

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Aus dem Institut für Tumorbiologie
des Zentrums für experimentelle Medizin

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Pantel

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Pantel und Dr. Katharina Harms- Effenberger

Erprobung einer neuen Methode zur Detektion und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen im Blut von Mammakarzinompatientinnen in verschiedenen Krankheitsstadien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Britta Kohlmorgen
geboren in Offenbach a. M.

Hamburg 2011

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

18.01.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Professor Dr. med. K. Pantel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter/in:

PD Dr. med. M. Bockhorn

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter/in:

Professor Dr. med. V. Müller

Tag der mündlichen Prüfung:

18.01.2012

Den Frauen die diese Arbeit ermöglicht haben

Inhaltsverzeichnis	4
1. Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2. Einleitung	6
2.1 Mammakarzinom	6
2.2 Tumor- und Prognosemarker	10
2.3. Metastasierung und Minimal Residual Disease	12
2.4 Zirkulierende Tumorzellen und deren derzeitige Nachweisverfahren	15
2.5 Ariol -Methode	19
3. Material und Methoden	22
3.1 Patienten	22
3.2 Anfertigung von Kontrollobjektträgern mit Zelllinien (3T3/ MCF-7) und Kontrollobjektträgern mit MCF-7 gespiktem Blut	23
3.3 Protokolle	24
3.3.1 Zellanreicherung mit der CTC- Methode	24
3.3.2 Färbung	27
3.4 CTC Screening	27
3.5 Auswertung des Scans	30
3.6 Vorbereitung der quantitativen Multimarker- Real Time PCR	31
3.7 Statistik	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Validierung der Methode	32
4.2 Methodenvergleich im M1 Patientinnenkollektiv	33
4.3 Methodenvergleich im M0 Patientinnenkollektiv	45
4.4. Vergleich der prä- und postoperativen Blutentnahmen	48
5. Diskussion	52
6. Zusammenfassung	59
7. Literaturverzeichnis	60
8. Abkürzungsverzeichnis	70
Danksagung	71
Lebenslauf	72
Eidesstattliche Versicherung	73

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Ausbildung von Metastasen stellt zurzeit noch immer die hauptsächliche Todesursache des fortgeschrittenen Mammakarzinoms dar. Das Verständnis der Metastasierungsmechanismen hat demnach eine Schlüsselrolle in Bezug auf Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle des Brustkrebses inne. Vorstufen overter Metastasen wie Mikrometastasen ($\leq 2\text{mm}$) oder einzelne vom Primärtumor disseminierte Tumorzellen fasst man unter dem Begriff *Minimal Residual Disease (MRD)* zusammen. Die erzielten Fortschritte innerhalb der *MRD* Forschung um das Mammakarzinom basieren größtenteils auf den Erkenntnissen, die aus Knochenmarkproben bei Patientinnen in metastasierter und nicht- metastasierter Situation gewonnen wurden. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen (*DTC*) im Knochenmark hat sich bereits als prognostischer Marker bewährt (Braun *et al.* 2000) und Eingang in den klinischen Alltag gefunden. Aufgrund der schwierigen Materialentnahme durch Biopsie des Knochenmarks im Beckenkamm der Patientinnen, erscheint der Nachweis zirkulierender Tumorzellen (*CTC*) im Blut eine weitere, einfachere Möglichkeit zum *MRD* Nachweis zu sein. Die Vielzahl unterschiedlicher Detektionsmethoden macht deutlich, dass der *CTC* Nachweis im Blut ein noch immer stark beforschtes Gebiet der Grundlagenforschung darstellt, welches weiterer Optimierung bedarf. Ziel dieser Arbeit soll es nun sein, eine neue Methode zum Nachweis und zur Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen- nachfolgend Ariol- Methode genannt- auf die Untersuchung des Blutes von Patientinnen mit Mammakarzinom in nicht- metastasierter (M0; vor und nach Operation) und metastasierter (M1) Situation anzuwenden. Im Zuge dieses Vorgehens sollen vorbestehende Daten an einem M1 Patientenkollektiv validiert und erstmalig mit dieser Methode Ergebnisse für M0 Patienten unter Berücksichtigung des Abnahmezeitfensters (vor/ nach OP) erhoben werden- zur Qualitätssicherung werden diese Untersuchungen im Methodenvergleich mit dem *FDA*- akkreditierten *CellSearch*- System (im Nachfolgenden *CellSearch*- Methode genannt) vorgenommen. Darüber hinaus soll ein Vergleich der neuen Methode, der *CellSearch*- Methode und eines PCR gestützten Procederes zur Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen, für das M1 Kollektiv durchgeführt werden. Diese Arbeit soll folgende Fragen beantworten:

- (1) Sind die bisherigen Ergebnisse zur neuen Ariol- Methode bezüglich der Detektion von *CTC* bei M1- Patientinnen reproduzierbar?
- (2) Wie verhalten sich die Detektionsraten der Ariol- und der *CellSearch* Methoden in anderen Patientengruppen (Untersuchung der M0 prä- und post- OP- Patientinnen)?
- (3) Besteht ein Vorteil in der Anwendung oder den Ergebnissen der Ariol- Methode gegenüber der *CellSearch*- Methode für die untersuchten Patientenkollektive?
- (4) Inwieweit sind die Ergebnisse der Ariol- Methode mit denen einer PCR- basierten Methode vergleichbar?

2. Einleitung

2.1 Mammakarzinom

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Detektion zirkulierender Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom, einem Verfahren, das der Verlaufskontrolle, Prognoseeinschätzung und dem Therapietargeting dient. Um das Kernstück der Arbeit in seinen Kontext einzuordnen, soll der folgende Abschnitt zunächst einen Überblick über die Epidemiologie, Biologie und die in der Klinik bisher üblichen Klassifikationskriterien des Brustkrebses, verschaffen.

Epidemiologie

Die maligne Neoplasie der Brustdrüse (ICD 10 C50.0) stellt die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache in Europa dar (Ferlay *et al.* 2007). Im Jahre 2006 wurde bei 429.900 (davon über 58.000 in Deutschland) Menschen Brustkrebs diagnostiziert. In Deutschland betreffen 28,9% aller Krebsneuerkrankungen der Frau die Brustdrüse. Darüber hinaus ist Brustkrebs derzeit die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen (RKI 2008) und mit 16,7% bezogen auf alle krebsbedingten Todesursachen des weiblichen Geschlechts, das am häufigsten zum Tode führende Malignom (Ferlay *et al.* 2007). In den 25 EU-Nationen starben 2007 131.900 Menschen an den Folgen einer Brustkrebserkrankung (alleine in Deutschland 17.029), demzufolge sind insgesamt 7,8% aller krebsbedingten Todesfälle auf das Mammakarzinom zurückzuführen (Statistisches Bundesamt 2008/2009). Die 5- Jahres Überlebensrate liegt laut Robert Koch Institut bei 83- 87% (RKI 2008).

Die Erkrankung betrifft überwiegend Frauen, ist aber bei Männern bei weitem nicht so selten, wie häufig angenommen, die jährliche Inzidenz liegt hier bei 1 von 100 000, wobei beim Mann das durchschnittliche Erkrankungsalter zwischen dem 60. und dem 70. Lebensjahr liegt (Elston *et al.* 1991).

Im Mittel erkranken die Frauen mit 64 Jahren, ein Alter, das laut Angaben des Robert Koch Instituts sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen liegt (RKI 2008).

Risikofaktoren

Die weite Verbreitung und das häufige Auftreten von Brustkrebs werden unter anderem einem veränderten Hormonstatus, insbesondere dem verminderten Östrogenspiegel der Frauen nach Ablauf der Wechseljahre zugeschrieben, aber auch Risikofaktoren wie eine frühe Menarche, ein höheres Alter bei der ersten Geburt und der frühe Eintritt in das Klimakterium werden diskutiert. Ein erhöhtes Risiko zu erkranken wird auch Menschen mit Adipositas, regelmäßigem Alkoholkonsum oder positiver Familienanamnese zugesprochen (RKI 2008).

Die epidemiologische Bedeutung und Signifikanz der Erkrankung versteckt sich sicherlich in den aufgeführten Zahlen, macht aber um so deutlicher wie wichtig neben Prävention und

Früherkennung auch eine individuelle Therapie, deren Verlaufskontrolle sowie eine sich anschließende Nachsorge sind.

Histologie

Histologisch unterteilt man das Mammakarzinom in invasive und nicht- invasive (*Carcinoma in situ*) Karzinome, von denen das invasive Karzinom das Häufigere darstellt. Beide Untergruppen können weiter in duktale, also von den Milchgängen ausgehende und lobuläre, aus dem Parenchym entstandene Karzinome unterschieden werden.

Einen kleineren Anteil machen tubuläre, muzinöse oder medulläre Karzinome aus, denen man eine bessere Prognose zuspricht, als den CAs vom lobulären oder dukталen Typ (Elston *et al.* 1991).

Tabelle 2.1.1: Histologische Einteilung der Mammakarzinome

Typ	Häufigkeit
invasive Karzinome	80–85%
invasiv-dukтал	> 70%
invasiv-lobulär	10%
Sonderformen	
u.a. tubulär, muzinös, szirrhös, medullär	< 5%
nicht invasive Karzinome (Carcinoma in situ)	15–20%
dukтал	~ 95% aller CIS (= Carcinoma in situ)
lobulär	~ 5% aller CIS

Tab 2.1.1: Hayes DE: Atlas of Breast Cancer 2nd Edition; Barcelona; Mosby International LTd. 2000, Elsevier

Klassifikationssysteme

Die Stadieneinteilung und Klassifikation des Tumors erfolgt nach dem TNM System, wobei T die Tumorgroße, N den Lymphknotenbefall und M das Vorhandensein von Fernmetastasen beschreibt, die Präfixe p und c stehen jeweils für die pathologische bzw. die klinische Beurteilung der TNM- Kriterien.

Suffixe sn (Sentinel- Lymphknotentechnik), i (immunhistochemisch) und mol (RT-PCR) werden gebraucht, um Veränderungen der Lymphknoten, des Tumors oder der Fernmetastase(n) weitergehend beschreiben bzw. eine Angabe über das ausschlaggebende Nachweisverfahren machen zu können. Das Suffix m beschreibt das Vorhandensein mehrerer Knoten.

Tabelle 2.2.2: Klassifikation nach TNM mit Korrelation zum Staging

Primary tumor (T)	
Tx	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	(DCIS) Carcinoma in situ
Tis	(LCIS) Carcinoma in situ
Tis	Paget's disease of the nipple with no tumor
T1	Tumor ≤ 2 cm in greatest dimension
T1mic	Microinvasion ≤ 0.1 cm in greatest dimension
T1a	Tumor > 0.1 but not > 0.5 cm in greatest dimension
T1b	Tumor > 0.5 cm but not > 1 cm in greatest dimension
T1c	Tumor > 1 cm but not > 2 cm in greatest dimension
T2	Tumor > 2 cm but not > 5 cm in greatest dimension
T3	Tumor > 5 cm in greatest dimension
T4	Tumor of any size, with direct extension to (a) the chest wall or (b) skin only, as described below
T4a	Extension to the chest wall, not including the pectoralis muscle
T4b	Edema (including peau d'orange) or ulceration of the skin of the breast or satellite skin nodules confined to the same breast
T4c	Both T4a and T4b
T4d	Inflammatory carcinoma
<i>Note: Paget's disease associated with a tumor is classified according to the size of the tumor.</i>	
Regional lymph nodes (N)	
Nx	Regional lymph nodes cannot be assessed (eg, previously removed)
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in movable ipsilateral axillary lymph node(s); pathologic involvement of one to three axillary lymph nodes
N2	Metastasis in ipsilateral axillary lymph node(s) fixed or matted, or in clinically apparent ^a ipsilateral internal mammary nodes in the absence of clinically evident axillary lymph node metastasis; pathologic involvement of four to nine axillary lymph nodes
N2a	Metastasis in ipsilateral axillary lymph nodes fixed to one another (matted) or to other structures
N2b	Metastasis only in clinically apparent ^a ipsilateral internal mammary nodes and in the absence of clinically evident axillary lymph node metastasis
N3	Metastasis in ipsilateral infraclavicular lymph node(s) with or without axillary lymph node involvement, or in clinically apparent ^a ipsilateral internal mammary lymph node(s) and in the presence of clinically evident axillary lymph node metastasis; or metastasis in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement; pathologic involvement of 10 or more axillary lymph nodes
N3a	Metastasis in ipsilateral infraclavicular lymph node(s) and axillary lymph node(s)
N3b	Metastasis in ipsilateral internal mammary lymph node(s) and axillary lymph node(s)
N3c	Metastasis in ipsilateral supraclavicular lymph node(s)

Stage grouping			
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1 ^b	N0	M0
Stage IIA	T0	N1	M0
	T1 ^b	N1	M0
	T2	N0	M0
Stage IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T0	N2	M0
	T1 ^b	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
Stage IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Stage IIIC	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

^b T1 includes T1mic

Distant metastasis (M)

Mx	Distant metastasis cannot be assessed
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

Tab 2.2.2: Greene FL, Page DL, Fleming ID *et al.*(eds):AJCC Cancer Staging Manual, 6th edition New York, Springer Verlag 2002

Zusätzlich verwendet man das *Grading*, um eine Differenzierungseinstufung des Tumors vornehmen zu können. Nach Bloom und Richardson bzw. nach Elston und Ellis (*Nottingham Combined Histologic Grade*) (Elston und Ellis 1991) werden Mitoserate, Kernpolymorphie und Tubulusausbildung verwendet, um einen prognoseweisenden Score zu errechnen. Neben der Tumorverdopplungszeit, der Proliferationsrate, dem invasiven Verhalten und dem metastatischen Potenzial werden auch der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, das Alter, der Her2/neu Status und die peritumorale Lymph- und Gefässinfiltration als prognostische Faktoren angesehen. Als prognostisch ungünstig gelten große Tumoren, der starke Befall axillärer Lymphknoten ggf. auch in verschiedenen Stationen, ein hoher *Grading-Score*, ein hoher immunreaktiver Score nach Remmele und Steger (Beurteilung von Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptorstatus (PR)), ein Alter unter 35 Lebensjahren, ein positiver Her-2/neu-Status und die Invasion von Lymph- bzw. Blutgefäßen (Regierer *et al.* 2005).

In dieser Arbeit wurden die Blutproben der unterschiedlichen Patientinnen vorwiegend nach ihrem M- Stadium eingeteilt. Die weitere Stadienzugehörigkeit nimmt sich recht heterogen aus, wurde aber soweit möglich erfasst und statistisch ausgewertet.

2.2 Tumor- und Prognosemarker

Verlaufs- und Prognosemarker haben sicherlich im Laufe der letzten Jahre stetig an Bedeutung gewonnen und sind weiterhin ein stark untersuchtes Gebiet im Bereich der Grundlagenforschung. Dieser Abschnitt soll kurz die häufig verwendeten Marker vorstellen und zusammenfassend ihre Bedeutung hinsichtlich der Prognose und des Krankheitsmonitorings darstellen. Trotz der Vielzahl unterschiedlicher Tumormarker, macht die bereits beschriebene Anzahl der Neuerkrankungen und der Krebstode pro Jahr (siehe 2.1) deutlich, dass es dringend eines tieferen Verständnisses hinsichtlich der Eigenschaften, Möglichkeiten und Grenzen der so genannten Tumormarker bedarf.

Carcino-embryogenes Antigen CEA oder Cancer Antigen 15-3 (CA 15-3)

„Klassische“ Tumormarker wie CEA oder CA 15-3, die unter Umständen bereits präoperativ erhöht im Vergleich zum Gesunden gemessen werden können, werden häufig routinemäßig zur Verlaufskontrolle bzw. zur Therapiekontrolle genutzt, insbesondere in Kombination. Obwohl ihre standardisierte Verwendung nach Therapieende aufgrund der derzeitigen Studienlage nicht mehr von der *American Society of Clinical Oncology* empfohlen wird (Khatcheressian *et al.* 2008), beschreibt das Manual zur Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms 2004 die Erhebung des CA-15-3/ CEA Status vor Ersttherapie als „wünschenswert“ und bewertet den Einsatz dieser Tumormarker insbesondere für die Rezidivprophylaxe als Standardmonitoringtool (Regierer *et al.* 2005).

c-erb-2 Onkoprotein (HER2/neu-Onkogen).

Der *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)* erlangte in Vergangenheit, insbesondere mit der Entwicklung eines gegen ihn gerichteten Antikörpers (Trastuzumab, Herceptin®) große klinische Bedeutung, nicht nur in Bezug auf die Erkrankungsnachsorge, sondern auch als Therapietarget. Tumoren die sich Her-2/neu positiv darstellen, werden einerseits mit schlechter differenzierten Tumoren, einer höheren Rezidivrate und Mortalität assoziiert, andererseits besteht aber mit dem Herceptin eine medikamentöse Therapieoption (Payne *et al.* 2008, Strieber *et al.* 2004).

Östrogenrezeptor alpha (ER- α)

Eine Überexpression der Östrogenrezeptoren gilt als einer der bedeutendsten individuellen prädiktiven Faktoren des Brustkrebses. 80% aller Mammatumoren der Altersgruppe ≥ 50 LJ sind ER- positiv. Ein ER- positiver Status geht mit einer besseren Gesamtprognose einher und ist ausschlaggebend für eine anti- hormonelle Therapie mit z. B. einem Selektiven Östrogenrezeptor- Modulator (z.B. Tamoxifen \rightarrow) oder einem Aromatasehemmer (z.B. Letrozol \rightarrow). Ein Drittel aller metastasierten Tumoren reagieren nicht auf die Therapie mit Aromatase- Hemmern oder Selektiven Östrogen Rezeptor Modulatoren (Payne *et al.* 2008).

Progesteronrezeptor (PR)

Das PR- Gen wird als Östrogen reguliert beschrieben, so dass die PR Expression einen funktionierenden ER Pfad voraussetzt. Aus dieser Annahme heraus gilt die PR Bestimmung in der Literatur durchaus als sensibleres prognostisches Werkzeug (Horwitz *et al.* 1975). Es gibt Hinweise, dass PR positive Tumoren sensibler auf Tamoxifen reagieren (Ravdin *et al.* 2003) als Tumoren, die nur als ER-positiv gelten.

Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCam)

EGP-2: ebenfalls bekannt als EpCam (GA 733-2, ESA, KSA, 17-1A) gehört, als epitheliales Glykoprotein, zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle und wird auch als Marker für Tumoren epithelialen Ursprungs verwertet (Litinov *et al.* 1994).

