinien mit einem reduzierten Therapieansprechen auf Trastuzumab. Spielt GDF-15 diesbezüglich auch im klinischen Verlauf eine Rolle und kann er als prädiktiver Marker dienen?

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen GDF-15-Spiegel bei Patienten mit HER2/neu positivem Mammakarzinom im frühen Stadium im klinischen Verlauf erstmals zu ermitteln und zum anderen das Ansprechen auf eine Antikörpertherapie zu analysieren, unter Zuhilfenahme von GDF-15 und dem Regressionsgrad nach Sinn.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen einer prospektiven, nicht-interventionellen Pilotstudie zur Evaluation von GDF-15 bei Patienten mit HER2/neu positivem Mammakarzinom im frühen Stadium, das heißt noch nicht fernmetastasiert, konnten im Zeitraum von Januar 2017 bis Juni 2018 22 Patienten in der Frauenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg rekrutiert werden. Die Patienten kamen regelmäßig zur Therapie in die Chemotherapie-Ambulanz der Frauenklinik und konnten dort über die Studie aufgeklärt werden. Die für die Studie benötigten Blutproben wurden ebenfalls in diesem Rahmen abgenommen.

Für die Teilnahme an der Studie mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

1. Patienten/innen mit Erstdiagnose eines HER2/neu positiven Mammakarzinoms, die einer Anti-HER2/neu-Therapie zugeführt werden sollen
2. Alter größer 18 Jahre
3. Schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie

Ausschließlich Patienten, die ihr Einverständnis gaben, wurden in die Studie aufgenommen. Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki. Eine Genehmigung der Ethik-Kommission der Universität Würzburg lag vor (15/18-me).

2.2 Ablauf der Studie

Für die Pilotstudie konnten im Zeitraum von Januar 2017 bis Juni 2018 22 Patienten rekrutiert werden. Alle Patienten wurden in die Studie eingeschlossen und ausgewertet. Den Ablauf der Studie zeigt Abbildung 4.

Die erste Probenentnahme erfolgte in einem Zeitraum von bis zu drei Monaten vor Antikörpertherapie, in welchem sich die Patienten bereits in chemotherapeutischer Behandlung befanden. Die meisten Patienten erhielten diese im Sinne einer NACT, lediglich 4 Patienten waren vorangehend operiert worden und erhielten daher eine adjuvante Chemotherapie (ACT). Anschließend folgte die Antikörpertherapie mit mindestens einem HER2/neu-Antikörper (Trastuzumab

und/oder Pertuzumab). Etwa drei Monate nach Beginn dieser Therapie fand die zweite Probenentnahme statt. Von vier Patienten konnte keine zweite Probe gewonnen werden. Bei den 18 Patienten der NACT-Gruppe erfolgte nun die Operation in Form einer Exzision des Tumors oder eine Ablatio mammae. Eine Patientin lehnte diese Operation jedoch ab. Durch den Pathologen wurde das gewonnene Tumorgewebe nach erfolgter Chemo- und Antikörpertherapie untersucht und der Regressionsgrad nach Sinn bestimmt. Bei den Patienten der ACT-Gruppe konnte dementsprechend kein Regressionsgrad nach Sinn bestimmt werden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der GDF-15-Spiegel aller gesammelten Serumproben im Labor. Im Dezember 2019 wurde eine Follow-up-Erhebung der Patienten mit der Frage nach einem Rezidiv oder anderen signifikanten Ereignissen durchgeführt.

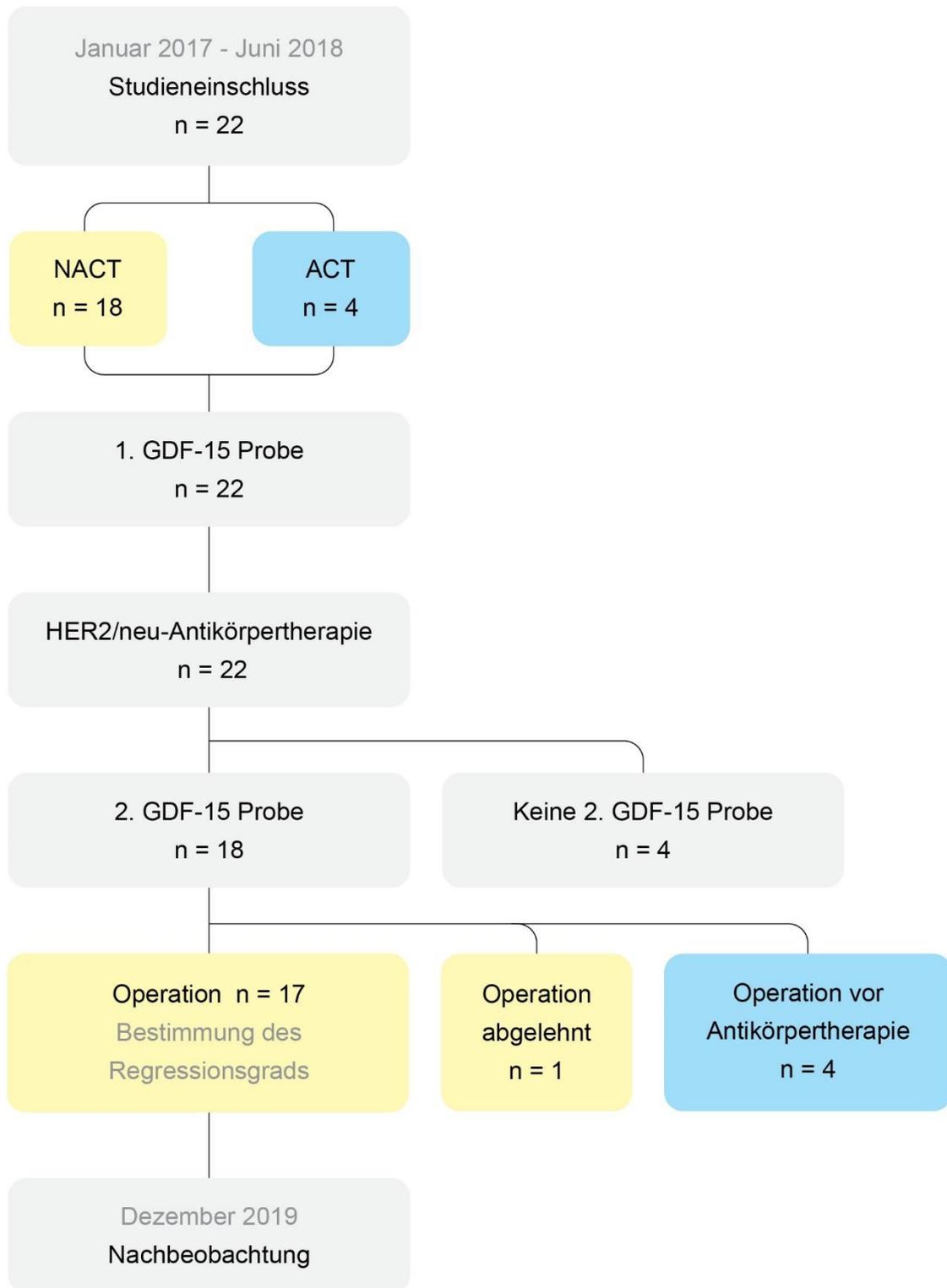


Abbildung 4: Chronologischer Ablauf der Studie
 NACT = neoadjuvante Chemotherapie
 ACT = adjuvante Chemotherapie
 Quelle: Eigene Darstellung

2.3 Probengewinnung und Aufbereitung

2.3.1 Probengewinnung

Nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Patienten wurde zunächst vor Beginn der Antikörpertherapie eine Blutprobe abgenommen. Die Gewinnung von 9 ml Blut mittels einer Serum-Monovette erfolgte im Rahmen einer regulären Blutabnahme in der Frauenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg. Die zweite Blutprobenentnahme fand ebenfalls im Rahmen einer regulären Blutabnahme circa drei Monate nach Beginn der Antikörpertherapie statt. Der Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme richtete sich nach dem erneuten Erscheinen des Patienten in der Klinik und kann daher variieren. Im Falle eines vorzeitigen Progresses der Erkrankung wäre eine frühere Probenentnahme möglich gewesen. Dies traf jedoch auf keinen der rekrutierten Patienten zu.

2.3.2 Material

Aus Tabelle 3 werden alle benötigten Materialien zur Aufbereitung der Blutproben ersichtlich.

Tabelle 3: Materialien zur Aufbereitung der Proben

Geräte	Hersteller
Serumröhrchen	Sarstedt
Aliquots 1,8 ml Nunc	Thermo Scientific
Pipette (100–1000 µl)	Eppendorf
Zentrifuge Rotina 380 R	Hettich
Gefrierschrank -80 °C	Haider

2.3.3 Aufbereitung

Die Aufbereitung der Proben wurde in der Early Clinical Trial Unit des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt.

Nach Erhalt der Blutprobe wurde diese für 10–15 Minuten aufrecht stehen gelassen. Danach wurde das Röhrchen bei 3200 U/min und 10 °C für 10 Minuten

zentrifugiert. Hierbei kam es zur Trennung von Zellbestandteilen und Serum. Das Serum beziehungsweise der zellfreie Überstand wurde anschließend auf drei bis vier Aliquots zu je 300 µl aufgeteilt. Diese wurden mit der Patientenummer und Datum beschriftet sowie farblich markiert. Eine gelbe Markierung wies auf eine Probe vor Therapie hin, violett kennzeichnete die zweite Probe drei Monate nach Antikörpergabe. Die eindeutige Kennzeichnung konnte eine Verwechslung der Proben nahezu ausschließen. Im Anschluss wurden die Proben bis zur Verwendung in einem -80 °C Gefrierschrank (täglich manuell und maschinell temperaturüberwacht) aufbewahrt.

2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA steht für Enzyme-linked Immunosorbent Assay und wird in der Medizin zur Detektion von Proteinen eingesetzt (Engvall & Perlmann, 1971). Für die Bestimmung von GDF-15 wurde ein sogenanntes Sandwich-ELISA durchgeführt. Die Grafik in Abbildung 5 veranschaulicht das Vorgehen eines solchen Assays.

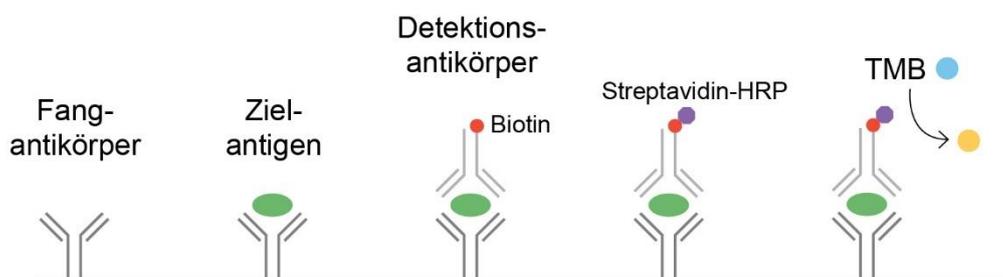


Abbildung 5: Sandwich-ELISA

Der am Boden der Mikrotiterplatte befindliche Fangantikörper bindet das Zielantigen (z.B. GDF-15), welches wiederum vom Detektionsantikörper gebunden wird. Im nächsten Schritt bindet Streptavidin-HRP am Biotin der Fc-Region des Detektionsantikörpers. Dieser Schritt ist notwendig, um anschließend einen Farbnachweis erzeugen zu können. Tetramethylbenzidine (TMB) führt dann zur gewünschten Blau- bzw. Gelbfärbung.

Quelle: Eigene Darstellung

2.4.1 Materialien

2.4.1.1 ELISA-Kit

Zur Durchführung des Immunoassays wurde das DuoSet® ELISA Kit der Firma R&D Systems (Katalog Nummer: DY957) verwendet und wie vom Hersteller empfohlen bis zum Gebrauch bei 2–8 °C gekühlt aufbewahrt. Die im Kit enthaltenen Komponenten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: ELISA-Kit Inhalt

Reagenz	Menge	Arbeitskonzentration
Human GDF-15 Capture Antibody	360 µg	2.00 µg/ml
Human GDF-15 Detection Antibody	2.25 µg	12.5 ng/ml
Human GDF-15 Standard	3 x 55 ng	7.81–500 pg/ml
Streptavidin-HRP	N/A	200-fache Verdünnung

2.4.1.2 Verwendete Reagenzien

Für die Durchführung des ELISAs wurden zusätzlich zum ELISA-Kit die in Tabelle 5 gelisteten Reagenzien verwendet. Das im Kit mitgelieferte Streptavidin-HRP wurde durch das der Firma Sigma ersetzt.

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien für das ELISA

Reagenz	Hersteller
Tween20	Roth
PBS Tabs	Roth
BSA (Fraktion V)	Roth
TMB	SDT
Streptavidin-HRP	Sigma
Stop Solution (Rotipuran®)	Roth
Aqua Plastipur®	Fresenius

2.4.1.3 Geräte und Verbrauchsgegenstände

Tabelle 6 zeigt die für die Durchführung des ELISAs benötigten Geräte und Verbrauchsgegenstände.

Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsgegenstände zur Durchführung des ELISAs

Gerätenamen	Hersteller
Pipette Transferpipette® S (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Brand
Pipettenspitzen	Sarstedt
Glaspipette Silberbrand Eterna (10 ml, 20 ml)	Brand
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand
Zentrifugenröhrchen Falcon® (15 ml, 50 ml)	Greiner
Mikrotitrierplatte 96 Well Microlon® V-bottom	Greiner
Mikrotitrierplatte 96 Well BD Falcon™	BD Biosciences
Polyethylen-Verschlussfolie	A. Hartenstein
Plattenschüttler Titramax 1000	Heidolph
Vortexer Vornado™	Benchmark
Absorbance Microplate Reader (Sunrise™)	Tecan
Gefrierschrank -80 °C Herafreeze™	Thermo Scientific
Absorbance Microplate Reader (Sunrise™)	Tecan

2.4.2 Durchführung des Immunoassays

Zur Bestimmung der GDF-15-Spiegel der Serumproben wurde das mitgelieferte ELISA-Protokoll des DuoSet® Kits, ausgenommen kleiner Abwandlungen, befolgt. Das nachfolgend beschriebene Vorgehen beinhaltet diese Abweichungen. Zunächst wurden am Vortag die 96-Well-Mikrotitrierplatten mit je 100 µl des Fangantikörpers (2 µl/ml in phosphate buffered saline (PBS)) beschichtet und mit einer Folie versiegelt. Über Nacht verblieben die Platten im Kühlschrank (2–8 °C). Am Folgetag wurden die Platten drei Mal mittels PBS 0,05 % Tween® gewaschen. Hierbei wurde jedes Well mit dem Puffer befüllt und anschließend die umgedrehte Platte auf Papierhandtüchern ausgeklopft. Für ein gutes Ergebnis ist ein gründliches Auswaschen unabdingbar. Die Platten wurden im nächsten Schritt mit 200 µl der Reagenzverdünnungslösung (Reagent Diluent:

PBS 1 % Bovine Serum Albumin (BSA)) geblockt, mit Folie abgedeckt und bei Raumtemperatur zwei Stunden lang auf dem Plattenschüttler (Titramax 1000, Heidolph) bei 450 rpm inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten ebenso bei Raumtemperatur und 450 rpm. Das Reagenz BSA setzt sich in die Lücken der gebundenen Fangantikörper und verhindert, dass andere Stoffe dort binden und dadurch das Endergebnis verfälschen könnten. Es folgten drei weitere Waschungen der Wells nach dem schon beschriebenen Schema. In die Wells einer V-Bottom Mikrotiterplatte wurden vorbereitend jeweils 40 µl der aufgetauten Serumproben gegeben und mit 80 µl der Reagenzverdünungslösung verdünnt. Die Serumproben wurden zuvor mittels Vortexer gemischt. Anschließend wurden 100 µl der vorbereiteten Verdünnung in die Wells der beschichteten und geblockten Mikrotiterplatte pipettiert. Es wurde jede Serumprobe bei einem Verdünnungsfaktor von 1 : 3 doppelbestimmt. Zum Erhalt einer Standardkurve wurden zwei Verdünnungsreihen für jede 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. An dieser Stelle wurde das humane GDF-15 Standard des Kits verwendet und bei einem Standardwert von 6000 pg/ml begonnen. Die Einteilung der Wells auf einer Mikrotiterplatte wird aus Tabelle 7 ersichtlich.

Tabelle 7: Beispiel einer 96-Well Mikrotiterplatte

Platte 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Standard GDF-15 in pg/ml	A	6000	3000	1500	750	375	187,5	93,75	46,88	23,44	11,72	5,86	0
	B	6000	3000	1500	750	375	187,5	93,75	46,88	23,44	11,72	5,86	0
Verdünnungsfaktor	Probe/Patient												
3	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	E	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	F	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
3	G	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	H	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36

In rot die Verdünnungsreihen in pg/ml zum Erhalt der Standardkurve. In blau die Aufteilung der Duplikate der jeweiligen Patientenproben bei einem Verdünnungsfaktor von 1 : 3.

Nach Abdeckung der Platten und einer Inkubationszeit von einer Stunde folgten wieder drei Waschungen. Als weiterer Schritt des ELISAs wurden 100 µl Detektionsantikörper (100 ng/ml in PBS 1 % BSA) in jedes Well pipettiert und wiederum versiegelt eine Stunde lang inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Waschung wurden jeweils 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung (1 : 200 in PBS 1 % BSA) hinzugefügt. Die Platten wurden wieder vorschriftsgemäß versiegelt und für 20 Minuten inkubiert. Es folgte ein letztes Waschen, bevor 100 µl Substrat-Lösung TMB (Tetramethylbenzidine ready-to-use, SDT) in jedes Well pipettiert wurde. Die Platten wurden anschließend für 25 Minuten abgedunkelt inkubiert, da TMB sehr lichtempfindlich ist. In dieser Zeit kam es zu einer zunehmenden Blaufärbung der Proben. 100 µl pro Well der Stopp-Lösung (Schwefelsäure 1N) führten zu einer Gelbfärbung. Am Ende ergab die sofortige Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Korrektur auf 620 nm festgesetzt) im Absorbance Microplate Reader (Sunrise, Tecan) Aufschluss über die Höhe der GDF-15-Spiegel.

2.5 Statistische Analyse

Im Rahmen der Nachbeobachtung der Patienten wurden die für die Studie relevanten Patientendaten über das SAP-System des Universitätsklinikums Würzburg erhoben. Die Erhebung des BMI erfolgte über das Programm für Zytostatikaherstellung Zenzy®. Darüber konnte das Gewicht exakt am Tag der jeweiligen Chemo- oder Antikörpertherapie ermittelt werden, was dem Tag der Blutprobenentnahme entsprach. Diese Patientendaten wurden pseudonymisiert in Microsoft Excel 365 gesammelt und zur Auswertung in das Statistikprogramm IBM® SPSS® Statistics 23 überführt.

Für die Patientencharakteristika wurden Häufigkeit, Median, Minimum und Maximum errechnet. Zur Korrelationsanalyse verschiedener Variablen wurden nichtparametrische Korrelationen nach Spearman angewendet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Für die Interpretation des Korrelationskoeffizienten wurde die Einteilung nach Cohen verwendet ($r > 0,1$ = gering; $r > 0,3$ = moderat; $r > 0,5$ = hoch) (Cohen, 1988).

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Bei 22 Patienten mit Mammakarzinom im frühen Stadium konnte im Rahmen einer Anti-HER2/neu-Therapie das GDF-15 im Blutserum bestimmt werden. Innerhalb der Kohorte gab es einen männlichen Patienten. Das mediane Alter der Patienten lag bei 54,5 Jahren (34 bis 79 Jahre). Alle Patientencharakteristika sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Die Einteilung des Tumorstadiums erfolgte nach der TNM-Klassifikation (siehe Anhang Tabelle 14). Die Mehrheit der Patienten ($n = 19$) wiesen eine Tumorgöße kleiner T3 auf. Dies entspricht einem Tumordurchmesser kleiner als 5 cm. Keiner der Patienten wies initial eine Fernmetastasierung auf. Ein nodaler Befall war jedoch in 63,6 % der Fälle vorhanden.

Es erfolgte ebenfalls die Bestimmung von Lymph- und Gefäßinvasion, Grading, Histologie, Ki-67, Hormonrezeptorstatus und HER2/neu. Als HER2/neu positiv wurden Patienten gewertet, die entweder in der Immunhistochemie (IHC) dreifach positiv oder in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) positiv waren. Bei einem zweifach positiven Ergebnis der IHC war immer die Bestätigung über eine FISH erforderlich. In der Kohorte konnten 72,7 % nach immunhistochemischer Analyse als ER positiv eingestuft werden. Für Ki-67 wurde ein Grenzwert bei 25 % angesetzt, dabei folgte man den aktuellen Leitlinien ("Leitlinienprogramm Onkologie," 2017). Der Median für Ki-67 lag bei 30 %.

Die Patienten folgten unterschiedlichen Therapieschemata, wobei ein Großteil der Patienten (15/22) eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid (FEC) mit anschließender dualen Anti-HER2/neu-Therapie erhielten. Zum Einsatz kamen Trastuzumab und Pertuzumab, wobei Pertuzumab nur als duale Antikörpertherapie eingesetzt wurde. Vier Patienten erhielten eine Chemotherapie mit Epirubicin und Cyclophosphamid (EC) mit anschließender alleiniger Trastuzumab-Gabe. Alle weiteren Patienten folgten weniger standardisierten Therapie-Protokollen, erhielten aber immer eine Antikörpertherapie.

Zusätzlich wurde von jedem Patienten der Body Mass Index (BMI) ermittelt und in normalgewichtig (18,5–24,9 kg/m²), übergewichtig (25–29,9 kg/m²) oder adipös (> 30 kg/m²) eingeteilt (American Society for Clinical Nutrition, 1998). Keiner der Patienten war untergewichtig (BMI < 18,5 kg/m²). Der mediane BMI lag bei 26,71 kg/m² und war somit im übergewichtigen Bereich. Alle gemessenen GDF-15-Werte lagen mit einem Median von 0,33 ng/ml initial im physiologischen Bereich (0,2–1,15 ng/ml).

Tabelle 8: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme (n = 22)

Variable	n	%
Alter in Jahren (Median = 54,4)		
34–45	7	31,8
46–55	5	22,7
55–79	10	45,5
Geschlecht		
weiblich	21	95,5
männlich	1	4,5
Menstruationsstatus (nur Patientinnen)		
prämenopausal	8	38,1
perimenopausal	1	4,8
postmenopausal	12	57,1
Tumorgroße		
Tis	1	4,5
T1	7	31,8
T2	11	50,0
T3	0	0
T4	3	13,6
Nodalstatus		
N0	8	36,4
N1	4	18,2
N2	4	18,2
N3	6	27,3
Metastasen		
Mx	5	22,7
M0	17	77,2
M1	0	0
Ki-67		

Variable	n	%
< 25 %	7	31,8
> 25 %	15	68,2
Lymph-/Gefäßinvasion		
Nein	14	63,6
Ja	5	22,7
fehlend	3	13,6
Grading		
G1	1	4,5
G2	13	59,1
G3	8	36,4
Hormonrezeptorstatus^a		
ER		
positiv	16	72,7
negativ	6	27,3
PR		
positiv	13	59,1
negativ	9	40,9
HER2/neu-Status^b		
IHC 2 + (FISH positiv)	6	27,3
IHC 3 +	12	54,5
positiv (nicht näher bezeichnet)	4	18,2
Chemotherapie^c		
3 Zyklen FEC	15	68,2
4 Zyklen EC	4	18,2
ETC nach Möbus	2	9,1
andere	1	4,5
Antikörpertherapie		
Dual (Trastuzumab + Pertuzumab)	16	72,7
Mono (Trastuzumab)	6	27,3
BMI^d [kg/m²] (Median = 26,71 (20,2–35,92))		
18,5–24,9	9	40,9
25,0–29,9	8	36,4
≥ 30,0	5	22,7
GDF-15 [ng/ml] (Median = 0,33 (0,09–0,95))		
	22	100

^a ER = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor

^b IHC = Immunhistochemie. Dabei wurde IHC 2+ durch eine FISH (= Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) ergänzt.

^c FEC = 5-Fluorouracil + Epirubicin + Cyclophosphamid; EC = Epirubicin + Cyclophosphamid; ETC = Epirubicin + Paclitaxel + Cyclophosphamid

^d Die Einteilung des Body Mass Index (BMI) erfolgte in normalgewichtig, übergewichtig und adipös

Nach dreimonatiger Antikörpertherapie wurden erneut vier Variablen analysiert. Die Ergebnisse sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme (n = 22)

Variable	n	%
Regressionsgrad nach Sinn		
1	3	13,6
2	5	22,7
3	1	4,5
4	7	31,8
fehlend	6	27,2
yT-Stadium		
0	7	31,8
Tis	1	4,5
1	5	22,7
2	2	9,1
3	1	4,5
4	1	4,5
fehlend	5	22,7
BMI [kg/m²] (Median = 26,63 (19,70 – 35,92))		
18,5 – 24,9	9	40,9
25,0 – 29,9	9	40,9
≥ 30,0	4	18,2
GDF-15 [ng/ml] (Median = 0,28 (0,09 – 1,06))		
	18	81,8

Direkt zum Zeitpunkt der Probenentnahme wurden BMI und GDF-15 erneut bestimmt, etwas später der Regressionsgrad nach Sinn und die Tumorgöße nach neoadjuvanter Therapie als yT-Stadium. Der Regressionsgrad konnte erst nach der Exzision des Tumors bestimmt werden, welche in der Regel vier Monate nach Therapiebeginn stattfand. Ein Wert von 4 entsprach keinem Resttumor und konnte bei sieben der 22 eingeschlossenen Patienten bestimmt werden. Grad 1 und 2 konnten einem eher geringen Therapieansprechen zugeordnet werden. Betroffen davon waren insgesamt acht Patienten. Als Vergleichsparameter für den Regressionsgrad nach Sinn wurde zusätzlich das yT-Stadium ermittelt. Der Regressionsgrad 4 entspricht yT0 und ist in der Kohorte für beide Variablen

gleich. Für die anderen Werte gibt es Abweichungen. Der BMI veränderte sich im Median durch die Therapie nicht. Bei der Betrachtung einzelner Patienten, gab es im Therapieverlauf nur bei einer Patientin einen deutlichen Gewichtsverlust (von BMI 23,31 auf 19,70 kg/m²). Der GDF-15-Spiegel fiel im Median auf 0,28 ng/ml.