Zytokeratine (CK 7,8,18,19)

Zytokeratine werden häufig als Detektionsmerkmal für Zellen epithelialen Ursprungs verwendet und finden insbesondere bei der Detektion von *CTC* und *DTC* Anwendung. Eine Anwendbarkeit dieser Marker bei frühen Stadien der Brustkrebserkrankung entsprechend einem bestimmten Verteilungsmuster konnte nachgewiesen werden (Effenberger *et al.* 2011).

Urokinase Plasminogenaktivator Typ 3 (uPA-3) und Plasminogenaktivator Inhibitor I (PAI-1)

Der Plasminogenaktivator vom Urokinase Typ (uPA- 3) und sein Inhibitor (PAI-1) gehören zu einem Proteolysesystem, welches Krebszellen ermöglicht die extrazelluläre Matrix zu durchdringen und zu metastasieren (Strieber *et al.* 2004). Der Nachweis der tumorassoziierten Proteolysefaktoren uPA-3 und PAI-1 scheint prognosebeeinflussend: sind sie im Primärtumor vermehrt nachweisbar, ist dies mit einem höheren Risiko für Metastasierung, Tumorinvasion und eine verkürzte Gesamtüberlebensdauer verbunden (Look *et al.* 2002). Darüber hinaus scheinen Patientinnen mit einer Überexpression dieser Marker von einer Chemotherapie zu profitieren. UPA-3 und PAI-1 werden, zumeist noch in Studien, als prognoseentscheidend und in gewissem Umfang auch als therapieweisend betrachtet (Look *et al.* 2002).

Ki-67 und die S-Phasen Fraktion

Um die Proliferationsaktivität innerhalb des Tumors zu bestimmen finden zwei Methoden besonders häufig Anwendung: zum einen die Bestimmung der „S- Phasen- Fraktion“, also dem Anteil der Tumorzellen, die sich gerade in der Synthese- Phase befinden; zum anderen die Bestimmung des Proliferationsmarkers Ki- 67, einem Protein, dass nur während der Proliferationsphase der Zellen nachweisbar ist. Bislang konnte nicht eindeutig belegt werden, ob ein über die Bestimmung des Tumorgrading Methoden hinaus bestehender Vorteil bezüglich der Prognoseabschätzung existiert (Ignatiadis *et al.* 2008).

DTC/CTC

Ein relativ neuer Ansatz, der ergänzend zu den bestehenden Möglichkeiten unter dem Begriff *Minimal Residual Disease* zusammengefasst wird, beschäftigt sich mit disseminierten, im Knochenmark angesiedelten bzw. im Blut zirkulierenden Tumorzellen von Karzinompatienten.

2007 fand der Nachweis von *DTC/CTC* Eingang in die Tumormarkerempfehlung der *American Society of Clinical Oncology* (Harris 2007). Im Folgenden soll, auch wenn im Gros der wissenschaftlichen Literatur durchaus keine allgemeingültige Nomenklatur besteht, der Begriff *CTC*, also zirkulierender Tumorzellen für *TCs* im Blut und *DTC* für disseminierte *TCs* beispielsweise im Knochenmark Verwendung finden.

Diese Arbeit beschäftigt sich in den folgenden Abschnitten mit der *Minimal Residual Disease* bei Mammakarzinompatientinnen und konzentriert sich im Besonderen auf den Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit Mamakarzinom. Für ein tieferes Verständnis von *DTC* bzw. *CTC* für eine Erkrankung wie Brustkrebs, wird es notwendig sein, den vollzogenen Wandel des Metastasierungsdogmas über die letzten Jahre hinweg nachzuvollziehen.

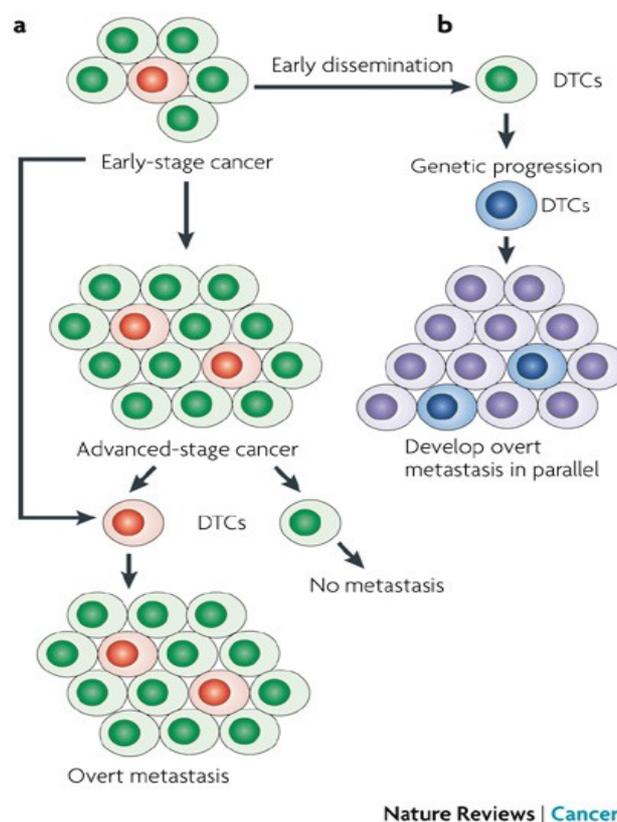
2.3. Metastasierung und *Minimal Residual Disease*

Seit sich Medizin und Wissenschaft eine Vorstellung von Krebs und Metastasenbildung zu machen versuchen, gab es immer wieder Ansätze ein Modell zu entwickeln, das Allgemeingültigkeit besitzt. Das von Stephen Paget bereits 1889 postulierte Prinzip von „*Seed and Soil*“ (Paget 1889) beschreibt eine tumorspezifische Organaffinität im Metastasierungsweg, welche er auf ein jeweils passendes Zusammentreffen des *Microenvironment* des betreffenden Organs (*Soil*) und entsprechende metastatische Zellen (*seed*) zurückführt. Diese These bildete unter anderem die Grundlage für den Wandel des Metastasierungsdogmas, welcher sich in den letzten Jahren vollzogen hat (Fidler *et al.* 2002). Der Glaube an eine späte Metastasierung, zu einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, ausgehend von wenigen Tumorzell-Subpopulationen (Fidler *et al.* 1977) bei epithelialen Tumoren, insbesondere beim Mamakarzinom, scheint überholt: die Parallelität lymphatischer und systemischer Metastasierung in einem frühen Tumorstadium wurde 2004 von Pantel und Brakenhoff beschrieben (Pantel und Braakenhoff 2004). Unter anderem trugen Studien, die auf der *Tissue Microarray* Technologie beruhen und mit deren Hilfe Genexpressions Analysen angefertigt wurden dazu bei, das Modell der frühen Metastasierung aufzustellen (Pantel und Braakenhoff 2004, Ramaswamy *et al.* 2002).

Im Jahr 2002 schlussfolgerten Bernards und Weinberg aus Ergebnissen verschiedener Studien folgende drei Metastasierungsgrundsätze: (1) die Metastasierungsfähigkeit eines Tumors wird schon sehr früh in der Tumorentwicklung durch das tumoreigene „Mutationspektrum“ festgelegt, (2) es gibt keine eigenständigen mutationsdeterminierenden Gene, sondern die

tumorzellspezifische Kombination aus Onkogenen und Tumorsuppressorgenen legen das Metastasierungspotential fest und (3) es ist bereits kleinen Tumoren möglich zu metastasieren (Bernards und Weinberg 2002). Grundlage hierfür bildeten unter anderem Studien zu folgenden Hypothesen: disseminierte Tumorzellen sind im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen nachweisbar; ein Großteil aller Metastasen stimmt mit der jeweils dominanten Zellpopulation (dem Großteil der Zellmasse ausmachenden Zellen) des Primärtumors häufig phänotypisch und zumeist auch genotypisch, in Hinsicht auf ihre DNA- Genexpressionsmuster, überein (Ramaswamy *et al.* 2002, Schmidt- Kittler *et al.* 2003). Nach Analyse des Genexpressionsmusters der dominanten Zellpopulation von Mammakarzinomzellen sei es möglich das Metastasierungspotential in über 90% der Fälle vorherzusagen (Van't Veer *et al.* 2001).

Die Tumorstammzellhypothese geht noch einen Schritt weiter: es werden *cancer stem cells*, postuliert, deren Stammzellcharakter den Tumorprogress und die Metastasierung bestimmen (Shipistsin *et al.* 2008).



(Abb.2.3.1 : A metastatic model derived from disseminated tumour cell (DTC) and circulating tumour cell studies in human patients. :Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells; Klaus Pantel, Ruud H. Brakenhoff & Burkhard Brandt; *Nature Reviews Cancer* 8, 329-340, May 2008)

Im Jahre 2008 kombinierten Pantel *et al.* die Stammzellhypothese und die Idee des parallelen metastatischen Progresses (Abb. 2.3.1): Zum einen wird dargestellt, dass Zellen mit Stammzellcharakter (in der Abbildung rot dargestellt, Pfad a), also beispielsweise mit

unbegrenzter Teilungsfähigkeit und der Fähigkeit Zellen zu bilden, die unterschiedlichste Funktionen annehmen können, die Grundlage des Tumorwachstums bilden und auch in der Lage sind nach systemischer Streuung Metastasen auszubilden. Zellen die aus diesen Tumorstammzellen hervorgehen und den Stammzellcharakter verloren haben (grün in der Abbildung), sind auch nach systemischer Streuung nicht in der Lage zu metastasieren. Ein zweiter Metastasierungspfad (b) ist ebenfalls denkbar: nach Disseminierung von Brustkrebszellen (ohne Stammzellcharakter, grün) kann es zu genetische Aberrationen dieser Zellen kommen, die es den verstreuten Zellen ermöglichen erneut Tumorgewebe zu formieren (blaue Zellen in der Abbildung) (Pantel *et al.* 2008).

Insbesondere in Bezug auf Brustkrebs, dessen Metastasierungsverhalten nicht vollständig über den Lymphknotenbefall, zu prognostizieren ist- trotz *SLN* Technik-, scheint das Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen in Blut oder Knochenmark ein Hinweis auf eine hämatogene Streuung von Tumorzellen aus dem Primärtumor zu sein (Bernards und Weinberg 2002). Auch die Analyse des Primärtumors und die Einzelzellanalyse der *DTC* legen den Schluss nahe, dass die metastatische Streuung von Tumorzellen schon recht früh, zu Beginn des Tumorwachstums, stattfindet. Als Hinweis auf die Richtigkeit dieser Schlussfolgerung wird der Vergleich von Tumorzellen und Primärtumor in der nicht metastasierten und metastasierter Situation hinzugezogen: dieser zeigt, dass weniger genetische Aberrationen auf Seiten der *DTC/CTC*, die zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung detektiert werden, als bei Patienten die sich bereits im M1- Stadium der Erkrankung befinden (Schmidt- Kittler *et al.* 2003, Riethdorf *et al.* 2008, Braun *et al.* 2000).

Die Detektion dieser *DTC/CTC*, die Analyse ihres genetischen Expressionsmusters und ihres Migrations- und Wachstumsverhaltens, können somit als Ansatz begriffen werden, der Metastasierung und Tumorprogression ein tieferes Verständnis abzugewinnen- einer ursprünglicheren Deutung des Seed und Soil Konzeptes folgend.

Braun *et al.* zeigten, dass *CK* positive Zellen im Knochenmark das Rezidivrisiko bei Patientinnen mit Brustkrebs im Stadium I, II und III steigern, wobei das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen unabhängig von der Detektion disseminierter Tumorzellen zu sein scheint (Braun *et al.* 2000). Der Zytokeratinnachweis in okkulten „Mikrometastasen“ im Knochenmark gilt als verlässliches Kriterium des Tumorzellnachweises (Klein *et al.* 1999, Pantel *et al.* 1994, Cote *et al.* 1991). In einer Metaanalyse wurden insgesamt 4703 Brustkrebspatienten mit bekanntem *DTC* Status ausgewertet. Die Patienten mit nachweisbaren Tumorzellen im Knochenmark hatten nicht nur größere Tumoren, sondern auch Tumoren mit höherem histologischem *Grade*, darüber hinaus wurden diese Tumoren häufiger als Hormonrezeptor negativ klassifiziert und die betroffenen Patienten wiesen häufiger Lymphknotenmetastasen auf. In einem 10 Jahres *Follow Up* konnte gezeigt werden, dass Patienten bei denen der Nachweis von *DTC* erbracht wurde, eine schlechtere

Gesamtüberlebensrate hatten und dass das Vorhandensein dieser „Mikrometastasen“ als unabhängiger prognostischer Faktor zu werten sei (Braun *et al.* 2005, Wiedswang *et al.* 2003). In den vergangenen Jahren gab es diverse Studien zu disseminierten Tumorzellen, ihrer Bedeutung bezüglich Prognose, Tumorprogression und auch Therapiestratifizierung (Klein *et al.* 1999, Pantel *et al.* 1994, Cote *et al.* 1991, Braun *et al.* 2005, Wiedswang *et al.* 2003, Wiedswang *et al.* 2004, Pantel *et al.* 2008, Wulfin *et al.* 2006, Meng *et al.* 2004, Vincent-Salomon *et al.* 2008, Janni *et al.* 2005). Fortschritte auf der Ebene der Einzelzellanalyse ermöglichen einen immer genaueren Einblick in die Mechanismen von Tumorzell-„Dormancy“, also dem vorübergehenden Ruhen der Zellen ohne metastatische Aktivität (z. B. im Knochenmark) und der Metastasenbildung an sich (z.B. durch systemische Rezirkulation aus dem KM) (Wiedswang *et al.* 2004, Pantel *et al.* 2008). Einen Therapievorteil vermutet man derzeit im Nachweis eines positiven Her2/neu Status der *DTC*, welcher zum Teil auch dann festgestellt werden konnte, wenn der Primärtumor als Her2/neu negativ diagnostiziert wurde (Wulfing *et al.* 2006, Meng *et al.* 2004), so dass der Verdacht nahe liegt, die Her2-/neu Amplifikation könne während des Tumorprogresses stattgefunden haben (Meng *et al.* 2004). Eine Antikörpertherapie könnte nun also auch für Patienten sinnvoll sein, deren Primärtumor Her2/neu negativ ist. Eine weitere Option wäre *DTCs* als *Monitoring-Tool* für den Therapieerfolg einzusetzen (Meng *et al.* 2004, Vincent-Salomon *et al.* 2008). Es gibt Studien, die belegen, dass das Vorhandensein von „dormanten“ Tumorzellen im Knochenmark während oder nach adjuvanter Therapie mit einem Wiederauftreten der Erkrankung und einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert sind (Wiedswang *et al.* 2004, Janni *et al.* 2005). Aufgrund des Erfolges bezüglich der Nachweisbarkeit und Verwendbarkeit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark als Prognosefaktor, aber aufwendigen Gewinnung durch Knochenmarkpunktionen am Beckenkamm, wurden bald erfolgreiche Versuche unternommen Tumorzellen auch im Blut von Mammakarzinompatientinnen zu detektieren (Wiedswang *et al.* 2006).

2.4 Zirkulierende Tumorzellen und deren derzeitige Nachweisverfahren

Die Detektion von *CTC* im Blut hat, in Bezug auf Prognose, Verlauf und Therapie der Erkrankung sicherlich noch nicht den selben standardisiert- prognostischen Stellenwert erreicht, den die Detektion von *DTC* im Knochenmark innehat. Dass der *CTC* Nachweis möglich ist, nicht nur bei Patientinnen mit Brustkrebs, sondern unter anderem auch bei Patient (-innen) mit Prostatakrebs, Ovarialkarzinom, Kolonkarzinom und Lungenkrebs, wurde in diversen Studien belegt (Brugger *et al.* 1994, Allard *et al.* 2004, Racila *et al.* 1998, Ross *et al.* 1993, Fehm *et al.* 2002).

In den letzten Jahren gab es einige Ansätze welche die Detektionsraten von Blut und Knochenmark auf ihren prognostischen Erfolg verglichen- mit durchaus unterschiedlichen Ergebnissen. So haben etwa Wiedswang *et al.* 2005 festgehalten, dass die *DTC* Rate, nicht aber

die *CTC* Rate mit einer schlechteren Prognose korrelierte (n=23) (Wiedswang *et al.* 2004), Pierga *et al.* konnten 2003 den prädiktiven Wert zirkulierender Tumorzellen aufgrund der bei 114 Patientinnen gesammelten Daten ebenfalls nicht bestätigen. Im Jahre 2004 jedoch wiesen Cristofanilli *et al.* nach, dass die Anzahl zirkulierender Tumorzellen vor Therapie bei M1-Patientinnen als ein unabhängiger Prädiktor für das Gesamtüberleben der untersuchten Patientinnen (n= 177) zu werten sei (Cristofanilli *et al.* 2004) und bereits im Jahre 1996 beschrieben Mori *et al.*, dass der *CTC* Nachweis mit einem Fortschreiten der Krebserkrankung (in diesem Fall gastro- intestinale Neoplasien und Brustkrebs) einhergeht (Mori *et al.* 1996). Neben dem Nachweis der Zellen bei M1- Patientinnen wurden viele Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der Untersuchung des Blutes von Patientinnen in einem frühen Stadium der Erkrankung, beschäftigten (Mori *et al.* 1996, Müller *et al.* 2003), bzw. den Vergleich dieser beiden Patientenkollektive anstrebten.

Die teilweise inhomogenen Datenlage mag durch diverse Variablen, einige davon bekannt (wie ein unterschiedliches Studiendesign, unterschiedliche Stichproben, unterschiedliche Isolations- und Nachweismethoden etc.) und einige davon unbekannt, beeinflusst sein. Ein wichtiger, zu berücksichtigender Aspekt ist allerdings die Aufarbeitungstechnik des Blutes, Isolation der *CTC* und die darauf folgende Detektionsmethode. Da es mehrere propagierte Methoden gibt und diese Arbeit sich mit den Ergebnissen einer neuen Herangehensweise an genau diesem Punkt beschäftigt, sollen im Folgenden die geläufigsten Methoden an Beispielen vorgestellt werden:

Flow- Zytometrie/ Microfluid CTC- Chip

In den vergangenen Jahren gab es verschiedene Ansätze mit Hilfe der Flowzytometrie Tumorzellen zu detektieren oder zu isolieren; einer der interessantesten wurde 2007 von Nagrath *et al.* vorgestellt: eine Methode die auf einem so genannten „*CTC- Chip*“ beruht. Basierend auf *Microfluid-* Verfahren, war es ihnen möglich aus Vollblutproben verschiedenster Tumoren (Prostata, Pankreas, Brust und Kolon) Tumorzellen zu isolieren, ohne die Proben vorher weiter zu präparieren. Das System basiert auf einem „*Chip*“ der mit 78.000 anti-EpCam- AK behandelten Mikro -Noppen (auf 970 nm^2), die in einem Abstand von max. 50µm voneinander auf einem Array angeordnet sind, besetzt ist. Mit Hilfe einer Pumpe wird das Blut nun, mit einer festgelegten Geschwindigkeit und Flussdichte, über das Array gepumpt. Diese Methode erlaubt die Anreicherung nicht fixierter Tumorzellen (Nagrath *et al.* 2007).