3.2 GDF-15-Spiegel bei HER2/neu positiven Mammakarzinomen

Ziel der Studie war es, bei allen eingeschlossenen Patienten die GDF-15-Spiegel zu zwei Zeitpunkten zu bestimmen und mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren. Insgesamt konnten 22 Blutproben zum Zeitpunkt vor Antikörpertherapie und 18 Blutproben circa drei Monate nach der ersten Antikörpergabe analysiert werden. Fast alle Proben blieben unter dem ursprünglich angesetzten Grenzwert von 1,0 ng/ml. Lediglich der einzige männliche Patient (17) und Patientin 20 übertrafen diesen Wert mit 1,06 ng/ml und 1,02 ng/ml (siehe Abbildung 6). Patient 17 wies ein Tumorstadium von cT4 N1 Mx auf (Hormonrezeptorstatus positiv, BMI 35,92 kg/m²). Bei ihm war vor Studieneinschluss eine Ablatio mammae durchgeführt worden, sodass kein Regressionsgrad nach Sinn bestimmt werden konnte. Patientin 20 befand sich bei Erstdiagnose im Tumorstadium cT2 N3 Mx (Hormonrezeptorstatus negativ) und konnte nach NACT ein Regressionsgrad von 4 erreichen. In der Nachbeobachtung wurde im Juli 2019 bei vergrößerten Lymphknoten der Verdacht eines Rezidivs geäußert. Eine zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Biopsie konnte eine Malignität ausschließen, allerdings eine Sarkoidose diagnostizieren. Ein GDF-15 Anstieg im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion wäre eine logische Erklärung.

Der GDF-15-Spiegel fiel im Median von eingangs 0,33 ng/ml auf 0,28 ng/ml. Insgesamt lagen die Werte der ersten Proben (GDF-15_0) zwischen 0,09 und 0,95 ng/ml und der zweiten Proben (GDF-15_3) zwischen 0,09 und 1,06 ng/ml.

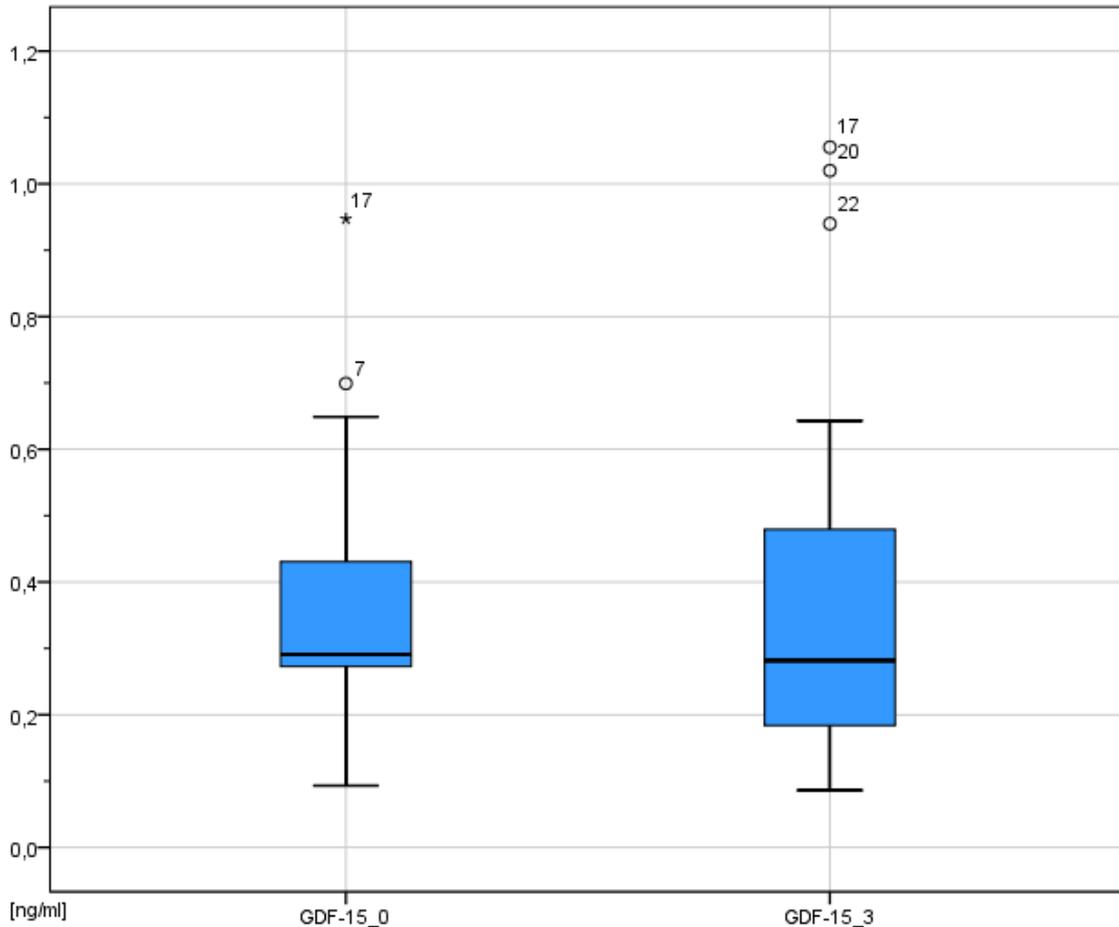


Abbildung 6: GDF-15-Spiegel zum Zeitpunkt vor Antikörpertherapie (GDF-15_0) und drei Monate nach Beginn der Antikörpertherapie (GDF-15_3)
Quelle: Eigene Darstellung

Es gab eine auffällige Patientin, die unter Therapie einen progressiven Verlauf der Tumorerkrankung zeigte (initiales Tumorstadium cT4a N3a M0). Die Patientin erhielt, wie alle anderen Patienten, eine Antikörpertherapie, lehnte jedoch die anschließende Operation ab. Ihre GDF-15-Spiegel lagen bei 0,27 ng/ml (GDF-15_0) und 0,26 ng/ml (GDF-15_3) und befanden sich somit unterhalb der Mediane der Kohorte. Eine Korrelation zwischen dem GDF-15-Spiegel und dem klinischen Verlauf konnte folglich in diesem Fall nicht hergestellt werden.

Für Patienten mit kleineren Tumoren, definiert als Tis/T1/T2, konnten verhältnismäßig geringere Werte für GDF-15 ($M = 0,32$ ng/ml) analysiert werden als für Patienten mit größeren Tumoren ($M = 0,47$ ng/ml) (siehe Tabelle 10). Im Verlauf zeigte sich die Differenz der beiden Gruppen noch deutlicher. Während GDF-15

in der Tis/T1/T2-Gruppe mit 0,28 ng/ml im Verlauf leicht sank, stieg der Wert in der T3/T4-Gruppe weiter auf 0,66 ng/ml an.

Bei der Einteilung der Patienten in Gruppen mit normalem (BMI < 25 kg/m²), übergewichtigem (BMI 25 - 29,9 kg/m²) und adipösem (BMI ≥ 30 kg/m²) BMI konnten ebenfalls unterschiedliche Werte für den GDF-15-Median ermittelt werden (siehe Tabelle 11). Für den Ausgangswert von GDF-15 sowie dem Verlaufswert wurde jeweils mit dem initial gemessenen Gewicht gerechnet. Patienten mit einem normalem BMI wiesen einen medianen GDF-15-Wert von 0,31 ng/ml auf, während Patienten mit Übergewicht deutlich höher lagen (M = 0,43 ng/ml). Für Patienten mit einem BMI größer 30 kg/m² stieg der GDF-15-Wert nur noch gering (M = 0,46 ng/ml). Während im Verlauf der GDF-15-Spiegel in den ersten beiden Gruppen sank, gab es in der Gruppe mit adipösen Patienten sogar einen leichten Anstieg.

Auf statistische Tests wurde aufgrund der unterschiedlichen Gruppengrößen und der geringen Anzahl an Patienten verzichtet.

Tabelle 10: GDF-15-Werte in Relation zur Tumorgröße

	Tis/T1 / T2	T3 / T4
GDF-15_0 Median [ng/ml]	0,32 (n = 19)	0,47 (n = 3)
GDF-15_3 Median [ng/ml]	0,28 (n = 16)	0,66 (n = 2)

Tabelle 11: GDF-15-Werte in Relation zum BMI [kg/m²]

	BMI < 25	BMI 25 – 29,9	BMI ≥ 30
GDF-15_0 Median [ng/ml]	0,31 (n = 8)	0,43 (n = 9)	0,46 (n = 5)
GDF-15_3 Median [ng/ml]	0,26 (n = 7)	0,25 (n = 6)	0,48 (n = 5)

3.3 Korrelation von GDF-15 mit klinischen Variablen

Bei der Korrelationsanalyse nach Spearman konnte für GDF-15 eine Korrelation mit dem Alter der Patienten hergestellt werden (siehe Tabelle 12). Je älter die

Patienten, desto höher der GDF-15-Spiegel im Blut. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,482$ besteht ein moderater Zusammenhang auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,023$.

Der Proliferationsmarker Ki-67 zeigte ebenfalls einen signifikanten, negativen Zusammenhang mit GDF-15 ($r = -0,462$; $p = 0,031$). Patienten mit einem niedrigen Ki-67 wiesen eher hohe GDF-15-Spiegel auf.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden zwischen GDF-15 und allen weiteren in Tabelle 12 aufgeführten Variablen. Zwischen GDF-15 und dem Grading des Tumors gibt es einen moderaten negativen Zusammenhang, der jedoch mit einem Wert von $p = 0,052$ das Signifikanzniveau nicht erreichte. Es ließ sich auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen GDF-15 und dem BMI herleiten. Dennoch scheint eher ein hoher BMI in Beziehung zu einem hohen GDF-15-Spiegel zu stehen.

Tabelle 12: Spearman Korrelation zwischen GDF-15_0 und einigen klinischen Variablen, die vor Beginn der Antikörpertherapie erhoben wurden

Tabelle 12 a

		Alter	Tumorgröße	Nodalstatus	ER	Ki-67
GDF-15_0	<i>Korrelationskoeffizient</i>	0,482*	0,166	-0,019	0,196	-0,462*
	<i>Signifikanz (zweiseitig)</i>	0,023*	0,461	0,932	0,382	0,031*
	<i>n</i>	22	22	22	22	22

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Tabelle 12 b

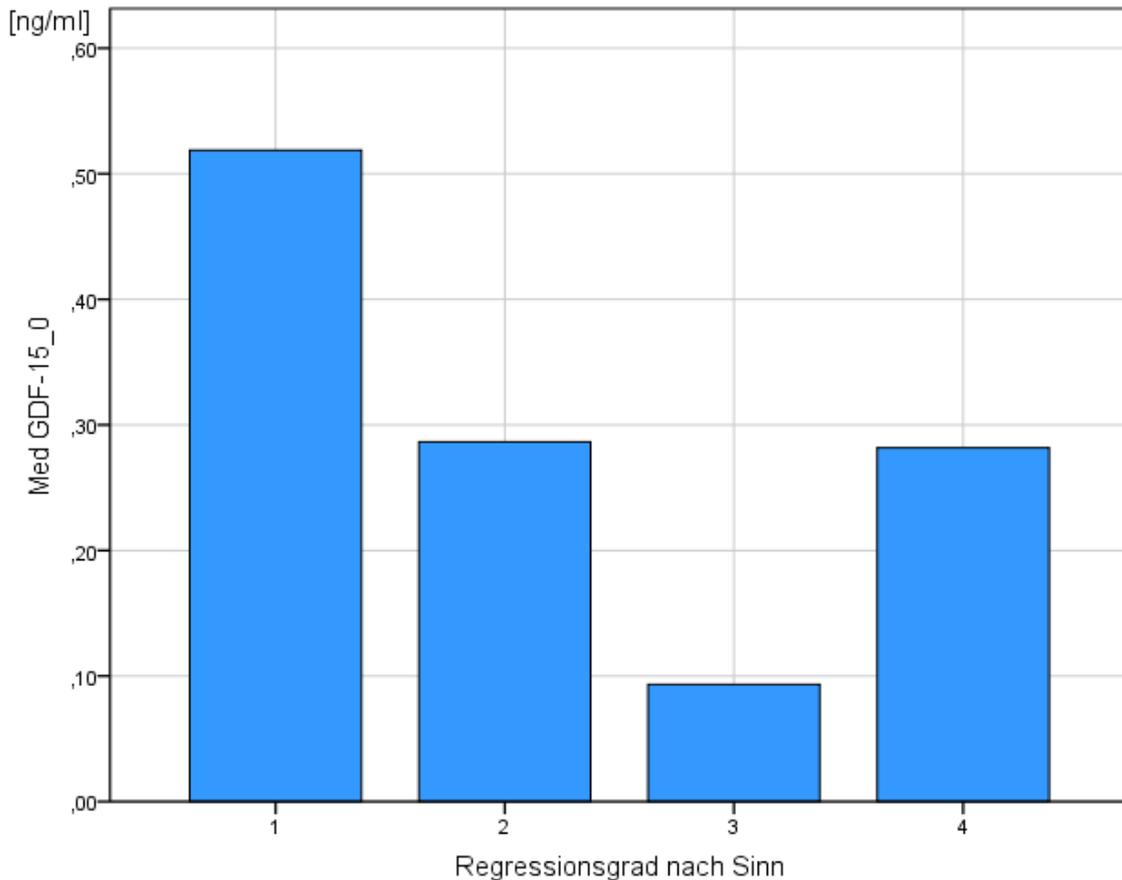
		Grading	Lymph-/Gefäßinvasion	Menstruationsstatus	BMI
GDF-15_0	<i>Korrelationskoeffizient</i>	-0,419	0,317	0,351	0,375
	<i>Signifikanz (zweiseitig)</i>	0,052	0,187	0,119	0,085
	<i>n</i>	22	19	21	22