Real-Time/ Quantitative PCR

In der Vergangenheit wurden verschiedene, erfolgreiche Versuche unternommen einen PCR-gestützten Tumorzellnachweis im Blut von Mammakarzinompatientinnen zu erbringen, wobei als Marker z. B. CKs, CEA, Her2 etc. dienen (Benoy *et al.* 2006, Lakiewicz 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der *CTC* Nachweis mittels RT-PCR, mit einer erhöhten Mortalitätsrate und einem schlechteren Gesamt- prognose assoziiert ist (Weigelt *et al.* 2003). In einer Vergleichsstudie von Ring *et al.* wurde gezeigt, dass im Vergleich mit einer

immunomagnetischen- und einer *Laser Scanning Zytometrie* Methode, die Detektion von Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen, die RT-PCR das sensibelste und sensitivste Werkzeug darzustellen scheint (Ring *et al.* 2005).

Insbesondere die 2008 von Molloy *et al.* vorgestellte Methode soll hier exemplarisch dargestellt werden, da einige der Patientenproben dieser Arbeit am National Cancer Institute in Amsterdam untersucht und diese Ergebnisse mit den Untersuchungsergebnissen der in dieser Arbeit angewandten Methode verglichen wurden.

Die Anreicherung der Zellen vollzieht sich zunächst über eine Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation und eine sich anschließende immunomagnetische Anreicherung der Tumorzellen mittels anti- CD326 (HEA/EpCam). Nach der mRNA Isolation und der cDNA Synthese wurde die *Real- Time PCR* zur Bestimmung einer so genannten *CTC* Signatur, gegen die Tumorzellmarker *CK-19*, *p1B*, *EGP-2*, *PS2*, *Mammaglobin* und *SBEM* durchgeführt.

pS2: Das pS2 Protein (84 AS) gehört zur Trefoil Faktor Familie (ITF), wird Östrogen kontrolliert, in Brustkrebszellen überexprimiert und scheint Östrogen-Rezeptor assoziiert zu sein (Rio *et al.* 1988). **p1B:** Ein weiteres Protein der Trefoil Faktor Familie, wird ebenfalls relativ spezifisch beim Mammakarzinom überexprimiert und genau wie ITF/ pS2 als Tumormarker empfohlen (Theisinger *et al.* 1996). **EGP-2:** ebenfalls bekannt als EpCam (GA 733-2, ESA, KSA, 17-1A) gehört, als epitheliales Glykoprotein, zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle und wird auch als Marker für Tumoren epithelialen Ursprungs verwendet (Litinov *et al.* 1994). **Mammogloblin:** ein Protein, das auch brustspezifisch exprimiert und bei Brustkrebszellen überexprimiert wird (Watson *et al.* 1996). **SBEM:** Das Small- Breast- Epithelial – Mucin gilt als brustspezifische mRNA (Miksicek *et al.* 2002).

Serienverdünnungen von aus Brustkrebsgewebe hergestellten cDNAs wurden verwendet, um Vergleichskurven für die Kontroll- und Markergene zu gewinnen.

Eine statistische, softwaregestützte Auswertung anhand eines Algorithmus kalkulierter Vergleichskurven, stellt die Grundlage für die Entscheidung dar, ob eine Probe als *CTC*- positiv gewertet wird oder nicht.

Immunocytochemie/ Cell Search→- Methode

Immunzytochemische Verfahren haben in der Regel einen oder mehrere Tumorzellanreicherungsschritte mit dem Ziel, die so genannte „*rare event detection*“ möglich zu machen. Die gängigsten Verfahren führen diesen Anreicherungsschritt entweder mit einer Dichtegradientenzentrifugation (beispielsweise über Ficoll oder OnkoQuick→) oder mit einer immunomagnetischen Zellanreicherung durch. Daran schließt sich eine immunozytochemische Visualisierung und Detektion der potentiellen *CTC* an. Die Visualisierung erfolgt über Chromogene (APAAP, DAB) oder über Immunfluoreszenz.

Da diese Arbeit unter anderem einen Vergleich zwischen dem etablierten und *FDA*-akkreditierten *CellSearch*-System durchführt, soll an dieser Stelle dieses Verfahren als Beispiel dargestellt werden:

Pro Test werden 7,5ml Blut manuell in einem Zentrifugierschritt vorbereitet und dann in das *CellTracks AutoPrep System* eingespeist. Alle folgenden Schritte werden komplett von dem System übernommen.

Zunächst findet eine immunomagnetische Anreicherung mit an kleine magnetische *Beads* (Ferrofluid) gekoppelte anti- EpCam Antikörpern statt. Im Anschluss an die durchgeführte Tumorzellselektion, der Permeabilisierung der selektierten Zellen und deren anschließender Fluoreszenzfärbung, mit gegen die Cytokeratine 8, 18 und 19 gerichteten Antikörpern (an Fluorochrome gebunden), einem gegen CD45 gerichteten Antikörper und einer mit DAPI durchgeführten Kernfärbung, wird die Probe automatisch in eine Küvette (*MagNest*®) überführt und einem starken magnetischen Feld mehrere Minuten ausgesetzt. Die immunomagnetisch gelabelten Zellen werden so an die Küvettenoberfläche gebracht und sind hier nun durch den *CellSpotter- Analyser*® detektierbar. Der *CellSpotter* ist ein halbautomatisches, computerunterstütztes Analysegerät mit integriertem Fluoreszenzmikroskop. Pro Analyse können sieben Proben plus interne Kontrolle (SKBR3- Zellen) untersucht werden (Riethdorf *et al.* 2007).

Die Kriterien die verwendet werden, um einer Zelle einen epithelialen Ursprung zuzuschreiben setzen sich aus folgendem Färbemuster zusammen: CD45 negativ, CK- positiv, DAPI- positiv (Cristofanilli *et al.* 2005), wobei sich CK- und DAPI- Färbung zu mindestens 50 % überschneiden müssen.

Cristofanilli *et al.* wiesen nach, dass die *CTC* Detektion mittels *CellSearch*- Methode als Prognostikum nutzbar ist (Cristofanilli *et al.* 2004 und 2005).

Eine von Riethdorf *et al.* 2007 publizierte Multicenter Studie bestätigt, dass dieses Verfahren nicht nur eine sehr hohe Detektionsrate ($\geq 70\%$ bei Patientinnen im metastasierten Stadium der Erkrankung hat), sondern auch im Vergleich der unterschiedlichen Studiocenter vergleichbare Ergebnisse mit hoher Sensitivität und Spezifität erzielt. Der hohe Automatisierungsgrad der Methode verspricht durch ein einheitlich geprägtes *Handling* einen geringen systemischen Fehler und zumindest während der Anreicherung und Färbung gleichwertige Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen (Riethdorf *et al.* 2007).

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse, welche auf einem Methodenvergleich zwischen *Cell Search* und der ebenfalls immunocytochemischen *Ariol*- Methode beruhen, soll im nachfolgenden Abschnitt die *Ariol*- Methode näher beschrieben werden.

2.5 Ariol -Methode

Der Ariol- Methode liegt, genau wie der *CellSearch*- Methode eine immunomagnetische Anreicherung mit anschließender Fluoreszenzfärbung gegen die CKs 8, 18 und 19 zugrunde. Die Detektionskriterien (CK⁺/ CD 45⁻/ Zellkern⁺/ Morphologie) richten sich nach den von Borgen *et al.* beschriebenen, Standards zur Evaluation immunzytochemisch gefärbter Zellen (Borgen *et al.* 1999). Die Auswertung erfolgt ebenfalls über einen halbautomatischen *Analyzer*: in diesem Fall das Ariol SL-50 (Applied Imaging/ Genetix, New Milton, GB). Die Nützlichkeit halbautomatisierter, digitaler Mikroskope hat sich bereits im Vorfeld bewiesen (Pierga *et al.* 2004, Riethdorf *et al.* 2007). Neben technischen Abweichungen und einem unterschiedlichen „Automatisierungsgrad“ der Methoden (Anreicherung und Färbung werden in diesem Fall manuell vorgenommen; Vgl. 3.3.1) ist der vordergründigste Unterschied, dessen Auswirkungen in dieser Arbeit im Speziellen untersucht werden sollen, die Verwendung eines zusätzlichen *Catcher*- Antikörpers zur Tumorzellanreicherung. Die immunomagnetischen Anreicherung erfolgt zum einen mit einem an magnetische *Beads* („Perlen“) gekoppelten anti- *EpCam*-Antikörper (Clone HEA-125), welcher gegen CD326 gerichtet ist, ein 40 kDa Transmembranglycoprotein, welches in die Zelladhäsion involviert ist. CD326 ist ebenfalls bekannt als EpCAM, *epithelial-specific antigen* (ESA) und als *human epithelial antigen* (HEA). Das CD326 Antigen ist übergreifend auf der basolateralen Oberfläche von Karzinom- und epithelialen Zellen, aber in der Regel nicht auf Melanom-, Neuroblastom-, Sarkom-, Lymphom- oder Leukämiezellen, sowie normalen Fibroblasten zu finden. Zum anderen wird im hier verwendeten Protokoll mit magnetisch gelabelten Antikörpern gegen die Cytokeratine 7 und 8 angereichert (Clone: CAM5.2. Isotype: IgG2a2).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben erfolgreich eine immunomagnetische Tumorzellanreicherung mit Antikörpern gegen epitheliale Oberflächenantigene (Naume *et al.* 1997, Tibbe *et al.* 2002, Hu *et al.* 2003) im Feld der „*rare event detection*“ durchgeführt.

Deng *et al.* veröffentlichten im Jahre 2008 eine Studie an 49 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, die aufzeigt, dass ein derartiges Vorgehen im Anreicherungsschritt die Detektionsrate, gegenüber der alleinigen Anreicherung mit anti- *EpCam* Antikörpern, signifikant steigert. Die Arbeitsgruppe begründet diesen Vorteil mit der Möglichkeit, dass neben den CK⁺/EpCam⁺ Zellen auch Zellen detektiert werden können die CK⁺/EpCam^{-low} bzw. CK^{low}/ EpCam⁺ (Deng *et al.*2008) sind.



Abb: 2.5.1: *CTC* Enrichment Strategy; Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF: Enrichment with Anti-Cytokeratin Antibodies Significantly Increases the Sensitivity for Circulating Tumor Cell Detection in metastatic Breast Cancer Patients; Breast Cancer Research 2008, 10;

Ziel der Arbeit soll es nun sein die Ergebnisse von Deng *et al.* (2008) zu validieren und sie darüber hinaus auf weitere Mammakarzinom Patientinnen zu übertragen. Ziel ist es die beschriebene Methode, von nun an Ariol- Methode genannt, mit der bereits etablierten *CellSearch*- Methode, im metastasierten und im nicht metastasierten *Setting* zu vergleichen. Klinisch- pathologische Parameter sollen mit dem Vorhandensein von *CTC* in peripherem Blut korreliert werden. Eine Herausforderung stellen hierbei die zu erwartenden geringeren *CTC*- Detektionsraten bei M0- Patientinnen dar.

Zusätzlich soll der Versuch unternommen werden, systematisch die Detektionsraten bei Patientinnen vor und nach der Primäroperation zu untersuchen. Die bis jetzt vorhandene Literatur zu postoperativem Tumorzell- „*Shedding*“, der *CTC* Freisetzung in die Blutbahn, macht oft sehr widersprüchliche Angaben zu diesem Aspekt. Versuche bei anderen epithelialen Tumoren den Nachweis zu erbringen, operative Manipulation würde Tumorzellen in den Blutkreislauf streuen, ergaben zum einen positive Aussagen, wie zum Beispiel die 2004 erschienene Publikation von Rolle *et al.* belegt: ein Anstieg zirkulierender epithelialer Zellen post- OP sei ein Prädiktor für ein Wiederauftreten von nicht kleinzelligem Lungenkrebs (Rolle *et al.*2004); zum anderen gab es Veröffentlichungen mit verhalteneren Aussagen (Swabata *et al.*2007) zum Thema des *CTC*- *Sheddings* beim Bronchialkarzinom.

Versuche in einem prä/ postoperativen *Setting* beim Prostatakarzinom ergaben ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse- einige Studien konnten keine Korrelation von Tumorzellanstieg und chirurgischer Manipulation feststellen (Davis *et al.* 2008), andere konnten festhalten, dass es nach Feinnadelbiosie bzw. radikaler Prostatektomie zunächst zu einem *CTC*- Anstieg kommt (Polascik *et al.* 1999).

In Bezug auf Brustkrebs gibt es eine Reihe ebenfalls widersprüchlicher Publikationen so konnten Camara *et al.* sehr wohl einen Zusammenhang zwischen Operation und *CTC* Anstieg ausmachen (Camara *et al.* 2006), wohingegen Banys *et al.* keinen Zusammenhang präsentieren konnten (Banys *et al.* 2008). Inwieweit eine etwaiges *Shedding* der Tumorzellen einer mechanischen Loslösung oder eher einer, beispielweise Zytokin vermittelten Stressreaktion entspricht, ist nicht geklärt (Weckermann *et al.* 2009, Retsky *et al.* 2008).

Die systematische Untersuchung von Proben die prä- bzw. postoperativ zu einem einheitlichen Zeitpunkt entnommen wurden (anvisiertes Zeitfester 24 Stunden), soll zumindest über die primäre Frage Aufschluss geben: Erhöht sich die Anzahl der detektierbaren Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom durch die Manipulation oder sinkt sie beispielsweise durch die Entfernung der Quelle der *CTC*?

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

Die Blutentnahmen wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Alle Patientinnen wurden über die Blutentnahme und etwaige Verwendung anonymisierter Patientendaten, sowie deren Nutzen für die Forschung aufgeklärt und haben schriftlich eingewilligt an den Untersuchungen teilzunehmen.

Zwischen April 2008 und Juli 2009 wurden insgesamt 101 Proben von 77 Patientinnen (hierbei handelt es sich um ausschließlich weibliche Studienteilnehmerinnen) von ca. 7,5 bis 20 ml Blut mit Hilfe des *CellSave* Blutentnahme Sets von Immunicon (New Jersey, USA) in der gynäkologischen Tagesklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf abgenommen. Zur Verhinderung epithelialer Zellanteile in der Probe, wurden die ersten ml nach Nadelstich nicht für unsere Untersuchungen verwendet.

Gruppe 1: Insgesamt wurden 56 Proben von 32 Patientinnen entnommen. Alle Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Probenentnahme (BE) bekannte (Fern-) Metastasen. Bei allen Patientinnen aus diesem Kollektiv wurde bereits vor BE eine operative und/ oder adjuvante Chemo- bzw. Strahlentherapie durchgeführt.

Gruppe 2a: 45 Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Stadium M0, also ohne bekannte (Fern-) Metastasen und waren noch nicht operiert.

Gruppe 2b: Von 41 Patientinnen des vorangegangenen Kollektivs konnten zusätzlich nach der Operation Proben entnommen werden, wobei in diesem Fall eine Blutentnahme nach 24 bis 48 Stunden angestrebt wurde, aber in Einzelfällen auch bis zu 21 Tage post- OP stattfand.

Gruppe 3: Die Kontrollgruppe besteht aus 18 gesunden Personen, die über den Zweck der Blutentnahme unterrichtet wurden und ihr zustimmten. Diese Proben dienen der Kontrolle und Überprüfung der Spezifität der angewandten Methoden. Für alle Teilnehmer der Kontrollgruppe gilt, dass keine Tumorerkrankungen im Vorfeld bestanden oder zum Zeitpunkt der Blutentnahme bekannt waren.

3.2 Anfertigung von Kontrollobjektträgern mit Zelllinien (3T3/ MCF-7) und Kontrollobjektträgern mit MCF-7 gespiktem Blut

I. Zellkultur

Die Brustkrebszelllinie MCF-7 (ATCC-Nr: HTB-22□) und die Mausfibroblastenzelllinie 3T3 wurden in DMEM Medium (+4,5g/L Glucose, +11g/L Natrium Pyruvat, -L-Glutamin) (Invitrogen, Carlsbad, USA) unter Zusatz von 200mM Glutamin (Invitrogen, Carlsbad, USA) und 10% Total Calf Serum (FCS) von PAA (Pasching, Austria) versetzt. Die Zellen wurden in 25cm² oder 75cm² Zellkulturflaschen (Thermo Fisher, Waltham, USA), im Brutschrank (Hera Cell Save 150, Thermo Fisher, Waltham, USA) bei 37°C und 10% -iger CO₂ Atmosphäre bebrütet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage bis zur Konfluenz. Zur Passagierung der Zellen wurde unter sterilen Bedingungen das alte Medium aus der Flasche pipettiert und der Zellrasen mit DPBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) gespült. Danach wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst indem, je nach Flaschengröße, 1 bzw. 2 ml Trypsin-EDTA (rein) (Invitrogen, Carlsbad, USA) in die Flasche pipettiert und für max. 3 min. bei 37°C inkubiert wurden. Das Trypsin wurde durch zupipettieren von 5 bzw. 10 ml Medium inaktiviert, die Zellsuspension in ein 50ml Falcon Tube (Corning, Lowell, USA) pipettiert und für 3 min bei 1200/min zentrifugiert (Rotofix 32, Hettich, Tuttlingen, Germany). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in Medium resuspendiert und neu ausgesät oder in DPBS zur Anfertigung der Objektträger weiterverwendet.

II. Mykoplasmentest der verwendeten Zelllinien

Zur Detektion einer möglichen Infektion aller Zelllinien in Kultur wurde Medium aus der Zellkulturflasche entnommen und mit einem PCR- basierten Verfahren auf das Vorhandensein von Mycoplasmen untersucht. Hierzu wurde das MycoTrace, Mycoplasma PCR Detection Kit (Cat.No: Q050-020) mit dazugehörigem Protokoll von PAA (Pasching, Austria) verwendet. 1ml Mediumüberstand wurde aus den Zellkulturflaschen entnommen, zentrifugiert, das entstandene Zellpellet wurde in sterilem Wasser resuspendiert und für 3 min auf 95° erhitzt. Der Mastermix für die PCR beinhaltet, neben der aufbereiteten Probe, unter anderem den MycoTrace Primer Mix, Taq Polymerase, Puffer und Wasser.