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Es wurden ebenfalls Analysen von den erhobenen Daten unter Antikörpertherapie durchgeführt (siehe Tabelle 13). Für die Analyse wurde der Ausgangswert von GDF-15 verwendet, um eine Aussage über den prädiktiven Wert von GDF-15 auf das Ansprechen auf eine Antikörpertherapie machen zu können. GDF-15 korrelierte weder signifikant mit dem Regressionsgrad nach Sinn ($p = 0,088$) noch mit dem yT-Stadium. Der Regressionsgrad und das yT-Stadium korrelierten sehr stark miteinander und hätten somit beide als äquivalente Variablen für das Ansprechen auf eine Therapie genutzt werden können. Für den Regressionsgrad lagen insgesamt Daten von 17 Patienten vor. Eine Tendenz von erhöhten GDF-15-Spiegeln bei niedrigem Regressionsgrad lässt sich anhand Abbildung 7 erkennen.

Tabelle 13: Spearman Korrelation zwischen GDF-15_0 und Variablen, die unter Therapie erhoben wurden

		Regressionsgrad nach Sinn	yT-Stadium	BMI
GDF-15_0	<i>Korrelationskoeffizient</i>	-0,426	0,331	0,297
	<i>Signifikanz (zweiseitig)</i>	0,088	0,194	0,180
	<i>n</i>	17	17	22



*Abbildung 7: Die medianen GDF-15-Spiegel der ersten Blutproben (GDF-15_0) aufgeteilt nach dem Regressionsgrad nach Sinn.
Quelle: Eigene Darstellung*

3.4 Korrelationen der erhobenen Variablen

In der Studie wurden nicht nur die erhobenen klinischen Variablen mit dem GDF-15-Spiegel verglichen, sondern auch untereinander analysiert. Einige signifikante Zusammenhänge konnten festgestellt werden.

Wie aus dem klinischen Alltag bekannt, korrelierte auch in der Studie die Tumorgroße mit dem Nodalstatus ($r = 0,717$). Des Weiteren korrelierte die Tumorgroße mit der Lymph-/Gefäßinvasion ($r = 0,589$) und Ki-67 ($r = 0,554$), nicht jedoch mit dem Grading. Ki-67 und die Lymph-/Gefäßinvasion wiesen ebenfalls eine starke Korrelation auf ($r = 0,556$). Zwischen dem Grading des Tumors und dem Alter der Patienten ($r = -0,570$) sowie dem Menstruationsstatus ($r = -0,563$) konnte ein starker Zusammenhang abgeleitet werden. Der Menstruationsstatus ergibt sich

definitionsgemäß aus dem Alter der Patienten. Je jünger der Patient, desto schlechter die Differenzierung des Tumors.

Der Regressionsgrad als Variable für das Ansprechen der NACT korrelierte negativ mit der Lymph-/Gefäßinvasion ($r = -0,568$). Diese Variable könnte dementsprechend ein schlechteres Ansprechen auf die Antikörpertherapie prädiktiv vorhersagen.

3.5 Nachbeobachtung

Eineinhalb Jahre nach Einschluss der letzten Patientin erfolgte eine Nachbeobachtung der gesamten Kohorte über das SAP-System des Universitätsklinikums Würzburg. Vom Zeitpunkt des Studieneinschlusses bis zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtung vergingen im Median 675,5 Tage (534–1046 Tage).

Regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen im Sinne einer klinischen Untersuchung, einer Mammographie sowie eventuell einer Ultraschalluntersuchung der Brust wurden im Abstand von sechs Monaten in der Frauenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg oder beim niedergelassenen Gynäkologen durchgeführt. Bei 21 der 22 untersuchten Patienten konnte in dem genannten Zeitraum weder ein Rezidiv noch ein Progress des Karzinoms festgestellt werden, soweit dies nachverfolgbar war. Lediglich eine Patientin zeigte einen progressiven Verlauf.

4 Diskussion

Die Rolle von GDF-15 ist bis zum heutigen Wissensstand immer noch stark umstritten. Vor allem in der Tumorbiologie gibt es kontroverse Meinungen zu anti-tumorigener bis pro-tumorigener Wirkung. Folglich ist die Rolle von GDF-15 insbesondere in der Onkologie Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Mittlerweile sind einige Signalwege, die GDF-15 beeinflusst und seit 2017 auch ein Rezeptor (GFRAL-Rezeptor), an welchen GDF-15 bindet, bekannt. Auch in Mammakarzinomen konnten schon erhöhte GDF-15-Spiegel nachgewiesen werden, welche sich negativ auf die Prognose auswirkten (Sasahara et al., 2017; Welsh et al., 2003; Wollmann et al., 2005).

Der Goldstandard für die Systemtherapie von HER2/neu positiven Mammakarzinomen ist heutzutage eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab und gegebenenfalls Pertuzumab in Kombination mit einer Chemotherapie. Eine primäre oder erworbene Resistenz gegen Trastuzumab stellt jedoch ein erhebliches Problem der Behandlung dieser Karzinome dar. Joshi et al. machten unter anderem GDF-15 und die durch das Zytokin vermittelte Phosphorylierung von HER2/neu für die Resistenz verantwortlich (Joshi et al., 2011). Mit der durchgeführten Studie sollte ein Zusammenhang zwischen GDF-15 und dem klinischen Verlauf von Patienten mit Mammakarzinom unter Anti-HER2/neu-Therapie gezeigt werden. Darüber hinaus sollten erstmals GDF-15-Spiegel beim frühen, nicht-fernmetastasierten, HER2/neu positiven Mammakarzinom analysiert werden.

In die Studie konnten 22 Patienten eingeschlossen werden, die die Kriterien erfüllten. Bis zum letzten Zeitpunkt der Nachbeobachtung (Median = 675,5 Tage) zeigten 21 Patienten einen guten klinischen Verlauf mit kompletter Remission. Dementsprechend lagen alle gemessenen GDF-15-Spiegel im physiologischen Bereich ($M = 0,33$ ng/ml). Zusammenhänge zwischen GDF-15 und verschiedenen klinischen Variablen konnten gezeigt werden. Als Korrelat für das Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie diente der Regressionsgrad nach Sinn, der aus dem operativ gewonnenem Tumorgewebe bestimmt wurde. In der untersuchten Kohorte konnte bisher keine signifikante Korrelation zwischen den

GDF-15-Spiegeln und dem Regressionsgrad hergestellt werden, ein Trend ist jedoch ersichtlich.

4.1 GDF-15-Spiegel beim Mammakarzinom

In unserer Studie für Mammakarzinome im frühen Stadium lagen die GDF-15-Spiegel ausnahmslos im physiologischen Bereich. Im Vergleich mit anderen Tumorentitäten scheint GDF-15 bei Mammakarzinomen generell niedrigere Werte anzunehmen. Dies ist bereits aus einigen Studien erkenntlich geworden (Arfsten et al., 2019; Wang et al., 2014; Welsh et al., 2003). Verglichen wurden die Werte mit mehreren häufig vorkommenden soliden Tumoren, zum Beispiel mit dem Lungenkarzinom, gastrointestinalen Karzinomen oder dem Prostatakarzinom (Arfsten et al., 2019; Wang et al., 2014; Welsh et al., 2003). Trotz der eher niedrigen Werte scheint GDF-15 beim Mammakarzinom eine wichtige Rolle zu spielen, denn in einer Studie mit nicht-selektierten Behandlungsnaiven Krebspatienten konnte die höchste Hazard Ratio (HR) für die Gruppe der Mammakarzinome (HR = 6,27) im Vergleich zur gesamten Kohorte (HR = 2,08) festgestellt werden (Arfsten et al., 2019). Verschiedene pathologische Grenzwerte von GDF-15 bei verschiedenen Tumorentitäten gilt es zu diskutieren.

Weide et al. konnten beispielsweise ab einem GDF-15-Spiegel von 1,5 ng/ml eine signifikante Verschlechterung der Überlebenszeit bei Melanom-Patienten sehen (Weide et al., 2016). Der Median der Kohorte von 761 Patienten lag bei 1,0 ng/ml (Weide et al., 2016). Arfsten et al. hingegen erreichten nur Serumspiegel von 0,34 ng/ml im Median bei einer Kohorte (n = 555) von soliden und nicht-soliden Tumoren (Arfsten et al., 2019). Hervorzuheben ist eine signifikante Differenz zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Stadien (0,44 ng/ml und 0,27 ng/ml) (Arfsten et al., 2019). In einer Studie von Brown et al. konnten erhöhte GDF-15-Spiegel mit einem Median von 0,783 ng/ml bei 58 Patienten mit kolorektalem Karzinom festgestellt werden (Brown et al., 2003). Vor allem im Stadium III (M = 1,403 ng/ml) und IV (M = 1,965 ng/ml) sind diese signifikant zum vorherigen Stadium angestiegen (Brown et al., 2003). Daraus wird deutlich, dass GDF-15

vor allem in späten Stadien signifikant ansteigt. Da bei 19 von 22 der Mammakarzinom-Patienten ein TNM-Tumorstadium von T2 oder kleiner vorlag, wäre dies eine logische Erklärung für wenig hohe Werte in unserer Studie ($M = 0,33 \text{ ng/ml}$). Dies würde die Hypothese einiger Studien stärken, dass GDF-15 zunächst anti-tumorigen wirkt und in späteren Tumorstadien pro-tumorigene Effekte erzielt (Eling et al., 2006; Husaini et al., 2012; Mimeault & Batra, 2010; Wang et al., 2013).

4.2 GDF-15 als prädiktiver Marker

Ein Anliegen dieser Studie war es, GDF-15 als prädiktiven Marker für das Ansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie zu analysieren. Einen eindeutigen Zusammenhang zwischen GDF-15 und dem Regressionsgrad nach Sinn konnte in dieser Pilotstudie noch nicht gezeigt werden ($r = -0,426$; $p = 0,088$). Alle in diese Analyse eingeschlossenen Patienten ($n = 17$) befanden sich zum Zeitpunkt der letzten Nachbeobachtung klinisch in kompletter Remission, auch diejenigen die einen niedrigen Regressionsgrad (geringer Effekt der NACT auf das Tumorgewebe) aufwiesen. Die Bestimmung des Regressionsgrads ist abhängig vom untersuchenden Pathologen. Alle Gewebeproben wurden jedoch im Pathologischen Institut der Universität Würzburg analysiert und sollten somit einheitlich bewertet worden sein. Alternativ zum Regressionsgrad hätte als klinisches Korrelat auch das yT-Stadium dienen können, aber auch mit dieser Variablen konnte kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden.

Im Gegensatz zu unserer Studie zeigte die Untersuchung an überexprimierenden HER2/neu Zelllinien von Joshi et al. einen signifikanten Zusammenhang von GDF-15 und dem Ansprechen auf Trastuzumab (Joshi et al., 2011). Es konnte nachgewiesen werden, dass GDF-15 über die Phosphorylierung von HER2/neu die Sensitivität gegenüber Trastuzumab vermindert (Joshi et al., 2011). Diese Hypothese weiter stützend, zeigte dieselbe Studie, dass durch das Herunterregulieren von GDF-15 wieder eine erhöhte Sensitivität gegenüber Trastuzumab hergestellt werden konnte (Joshi et al., 2011). Interessanterweise sprachen

GDF-15 überexprimierende Zellen weiterhin auf den Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib an (Griner et al., 2013). Wäre GDF-15 in Zukunft als prädiktiver Marker in der Brustkrebsdiagnostik denkbar, könnte eine Therapieentscheidung zwischen Trastuzumab und Lapatinib relevant werden. Joshi et al. konnten diese Daten nur experimentell darlegen, klinische Korrelate lagen bisher nicht vor.

Die untersuchte Kohorte stellt ein kleines Kollektiv mit 22 Patienten dar, allerdings sollten im Rahmen dieser Pilotstudie zunächst richtungsweisende Erkenntnisse gewonnen werden. In anderen Studien, wie beispielsweise von Welsh et al., wurden auch nur kleine Kollektive (26 Patienten) untersucht, um zunächst Tendenzen festzustellen, die anschließend für weiterführende, größere Studien wegweisend genutzt werden konnten (Welsh et al., 2003). Eine größere Kohorte, eventuell auch mit einem Anteil an fortgeschrittenen Tumoren, könnte möglicherweise einen signifikanten Zusammenhang der untersuchten Variablen aufweisen.