Nach 37 Zyklen im PCR Cycler wurde dann mit dem amplifizierten Material eine Gelelektrophorese in 2% Agarose Gel durchgeführt. Positive Banden bei 500bp wurden als Hinweis auf eine Mycoplasmeninfektion angesehen.

III. Anfertigung der Objektträger

Der in Schritt I. hergestellten Zellsuspension wurden zunächst 50ul entnommen und mit 50ul Trypan Blau (Trypan Blue Solution 0,4%, Sigma, St. Louis, USA) versetzt. Die so angefärbten Zellen wurden dann in einer Neubauer Zählkammer (Labor Optik, Friedrichsdorf, Germany) gezählt und gegebenenfalls mit DPBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) verdünnt bis sich eine Lösung herstellen ließ, aus der sich mindestens 1000ul entnehmen ließen die maximal 500

MCF-7 Zellen und mindestens 700.000 3T3- Zellen für die Kontrollen enthielten. Für das gespikete Blut musste die Zellsuspension verdünnt werden, bis die gewünschte Zellanzahl (10, 50 oder 500) Zellen in mindestens 100ul DPBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) enthalten waren. Die entsprechende Menge der verdünnten Lösung wurde im Falle der reinen Zelllinien-Kontrollen direkt in die Zytospin- Kammern (Durchmesser 8,7mm, Hettich, Tuttlingen, Germany) und im Falle des zu spikenden Blutes direkt in das in ein 50 ml Falcon Tube (Corning, Lowell, USA) überführte Blut pipettiert. Das Blut wurde im Anschluß nach Protokoll aufgearbeitet (siehe 3.3.1). Die Zytospin- Kammern wurden für 3min bei 1200/min zentrifugiert (Rotofix 32, Hettich, Tuttlingen, Germany) und anschließend bis zur Benutzung über Nacht getrocknet. Die Kontrollen wurden im Anschluss direkt verwendet oder bei -80°C eingelagert.

3.3 Protokolle

3.3.1 Zellanreicherung mit der *CTC*- Methode

I. Erythrozytenlyse

Das entnommene Blut (bis zu 10 ml) wurde im Verhältnis 1:5 mit Lysepuffer (Genetix *CTC* Kit Cat- No: A1000, New Milton, GB) versetzt, 3-5mal invertiert und bis zu 10 min auf einem Rotator mit dem Puffer inkubiert, bis das Gemisch in den verwendeten 50ml Falcon Tubes eine kirschrote, durchscheinende Farbe entwickelte. Die Falcon Tubes wurden dann mit 700xg (1800- 2000/min) für 10 min zentrifugiert (Multifuge 3 SR/ Thermo- Fisher, Waltham, USA). Der Überstand wurde dekantiert und das zurückbleibende Pellet in Dilution Buffer (Miltenyi, Cell Enrichment and Detection Kit, Bestell- Nr: 130-060-101; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) gelöst, indem das Tube mehrfach kräftig über eine raue Oberfläche gezogen wurde.

II. Zellanreicherung

Zum gelösten Pellet wurden nun 100ul FcR blocking reagent (Miltenyi Cell Enrichment and Detection Kit, Bergisch Gladbach, Germany) pipettiert, um unspezifischen Antikörper (AK)-bindungen entgegenzuwirken. Als nächstes wurden 100ul Permeabilisierungspuffer (Genetix *CTC* Enrichment Kit, A1000 New Milton, GB) zugeführt, um die Zellmembranen für die nachfolgenden Reagenzien durchlässiger zu machen.

Es folgten 60ul Fixierungspuffer (Genetix, *CTC* Kit) und schließlich wurden jeweils 100ul MACS Anti- Cytokeratin (gegen CK 7 und 8) bzw. MACS Anti- *EpCam* Microbeads (Miltenyi, Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit/ Miltenyi Anti- *EpCam* Antikörper Bestell- Nr: 130-061-101) hinzugefügt. Nach jedem der vorangegangenen Schritte musste die Zellsuspension mit dem Vortexgerät (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA) gemischt werden. Das Gemisch wurde dann 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, alle 10 min musste gevortext werden.

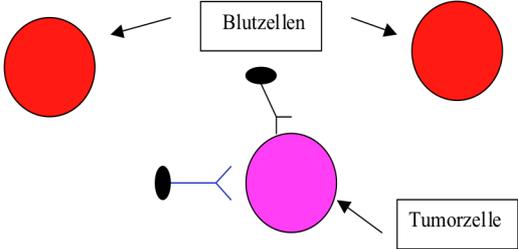
Im Anschluss wurde das Gemisch mit Dilution Buffer (Cell Enrichment and Detection Kit, Miltenyi Biotech, Bergisch- Gladbach, Germany) auf 10 ml aufgefüllt und erneut bei nun 300xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 1 ml Dilution Buffer resuspendiert.

Der nächste Schritt diente magnetischen Separation der an AK gebundenen potentiellen Tumorzellen von den regulären Zellen des Blutes: Aufbau der Magnetsäulen: für jede Patientenprobe wurde eine Säule (MACS Separation Columns, Miltenyi Biotech, Bergisch- Gladbach, German) in den Magnetständer (OctoMACS, Miltenyi Biotech, Bergisch- Gladbach, Germany) eingehängt und mit 500ul Dilutionbuffer (DB) equilibriert. Als nächstes wurde die gesamte Patientenprobe (insgesamt 1ml in DB) auf die Säule gegeben. Nach der Passage durch die Säule wurde diese 2 Mal mit jeweils 500ul DB gespült. Bei diesem Schritt war im Besonderen darauf zu achten, dass die Säule nicht austrocknete und immer ein Flüssigkeitsspiegel auf der Säule stehen blieb.

Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und in einen Ständer eingehängt, so dass das Eluat direkt in die Zytospinkammer, die auf ein PLL- beschichtetes Objektträger (Sigma- Aldrich) montiert wurde, tropfen konnte. Mit 2x 500ul werden die Zellen aus der Magnetsäule eluiert.

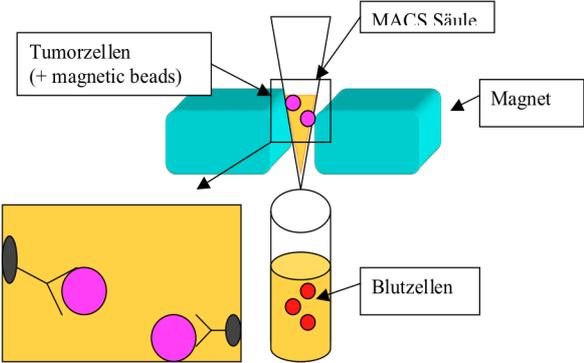
Abb 3.3.1.1:

1. Schritt



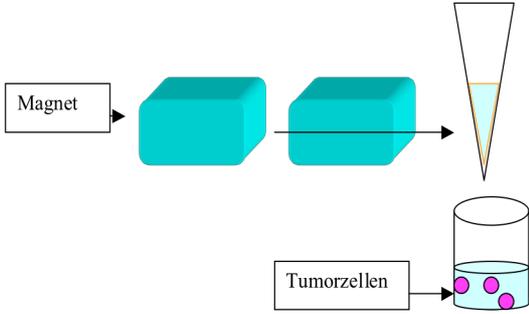
Immunomagnetische Antikörper gegen Zytokeratine und gegen EpCam binden an die Tumorzellen

2. Schritt



Positive Selektion der Tumorzellen mittels magnet- gelabelten Antikörpern

2. Schritt



Auswaschen der Tumorzellen aus der Magnetsäule

Abb 3.3.1.1: Tumorzellenanreicherung mittels immunomagnetischer Methode: nach: Hajkova P (2003) Epigenetic reprogramming in mouse germ cells, rer. nat Dissertation. Max- Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin- Dahlem (Fig 10: Scheme of the Magnetic Bead- Based Cell Separation)

III Zellfixierung

Mit 800 Umdrehungen/min (rpm) wurde das Eluat in der Zentrifuge (Hettich) auf die Objektträger (Sigma-Aldrich) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne mit der Pipettenspitze den OT zu berühren, abpipettiert und verworfen. Die OT wurden nun erneut bei 1000 rpm zentrifugiert. Im Anschluß wurden sie entweder 24h bei RT oder für 60 min auf einer Heizplatte (Fisher) getrocknet.

3.3.2 Färbung

Zunächst wurden die bei der Zellanreicherung hergestellten OT bei -20°C für 10 min in Aceton fixiert und anschließend bei RT getrocknet.

Die OTs wurden dann in 1x Wash Buffer (Genetix *CTC* Detection Kit) 2 mal für 3min gewaschen und danach in einer Dunkelfärbekammer mit 1 Tropfen Image iT Signal Enhancer (Invitrogen) für 30 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (3min) mit 1x Wash Buffer wurde das Antikörpergemisch auf jeden OT pipettiert: 50ul mouse anti-human CK 8/18/19, direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC [grün] konjugiert, 10 ul mouse anti- human CD45- direkt mit Dylight 547 [rot] konjugiert und 140ul 1x Wash Buffer aufgetragen und für 45 min inkubiert.

Die OT wurden für 5 min mit 1x Wash Buffer gewaschen und die Zellen anschließend mit einer Hämatoxylin- Mischung (1:2 Verdünnung von Hämatoxylin und 1x Brightfield Stainig Solution, Genetix *CTC* Detection Kit) gegengefärbt, um sie im Durchlichtmikroskop sichtbar zu machen.

Nach diesem Schritt wurden die OTs insgesamt dreimal mit Leitungswasser gewaschen und letztlich in einer wassergefüllten Färbeküvette im Wasserbad (Mettler) bei 37°C aufbewahrt bis sie alle mit einem Tropfen Dapi Mounting Medium (Vecta Shield) und einem Deckgläschen versorgt werden konnten. Das Deckgläschen wurde dann mit einem dünnen Rahmen aus Nagellack versiegelt und 30 bis 60 min ruhen gelassen

3.4 *CTC* Screening

Hardware

Zur Auswertung der *Slides* wurde das Ariol SL-50 (Applied Imaging/ A Genetix Company, New Milton, GB) verwendet. Dieser *Analyzer* besteht aus einem semi- automatischen Mikroskop- Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie sind möglich, integrierter Kamera, externem *Slide Loader* (maximales Fassungsvermögen 50 Objektträger) und einem als Steuerungs- und Auswertungseinheit fungierenden Computer.

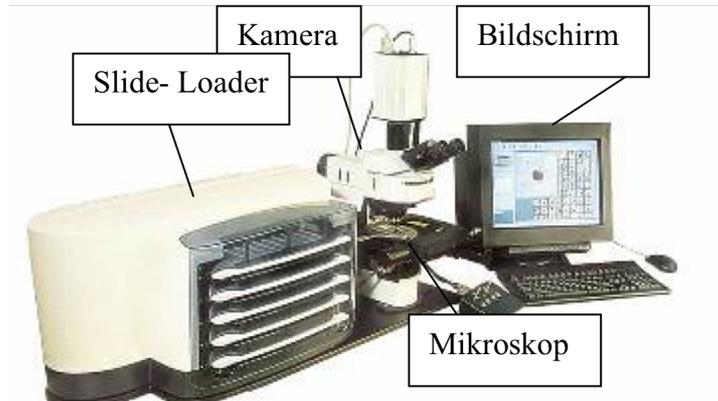


Abb.3.4.1: Ariol SL-50
www.gene-lab.com/gpc/ceg_hrpc_img/hrpc_SL50.jpg

Software

Ein von Applied Imaging (Genetix, San Jose, USA) entworfenes Programm ist das zentrale Steuerungsprogramm für die Datenverarbeitung vor und nach dem *Scan*. Zum einen wird durch die *Entry*- Funktion für jede Studie/ Patienten/ Slide die spätere Zuordnung von Bildmaterial und Patient ermöglicht, zum anderen wird mit dieser Funktion älteres Material archiviert.

Die *Scan*- Funktion dient dem manuellen Kalibrieren der Slides und dem vollautomatischen Scannen nach den vorher festgelegten Parametern.

In der *Review*- Funktion werden alle fraglichen Ereignisse präsentiert, sortiert und klassifiziert (Bsp: Klasse 1: *negative* Klasse 2: *TC*, Klasse 3: *Cluster of 2* etc.)

Des Weiteren ist es möglich mit dieser Anwendung Fotoaufnahmen der *CTC* zu machen.

Einlesen der Objektträger

Zunächst werden die Objektträger mit Hilfe der *Entry*- Funktion eingelesen und einem Barcode fest zugeordnet, dies soll etwaigen Verwechslungen vorbeugen. Danach werden sie im *Slide-Loader* verstaut. In diesem Gerät werden die *Barcodes* der Objektträger erfasst und an den Computer übermittelt. In einem Auswahlmenü sind nun die im *Loader* vorhandenen OTs für das Kalibrieren präsentiert.

Kalibrierung

Jeder OT wird einzeln über die *Scan*- Applikation des Ariols ausgewählt und automatisch vom *Slide- Loader* auf den Mikroskoptisch überführt. Ein *Tool* des *Scan*- Programmes ist der *Calibration Wizard*, ein kleines Unterprogramm, welches die Kalibrierung erleichtern soll.

Für jeden OT werden einzeln die Parameter *Gain* (Fluoreszenzsensibilität) *Offset* (Leuchtkraftschwellenwert) und *Exposure* (Belichtungszeit) festgelegt, um die Detektionsschwelle des *Scans* individuell festzulegen. Im Besonderen wurde darauf geachtet, die Sensibilität des Gerätes für die Cytokeratin-Detektion möglichst hoch zu halten (FITC-grün), aber einen zu hellen Hintergrund zu unterdrücken. Das Programm erlaubt es alle

Objektträger nach demselben Kalibrierungsmuster zu scannen oder auch das Kalibrieren automatisch nach einem bestimmten Algorithmus ablaufen zu lassen. Bei dieser Arbeit wurde auf diese Möglichkeiten verzichtet, jeder Objektträger wurde einzeln manuell kalibriert.

Scan

Dieser Schritt erfolgt automatisiert. Zunächst werden zehn nach einem Zufallsprinzip ausgewählte Fixpunkte im eingestellten Scanbereich des Ariols aufgesucht und fokussiert. Alle Kanäle (3x Fluoreszenz- und 1x Durchlicht) werden auf ihre ideale Scanhöhe hin überprüft, welche danach automatisch festgelegt wird.

Im zweiten Schritt wird der Scanbereich automatisch in 564 *Frames* unterteilt. Jeder *Frame* des Scanbereichs, also jedes virtuelle Abbild eines Objektträgerabschnitts, wird nun durch drei unterschiedliche Fluoreszenzfilter (DAPI/FITC/TXRED) mit 10x Vergrößerung abgelichtet. Die entstehende Datenmenge wird computergesteuert, je nach Lokalisation sortiert, abgeglichen und gespeichert, so dass letztendlich für jedes Scanareal des OTs ein Bild existiert, das sich aus den drei Fluoreszenz-Einzelfarben, die nacheinander aufgenommen wurden, zusammensetzt: dieses Komposit- Image bildet die spätere Auswertungsgrundlage.

In einem dritten Schritt werden alle *Frames* durchlichtmikroskopisch abgelichtet.

Für jede frei wählbare Lokalisation auf dem OT gibt es nun die Möglichkeit fünf Aufnahmen anzusehen: drei davon entstehen durch die Ablichtung des Areals mit den Fluoreszenzfiltern (grün: CK, rot: CD 45; blau: Zellkern), eins durch eine im Anschluss angefertigte Durchlichtaufnahme und die fünfte Aufnahme ist das Komposit- Bild: also die Möglichkeit die Fluoreszenzbilder virtuell übereinander zu legen, um das Gesamtfärbemuster zu beurteilen. Jedes Komposit- Bild entspricht nun einem Abschnitt auf dem Objektträger. Dieses virtuelle Abbild des Objektträgerabschnitts wird *Frame* genannt. Ein virtueller Objektträger setzt sich also aus den entsprechenden *Frames* zusammen, deren jeweilige Position auf dem OT jederzeit nachzuvollziehen ist. Eine Gesamtansicht des OTs ist ebenfalls möglich.

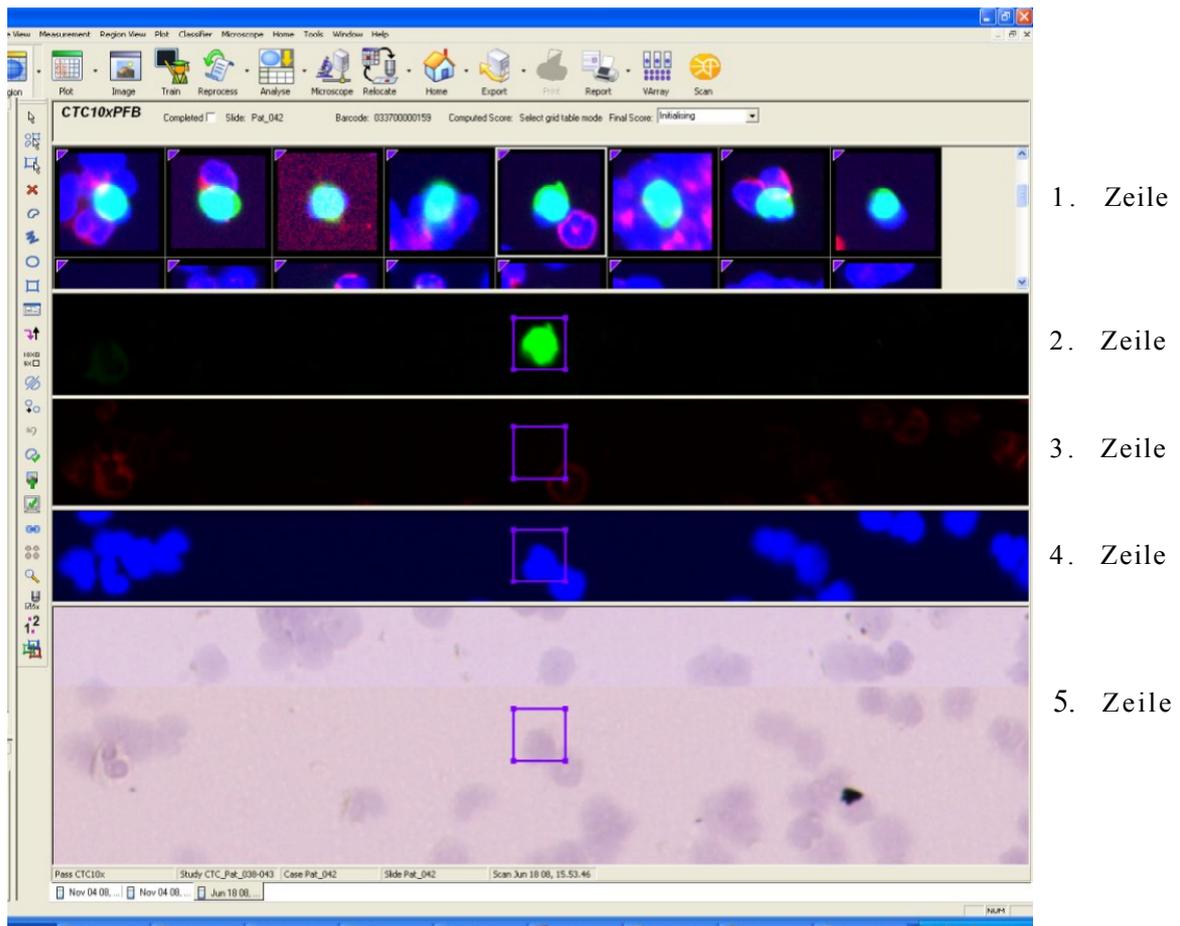


Abb.3.4.2: Screenshot Review Ansicht, Applied Imaging/Genetix:

1. Zeile: Komposit Bild; positive Zelle, 2. Zeile: FITC- Aufnahme (positiv, Zytokeratinfärbung), 3. Zeile: Tx-Red- Aufnahme (negativ, kein CD45 angefärbt), 4. Zeile DAPI- Aufnahme (positiv, Zellkern vorhanden) 5. Zeile: Durchlichtmikroskopie-Bild (unauffällige Zellmorphologie), links: Navigationsleiste

3.5 Auswertung des Scans

Virtuell

Die Auswertung der Einzelbilder erfolgte zunächst am Computerbildschirm mit Hilfe der zum Mikroskop zugehörigen Auswertungssoftware von Applied Imaging (Genetix, San Jose, USA) im Vorfeld als *Review* Funktion beschrieben. Präsentiert wurden alle Bilder die eine Färbung durch den FITC- gelabeltem AK zeigen. Der computergestützte *Scan* beinhaltet die Vorsortierung der Bilder in 2 Kategorien: Kategorie 1: mögliche Tumorzellen (also DAPI Färbung positiv, FITC Färbung positiv, aber keine Signale im TxRed Bild) und Kategorie 2: keine Tumorzellen (Signale in allen drei Fluoreszenzkanälen), hierzu verwendet das Programm das Komposit- Image.