4.3 GDF-15 und prognostische Faktoren

Etwas verwunderlich ist die Tatsache, dass die Tumorgröße als wichtiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben in unserer Studie nicht mit dem potenziell prognostischen Faktor GDF-15 korrelierte ($r = 0,166$). Einzeln betrachtet wiesen die Patienten im T3/4-Stadium dennoch höhere Werte auf als Patienten im Tis/T1/T2-Stadium. Allerdings war die Anzahl der Patienten in den Gruppen sehr unterschiedlich (3 vs. 19) und ist somit nur bedingt beurteilbar.

Ebenso gab es keinen Zusammenhang zwischen dem Nodalstatus und GDF-15 ($r = -0,019$). Für beide Faktoren hätte man einen Zusammenhang erwarten können, da das TNM-Stadium einen Hinweis für die Invasivität des Tumors gibt. In der Studie von Peake et al. konnte GDF-15 für epithelial to mesenchymal transition (EMT) und Invasion bei Mammakarzinomen verantwortlich gemacht werden (Peake et al., 2017). Beim kolorektalem Karzinom konnte dieser Zusammenhang ebenfalls gezeigt werden (C. Li et al., 2016). Dennoch konnte auch die Studie von Peake et al. keine Korrelation von GDF-15 und dem Nodalstatus herstellen (Peake et al., 2017). Dies wird mit der geringen Anzahl an Patienten mit mehr als

vier metastasierten Lymphknoten (13 %) begründet. In unserer Studie wurden in 63,6 % der Patienten befallenen Lymphknoten (N1–N3) gefunden und trotzdem konnte keine Korrelation hergestellt werden. Bei einer Studie mit Pankreaskarzinomen konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen GDF-15 und dem TNM-Stadium dargestellt werden (Wang et al., 2014). Brown et al. und Li et al. konnten hingegen bei kolorektalen Karzinomen einen signifikanten Zusammenhang darlegen (Brown et al., 2003; C. Li et al., 2016).

Des Weiteren wurde GDF-15 mit dem Proliferationsmarker Ki-67 verglichen. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,462$ war dieser Zusammenhang signifikant ($p = 0,031$). In einer Untersuchung von Kilickap et al. konnte gezeigt werden, je höher der Ki-67-Wert ist, desto schlechter ist die Prognose und das Überleben für Patienten mit Mammakarzinom (Kilickap et al., 2014). Denkert et al. hingegen konnten zeigen, dass bei Mammakarzinom-Patienten, die gut auf eine NACT ansprechen, ein hoher Ki-67-Wert ein positiver prognostischer Marker darstellte (Denkert et al., 2013). Genau dieser Fall könnte auch auf unsere Pilotstudie zutreffen, da fast alle Patienten gut auf die neoadjuvante Therapie ansprechen. Dementsprechend wurden bei hohen Ki-67-Werten eher niedrige GDF-15-Spiegel nachgewiesen. Ein niedriger GDF-15-Spiegel würde wiederum für eine positive Prognose sprechen.

Um eine sichere Aussage von GDF-15 und den prognostischen Faktoren generell treffen zu können, müsste eine Langzeit-Nachbeobachtungs-Studie von beispielsweise 10 Jahren an dieser oder einer größeren Studie mit ähnlichem Patientenkollektiv erfolgen.

4.4 GDF-15 und Alter

In unserer Studie konnte eine signifikante Korrelation von GDF-15 mit dem Alter der Patienten gezeigt werden. Eingeschlossen waren Patienten zwischen 39 und 79 Jahren. Das mittlere Erkrankungsalter für Brustkrebs in Deutschland liegt bei etwa 64 Jahren (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut, 2019). Die untersuchten Patienten waren im Schnitt circa 10 Jahre jünger ($M = 54,5$ Jahre). Je älter die Patienten waren, desto höhere GDF-15-Spiegel

wurden gemessen. Studien konnten diesen Zusammenhang bei Tumorpatienten ebenfalls bestätigen (Arfsten et al., 2019; Vila et al., 2011). Eine Studie von Kempf et al. konnte bei 429 gesunden, älteren Probanden (medianes Alter = 65 Jahre) einen ähnlichen Verlauf sehen (Kempf et al., 2007). Patienten über 65 Jahre wiesen etwas höhere GDF-15-Spiegel (0,804 ng/ml) auf als jüngere (0,714 ng/ml) (Kempf et al., 2007). In einer Kohorte mit Diabetes mellitus Typ II Patienten konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen GDF-15 und dem Alter aufgezeigt werden ($r = 0,418$; $p = 0,001$) (Shin et al., 2016).

Laut einer Studie von Partridge et al. scheint das Alter jedoch weder Einfluss auf prognostische noch auf prädiktive Faktoren zu nehmen (Partridge et al., 2013). In einem Zwei-Jahres-Follow-up wurden 3401 Patienten mit HER2/neu positivem Mammakarzinom des Herceptin Adjuvant Trials untersucht, bei welchem die Hälfte der Patienten für ein Jahr Trastuzumab erhielt und die andere Hälfte nur beobachtet wurde (Partridge et al., 2013). In keiner Gruppe war das Alter prognostisch für ein frühes Rezidiv oder prädiktiv für das Ansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie signifikant (Partridge et al., 2013). Ob sich jedoch ein Unterschied für ein späteres Rezidiv zeigen würde, konnte durch die kurze Nachbeobachtungszeit von 2 Jahren nicht gezeigt werden (Partridge et al., 2013).

GDF-15 scheint zwar mit dem Alter zu steigen, ob dies jedoch für die Therapie oder die Prognose der Patienten entscheidend ist, ist fraglich. Eventuell kann die Erhöhung im Alter damit begründet werden, dass die Anzahl an Stressfaktoren im Körper mit dem Alter zunehmen. Diese wiederum können über die Aktivierung der Tumorsuppressorgene p53 und early growth response protein-1 (EGR-1) die GDF-15-Spiegel erhöhen (Baek et al., 2005; P. X. Li et al., 2000; Tan et al., 2000; Yang et al., 2003).

4.5 GDF-15, BMI und Östrogenrezeptor

In der Literatur wird Adipositas als Risikofaktor für die Entstehung von Mammakarzinomen gelistet (McPherson et al., 2000). In der untersuchten Kohorte wurde ein medianer BMI von 26,62 kg/m² erreicht und fällt somit in den

übergewichtigen Bereich. Ein signifikanter Zusammenhang mit GDF-15 konnte zwar nicht hergestellt werden, dennoch ist ein Trend ($r = 0,375$; $p = 0,085$) ersichtlich. Ebenso wiesen Patienten mit einem übergewichtigen BMI einen höheren GDF-15-Wert ($M = 0,45$ ng/ml) auf als normalgewichtige Patienten ($M = 0,31$ ng/ml). Mit zunehmendem BMI scheint der GDF-15-Spiegel im Blut zu steigen. Interessant war die Gruppe mit BMI größer 30 kg/m^2 , da sie keinen Abfall der GDF-15-Spiegel im Verlauf aufwies, so wie es in den anderen Gruppen der Fall war. Zu beachten ist jedoch, dass nur fünf Patienten dieser Gruppe angehörten und es sich auch um ein zufälliges Ergebnis handeln könnte. Ob diese Patienten auch einen schlechteren klinischen Verlauf aufweisen, gilt es zu untersuchen.

Die Studie von Vila et al. konnte zeigen, dass die GDF-15-Spiegel bei übergewichtigen Patienten ($M = 0,427$ ng/ml) im Vergleich zu gesunden Probanden ($M = 0,309$ ng/ml) generell höher liegen (Vila et al., 2011). GDF-15 scheint demnach eine Rolle in Fettgewebe zu spielen. Es wird unter anderem von Adipozyten sezerniert und spielt eventuell eine Rolle in der Modulation der Fettgewebefunktion (Ding et al., 2009). Griner et al. stellten einen Zusammenhang zwischen der Sezernierung von GDF-15 aus Adipozyten und der Trastuzumab-Resistenz her (Griner et al., 2013).

In einer Untersuchung konnte für die Subgruppe ER-positiv/HER2/neu-positiver Mammakarzinome Adipositas als prognostischen Faktor für eine verminderte komplette Remission nachgewiesen werden, während die Subgruppe ER-negativ/HER2/neu-positiv eine erhöhte komplette Remission aufwies (Warner et al., 2016). Da über 72 % der Patienten der hier vorliegenden Studie ER-positiv/HER2/neu-positiv waren, würde das primär für ein schlechteres Ansprechen plädieren. Dennoch scheint der Großteil der Patienten (21/22) einen positiven klinischen Verlauf zu haben. Dies wiederum ist zu einem Großteil auch der frühen Tumorstadien der Kohorte geschuldet.

Zusätzlich wiesen Peake et al. eine Korrelation zwischen GDF-15 und dem ER-negativ/HER2/neu-positiven Status in Mammakarzinomen nach (Peake et al., 2017). Aber auch diese Korrelation trifft auf die untersuchten Patienten nicht zu.

Es konnte keine Korrelation zwischen GDF-15 und dem ER-Status hergestellt werden.

Die Funktion von GDF-15 als Auslöser einer Kachexie konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden (Johnen et al., 2007). Die Studie von Emmerson et al. wies den GFRAL-Rezeptor in der Area postrema als endogenen Rezeptor für GDF-15 nach (Emmerson et al., 2017). Darüber wird der Appetit gesteuert und soll durch verminderte Essensaufnahme für Tumorkachexie verantwortlich sein. Lediglich eine Patientin verlor im Verlauf von wenigen Monaten 10 kg und fiel auf einen BMI von 19,70 kg/m². Passend dazu stieg der GDF-15-Spiegel im Verlauf von 0,32 ng/ml auf 1,02 ng/ml. Ursächlich für den Gewichtsverlust und den Anstieg von GDF-15 kann eine in diesem Zeitraum neudiagnostizierte Sarkoidose sein, ein Rezidiv wurde mittels Lymphknotenbiopsie ausgeschlossen. Insgesamt konnte aber bei keinem der Patienten eine Kachexie ausgelöst werden, korrelierend dazu fehlten die hohen GDF-15-Spiegel. Ebenso scheint die Kachexie erst eine Rolle in späten Tumorstadien zu spielen, wie eine Studie von Lerner et al. zeigte (Lerner et al., 2016). Die Studie wies eine Korrelation zwischen GDF-15 und Karzinom-assoziiertem Gewichtsverlust bei unheilbaren Lungentumoren, nicht jedoch bei Pankreastumoren, auf (Lerner et al., 2016). Auch wenn die Kohorte der Pankreastumoren mit 66 Patienten (30 %) kleiner war und eventuell deshalb keine signifikante Korrelation hergestellt werden konnte, gibt dies eventuell einen Hinweis darauf, dass die Korrelation zwischen hohen GDF-15-Spiegeln und Kachexie nicht bei jeder Tumorentität besteht.

4.6 Limitationen und Ausblick

Obwohl diese Pilotstudie auf einem kleinen Patientenkollektiv basiert, lassen sich dennoch einige Trends feststellen, die in größeren Kohorten kontrolliert und erneut analysiert werden sollten. Einige Limitationen, die unsere Studie aufwies, sollten dabei berücksichtigt werden.

Wichtig wäre ein einheitlicher Abnahmezeitpunkt der ersten Probe, der aus logistischen Gründen in unserem Kollektiv nicht möglich war. Alle Proben wurden zwar vor erster Trastuzumab-Gabe abgenommen, jedoch hatten manche schon

Chemotherapie erhalten, andere noch nicht. Vorzuschlagen wäre beispielsweise die Entnahme der Probe am Tag der ersten Trastuzumab-Gabe, wenn man spezifisch die prädiktive Wertigkeit von GDF-15 auf eine Antikörpertherapie prüfen möchte oder der Tag vor Beginn einer systemischen Therapie im Allgemeinen. Eine Erhöhung von GDF-15 durch verschiedene Medikamente konnte durch mehrere Studien mittlerweile festgestellt werden, unter anderem durch Chemotherapeutika (Altena et al., 2015; Baek et al., 2002; Eling et al., 2006). Diesen Confounder wird man allerdings nicht ausschließen können. Für den zweiten Abnahmezeitpunkt würden wir nach unseren neu gewonnenen Erkenntnissen nicht die drei Monate wählen, sondern den Tag vor der Operation, um ein direktes Korrelat zum Regressionsgrad nach Sinn aufweisen zu können.

Da die Dauer bis zum Rezidiv beim Mammakarzinom Jahre betragen kann, sollte ein längeres Follow-up von mindestens fünf, besser zehn Jahren, eingeplant werden. Untersuchungen zeigten beim frühen Mammakarzinom eine mediane Dauer von 38,5 Monaten für ein lokales Rezidiv und eine Dauer von 64,5 Monaten für das Auftreten eines entfernten Rezidivs (Recht et al., 1988).