Entlang dieser Sortierung wurden nun die Bilder von Interesse manuell separiert, individuell klassifiziert und in weitere Unterkategorien unterteilt. Zusätzlich zu den Fluoreszenzkanälen kommt in diesem Schritt auch die Bildgebung durch das Durchlichtmikroskop zum Tragen.

Manuell

Nach Durchsicht der Bilder am Bildschirm wurden verschiedene Lokalisationen auf dem virtuellen Abbild des OT ausgewählt und automatisch von dem Mikroskop direkt auf dem realen OT angefahren, so dass mit Hilfe des externen Mikroskops (Abb 3) die reale Begutachtung und Beurteilung der fraglichen Zellen vorgenommen werden konnte. Die Entscheidung, ob eine Zelle als potentielle Tumorzelle zu werten ist, wurde erst getroffen, nachdem zwei geschulte Gutachter unabhängig voneinander von der Erfüllung der Kriterien bezüglich der Fluoreszenzverteilung überzeugt waren

3.6 Vorbereitung der quantitativen Multimarker- Real Time PCR

Zum Vergleich der Methoden, die auf einer immunomagnetischen Technik basieren (Ariol- und *CellSearch*- Methode), wurde von der Arbeitsgruppe um Tim Molloy am Netherlands Cancer Institute in Amsterdam eine q- RT PCR gegen die Tumormarker SBEM, PS2, EGP2, Mammaglobin und p1B durchgeführt. Einer Subgruppe des M1 Patientinnenkollektivs wurde also zusätzlich ein Ficoll -Vacutainer Röhrchen entnommen.

Nach Entnahme wurden diese bei 1500g für 20 min in einer Rotofix Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany) zentrifugiert, zusätzlich mit Parafilm verschlossen und per Kurier in die Niederlande zur weiteren Verarbeitung gebracht.

3.7 Statistik

Zur näheren Beschreibung des Patientenkollektivs wurde, soweit eruiert, das Durchschnittsalter ermittelt, darüber hinaus wurde eine Aufteilung in einzelne Patientinnensubgruppen nach TNM- Klassifikationskriterien vorgenommen, diese wurden dann mittels Chi- Quadrat Test mit den Untersuchungsergebnissen verglichen. Darüber hinaus wurde der Chi Quadrat Test verwendet, um die Korrelation zwischen den beiden angewandten Methoden (Ariol- Methode/ *CellSearch*- Methode) zu bestimmen, Kappa diene hierbei als Maß für die Zufälligkeit dieser Beobachtung. Der Wilcoxon Test und das Poisson- Regressions Model dienten dem Vergleich zwischen den absoluten Zellzahlen. Der t- Test wurde in dieser Arbeit verwandt, um die unterschiedlichen Detektionsraten, der beiden angewandten Methoden auf ihre Übereinstimmung hin zu untersuchen, um dies zu untermauern wurde zusätzlich der McNemar Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde für alle verwendeten Tests auf $< 0,05$ festgelegt. Damit eine Beobachtung von einem Kappa- Wert als nicht zufällig eingestuft wird, muss der Kappa- Wert $\geq 0,4$ sein. Alle Berechnungen wurden mit SPSS 15.0 für Windows (SPSS Inc.-1999) und STATA 9.0 Windows (StataCorp LP 2005) angefertigt mit Hilfe von Dr. C. Eulenburg vom Institut für medizinische Statistik und Biometrie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

4. Ergebnisse

4.1 Validierung der Methode

Spiking Experimente mit MCF7 und SKBR3 Zelllinien im Blut gesunder Probanden

Tabelle 4.1.1 Übersicht Spikingexperimente

Versuch Nr.	Zelllinie	Zellzahl	Ariol	Wiederfindungsrate(%)
1	MCF7	401	193	48
1b	MCF7		182	45
1c	MCF7		347	86
2	MCF7	486	485	99
2b	MCF7		407	84
3	MCF7	137	134	97
4	MCF7	19	13	68
5	MCF7	48	31	64
5b	MCF7		42	88
6	MCF7	19	13	68
6b	MCF7		17	89
7	MCF7	18	13	72
7b	MCF7		12	66
8	MCF7	7	7	100
8b	MCF7		7	100
9	SKBR3	306	362	85
10	SKBR3	74	66	89
Mittelwert				79
Median				85

Zur Anfertigung eines Kontrollslides wurde die gleiche Menge Zellsuspension (in PBS gelöste MCF-7 bzw. SKBR-3 Zellen) auf einen *Slide* aufgebracht, die letztlich auch für den Spikingversuch ins Blut gegeben wurde. Im Folgenden wurden diese Slides genauso behandelt und gefärbt wie die regulären Slides und die Zellzahl mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die so ermittelte Zellzahl diente als Referenzwert für die tatsächlich gespikete Anzahl der Zellen im gespikten Blut. Die Wiederfindungsrate wird in Prozent angegeben und errechnet sich wie folgt: $(\text{Anzahl MCF-7 gespiked} / \text{Anzahl MCF-7 Kontrollslide}) \times 100$ (Tabelle 4.1.1). Die jeweilige Versuchsnummer (1, 2, 3...) entspricht jeweils einem Spikingexperiment, die Buchstaben (a, b, c...) dienen dazu zwei unterschiedliche Blutproben voneinander abzugrenzen, denen aber das gleiche Volumen Zellsuspension zugeführt wurde (innerhalb eines Versuchs). Versuch 1 diente dazu die Methode zu erlernen. Die Wiederfindungsrate liegt bei diesem Versuch zwischen 48% und 86 %. Innerhalb des Experiments wurden in den unterschiedlichen Proben teils stark differierende Werte ermittelt.

Die nachfolgenden Ergebnisse sind homogener innerhalb eines Experimentes (Bsp: 2a, b, c) und zeigen insgesamt eine höhere Wiederfindungsrate. Im Mittel (inklusive Versuch Nr.1) werden 79% der zu erwartenden Zellen nach Anwendung der Ariol -Methode wiedergefunden (Median 85%).

Kontrollen

Die Probanden der Kontrollgruppe sind sowohl männlich als auch weiblich. Bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme war bei keinem der Freiwilligen eine neoplastische Erkrankung oder Krebsvorerkrankung bekannt. Weder die Ariol- noch die *CellSearch*- Methode hat am gesunden Probanden Tumorzellen nachweisen können (Tabellen 4.1.2 und 4.1.3).

Tabelle 4.1.2 Methodenvergleich (Ariol/ *CellSearch*) am gesunde Probanden

n=10	Ariol	<i>CellSearch</i>
positiv	0	0

Tabelle 4.1.3 Methodenvergleich (Ariol/*CellSearch*/ MM- Q- PCR)

n= 8	Ariol	<i>CellSearch</i>	MM-Q -PCR
positiv	0	0	0

Zur weiteren Validierung der Ariol- Methode wurden die Ergebnisse für Teile der Patientenkollektive M1 und M0 (prä- und postoperativ) mit den Ergebnissen, die mit der *FDA*-akkreditierten *CellSearch*- Methode gewonnen wurden, verglichen (siehe 4.2- 4.4).

4.2 Methodenvergleich im M1 Patientinnenkollektiv

Stichprobenbeschreibung

Insgesamt wurden 56 Proben von 32 Patientinnen im Stadium M1 untersucht, davon 28 im Vergleich mit der *CellSearch*- Methode. Vier Blutproben konnten von dem *CellSearch* Gerät nicht bearbeitet werden bzw. wurden fehlerhaft bearbeitet (Ariol Daten sind vorhanden) und wurden deshalb aus dem Vergleich ausgeschlossen. Das Durchschnittsalter dieses Patientinnenkollektivs liegt bei 55 Jahren. Tabelle 4.2.1 beschreibt die Patientienstichprobe hinsichtlich klinisch- pathologischer Parameter. Die häufigste Tumorart ist das duktales Mamakarzinom (63% aller Patientinnen). Bei dem überwiegenden Anteil aller Patientinnen wurden Tumoren der Größe pT2 gefunden (53%), bei 56% waren bereits die umgebenden Lymphknoten mitbefallen. Bei 53% aller Patientinnen wurde ein mittleres Tumorigradung (Grade 2) festgestellt. Dreiviertel der Patientinnen hatten Hormonrezeptor positive Tumoren (75%). Der Her2/ Neu- Status wurde bei 59% der Patientinnen als negativ bestimmt.

Tabelle 4.2.1 Darstellung aller Patientinnen des M1 Kollektivs

	Anzahl Pat.(%)	Anzahl pos Ariol(%)	Anzahl pos <i>CellSearch</i> (%)
Alle	32/ 28	17 von 32 (53)	14 von 28* (50%)
Alter (Mittelwert)	55	56	53
Art des Tumors			
duktal	20 (63)	9 (52)	8 (57)
lobulär	8 (25)	5 (30)	4 (29)
tubulär	2 (6)	2 (12)	1 (7)
unbekannt	2 (6)	1 (6)	1 (7)
Tumorstadium			
T1	7 (22)	5 (29)	3 (21)
T2	17 (53)	8 (47)	7 (50)
T3	3 (9)	3 (24)	3 (29)
unbekannt	5 (16)	0	0
Nodalstatus			
pos	18 (56)	4 (24)	1 (7)
neg	9 (28)	10 (59)	10 (72)
unbekannt	5 (16)	3 (17)	3 (21)
Grade			
1	2 (6)	1 (6)	1 (7)
2	17 (53)	7 (41)	6 (43)
3	10 (31)	6 (35)	5 (36)
unbekannt	3 (9)	3 (18)	2 (14)
ER/PR**			
pos	24 (75)	13 (76)	11 (79)
neg	6 (19)	3 (18)	2 (14)
unbekannt	2 (6)	1 (6)	1 (7)
Her2			
pos	19 (59)	11 (64)	9 (64)
neg	9 (28)	4 (24)	3 (22)
unbekannt	4 (13)	2 (12)	2 (14)
	* 28 Patientinnen im Vergleich mit <i>CellSearch</i>		** ER und/oder PR pos

Vergleich der Detektionsraten

Tabelle 4.2.2 stellt alle positiv getesteten Patientinnen aus dem M1 Kollektiv (n=28) gegenüber. Zunächst gibt sie einen Überblick über die mit dem jeweiligen Gerät ermittelte *CTC* Anzahl. Bei einem Großteil der dargestellten Patientinnen, sind sowohl nach Durchführung der Ariol-Methode, als auch der *CellSearch*- Methode *CTC* gefunden worden. Die Übereinstimmungen wurden zusätzlich nach Anwendung unterschiedlicher Schwellenwerte für die Entscheidung eine Patientin als *CTC* positiv zu werten (≥ 3 *CTC*; ≥ 5 *CTC*) überprüft. Hierbei nimmt die Anzahl gleich bewerteter Blutproben (grün unterlegt) weiter zu.

Tabelle 4.2.2 Gegenüberstellung der positiv getesteten (≥ 1 TC/ ≥ 3 TC/ ≥ 5 TC) M1 Patientinnen

Patientennummer	Anzahl CTC CellSearc	Anzahl CTC Ariol	Übereinstimmun g CellSearch/	Übereinstimmung CellSearch/ Ariol ≥ 5
(0) 3	336	171	ja/ja	ja/ja
(0) 5	3	3	ja/ja	nein/nein
(0) 7	41	38	ja/ja	ja/ja
(0) 20	11	13	ja/ja	ja/ja
(0) 30	1	1	nein/nein	nein/nein
(0) 39	1	1	nein/nein	nein/nein
(0) 41	2	1	nein/nein	nein/nein
(0) 45	2	3	nein/ja	nein/nein
(0) 50	2	1	nein/nein	nein/nein
(0) 53	0	1	nein/nein	nein/nein
(0) 54	0	3	nein/ja	nein/nein
(0) 62	7	2	ja/nein	ja/nein
(0) 65	/	2	X/nein	X/nein
(0) 68	3	4	ja/ja	nein/nein
(0) 69	0	3	nein/ja	nein/nein
(0) 71	1	19	nein/ja	nein/ja
(0) 72	0	1	nein/nein	nein/nein
(0) 12	1	0	nein/nein	nein/nein
(0) 67	40	0	ja/nein	ja/nein
Insgesamt	12(von28)			

Grün= Übereinstimmung CellSearch/Ariol; Rot= CellSearch positiv/ Ariol negativ; Gelb = CellSearch negativ/ Ariol positiv

Tabelle 4.2.3 Kreuztabelle M1 Patienten (n= 28) positiv bedeutet min. 1TC im Blut nachgewiesen

	CS Pat neg	CS Pat pos	Gesamt
Ariol Pat neg	10	2	12
Ariol Pat pos	4	12	16
Gesamt	14	14	28

Tabelle 4.2.3 zeigt eine Detektionsrate von 50% für die *CellSearch*- Methode (14/28 Patienten positiv getestet) und eine Detektionsrate von 57% für die Ariol- Methode (16/ 28 positiv getestet). 22 Patientinnen wurden gleich getestet, es gab bei der *CTC* positiv/ negativ Entscheidung 6 unterschiedlich getestete Patientinnen. Der Chi- Quadrat Test ergab eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Methoden ($p= 0.003$; $kappa= 0,571$ ($p= 0,002$)). Mittels t- Test/ McNemar Test konnte kein signifikanter Unterschied in den Detektionsraten festgestellt werden ($p= 0,424/ p= 0,688$). Liegt der Schwellenwert für die *CTC* positiv/ negativ Entscheidung nun höher, besteht weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Methoden. Für eine positive Entscheidung, mit der Bedingung, dass min 3 *CTC* im Blut detektiert werden müssen ($n=28$) besteht für die *CellSearch*- Methode eine Detektionsrate von 25% (7/28 Patientinnen positiv getestet), die Detektionsrate der Ariol- Methode liegt bei 32% (9/ 28 positiv getestet). Mittels Chi Quadrat Test wurde auch in diesem Fall eine signifikante Korrelation der beide Methoden errechnet (p -Wert: 0,02 $kappa$ 0,478 ($p=0,01$)). Hier

unterscheiden sich die Detektionraten nicht signifikant (t- Test $p=0,424$, McNemar $p= 0,754$). Für die Bedingung, dass 5 oder mehr Tumorzellen im Blut detektiert werden müssen, um eine Patientin *CTC* positiv einzuschätzen, ergeben sich folgende Detektionsraten: *CellSearch*: 18% (5/28 Patientinnen); Ariol: 18% (5/ 28 Patientinnen). Es liegt ebenfalls eine signifikante Korrelation vor ($p= 0,04$; Kappa = $0,604(p= 0,001)$) und kein signifikanter Unterschied zwischen den Raten (t- Test $p= 0,573$, McNemar $p= 0,125$).

Tabelle 4.2.4 Kreuztabelle M1 Patientinnen (n= 48) positiv bedeutet min. 1TC im Blut nachgewiesen

	CS Pat neg	CS Pat pos	Gesamt
Ariol Pat neg	17	3	20
Ariol pat pos	8	20	28
Gesamt	25	23	48

Tabelle 4.2.4 zeigt alle bearbeiteten Blutproben ($n=48$), inklusive mehrerer Messungen pro Patientin, wie es in einigen Fällen durchgeführt wurde. Insgesamt wurden 56 Blutproben untersucht, von denen 48 mit der *CellSearch*- Methode vergleichbar waren. Die Detektionsraten liegen nach Anwendung der 2 verschiedenen Methoden bei 48% (*CellSearch*; 23 von 48 positiv getestet) und bei 58% (Ariol- Methode; 28 von 48 Patientinnen positiv getestet). Für alle getesteten Blutproben besteht eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Methoden ($p < 0,001$ kappa= $0,545$). Nach Durchführung des t-Tests/ McNemar Tests zeigen die Detektionsraten auch hier keinen signifikanten Unterschied ($p= 0,133/ p= 0,227$). Finden hier die zusätzlichen Schwellenwerte Anwendung, ändern sich die Ergebnisse nicht. Die Detektionsraten für den Schwellenwert ≥ 3 TC betragen für das Ariol wie für *CellSearch* 31%. Die Methoden korrelieren signifikant (Chi Quadrat Test $p= 0,02$, Kappa= $0,457$), mit dem t-Test/ McNemar Test lässt sich kein signifikanter Unterschied in den Detektionsraten nachweisen ($p= 0,767 /p= 1,000$). Genauso verhält es sich bei dem Schwellenwert ≥ 5 *CTC*: Detektionsrate Ariol: 19%; *CellSearch*: 32%; die Methoden korrelieren signifikant (Chi Quadrat Test $p= \geq 0,001$; Kappa = $0,622$) und unterscheiden sich bezüglich der Detektionsraten mit den üblichen Tests nicht nachweisbar (t- Test $p=0,420$; McNemar $p= 0,688$).

Vergleich der absoluten Tumorzellzahl

Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Ariol- und *CellSearch*- Methode bestimmten absoluten Zellzahlen festgestellt werden, weder für die einfachen Messungen ($n=28$; $p= 0,830$ Wilcoxon), noch für die Mehrfachmessungen, welche die Patientinnen beinhalten, deren Blut wiederholt untersucht wurde ($n= 48$; Wilcoxon $p=0,448$).

Die Zellzahl- *Range* innerhalb des untersuchten Kollektivs ($n=28$) beträgt für das Ariol 1-171 Zellen und für *CellSearch* 1- 336 Zellen.

Betrachtet man mit Hilfe des Poisson- Regressions Modells nur die Patientenproben, die innerhalb aller Patientenproben (inklusive der wiederholt gemessenen Patientinnen) als positiv gewertet wurden ($n= 31$), dann lässt sich die Aussage formulieren, dass die *CellSearch*-Methode, bezogen auf die reine Tumorzellzahl 63% mehr *CTC* findet, als die Ariol- Methode.

Zusammenhang mit dem Erkrankungsstadium

Tabelle 4.2.1 zeigt den Zusammenhang zwischen *CTC* Status und histo- pathologischen Parametern. Die *CellSearch*- Methode zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der *CTC* Detektion (Schwelle ≥ 1) und dem Tumorstadium ($p= 0,045$). Dieser Zusammenhang verliert sich nach Anlegen der anderen Schwellenwerte.

Bei der Ariol- Methode haben signifikant mehr *CTC*- positive Patientinnen (Schwelle ≥ 3) lobuläre Tumoren ($p= 0,017$). Ansonsten gilt für die 28 untersuchten Patientinnen, dass keine signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium, dem Nodalstatus, dem Hormonrezeptorstatus, der Her2- Status oder der Art des Tumors festgestellt werden konnte, (untersuchte Schwellenwerte $\geq 1, \geq 3, \geq 5$). Zu bedenken ist hier die geringe Stichprobengröße (siehe Tabelle 4.2.1).

Patientinnen mit wiederholten Messungen

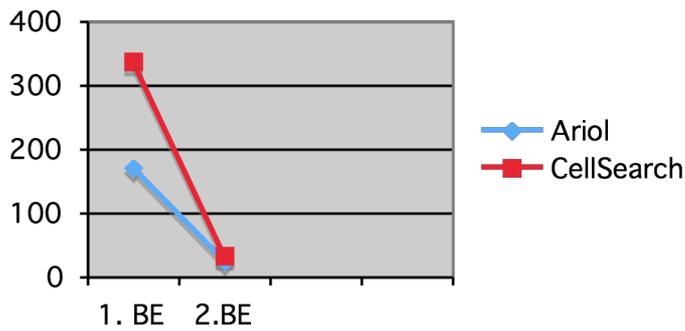
Das Blut von 12 Patientinnen wurde wiederholt untersucht. Alle Patientinnen befanden sich während der Entnahmen in einem Zyklus ihrer Chemotherapie. In der Regel gab es zwei Untersuchungen, in Ausnahmefällen bis zu vier Messungen. Die zeitlichen Abstände in denen das Blut entnommen wurde, variieren logistisch bedingt stark (1- 207 Tage). In Tabelle 4.2.5 werden die Wiederholungsfälle dargestellt. Bei Patientin 3 (bzw.15) sieht man einen Abfall der Tumorzellzahl von über 100 Zellen (sowohl bei der Messung mit dem Ariol, als auch bei der Untersuchung mittels *CellSearch*- Methode) auf eine Zellzahl um die 30, nach einem Zeitraum von 11 Tagen. Bei Patient 14 (bzw. 17, 36, 76) erkennt man einen Anstieg der gemessenen Zellen von 0 auf über hundert Zellen über 4 Messungen in einem Zeitraum von 207 Tagen hinweg. Einen gleich bleibenden positiven *CTC*- Status behält z. B. Patient 20 (bzw. 42, 60) bei einer um Zellzahl die zwischen 10 und 40 Zellen gemessen wird. Bemerkenswert ist jedoch Patient 67 (bzw. 70), der mit der *CellSearch*- Methode von 40 auf über 70 Zellen innerhalb von 11 Tagen ansteigt, mit dem Ariol Gerät aber zu Messzeitpunkt 1 negativ auf *CTC* und zu Zeitpunkt zwei mit 2 Zellen positiv getestet wurde.

Tabelle 4.2.5 Darstellung der wiederholt untersuchten Patientinnen

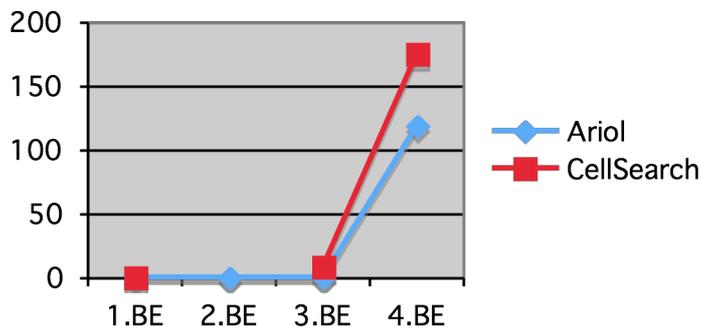
Patientennummer	Messung	Anzahl CTC	Anzahl CTC CellSearch	Wiederholung	Tage
3	1.	171	336		
15	2.	26	35	Patient 3	11
1	1.	0	0		
56	2.	4	0	Patient 1	182
2	1.	0	0		
73	2.	0	0	Patient 2	196
5	1.	3	3		
59	2.	1	0	Patient 5	60
64	3.	0	0	Patient 5	116
12	1.	0	1		
19	2.	0	/	Patient 12	1
13	1.	0	0		
18	2.	0	/	Patient 13	1
29	3.	0	0	Patient 13	7
14	1.	0	0		
17	2.	0	/	Patient 14	1
36	3.	1	9	Patient 14	21
76	4.	118	175	Patient 14	207
20	1.	13	11		
42	2.	47	37	Patient 20	24
60	3.	12	13	Patient 20	32
24	1.	0	0		
38	2.	0	1	Patient 24	21
27	1.	0	0		
40	2.	0	0	Patient 27	20
30	1.	1	1		
47	2.	0	/	Patient 30	31
63	3.	1	2	Patient 30	112
66	4.	11	0	Patient 30	27
67	1.	0	40		
70	2.	2	73	Patient 67	11

Grafiken 4.2.1 bis 4.2.4 Darstellung ausgewählter CTC Verläufe über mehrere Messungen an verschiedenen Tagen

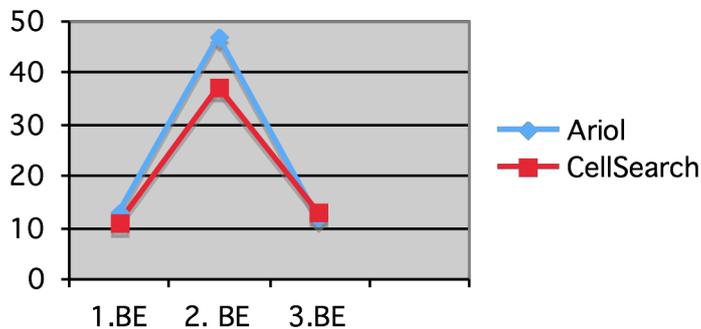
X: Blutentnahmen Y: CTC Anzahl



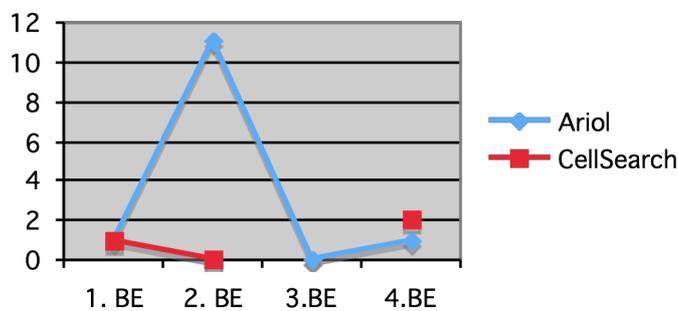
Grafik 4.2.1: Patient 3, 11 Tage Abstand zwischen den Blutentnahmen (BE) Y- Achse, X- Achse: Anzahl CTC



Grafik 4.2.2: Patient 14, 1 (2.BE) 21 (3.BE) bzw. 207 (4.BE) Tage nach 1. Blutentnahme (BE)



Grafik 4.2.3: Patient 20, 24 Tage (2.BE) bzw. 32 Tage nach erster Blutentnahme (BE)



Grafik 4.2.4: Patient 30, 27 Tage (2.BE) bzw. 31 (3.BE) und 112 Tage (4.BE) nach erster Blutentnahme (BE)

Methodenvergleich: Ariol- Methode, CellSearch- Methode und MM- Q PCR

Das Blut von 28 Patienten und 10 gesunden Probanden wurde zusätzlich zu der Ariol- und *CellSearch*- Methode, mit einer quantitativen Multimarker PCR (MM- Q PCR) untersucht. Hierbei handelt es sich um einen quantitativen PCR Nachweis der Tumormarker SBEM, PS2, EGP2, Mammaglobin und p1B. Tabelle 4.2.6 zeigt die Ergebnisse dieses Vergleichs. Grundlage für die positiv/ negativ Entscheidung liegt in diesem Fall bei einem *CTC*- Score von ≥ 1 *CTC* im Patientenblut. Bei keinem der 10 gesunden Kontrollprobanden wurden mit einer der Methoden *CTC* gefunden. (siehe Tabelle 4.1.3). Von den 28 Patienten gab es in 7 Fällen (25%) eine Übereinstimmung in allen drei Methoden (2 *CTC* negativ-, 5 *CTC* positiv Entscheidungen). Ariol und *CellSearch*- Methode korrelieren signifikant, aber zufälligerweise (Chi Quadrat Test; $p= 0,028$, $\kappa= 0,331$) für das untersuchte Patienten-/ Probandenkollektiv ($n= 38$; 10 gesunde Probanden + 28 Patientinnen). Folgende Detektionsraten wurden bestimmt: Ariol- Methode 57% (16/28); *CellSearch*- Methode: 39% (11/28); MM- Q PCR: 54% (15/28). Die Detektionsraten von Ariol- und *CellSearch* Methode unterscheiden sich signifikant zugunsten der Ariol- Methode (t- Test $p= 0,019$), welche mehr Patienten als *CTC* positiv bewertet. Zwischen Ariol-Methode und MM- PCR lässt sich keine signifikante Korrelation nachweisen (Chi Quadrat Test: $p=0,131$). Zwischen den Detektionsraten besteht kein signifikanter Unterschied (t-Test $p= 0,8$). *CellSearch*- Methode und PCR zeigen ebenfalls keine signifikante Korrelation (Chi Quadrat Test, $p= 0,129$), unterscheiden sich jedoch signifikant in den Detektionsraten (t-Test, $p= 0.031$) zugunsten der PCR- Methode, welche eine höhere Detektionsrate aufweist.

Tabelle 4.2.6 Darstellung 3 Methoden Vergleich Grün= positiv getestet; Rot= negativ getestet

Patientennummer	Ariol	CellSearch	MM- Q PCR
(0)51A	positiv	negativ	negativ
(0)52A	negativ	negativ	positiv
(0)53A4	positiv	negativ	negativ
(0)54A5	positiv	negativ	negativ
(0)56A3	positiv	negativ	positiv
(0)57A7	negativ	negativ	positiv
(0)58A8	negativ	negativ	positiv
(0)59A9	positiv	unbekannt	positiv
(0)60A10	positiv	positiv	positiv
(0)61A11	negativ	negativ	negativ
(0)62A12	negativ	positiv	positiv
(0)63A13	positiv	positiv	positiv
(0)65A17	positiv	positiv	negativ
(0)66A19	positiv	positiv	negativ
(0)67A20	negativ	positiv	negativ
(0)68A22	positiv	positiv	negativ
(0)69A23	positiv	negativ	negativ
(0)70A24	positiv	positiv	positiv
(0)71A25	positiv	positiv	negativ
(0)72A26	positiv	negativ	positiv
(0)73A27	negativ	negativ	positiv
(0)74A28	negativ	negativ	positiv
(0)75A29	negativ	negativ	positiv
(0)76A30	positiv	positiv	positiv
1046präA14	negativ	positiv	negativ
1045präA15	positiv	negativ	positiv
1048präA21	negativ	negativ	negativ

Die nachfolgenden Bilder sollen den dargestellten Ergebnissen, neben der tabellarischen Aufarbeitung der Datenlage, eine plastischere Darstellung abgewinnen. Sie beinhalten jeweils 4 Bilder pro ausgewähltem Zielbereich auf dem *Slide*: 1 Beispiel aus dem M1- Kollektiv, ein Zell-Cluster (2 Zellen) und 2 Beispiele aus dem M0- Kollektiv, wobei hierabei jeweils eine Bilderserie aus einer prä- und einer post- operativ gewonnenen Probe entspricht.

Abb. 4.2.1, Bilder 1-4: Cluster 2 CTCs

Pat. 003 aus dem M1- Patientinnenkollektiv

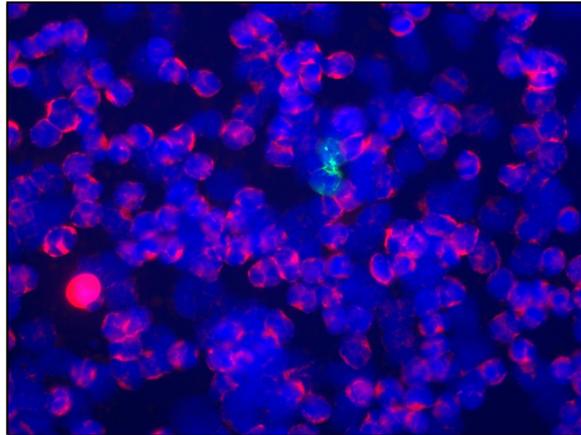


Bild1: Komposit- Image , alle Fluoreszenzkanäle offen, 2 CTC

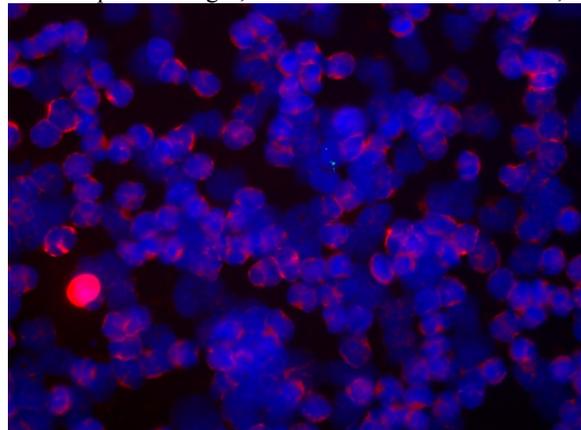


Bild2: DAPI und TexasRed Kanal offen, keine CK Färbung sichtbar, CTCs zeigen keine Rotfärbung

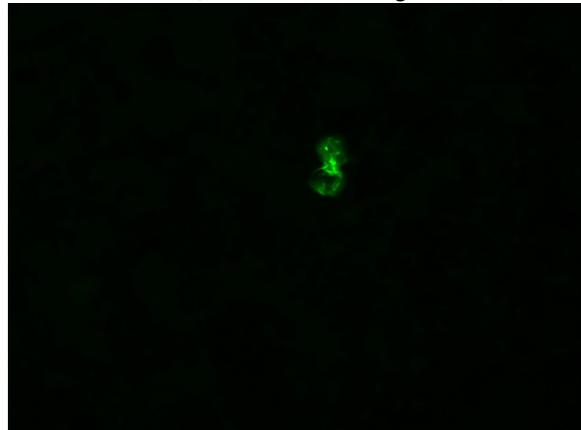


Bild3: FITC- Kanal, CK Färbung sichtbar, 2 CTC

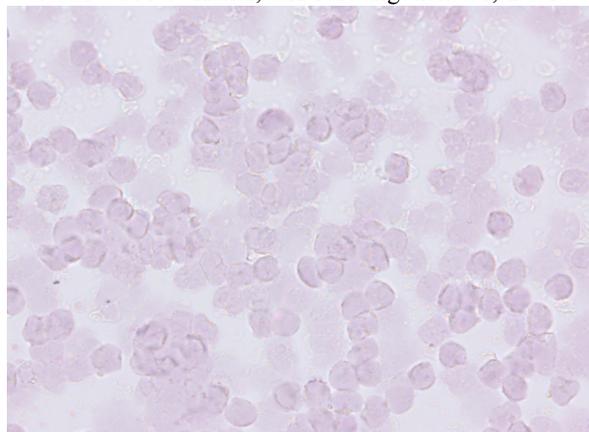


Bild 4: Durchlichtmikroskopisches Bild zur Beurteilung der Zellmorphologie: Zellstruktur erkennbar