Auch wenn unsere Ergebnisse noch nicht die erhofften Erkenntnisse bezüglich hoher GDF-15-Spiegel und dem schlechten Ansprechen der Therapie auf den Antikörper Trastuzumab im klinischen Rahmen darlegen konnten, sollte dieses Ziel dennoch weiterverfolgt werden. Bereits in vielen Studien konnte gezeigt werden, dass GDF-15 eine wichtige Rolle in der Prognose von verschiedenen Tumoren spielt. Joshi et al. konnten zeigen, dass GDF-15 nicht nur prognostisch für HER2/neu positive Mammakarzinome eine Rolle spielt, sondern auch prädiktiv für das Ansprechen auf Trastuzumab (Joshi et al., 2011). Die Erkenntnisse, die wir aus dieser Pilotstudie gewinnen konnten, müssen nun in weiteren Studien auch klinisch belegt werden. GDF-15 als prädiktiver Marker für HER2/neu positive Mammakarzinome könnte die Therapie dieser Subgruppe individualisieren und dadurch signifikant verbessern. Als eine alternative Therapiemöglichkeit bei Resistenzen gegenüber etablierten Therapien wäre ein GDF-15-Antikörper denkbar.

5 Zusammenfassung

Dem erst vor etwa 23 Jahren entdeckten Protein GDF-15 wird heutzutage eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung beziehungsweise Tumormetastasierung zugeschrieben. Bei verschiedenen Tumorentitäten konnte es mittlerweile als prognostischer oder prädiktiver Marker angeführt werden. Auch bei HER2/neu positiven Mammakarzinomen wurde GDF-15 als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie in einer experimentellen Studie nachgewiesen. Klinische Studien in diesem Bereich sind bisher noch stark unterrepräsentiert.

Diese Pilotstudie sollte erstmals GDF-15 bei Patienten mit HER2/neu positivem Mammakarzinom im frühen Stadium im klinischen Verlauf untersuchen. Dazu wurden 22 Patienten rekrutiert und die GDF-15-Spiegel mittels ELISA vor und während einer Antikörpertherapie bestimmt. Um GDF-15 als prädiktiven Marker zu testen, wurde nach neoadjuvanter Therapie und anschließender Operation der Regressionsgrad nach Sinn bewertet. Des Weiteren wurde GDF-15 mit den Patientencharakteristika korreliert.

In der untersuchten Kohorte wurde ein medianer GDF-15-Spiegel von 0,33 ng/ml ermittelt. Im Therapieverlauf kam es zu keiner signifikanten Veränderung des Spiegels. Höhere GDF-15-Spiegel konnten allerdings bei größeren Tumoren und bei einem höheren BMI analysiert werden. Ebenfalls konnten wir zeigen, dass der GDF-15-Spiegel signifikant mit dem Alter steigt. Nicht signifikant, aber von Bedeutung ist der Zusammenhang zwischen GDF-15 und dem Regressionsgrad nach Sinn. Die untersuchten Patienten wiesen tendenziell höhere GDF-15-Werte bei niedrigem Regressionsgrad auf. Ein schlechteres Ansprechen auf eine Antikörpertherapie bei höheren GDF-15-Spiegeln ist somit anzunehmen.

GDF-15 als prädiktiver Marker in der Tumorthherapie sollte weiterverfolgt werden, sodass in Zukunft für Patienten mit Therapieresistenz schon frühzeitig alternative Therapiemöglichkeiten in Betracht gezogen werden können. Möglicherweise könnte eine Trastuzumab-Resistenz durch eine GDF-15-Antikörpertherapie überwunden werden.

6 Anhang

6.1 Patienteninformation

Patienteninformation

Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme

GDF-15

Beobachtungsstudie zur Analyse von GDF-15 Serumspiegeln in Patienten mit soliden Tumoren

Version 1.0 vom 16.11.2016

Studienleiter:

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

im Rahmen einer Beobachtungsstudie soll der Serumspiegel von GDF-15, einem Zytokin, in Patienten mit soliden Tumoren vor und 3 Monate nach Therapiebeginn oder bei Progress der Erkrankung bestimmt werden. Dieses Zytokin spielt voraussichtlich eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren. Folgende Studie soll den diagnostischen und prognostischen Wert des Zytokins als Tumormarker im Verlauf der Therapie analysieren. Hierfür wird bei Ihren regulär angeordneten Blutabnahmen zu den zwei angegebenen Zeitpunkten ein zusätzliches Serumröhrchen abgenommen.

Ablauf der Studie:

Da viele Funktionen des Zytokins „GDF-15“ noch unerforscht sind, es jedoch Hinweise gibt, dass es eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression in soliden Tumoren spielt, könnte die Erhebung des GDF-15-Serumspiegels im Verlauf der Erkrankung beziehungsweise der Therapie, eine weitere Erkenntnis des Zytokins liefern.

Wichtig ist natürlich den klinischen Verlauf mit dem Serumspiegel zu vergleichen, d.h. wir würden – Ihr Einverständnis vorausgesetzt – Ihren behandelnden Arzt über Ihren klinischen Zustand befragen und ggf. um Befundübermittlung bitten.

Vor und 3 Monate nach Therapiebeginn wird bei regulären Kontrolluntersuchungen ein zusätzliches Serumröhrchen, zur Analyse von GDF-15, abgenommen. Ansonsten werden keine weiteren Untersuchungen benötigt.

Wo liegt der mögliche persönliche Nutzen?

Für Sie als Patient liegt in der Teilnahme an der Beobachtungsstudie kein spezieller persönlicher Nutzen.

Wenngleich die Studie aus rein wissenschaftlichem, nicht aus kommerziellem Interesse durchgeführt wird, so könnten doch die Ergebnisse einen kommerziellen Wert haben und eine wirtschaftliche Nutzung nicht ausgeschlossen sein. Ein Eigentumsrecht an den Ergebnissen haben Sie als Einzelperson nicht.

Version1_ICF_16_11_16

WIE WIRD DIE VERTRAULICHKEIT GEWÄHRLEISTET? - DATENVERARBEITUNG UND DATENSCHUTZ

Alle im Rahmen dieser Studie erhobenen personenbezogenen Daten werden entsprechend der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Bestimmungen vertraulich behandelt. Die Weitergabe der Daten und ihre wissenschaftliche Auswertung erfolgen pseudonymisiert, d. h. ihr Name wird dazu durch eine Kenn-Nummer ersetzt, die ohne den entsprechenden Code, der nur den an dieser Studie beteiligten Ärzten vorliegt, nicht entschlüsselt werden kann. Gewonnene Daten werden zur Durchführung der wissenschaftlichen Analysen maximal 15 Jahre aufbewahrt und nicht an Dritte außerhalb der beteiligten Kliniken, insbesondere auch nicht zu kommerziellen Zwecken, weitergegeben. Die Ergebnisse der Studie werden in Form wissenschaftlicher Artikel in anonymisierter Form veröffentlicht.

Einwilligungserklärung, Freiwilligkeit und Abbruch der Teilnahme

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist vollkommen freiwillig. Falls Sie sich für die Teilnahme an dieser Studie entscheiden, werden Sie gebeten, eine Einwilligungserklärung zu unterschreiben. Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile von der Studie zurücktreten. Dies beeinflusst in keiner Weise die weitere Betreuung in unserer Klinik. Falls Sie sich entscheiden, Ihre Teilnahme an der Studie zu beenden, verständigen Sie bitte Ihren Studienarzt/-ärztin. Im Zuge ihres Widerrufs haben Sie auch das Recht, die Verarbeitung Ihrer personenbezogenen Daten zu stoppen; dieses wird dann umgehend erfolgen. Bereits erhobene wissenschaftliche Analysedaten können aber weiter zu Forschungszwecken verwendet werden, allerdings nur in pseudonymisierter Form (d.h. ohne Bezugsmöglichkeit zu Ihrer Person).

Weitere Informationen

Sollten Sie weitere Fragen zum Studienablauf und den mit der Studienteilnahme verbundenen Risiken oder zu Ihren Rechten als Studienteilnehmer haben, wenden Sie sich bitte an Ihren betreuenden Arzt:

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen
Kontakt: 0931/ 201 25291

Lassen Sie sich ausreichend Zeit für Ihre Entscheidung zur Teilnahme an der Studie und stellen Sie alle Fragen, die für Ihr Verständnis wichtig sind.

Wir hoffen, durch unsere Aufklärung Ihr Verständnis für die Notwendigkeit zur Durchführung dieser Studie gefunden zu haben und bedanken uns für Ihre Kooperation.

6.2 Einwilligungserklärung

Universitätsklinikum Würzburg

Anstalt des öffentlichen Rechts



Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme

GDF-15

1 / 2

Beobachtungsstudie zur Analyse von GDF-15 Serumspiegeln in Patienten mit soliden Tumoren

Version 1.0 vom 16.11.2016

Studienleiter:

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Prüfärzte: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Kontakt: wischhusen_j@ukw.de; 0931 201 25291

(Original für den/die Studienteilnehmer/in, Kopie für die Krankenakte)

Patient/in:

(Name, Vorname)

Geb.-Datum:

Adresse:

Prüfarzt/Prüfärztin:

Ich bin durch den behandelnden Arzt/die behandelnde Ärztin über Ziel, Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie aufgeklärt worden und hatte Gelegenheit, solange Fragen zu stellen, bis ich alle Punkte verstanden habe. Die von mir gestellten Fragen wurden beantwortet. Außerdem habe ich die vorangehende schriftliche Patienteninformation erhalten und gelesen. Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zur Teilnahme an dieser Studie frei zu treffen.

Ich bin einverstanden, an dieser Studie teilzunehmen.

Ich weiß, dass meine Teilnahme an der Studie vollkommen freiwillig ist und ich diese Einverständniserklärung jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir hieraus Nachteile entstehen. Sollte ich die Studie abbrechen, werde ich dies dem behandelnden Arzt mitteilen.

- Ich bin damit einverstanden, dass meine Daten im Zusammenhang mit dieser Untersuchung gespeichert, verarbeitet und in pseudonymisierter Form an die an der Durchführung und Auswertung dieser Studie beteiligten Personen weitergegeben werden darf. Dabei werden die Bestimmungen des geltenden Datenschutzes und die ärztliche Schweigepflicht eingehalten. Ich bin über die Möglichkeit, dass autorisierte Personen von Seiten zuständiger Behörden unter Wahrung der Vertraulichkeit falls erforderlich in Originalbefunde Einsicht nehmen können, informiert worden und erkläre mich damit einverstanden. Entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen kann eine Weitergabe der im Rahmen der Studie erfolgenden Aufzeichnung von Krankheitsdaten zur Überprüfung an die zuständigen Behörden erfolgen. Das zugehörige Kapitel "Datenverarbeitung und Datenschutz" der

Version 1.0 vom 16.11.2016

Patienteninformation zu dieser Studie habe ich gelesen und stimme dem beschriebenen Vorgehen zu.

Eine Kopie dieser Einverständniserklärung habe ich erhalten.

Datum - vom Studienteilnehmer einzutragen

Unterschrift des/der Studienteilnehmer/in

Der Patient/die Patientin wurde von mir über Ziel, Wesen, Bedeutung, Tragweite sowie etwaige Risiken der Studie aufgeklärt.

Datum

Unterschrift des Prüfarztes / der Prüfarztin

6.3 TNM-Klassifikation

Tabelle 14: TNM Klassifikation der Mammakarzinome

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ (DCIS, LCIS, Paget)
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut (inkl. Inflammatorisches Karzinom)
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II
N2	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II, untereinander oder an andere Strukturen fixiert oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen
N3	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten (Level III) mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten des Level I und II oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen des Level I und II oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder der Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Quelle: modifiziert nach (van Eycken, 2020)

6.4 Regressionsgrad nach Sinn

Tabelle 15: Regressionsgrad nach Sinn

Regressionsgrad	Definition
0	kein Effekt
1	vermehrte Tumorsklerose mit herdförmiger resorptiver Entzündung und/oder deutliche zytopathische Effekte
2	weitgehende Tumorsklerose mit nur fokal noch nachzuweisendem, evtl. auch multifokalem, minimalem invasivem Resttumor ($\leq 0,5$ cm), häufig ausgedehnte intraduktale Tumorausbreitung
3	kein invasiver Resttumor
4	kein Resttumor

Quelle: (Sinn et al., 1994), mit freundlicher Genehmigung © Georg Thieme Verlag KG.