Abb. 4.2.2 Bild 1-4: 1 CTC Pat. 003post aus dem M0- Patientinnenkollektiv

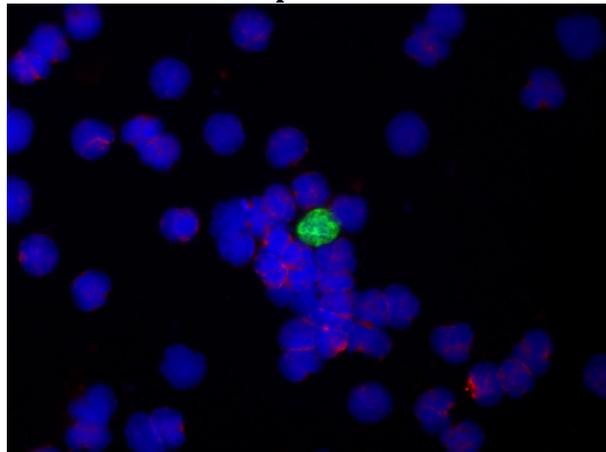


Bild 1: Komposit Image, alle Fluoreszenzkanäle offen

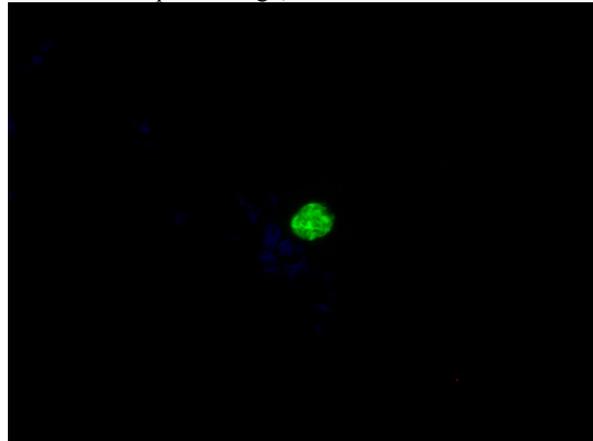


Bild 2: FITC Kanal offen, CK positive Zelle sichtbar

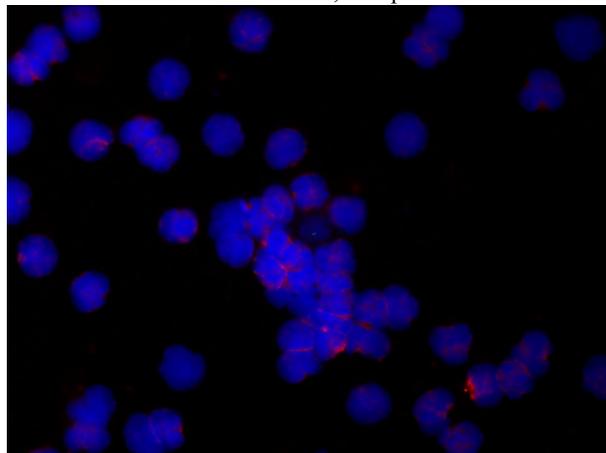


Bild 3: DAPI und TexasRed Kanal offen, keine CK Färbung sichtbar, keine Rotfärbung der CTCs

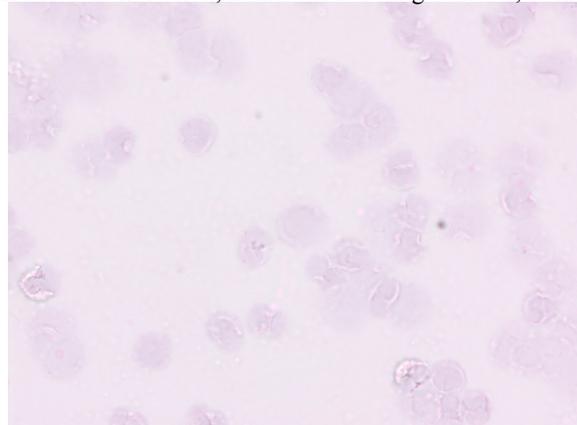


Bild 4: Durchlichtmikroskopisches Bild zur Beurteilung der Zellmorphologie, Zellstruktur erkennbar

Abb. 4.2.3 Bilder 1-4: Cluster 3 CTC Pat. 1009 prä aus dem M0 Patientinnenkollektiv

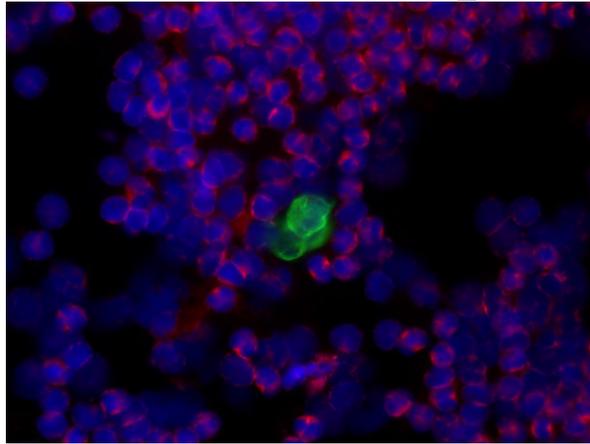


Bild 1: Komposit Image: Alle Fluoreszenzkanäle offen, 3 CTC

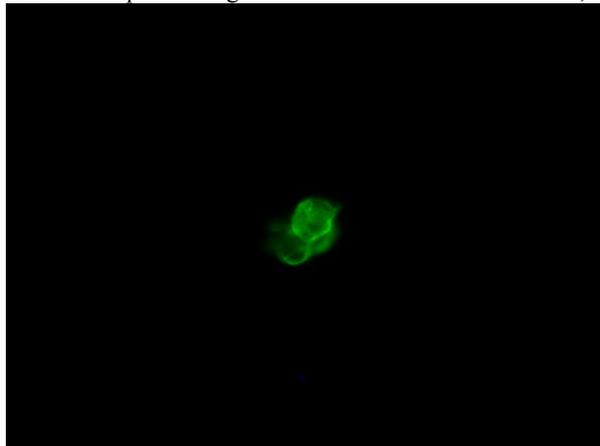


Bild 2: FITC Kanal offen, CK Färbung sichtbar: 3 CTC

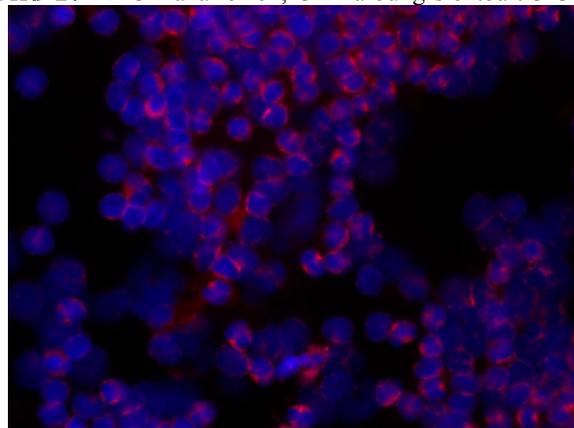


Bild 3: DAPI und TexasRed Kanäle offen, keine CK Färbung sichtbar, CTCs zeigen keine Rotfärbung

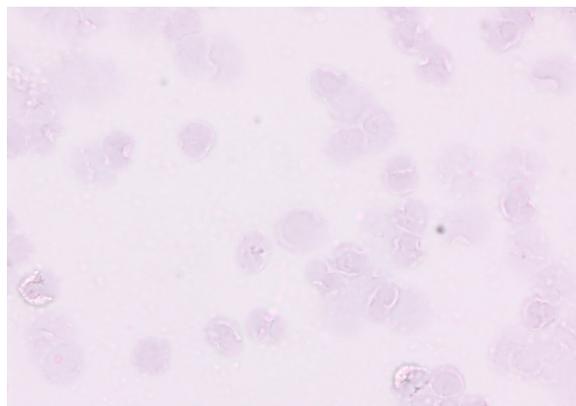


Bild 4: Durchlichtmikroskopisches Bild zur Beurteilung der Zellmorphologie, Zellstruktur erkennbar

4.3 Methodenvergleich M0 Patientinnen

Stichprobenbeschreibung

Insgesamt wurden 45 Patientinnen im Stadium M0 mit Ariol- und *CellSearch*- Methode untersucht, wovon 2 Blutproben nicht mit dem *CellSearch*- Gerät ausgewertet werden konnten, so dass 43 Proben in den Methodenvergleich eingehen. Wie Tabelle 4.3.1 zeigt, ist der überwiegende Anteil der Tumoren vom duktalem Typ (63%). Die Tumoren sind mit wenigen Ausnahmen T1 (40%) bzw. T2 (45%) eingestuft worden. Die Erkrankung hatte sich bei 58% der Patientinnen zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch nicht nach Pathologiebefund erkennbar auf die Lymphknoten ausgedehnt. Über die Hälfte der Tumoren wurden dem Status G2 zugeordnet (53%). 71% der Neoplasien sind Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor positiv, 63% wurden Her2 positiv getestet. Mittels Ariol- Methode hatten 8 Patientinnen (18%) einen positiven *CTC*- Status, mittels *CellSearch- Methode* wurden 6 Patientinnen mit *CTC* detektiert.

Tabelle 4.3.1 Darstellung aller Patientinnen des M0 Kollektivs

	Anzahl Pat.	Anzahl CTC	Anzahl CTC CellSearch
Alle	45 (43*)	8 von 45 (18)	6 von 43* (14)
Alter (Mittelwert)	59	53	53
Art des Tumors			
duktal	28 (63)	7 (87)	3 (50)
lobulär	11 (25)	1 (13)	2 (33)
tubulär	2 (4)	0	0
	4 (8)	0	1 (17)
Tumorstadium			
T1	18 (40)	2 (25)	4 (67)
T2	20 (45)	5 (62)	1 (17)
T3	2 (4)	1 (13)	0
unbekannt	5 (11)	0	1 (17)
Nodalstatus			
pos	14 (31)	3 (38)	5 (83)
neg	26 (58)	5 (62)	0
unbekannt	5 (11)	0	1 (17)
Grade			
1	5 (11)	1 (13)	0
2	24 (53)	5 (62)	4 (67)
3	9 (20)	1 (13)	1 (17)
unbekannt	7 (16)	1 (13)	1 (17)
ER/PR**			
pos	32 (71)	7 (88)	0
neg	5 (11)	0	5 (83)
unbekannt	8 (18)	1 (13)	1 (17)
Her			
2 pos	28 (63)	1 (13)	1 (17)
neg	6 (13)	6 (74)	3 (50)
unbekannt	11 (25)	1 (13)	2 (33)

* Patienten im Vergleich mit *CellSearch*
** ER und/oder PR pos

Vergleich der Detektionsraten

Tabelle 4.3.2 stellt die mit *CellSearch*- und/ oder Ariol- Methode *CTC*- positiv getesteten Patientinnen dar. Von diesen 14 Patientinnen gab es von 2 Patientinnen nur Ariol Ergebnisse (in der Tabelle weiß unterlegt), 1 Patientin wurde sowohl mittels Ariol- als auch *CellSearch*- Methode *CTC*- positiv beurteilt (grün unterlegt), 5 Patientinnen wurden nur mit der Ariol- Methode als *CTC* positiv bewertet (rot unterlegt). Bei 5 der 8 mit dem Ariol als *CTC* positiv gewerteten Patienten (Pat 100, 1009, 1010, 1034, 1045) wurden 3 oder mehr *CTC* im Blut detektiert (*Range*: 3- 5 *CTC*), alle diese Patienten wurden mit der *CellSearch*- Methode *CTC* negativ getestet.

Tabelle 4.3.2 Gegenüberstellung der positiv getesteten M0 Patientinnen

Patientennummer	Anzahl Ariol	Anzahl <i>CellSearch</i>
1003prä	4	/
1006prä	1	/
1007prä	1	1
1008prä	9	0
1009prä	58	0
1010prä	9	0
1034prä	1	0
1045prä	3	0
1011prä	0	1
1011prä	0	1
1019prä	0	1
1026prä	0	1
1039prä	0	1
1046prä	0	1

Zum besseren Vergleich der Detektionsraten wurden die 2 Patientinnen ausgeschlossen, deren Blut nicht mittels *CellSearch*- Methode ausgewertet werden konnte.

Tabelle 4.3.3 Kreuztabelle M0 (n=43); positiv bedeutet ≥ 1 TC im Blut nachgewiesen

	CS neg	CS pos	Gesamt
Ariol neg	32	5	37
Ariol pos	5	1	6
Gesamt	37	6	43

Aus Tabelle 4.3.3 geht hervor, dass die Ergebnisse der *CellSearch*- bzw. der Ariol- Methode für das nicht metastasierte Patientenkollektiv nicht signifikant korrelieren (Chi- Quadrat Test; $p=0,619$; Kappa= 0,032 $p=0,836$). Die Detektionsraten weisen keinen signifikanten Unterschied auf (t- Test $p=1,000$).

Vergleich der absoluten Tumorzellzahlen

Ein signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten absoluten Tumorzellzahlen konnte für die M0- Kohorte nicht nachgewiesen werden (Wilcoxon Test $p= 0,301$). Die Tumorzellzahl verzeichnet eine Spannweite von 1 bis 58 *CTC* bei der Ariol- Methode. Die *CellSearch*- Methode findet maximal 1 Zelle bei den untersuchten Patientinnen des M0- Kollektivs. Werden die absoluten Zellzahlen aller mit Ariol- und-/ oder *CellSearch*- Methode positiv getesteten Patientinnen ($n=11$) mit dem Poisson- Regressions Modell verglichen, findet das Ariol 94% mehr *CTC*, das heißt 16 mal so viele Zellen, wie das *CellSearch* Gerät (Konfidenzintervall: 6,5 bis 40).

Zusammenhang mit dem Erkrankungsstadium

Die Ergebnisse des *CTC* Screenings wurden mit den histologischen Patientendaten mittels Chi- Quadrat Test auf statistische Zusammenhänge hin untersucht. Für die 48 Patientinnen aus dem M0 Kollektiv konnte weder bei der Ariol- noch bei der *CellSearch*- Methode eine Korrelation zwischen den *CTC*- positiv getesteten Patientinnen und der histologischen Datenlage ermittelt werden.

4.4. Vergleich der prä- und postoperativen Blutentnahmen

Stichprobenbeschreibung

Von den 45 M0 Patientinnen bei denen vor der OP eine Blutentnahme stattfand, konnte bei 41 auch nach der Operation Blut entnommen und untersucht werden (33 konnten zudem noch vergleichend mit der *CellSearch*- Methode untersucht werden). Zur näheren Stichprobenbeschreibung siehe Tabelle 4.3.1. Tabelle 4.4.1 zeigt, dass sich die mit der Ariol- Methode post- OP *CTC*- positiv bestimmten Patientinnen zu annähernd gleichen Teilen (5 bzw. 4 Patientinnen) einer weiten Exzision bzw. einer *Ablatio* unterziehen mussten. Der Tumor aller mit dem Ariol positiv bestimmten Patientinnen wurde *in sano* resiziert. 6 der 8 mit der *CellSearch*- Methode *CTC* positiv bestimmten Patientinnen unterzogen sich einer weiten Exzision und 2 hatten eine *Ablatio*. Der Schnittrand war bis auf bei 2 Patientinnen als frei diagnostiziert worden.

Tabelle 4.4.1 Darstellung der Operationart und des Schnitttrandes der Patientinnen mit post- OP Blutentnahme

OP	Anzahl Patiente	Anzahl CTC Ariol (%)	Anzahl CTC CellSearch (% auf
weite Exzision	31(75)	5(56)	6(75)
Ablatio	6(15)	4(44)	2(25)
unbekannt	4(10)	0	0
Schnitttrand			
R0	24(59)	6(67)	4(50)
R1	2(5)	0	2(25)
unbekannt	15(37)	3(33)	2(25)
	* im Vergleich mit <i>CellSearch</i>		

Ergebnisse des prä und post- OP Vergleichs

Der Prä/ Post Vergleich ergab weder für die Ariol- Methode noch für die *CellSearch*- Methode einen signifikanten Unterschied in den Detektionsraten (t- Test Ariol: $p=0,262$, *CellSearch*: $0,292$; McNemar: Ariol $p=0,453$, *CellSearch*: $p=0,424$) oder absoluten Zellzahlen (Wilcoxon Test: Ariol: $p=0,257$; *CellSearch* $p=0,285$).

Tabelle 4.4.2 Kreuztabelle der prä und post- OP Ergebnisse Ariol- Methode

	Ariol Post neg	Ariol Post pos	Gesamt
Ariol Prä neg	30	5	35
Ariol Prä pos	2	4	6
Gesamt	32	9	41

Tabelle 4.4.3 Kreuztabelle der prä und post- OP Ergebnisse *CellSearch*- Methode

	CS Post neg	CS Post pos	Gesamt
CS Prä neg	19	9	28
CS Prä pos	5	0	5
Gesamt	24	9	33

Tabelle 4.4.4 stellt noch einmal alle Patientinnen dar, die entweder mit der Ariol- oder der *CellSearch*- Methode prä- und/ oder post- OP positiv getestet wurden. Auffällig ist, dass viele der positiven Blutproben nicht wie geplant 24 h post- OP stattgefunden haben, sondern später. Es kann festgehalten werden, dass innerhalb der untersuchten Stichprobe keine statistisch signifikante Aussaat von Tumorzellen ins Blut zu beobachten war, weder mit der *CellSearch*- noch mit der Ariol- Methode.

Tabelle 4.4.4 Darstellung aller prä und/ oder post- Operativ positiven Patientinnen

	Pat. Nr.	Prä Ariol	Prä CS	Tage post-	Post Ariol	Post CS
Ariol prä < post						
	1003	4	/	5	5	0
	1004	0	0	4	1	0
	1006	1	/	9	30	0
	1022	0	0	5	2	1
	1026	0	1	1	2	0
	1028	0	0	1	2	0
	1043	0	0	1	24	0
Ariol prä ≥ post						
	1007	1	1	2	0	0
	1009	58	0	6	1	0
	1034	1	0	1	0	0
	1045	3	0	2	1	/
CS prä < post						
	1005	0	0	4	0	1
	1009	58	0	6	1	0
	1013	0	0	15	0	2
	1022	0	0	5	2	1
	1025	0	0	2	0	1
	1027	0	0	1	0	1
	1029	0	0	1	0	1
	1030	0	0	1	0	1
	1036	0	0	1	0	2
CS prä ≥ post						
	1007	1	1	2	0	0
	1011	0	1	2	0	0
	1019	0	1	1	0	0
	1026	0	1	1	2	0
	1039	0	1	2	0	0

Einzelfälle

Bei zwei Patientinnen (1006 und 1043) waren nur mit der Ariol- Methode *CTC*- Anstiege von 1 auf 30 *CTC* und von 0 auf 24 *CTC* zu beobachten. Bei Patientin 1009 war allein mit der Ariol- Methode ein *CTC* Abfall von 58 auf 1 *CTC* zu beobachten. Die *CellSearch*- Methode zeigt bei den Patientinnen 1006 und 10043 keinen *CTC*- Anstieg, weist bei diesen Patientinnen sogar gar keine *CTC* nach. Bei Patientin 1009 zeigt auch die *CellSearch*- Methode einen Umschwung von negativ auf positiv nach der Operation, allerdings nur mit 1 *CTC*, die post- OP detektiert wird.