7 Literaturverzeichnis

- Agus, D. B., Akita, R. W., Fox, W. D., Lewis, G. D., Higgins, B., Pisacane, P. I., . . . Sliwkowski, M. X. (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*, 2 (2), 127-137. doi:10.1016/s1535-6108(02)00097-1
- Alroy, I., & Yarden, Y. (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*, 410 (1), 83-86. doi:10.1016/s0014-5793(97)00412-2
- Altena, R., Fehrmann, R. S., Boer, H., de Vries, E. G., Meijer, C., & Gietema, J. A. (2015). Growth differentiation factor 15 (GDF-15) plasma levels increase during bleomycin- and cisplatin-based treatment of testicular cancer patients and relate to endothelial damage. *PLoS One*, 10 (1), e0115372. doi:10.1371/journal.pone.0115372
- American Society for Clinical Nutrition. (1998). Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res*, 6 Suppl 2, 51S-209S.
- Arfsten, H., Cho, A., Freitag, C., Raderer, M., Goliash, G., Bartko, P. E., . . . Pavo, N. (2019). GDF-15 in solid vs non-solid treatment-naïve malignancies. *European Journal of Clinical Investigation*, 49 (11), e13168. doi:10.1111/eci.13168
- Baek, S. J., Kim, J. S., Moore, S. M., Lee, S. H., Martinez, J., & Eling, T. E. (2005). Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol Pharmacol*, 67 (2), 356-364. doi:10.1124/mol.104.005108
- Baek, S. J., Kim, K. S., Nixon, J. B., Wilson, L. C., & Eling, T. E. (2001). Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol*, 59 (4), 901-908.
- Baek, S. J., Okazaki, R., Lee, S. H., Martinez, J., Kim, J. S., Yamaguchi, K., . . . Eling, T. E. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1

over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology*, 131 (5), 1553-1560. doi:10.1053/j.gastro.2006.09.015

- Baek, S. J., Wilson, L. C., Lee, C. H., & Eling, T. E. (2002). Dual function of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): inhibition of cyclooxygenase and induction of NSAID-activated gene. *J Pharmacol Exp Ther*, 301 (3), 1126-1131. doi:10.1124/jpet.301.3.1126
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., . . . Norton, L. (1996). Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 14 (3), 737-744. doi:10.1200/JCO.1996.14.3.737
- Bauskin, A. R., Brown, D. A., Kuffner, T., Johnen, H., Luo, X. W., Hunter, M., & Breit, S. N. (2006). Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res*, 66 (10), 4983-4986. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4067
- Boekhout, A. H., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. (2011). Trastuzumab. *Oncologist*, 16 (6), 800-810. doi:10.1634/theoncologist.2010-0035
- Bootcov, M. R., Bauskin, A. R., Valenzuela, S. M., Moore, A. G., Bansal, M., He, X. Y., . . . Breit, S. N. (1997). MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (21), 11514-11519. doi:10.1073/pnas.94.21.11514
- Bottner, M., Suter-Crazzolara, C., Schober, A., & Unsicker, K. (1999). Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell Tissue Res*, 297 (1), 103-110. doi:10.1007/s004410051337
- Breit, S. N., Tsai, V. W., & Brown, D. A. (2017). Targeting Obesity and Cachexia: Identification of the GFRAL Receptor-MIC-1/GDF15 Pathway. *Trends Mol Med*, 23 (12), 1065-1067. doi:10.1016/j.molmed.2017.10.005
- Brown, D. A., Ward, R. L., Buckhaults, P., Liu, T., Romans, K. E., Hawkins, N. J., . . . Breit, S. N. (2003). MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9 (7), 2642-2650.

- Carter, C. L., Allen, C., & Henson, D. E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 63 (1), 181-187. doi:10.1002/1097-0142(19890101)63:1<181::aid-cncr2820630129>3.0.co;2-h
- Cianfrocca, M., & Goldstein, L. J. (2004). Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist*, 9 (6), 606-616. doi:10.1634/theoncologist.9-6-606
- Clarke, R. B., Howell, A., Potten, C. S., & Anderson, E. (1997). Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res*, 57 (22), 4987-4991.
- Coates, A. S., Winer, E. P., Goldhirsch, A., Gelber, R. D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., . . . Panel, M. (2015). Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*, 26 (8), 1533-1546. doi:10.1093/annonc/mdv221
- Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., . . . Slamon, D. J. (1999). Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*, 17 (9), 2639-2648. doi:10.1200/JCO.1999.17.9.2639
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2 ed.). Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet. Oncology*, 13 (11), 1141-1151. doi:10.1016/S1470-2045(12)70425-4
- Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., . . . et al. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230 (4730), 1132-1139. doi:10.1126/science.2999974
- Curigliano, G., & Goldhirsch, A. (2017). Dual HER2 inhibition and pathological complete response in early breast cancer: increasing success of treatment by improving patient selection. *Ann Oncol*, 28 (3), 441-443. doi:10.1093/annonc/mdx016

- Deng, W., Liu, J., Pan, H., Li, L., Zhou, C., Wang, X., . . . Wang, Z. (2018). A Bispecific Antibody Based on Pertuzumab Fab Has Potent Antitumor Activity. *J Immunother*, 41 (1), 1-8. doi:10.1097/CJI.0000000000000200
- Denkert, C., Loibl, S., Muller, B. M., Eidtmann, H., Schmitt, W. D., Eiermann, W., . . . von Minckwitz, G. (2013). Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol*, 24 (11), 2786-2793. doi:10.1093/annonc/mdt350
- Ding, Q., Mracek, T., Gonzalez-Muniesa, P., Kos, K., Wilding, J., Trayhurn, P., & Bing, C. (2009). Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes. *Endocrinology*, 150 (4), 1688-1696. doi:10.1210/en.2008-0952
- Eling, T. E., Baek, S. J., Shim, M., & Lee, C. H. (2006). NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. *J Biochem Mol Biol*, 39 (6), 649-655. doi:10.5483/bmbrep.2006.39.6.649
- Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19 (5), 403-410. doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
- Emmerson, P. J., Wang, F., Du, Y., Liu, Q., Pickard, R. T., Gonciarz, M. D., . . . Wu, X. (2017). The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. *Nat Med*, 23 (10), 1215-1219. doi:10.1038/nm.4393
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8 (9), 871-874. doi:10.1016/0019-2791(71)90454-x
- Erić, I., Petek Erić, A., Kristek, J., Koprivčić, I., & Babić, M. (2018). BREAST CANCER IN YOUNG WOMEN: PATHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES. *Acta clinica Croatica*, 57 (3), 497-502. doi:10.20471/acc.2018.57.03.13
- Esteva, F. J., Valero, V., Booser, D., Guerra, L. T., Murray, J. L., Pusztai, L., . . . Hortobagyi, G. N. (2002). Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 20 (7), 1800-1808. doi:10.1200/JCO.2002.07.058

- Fairlie, W. D., Moore, A. G., Bauskin, A. R., Russell, P. K., Zhang, H. P., & Breit, S. N. (1999). MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol*, *65* (1), 2-5. doi:10.1002/jlb.65.1.2
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., . . . Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, *5* (2), 77-106. doi:10.1016/j.gendis.2018.05.001
- Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., . . . et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, *62* (3), 676-689. doi:10.1086/301749
- Gaudet, M. M., Gapstur, S. M., Sun, J., Diver, W. R., Hannan, L. M., & Thun, M. J. (2013). Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, *105* (8), 515-525. doi:10.1093/jnci/djt023
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., & Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, *31* (1), 13-20. doi:10.1002/ijc.2910310104
- Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B., . . . Panel, m. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, *24* (9), 2206-2223. doi:10.1093/annonc/mdt303
- Goldman, R., Levy, R. B., Peles, E., & Yarden, Y. (1990). Heterodimerization of the erbB-1 and erbB-2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation. *Biochemistry*, *29* (50), 11024-11028. doi:10.1021/bi00502a002
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., & Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, *16* (7), 1647-1655. doi:10.1093/emboj/16.7.1647

- Griner, S. E., Wang, K. J., Joshi, J. P., & Nahta, R. (2013). Mechanisms of Adipocytokine-Mediated Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer Cell Lines. *Curr Pharmacogenomics Person Med*, 11 (1), 31-41. doi:10.2174/1875692111311010006
- Gullick, W. J., Love, S. B., Wright, C., Barnes, D. M., Gusterson, B., Harris, A. L., & Altman, D. G. (1991). c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer*, 63 (3), 434-438. doi:10.1038/bjc.1991.100
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., & King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250 (4988), 1684-1689. doi:10.1126/science.2270482
- Houston, S. J., Plunkett, T. A., Barnes, D. M., Smith, P., Rubens, R. D., & Miles, D. W. (1999). Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*, 79 (7-8), 1220-1226. doi:10.1038/sj.bjc.6690196
- Husaini, Y., Qiu, M. R., Lockwood, G. P., Luo, X. W., Shang, P., Kuffner, T., . . . Breit, S. N. (2012). Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) slows cancer development but increases metastases in TRAMP prostate cancer prone mice. *PLoS One*, 7 (8), e43833. doi:10.1371/journal.pone.0043833
- Hynes, N. E., & Stern, D. F. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1198 (2-3), 165-184. doi:10.1016/0304-419x(94)90012-4
- Johnen, H., Lin, S., Kuffner, T., Brown, D. A., Tsai, V. W., Bauskin, A. R., . . . Breit, S. N. (2007). Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med*, 13 (11), 1333-1340. doi:10.1038/nm1677
- Joshi, J. P., Brown, N. E., Griner, S. E., & Nahta, R. (2011). Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 82 (9), 1090-1099. doi:10.1016/j.bcp.2011.07.082
- Kaufmann, M., von Minckwitz, G., Scharl, A., Costa, S. D., & Linder, M. (2013). Mammakarzinom. In *Die Gynäkologie* (pp. 625-705). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Kempf, T., Horn-Wichmann, R., Brabant, G., Peter, T., Allhoff, T., Klein, G., . . . Wollert, K. C. (2007). Circulating concentrations of growth-differentiation factor 15 in apparently healthy elderly individuals and patients with chronic heart failure as assessed by a new immunoradiometric sandwich assay. *Clin Chem*, *53* (2), 284-291. doi:10.1373/clinchem.2006.076828
- Kilickap, S., Kaya, Y., Yucel, B., Tuncer, E., Babacan, N. A., & Elagoz, S. (2014). Higher Ki67 expression is associates with unfavorable prognostic factors and shorter survival in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, *15* (3), 1381-1385. doi:10.7314/apjcp.2014.15.3.1381
- Kim, K. K., Lee, J. J., Yang, Y., You, K. H., & Lee, J. H. (2008). Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, *29* (4), 704-712. doi:10.1093/carcin/bgn031
- King, M. C., Marks, J. H., Mandell, J. B., & New York Breast Cancer Study, G. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, *302* (5645), 643-646. doi:10.1126/science.1088759
- Lawton, L. N., Bonaldo, M. F., Jelenc, P. C., Qiu, L., Baumes, S. A., Marcelino, R. A., . . . Soares, M. B. (1997). Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene*, *203* (1), 17-26. doi:10.1016/s0378-1119(97)00485-x
- Leitlinienprogramm Onkologie. (2017). (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* Version: 4.0. abgerufen von <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> 27.07.2018
- Lerner, L., Gyuris, J., Nicoletti, R., Gifford, J., Krieger, B., & Jatoi, A. (2016). Growth differentiating factor-15 (GDF-15): A potential biomarker and therapeutic target for cancer-associated weight loss. *Oncol Lett*, *12* (5), 4219-4223. doi:10.3892/ol.2016.5183
- Li, C., Wang, J., Kong, J., Tang, J., Wu, Y., Xu, E., . . . Lai, M. (2016). GDF15 promotes EMT and metastasis in colorectal cancer. *Oncotarget*, *7* (1), 860-872. doi:10.18632/oncotarget.6205

- Li, P. X., Wong, J., Ayed, A., Ngo, D., Brade, A. M., Arrowsmith, C., . . . Klamut, H. J. (2000). Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem*, 275 (26), 20127-20135. doi:10.1074/jbc.M909580199
- Li, S., Ma, Y. M., Zheng, P. S., & Zhang, P. (2018). GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2. *J Exp Clin Cancer Res*, 37 (1), 80. doi:10.1186/s13046-018-0744-0
- Liu, E., Thor, A., He, M., Barcos, M., Ljung, B. M., & Benz, C. (1992). The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene*, 7 (5), 1027-1032.
- Majewski, I. J., Nuciforo, P., Mittempergher, L., Bosma, A. J., Eidtmann, H., Holmes, E., . . . Baselga, J. (2015). PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer. *J Clin Oncol*, 33 (12), 1334-1339. doi:10.1200/JCO.2014.55.2158
- McPherson, K., Steel, C. M., & Dixon, J. M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, 321 (7261), 624-628. doi:10.1136/bmj.321.7261.624
- Menyhart, O., Santarpia, L., & Gyorffy, B. (2015). A Comprehensive Outline of Trastuzumab Resistance Biomarkers in HER2 Overexpressing Breast Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 15 (8), 665-683. doi:10.2174/156800961508151001101742
- Michaelson, J. S., Silverstein, M., Sgroi, D., Cheongsiatmoy, J. A., Taghian, A., Powell, S., . . . Smith, B. (2003). The effect of tumor size and lymph node status on breast carcinoma lethality. *Cancer*, 98 (10), 2133-2143. doi:10.1002/cncr.11765
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2010). Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. *J Cell Physiol*, 224 (3), 626-635. doi:10.1002/jcp.22196
- Nagata, Y., Lan, K. H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., . . . Yu, D. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6 (2), 117-127. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.022

- Nahta, R., Yuan, L. X., Zhang, B., Kobayashi, R., & Esteva, F. J. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*, *65* (23), 11118-11128. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3841
- Ono, M., & Kuwano, M. (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res*, *12* (24), 7242-7251. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0646
- Pandolfi, P. P. (2004). Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N Engl J Med*, *351* (22), 2337-2338. doi:10.1056/NEJMcibr043143
- Partridge, A. H., Gelber, S., Piccart-Gebhart, M. J., Focant, F., Scullion, M., Holmes, E., . . . Gelber, R. D. (2013). Effect of age on breast cancer outcomes in women with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: results from a herceptin adjuvant trial. *J Clin Oncol*, *31* (21), 2692-2698. doi:10.1200/JCO.2012.44.1956
- Peake, B. F., Eze, S. M., Yang, L., Castellino, R. C., & Nahta, R. (2017). Growth differentiation factor 15 mediates epithelial mesenchymal transition and invasion of breast cancers through IGF-1R-FoxM1 signaling. *Oncotarget*, *8* (55), 94393-94406. doi:10.18632/oncotarget.21765
- Peiro, G., Ortiz-Martinez, F., Gallardo, A., Perez-Balaguer, A., Sanchez-Paya, J., Ponce, J. J., . . . Lerma, E. (2014). Src, a potential target for overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma. *Br J Cancer*, *111* (4), 689-695. doi:10.1038/bjc.2014.327
- Perez, E. A., Romond, E. H., Suman, V. J., Jeong, J. H., Davidson, N. E., Geyer, C. E., Jr., . . . Wolmark, N. (2011). Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol*, *29* (25), 3366-3373. doi:10.1200/JCO.2011.35.0868
- Pohlmann, P. R., Mayer, I. A., & Mernaugh, R. (2009). Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, *15* (24), 7479-7491. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0636
- Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Lee, A. H. S., Elston, C. W., Grainge, M. J., Hodi, Z., . . . Ellis, I. O. (2008). Prognostic Significance of Nottingham

Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26 (19), 3153-3158. doi:10.1200/jco.2007.15.5986

Recht, A., Silen, W., Schnitt, S. J., Connolly, J. L., Gelman, R. S., Rose, M. A., . . . Harris, J. R. (1988). Time-course of local recurrence following conservative surgery and radiotherapy for early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 15 (2), 255-261.

Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe*, 8 (3), 138-140.

Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*, 59 (4), 651-672. doi:10.1097/GRF.0000000000000239

Roth, P., Junker, M., Tritschler, I., Mittelbronn, M., Dombrowski, Y., Breit, S. N., . . . Wischhusen, J. (2010). GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clin Cancer Res*, 16 (15), 3851-3859. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0705

Rubin, I., & Yarden, Y. (2001). The basic biology of HER2. *Ann Oncol*, 12 Suppl 1, 3-8. doi:10.1093/annonc/12.suppl_1.s3

Sasahara, A., Tominaga, K., Nishimura, T., Yano, M., Kiyokawa, E., Noguchi, M., . . . Gotoh, N. (2017). An autocrine/paracrine circuit of growth differentiation factor (GDF) 15 has a role for maintenance of breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*, 8 (15), 24869-24881. doi:10.18632/oncotarget.15276

Schneeweiss, A., Chia, S., Hickish, T., Harvey, V., Eniu, A., Hegg, R., . . . Cortes, J. (2013). Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol*, 24 (9), 2278-2284. doi:10.1093/annonc/mdt182

Selander, K. S., Brown, D. A., Sequeiros, G. B., Hunter, M., Desmond, R., Parpala, T., . . . Jukkola-Vuorinen, A. (2007). Serum macrophage inhibitory cytokine-1 concentrations correlate with the presence of prostate cancer bone metastases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16 (3), 532-537. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0841

- Shin, M. Y., Kim, J. M., Kang, Y. E., Kim, M. K., Joung, K. H., Lee, J. H., . . . Shong, M. (2016). Association between Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) and Cardiovascular Risk in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *J Korean Med Sci*, 31 (9), 1413-1418. doi:10.3346/jkms.2016.31.9.1413
- Sinn, H. P., Schmid, H., Junkermann, H., Huober, J., Leppien, G., Kaufmann, M., . . . Otto, H. F. (1994). [Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy]. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 54 (10), 552-558. doi:10.1055/s-2007-1022338
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235 (4785), 177-182. doi:10.1126/science.3798106
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., . . . Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344 (11), 783-792. doi:10.1056/NEJM200103153441101
- Stierer, M., Rosen, H., Weber, R., Hanak, H., Spona, J., & Tuchler, H. (1993). Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg*, 218 (1), 13-21. doi:10.1097/0000658-199307000-00004
- Stuckey, A. (2011). Breast cancer: epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol*, 54 (1), 96-102. doi:10.1097/GRF.0b013e3182080056
- Swain, S. M., Kim, S. B., Cortes, J., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M., . . . Baselga, J. (2013). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 14 (6), 461-471. doi:10.1016/S1470-2045(13)70130-X
- Tamimi, R. M., Spiegelman, D., Smith-Warner, S. A., Wang, M., Pazaris, M., Willett, W. C., . . . Hunter, D. J. (2016). Population Attributable Risk of Modifiable and Nonmodifiable Breast Cancer Risk Factors in Postmenopausal Breast Cancer. *American journal of epidemiology*, 184 (12), 884-893. doi:10.1093/aje/kww145

- Tan, M., Wang, Y., Guan, K., & Sun, Y. (2000). PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97* (1), 109-114. doi:10.1073/pnas.97.1.109
- Tong, S., Marjono, B., Brown, D. A., Mulvey, S., Breit, S. N., Manuelpillai, U., & Wallace, E. M. (2004). Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage. *Lancet*, *363* (9403), 129-130. doi:10.1016/S0140-6736(03)15265-8
- van de Vijver, M. J., Peterse, J. L., Mooi, W. J., Wisman, P., Lomans, J., Dalesio, O., & Nusse, R. (1988). Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med*, *319* (19), 1239-1245. doi:10.1056/NEJM198811103191902
- van Eycken, E. (2020) Mammatumoren. In C. Wittekind (Ed.), *TNM Klassifikation maligner Tumoren: Korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019* (8 ed., pp. 197-204). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH et Company KGaA.
- van Gemert, W. A., Lanting, C. I., Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A., Grooters, H. G., Kampman, E., . . . Elias, S. G. (2015). The proportion of postmenopausal breast cancer cases in the Netherlands attributable to lifestyle-related risk factors. *Breast Cancer Research and Treatment*, *152* (1), 155-162. doi:10.1007/s10549-015-3447-7
- Vila, G., Riedl, M., Anderwald, C., Resl, M., Handisurya, A., Clodi, M., . . . Luger, A. (2011). The relationship between insulin resistance and the cardiovascular biomarker growth differentiation factor-15 in obese patients. *Clin Chem*, *57* (2), 309-316. doi:10.1373/clinchem.2010.153726
- Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., . . . Press, M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, *20* (3), 719-726. doi:10.1200/JCO.2002.20.3.719
- Wallentin, L., Zethelius, B., Berglund, L., Eggers, K. M., Lind, L., Lindahl, B., . . . Siegbahn, A. (2013). GDF-15 for prognostication of cardiovascular and cancer morbidity and mortality in men. *PLoS One*, *8* (12), e78797. doi:10.1371/journal.pone.0078797

- Wang, X., Baek, S. J., & Eling, T. E. (2013). The diverse roles of nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1/GDF15) in cancer. *Biochem Pharmacol*, *85* (5), 597-606. doi:10.1016/j.bcp.2012.11.025
- Wang, X., Li, Y., Tian, H., Qi, J., Li, M., Fu, C., . . . Zhang, W. (2014). Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a novel diagnostic serum biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*, *14*, 578. doi:10.1186/1471-2407-14-578
- Warner, E. T., Ballman, K. V., Strand, C., Boughey, J. C., Buzdar, A. U., Carey, L. A., . . . Partridge, A. H. (2016). Impact of race, ethnicity, and BMI on achievement of pathologic complete response following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a pooled analysis of four prospective Alliance clinical trials (A151426). *Breast Cancer Res Treat*, *159* (1), 109-118. doi:10.1007/s10549-016-3918-5
- Weide, B., Schafer, T., Martens, A., Kuzkina, A., Uder, L., Noor, S., . . . Wischhusen, J. (2016). High GDF-15 Serum Levels Independently Correlate with Poorer Overall Survival of Patients with Tumor-Free Stage III and Unresectable Stage IV Melanoma. *J Invest Dermatol*, *136* (12), 2444-2452. doi:10.1016/j.jid.2016.07.016
- Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Kern, S. G., Brown, D. A., Liu, T., Bauskin, A. R., . . . Hampton, G. M. (2003). Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100* (6), 3410-3415. doi:10.1073/pnas.0530278100
- Wollmann, W., Goodman, M. L., Bhat-Nakshatri, P., Kishimoto, H., Goulet, R. J., Jr., Mehrotra, S., . . . Nakshatri, H. (2005). The macrophage inhibitory cytokine integrates AKT/PKB and MAP kinase signaling pathways in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, *26* (5), 900-907. doi:10.1093/carcin/bgi031
- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., . . . et al. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, *265* (5181), 2088-2090. doi:10.1126/science.8091231
- Yang, H., Filipovic, Z., Brown, D., Breit, S. N., & Vassilev, L. T. (2003). Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther*, *2* (10), 1023-1029.
- Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut. (2019). Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen

Landeskrebsregisterdaten, verfügbare Diagnosejahre bis 2016.Version:
Epi2018_1. doi:10.18444/5.03.01.0005.0014.0001.

Zhang, S., Huang, W. C., Li, P., Guo, H., Poh, S. B., Brady, S. W., . . . Yu, D.
(2011). Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common
node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med*, 17 (4), 461-
469. doi:10.1038/nm.2309

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität beim Mammakarzinom in Deutschland	1
Abbildung 2: HER2/neu Signalkaskade.....	6
Abbildung 3: Einfluss von GDF-15 auf das Tumorgewebe über verschiedene Signalwege	14
Abbildung 4: Chronologischer Ablauf der Studie	18
Abbildung 5: Sandwich-ELISA	20
Abbildung 6: GDF-15-Spiegel zum Zeitpunkt vor Antikörpertherapie (GDF-15_0) und drei Monate nach Beginn der Antikörpertherapie (GDF-15_3)	30
Abbildung 7: Die medianen GDF-15-Spiegel der ersten Blutproben (GDF-15_0) aufgeteilt nach dem Regressionsgrad nach Sinn.....	34

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung des Gradings nach Elston und Ellis	4
Tabelle 2: Postoperative Therapieempfehlung für HER2/neu positive Mammakarzinome	7
Tabelle 3: Materialien zur Aufbereitung der Proben	19
Tabelle 4: ELISA-Kit Inhalt	21
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien für das ELISA.....	21
Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsgegenstände zur Durchführung des ELISAs	22
Tabelle 7: Beispiel einer 96-Wells Mikrotiterplatte	23
Tabelle 8: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme (n = 22).....	26
Tabelle 9: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme (n = 22).....	28
Tabelle 10: GDF-15-Werte in Relation zur Tumorgroße	31
Tabelle 11: GDF-15-Werte in Relation zum BMI [kg/m ²]	31
Tabelle 12: Spearman Korrelation zwischen GDF-15_0 und einigen klinischen Variablen, die vor Beginn der Antikörpertherapie erhoben wurden	32
Tabelle 13: Spearman Korrelation zwischen GDF-15_0 und Variablen, die unter Therapie erhoben wurden	33
Tabelle 14: TNM Klassifikation der Mammakarzinome	50
Tabelle 15: Regressionsgrad nach Sinn.....	51

III Danksagung

Folgenden Personen möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen, da sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herr Prof. Dr. med. V. Kunzmann danke ich für die Betreuung als Doktorvater. Er hat durch sein Fachwissen, konstruktive Kritik sowie nutzbringende Vorschläge zur Finalisierung meiner Arbeit beigetragen.

Besonderen Dank gilt Frau Dr. med. M. Goebeler für ihre Hilfsbereitschaft, Geduld und die unzähligen Gespräche, die zum Gelingen dieser Arbeit geführt haben. Trotz der Belastung in ihrer Klinik­tätigkeit hat sie mich in den letzten vier Jahren zu jedem Zeitpunkt unterstützt und mir immer wieder wichtige Denkanstöße gegeben. Ich bedanke mich ausdrücklich für die ausgezeichnete Betreuung in allen Arbeitsphasen.

Ebenso danke ich Prof. Dr. rer. nat. J. Wischhusen und seinem Labor-Team. Die Zusammenarbeit trug wesentlich zur Themenfindung und zum Gelingen des experimentellen Teils bei. Insbesondere danke ich Frau Dr. P. Römer für ihre Betreuung und Hilfestellung im Labor.

Des Weiteren möchte ich dem Chemoambulanz-Team der Frauenklinik und Poliklinik der Universität Würzburg für die gute Zusammenarbeit bei der Rekrutierung der Patienten danken.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank meiner Familie und Freunden, die mich während des Studiums immer unterstützt und mich bei Rückschlägen wiederaufgerichtet haben. Sie haben mir Inspiration, Kraft, Durchhaltevermögen und den nötigen Rückhalt gegeben. Ohne diese Unterstützung würde ich heute nicht dort stehen, wo ich jetzt bin. Ich danke ihnen, dass sie mir das Studium und somit die Finalisierung dieser Arbeit ermöglicht haben. Diesbezüglich geht auch ein besonderer Dank an meine Schwester, die mich bei der graphischen Umsetzung meiner Ideen unterstützt hat.