Methodenvergleich der prä- und post- OP Ergebnisse nach Untersuchungszeitraum aufgeteilt Die absolute Zellzahl zeigt im Methodenvergleich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden, weder für die prä- OP Blutentnahmen (Wilcoxon $p= 0,502$) noch für die postoperativ entnommenen Proben (Wilcoxon $p= 0,318$). Vergleicht man mit Hilfe des Poisson- Regressions Modell alle *CTC* positiv getesteten post- OP untersuchten Patientinnen (die prä- OP untersuchten Patientinnen werden unter Punkt 4.3 dargestellt), findet man mit der Ariol- Methode 86% mehr (7mal so viele) *CTC* als mit der *CellSearch*- Methode (*Range Ariol*: 0-58 *CTC*; *Range CellSearch*: 0-1 *CTC*). \geq

5. Diskussion

Diese Arbeit beinhaltet zwei unterschiedliche Aspekte: Zum einen wird ein Methodenvergleich zwischen *CellSearch*- Methode, Ariol- Methode und zuweilen auch MM- PCR durchgeführt; zum anderen wird die so erprobte Ariol- Methode angewandt, um verschiedene klinische Fragestellungen zu beantworten. Zunächst die Anwendbarkeit der Methode auf ein neues Patientenkollektiv und darüber hinaus die Frage, ob diese neue Methode ein angemessenes Werkzeug für die Detektion von perioperativ gestreuten Tumorzellen sein kann.

Als Diskussionsleitfaden sollen die in der Einleitung umrissenen Fragen dienen:

Als erstes ist die Frage zu klären, in wie weit die bisher erhobenen Ergebnisse zur neuen Ariol- Methode bezüglich der Detektion von *CTC* bei M1- Patientinnen reproduzierbar sind.

Die von Deng *et al* 2008 publizierte Studie zur Etablierung der Ariol- Methode beschreibt einen signifikant höhere *CTC*- Detektionsrate im M1 Kollektiv (n= 49) gegenüber der *CellSearch*- Methode und erklärt diesen durch die Verwendung von Anti- *CK* Antikörpern bzw. der Kombination von Anti- *CK* und Anti- *EpCam* Antikörpern als *Catcher* in der Anreicherungsphase (Deng *et al.* 2008). Im Kontrollversuch mit Zellkulturzellen finden Deng *et al.* im Mittel 78,9% der gespikten Zellen im peripheren Probandenblut wieder. Die Kontrollversuche, die in dieser Arbeit dargestellt werden, haben ebenfalls eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 79% (Median: 85%). Allerdings weisen die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse innerhalb des M1 Patientenkollektivs (n=28) darauf hin, dass die Methoden (hier: *CellSearch*- Methode und Ariol- Methode) einander zwar ebenbürtig sind und hoch signifikant korrelieren, die Detektionsraten jedoch keinen signifikanten Unterschied aufweisen.

Der Fragestellung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Deng *et al.* und der Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Methoden folgend muss jedoch festgehalten werden, dass sich mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten, die Beobachtung der signifikanten Erhöhung der Sensitivität, nicht unterstützen lässt. Die Korrelation zwischen den Detektionsraten war jedoch ermutigend und der Grund zur Fortführung der Experimente. Rückwirkend betrachtet bleibt die Frage offen, weshalb der zusätzliche, magnetische *Catcher* nicht den erwarteten Effekt im M1- Patientenkollektiv bewirkte: die Erhöhung der Sensitivität der Ariol Methode gegenüber solchen Methoden, die lediglich mit *EpCam*- Antikörpern anreichern. An dieser Stelle müssen zwei Aspekte berücksichtigt werden: zum einen ist fraglich weshalb die Idee einen zusätzlichen *Catcher* zu verwenden nicht zu einer höheren Tumorzellausbeute führt, zum anderen wirft sich die Frage nach einem methodischen Problem auf, da die erstmalige Etablierung der Methode durch Deng und seine Arbeitsgruppe, sich so nicht validieren ließ. Ein Ansatz zur Klärung des biologischen Aspekts könnte die Annahme sein, dass der Anstieg der Expression von *EpCam* auf der Tumorzelloberfläche erst später in der Metastasierungskaskade erfolgt, was bei Patientinnen im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium

eine höhere *EpCam*- Dichte auf den Tumorzellen bedingen und einer zusätzlichen Anreicherung mit *CK*- Antikörpern keinen Vorteil verschaffen würde (Meng et al. 2006). Allerdings gibt es Beobachtungen, die dieser Überlegung widersprechen und eine Downregulation von *EpCam*, insbesondere bei Patientinnen nach *Firstline* Chemotherapie, beschreiben (Thurm et al. 2003, Willipinski et al. 2005).

Eine weitere denkbare Erklärung ist ein methodischer Aspekt: die Ariol- Methode bedient sich vieler Schritte die manuell durchgeführt werden, eine Lücke für systemische Fehler, wohingegen die *CellSearch*- Methode häufiger automatisierte Schritte verwendet, desweiteren ist bei beiden Methoden eine computergesteuerte Auswertung der *Slides*, bzw. Küvette nur teilweise möglich, es liegt also buchstäblich im Auge des Betrachters, ob eine Zelle den Richtlinien folgend als Tumorzelle gewertet wird oder nicht. Durch eine zusätzliche durchlichtmikroskopische Aufnahme des kompletten *Slides* und der Möglichkeit, jede Zelle nicht nur virtuell sondern auch real zu begutachten, bietet die Ariol- Methode im Gegensatz zur *CellSearch*- Methode zusätzliche Ausschlusskriterien für falsch positive Zellen. Dies sind mögliche Argumente für einen potentiellen Unterschied der zwischen der Ariol- und *CellSearch*- Methode gemessen wird, welcher sich aus den bestehenden Daten zum M1 Kollektiv jedoch nicht signifikant darstellte. Ein innermethodischer Unterschied zwischen den Arbeitsgruppen lässt sich sicherlich so nicht erklären, in diesem Fall lässt sich eher ein methodischer Unterschied in der Auswertung der *Slides* bzw. eine andere Zusammensetzung des Patientenkollektivs, eventuell bedingt durch regionale oder beispielsweise ethnische Unterschiede der gewählten Patientengruppe anführen. Ein weiterer möglicher Aspekt ist sicherlich die Vorbehandlung der Patientinnen, sowohl in unseren Versuchen, als auch im Patientenkollektiv von Dengs Arbeitsgruppe gab es in der M1 Gruppe bei fortgeschrittenem Tumorstadium bereits begonnene bzw. abgelaufene Therapieansätze, wie z.B. Chemotherapie. Ein weiterer zu beachtender Punkt ist sicherlich der Ansatz der wiederholt untersuchten Patientinnen innerhalb des M1- Kollektivs. Interessanterweise konnten hier auch im Vergleich mit *CellSearch* unter adjuvanter Chemotherapie sowohl ein Ansteigen, als auch ein Abfallen der *CTCs* detektiert werden. Dieser Ansatz unterstreicht den Charakter eines *Monitoringtools* der Ariol- Methode. Es muss hier kritisch angemerkt werden, dass die Abnahmezeiten stark variieren (1-207 Tage), allerdings spiegelt dies durchaus den klinischen Alltag wieder, in welchem die Probenentnahme auch bei Wiedererscheinen des Patienten mit variierenden Abständen stattfindet. Zur letztlichen Abklärung inwieweit die erhobenen Daten, also in diesem Fall die Ab- bzw. Zunahme der *CTCs* über den Untersuchungszeitraum hinweg eine klinische Bedeutung haben, müssen sicherlich weitere *Follow- Up* Daten erhoben werden. Der klinische Einsatz der *CellSearch*- Methode in der Verlaufskontrolle der Brustkrebstherapie (Slade et al. 2009) und die Entsprechung beider Methoden bei der Untersuchung dieses Patientenkollektivs

deutet jedoch auf eine gute Anwendbarkeit der Ariol- Methode im Bereich des *Therapiemonitorings* und der Verlaufkontrolle bei Brustkrebspatientinnen hin.

Als zweites sollte die Frage untersucht werden, wie sich die Detektionsraten und die Bedeutung der Ariol- und der *CellSearch*- Methoden bei der Untersuchung von M0 Patientinnen prä- und postoperativ Patientinnen unterscheiden. Leitmotiv dieser Untersuchungen war einerseits sicherlich die spannende klinische Frage nach der Nachweisbarkeit perioperativ gestreuter *CTCs*, andererseits betrachteten wir hierbei auch das Kollektiv der M0- Patientinnen präoperativ im Vergleich mit der *CellSearch*- Methode.

Im Falle der nicht metastasierten Patientinnen zeigte der Methodenvergleich keine signifikante Korrelation. Die Detektionsraten wiesen keinen signifikanten Unterschied auf. Bemerkenswert ist allerdings, dass im Vergleich der absoluten Tumorzellzahlen die Ariol- Methode innerhalb dieses Patientinnenkollektivs 16mal so viele Zellen fand, wie die *CellSearch*- Methode. Die Tumorzellanzahl bei den positiv getesteten Patientinnen wiesen bei der Ariol- Methode eine *Range* von 1-58 Zellen, bei der *CellSearch*- Methode jedoch lediglich 1 Zelle auf.

Bei Betrachtung dieses Punktes sollte man den zuvor dargestellten Vergleich des M1- Kollektivs nicht aus den Augen lassen. In beiden Fällen werden Unterschiede innerhalb der Ergebnisse beider Methoden auffällig: innerhalb des M1- Kollektivs wurden nicht, wie erwartet, höhere Zellzahlen mit der Ariol- Methode detektiert, innerhalb des M0- Kollektivs dafür signifikant höhere Zellzahlen.

Sicherlich können hier auch wieder methodische Gründe, beispielsweise zur Aufarbeitung, zur Auswertung oder zur Stichprobenauswahl geltend gemacht werden, dennoch bleibt zu bedenken dass ein zu Beginn der Versuchsreihe erfolgreiche Spiking- Experimente zur Etablierung der Methode stattfanden.

Eine 2009 von Sieuwarts *et al.* verfasste Publikation im *Journal of the National Cancer Institute* beschreibt eine diagnostische Lücke der *CellSearch*- Methode hinsichtlich der *Normal- Like Breast Tumor Cells*, welche die Wissenschaftler auf die Anreicherungsform mit einem *EpCam* Antikörper alleine zurückführen (Sieuwarts *et al.* 2009). Ein Ansatz wie dieser macht deutlich, dass die Frage, ob die gewählten *Catcher* beider Verfahren alle Zellen einschließen, insbesondere bei abweichenden Patientenkollektiven weiterer Abklärung bedarf. Die Idee, dass sich potentiell erfassbare Tumorzellen von ihrer Oberflächenstruktur her unterscheiden ist nicht neu und auch eine Veränderung dieser Oberflächenstruktur innerhalb des Tumorprogresses wird diskutiert (Sieuwarts *et al.* 2009). Der von uns gewählte Versuchsaufbau lässt leider keine weitere Differenzierung zu, weist aber mit den unterschiedlichen Resultaten, insbesondere im Vergleich der Datenlage der Kollektive M0 und M1 auf die Möglichkeit hin, dass das *Targeting* der Zielzellen, insbesondere die Auswahl der *Catcher* in der Anreicherungsphase weiterer Untersuchung und stetiger Optimierung bedarf.

Der zweite Unterpunkt dieses Teils der Diskussion soll sich der Detektion von perioperativ gestreuten CTC widmen. Hierbei muss man sich sicherlich zwei unterschiedlichen Fragen stellen: Werden CTCs durch chirurgische Intervention „freigesetzt“, die sich prognostisch negativ für die Patienten auswirken?

Lassen sich Veränderungen im postoperativen CTC- Level mit der Ariol- Methode nachweisen? Die erste Frage ist eher allgemeiner Natur und stellt sich prinzipiell bei jeder Anreicherungs- und Detektionsmethode und wurde in der Einleitung bereits angesprochen. Mehrere Arbeitsgruppen haben mit verschiedentlichen Nachweismethoden innerhalb verschiedenster Patientengruppen die unterschiedlichsten Ergebnisse erhalten. So konnten Banys *et al.* keine perioperative Streuung bei Brustkrebspatientinnen nachweisen (Banys *et al.*2008), Camara *et al.*hingegen schon (Camara *et al.* 2006).

Der Ansatz dieser Untersuchung sollte zunächst ein *Screening* Versuch zu einem festgesetzten Zeitpunkt, 24 Stunden postoperativ sein. Bei Nachweis einer signifikanten Erhöhung der CTC- Werte wäre eine differenzierte Untersuchung des Steuerungsmusters, sprich erstes Auftreten und Persistieren, erfolgt. Dieser Ansatz birgt sicherlich Risiken in sich: so ist bei einer Untersuchung 24 Stunden post OP natürlich fraglich, ob dies der richtige Zeitrahmen zur Bestimmung der CTCs ist. Die Untersuchungen von Camara *et al.*zeigten, dass mit Hilfe des MAINTRAC Systems 3-4 Tage postoperativ die meisten Patienten eine Zunahme der CTC im Blut zeigten und diese häufig auch beibehielten (Camara *et al.*2006). Der Grund für die Wahl des 24 Stunden Zeitfensters waren zum einen die klinische Durchführbarkeit und zum anderen und die zeitliche Nähe zur Operation selbst.

Die in dieser Studie erhobenen Daten verzeichnen keine statistisch relevante Aussaat von CTC in das periphere Blut der untersuchten Patientinnen, weder mit der Ariol- noch mit der *CellSearch*- Methode. Eine große Hürde in der Durchführung dieser Untersuchung, welche 41 Patientinnen beinhaltete, war die Einhaltung des 24 Stunden Zeitfensters. In Kooperation mit der Klinik und unter Berücksichtigung des für die jeweilige Patientin angemessenen Behandlungsablaufs, variieren die postoperativen Blutentnahmezeitpunkte teilweise sehr stark (1-15 Tage post OP). Es scheint also sinnvoller die Einzelfälle zu betrachten, da für den statistischen Beweis oder aber eben die Widerlegung der These der Aussaat von Tumorzellen unter bzw. nach Operation eine sehr saubere Systematik der Probengewinnung hätte ermöglicht werden müssen.

Betrachtet man allerdings die 21 Patientinnen, deren Entnahme tatsächlich 24 Stunden post OP stattfand, war kein signifikanter Anstieg des CTC Scores zu verzeichnen. Interessanterweise findet sich in der Betrachtung der Einzelfälle bei 4 Patientinnen bei Untersuchung des Materials nach der Ariol- Methode ein Anstieg der CTC Anzahl, die Blutentnahme bei diesen Patientinnen erfolgte jeweils mehr als 24 Stunden post OP (4- 9Tage). Sicherlich kann dieser Anstieg neben der Möglichkeit der perioperativen bzw. postoperativen Tumorzellaussaat, auch

auf die natürliche Schwankung der nachweisbaren Tumorzellzahl zurückzuführen sein. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bestätigen, dass die Ariol- Methode die Möglichkeit des *Monitorings* bietet, dass zur Beantwortung der Frage jedoch ein sehr viel aufwendigeres *Setting* von Nöten ist: eine systematische Blutentnahme in z.B. folgenden Abständen: direkt nach der Operation; in einem mittleren Zeitraum (mehrere Stunden post operativ) und in einem langfristigen Zeitraum (mehrere Tage postoperativ). Fraglich bleibt ebenfalls welcher mögliche Mechanismus zum Tumorzell- „shedding“ führt: der mechanisch gesetzte Reiz und ein Persistieren, der unter der Operation abgescherten Tumorzellen oder vielleicht doch die Ausschüttung stressbedingter Hormone und Zytokine, die eventuell vorhandene dormante Tumorzellen aus ihrem „Winterschlaf“ reißen (Retsky *et al* 2008). Die Versuchsreihe verdeutlicht, dass die Ariol- Methode ein mögliches Werkzeug für oben genannte Fragestellungen ist, deren endgültige Abklärung ein umfassendes Versuchssetting benötigt, um die klinische Bedeutung zu untermauern.

Zum Dritten steht die Frage im Mittelpunkt, in wieweit ein Vorteil in der Anwendung oder den Ergebnissen der Ariol- Methode gegenüber denen der *Cell- Search-* Methode besteht.

Die anfangs diskutierten Ergebnisse zur Methodvalidierung am M1 Patientinnenkollektiv sowie die Erfahrungen, die sich aus dem Vergleich des M0 Kollektivs ziehen lassen, legen nahe, dass beide Methoden ihre spezifische Anwendbarkeit haben.

Der inhaltlich wohl am gravierendsten wirkende Unterschied der Methoden (der zusätzliche *Catcher* bei der Ariol- Methode, welcher gegen unterschiedliche Zytokeratine gerichtet ist), erweckt nach Auswertung der in dieser Studie erhobenen Daten den Anschein, am ehesten die Tumorzellausbeute bei Patientinnen in nicht metastasiertem Stadium der Erkrankung zu verbessern.

Methodisch weisen beide Aufarbeitungsmöglichkeiten unterschiedliche Profile auf: die *CellSearch-* Methode bedient sich vieler automatisierter Schritte, die Ariol- Methode hat das „offenere“ System, viele Schritte werden per Hand durchgeführt, was zum einen die Möglichkeit bietet relativ zügig Versuchsstrukturen bei Bedarf zu ändern, sowohl während der Aufarbeitung, als auch in der Hard- und Software innerhalb der Auswertungsphase, zum anderen aber auch den potenziellen systemischen Fehler erhöht. Beide Methoden ringen in Bezug auf die Auswertung des Bildmaterials, mit der Subjektivität, welche sich automatisch aus der Betrachtung durch den Untersucher ergibt. Ein Anlegen streng definierter Auswertungskriterien ist daher unerlässlich. Die Konzeption des Ariols trägt diesem Problem durch die zusätzlich Durchlichtmikroskopie und die Möglichkeit die Zellen nicht nur virtuell auf den Fotos, sondern auch real auf dem *Slide* durch das Mikroskop zu betrachten, Rechnung. Letztlich ist es wohl die Fragestellung, das Studiendesign oder im Allgemeinen das Anwendungsgebiet welches die Wahl des Werkzeuges, bzw. der Methode bestimmen sollte.

Durch die Flexibilität des Systems lässt sich das Ariol gut in der Forschung verwenden, ein Experimentieren mit den einzelnen Stellgliedern des Systems ist schnell und relativ leicht möglich. Für Studien mit großem Patientendurchsatz oder Einsätze im klinischen Alltag ist die *CellSearch*- Methode vermutlich geeigneter, und bereits vielfach genutzt (Riethdorf *et al.* 2007).

Weitere Aspekte die noch angesprochen werden sollten sind statistischer Natur: so beschäftigen sich z. B. die 2007 von Tibbe *et al.* veröffentlichten Überlegungen zur statistischen Auswertung von angereicherten *CTC* aus peripherem Blut im Rahmen der Etablierung eines neuen Anreicherungsverfahrens mit der Frage, ob die vormalig auf ein Minimum von 5 *CTC* festgelegte Schwelle zur Wertung des Patientenblutes als positiv, auf einen Schwellenwert von 1 *CTC* zu reduzieren sei. Basierend auf diesen Überlegungen sind in dieser Arbeit verschiedene Schwellenwerte angelegt und im Methodenvergleich berücksichtigt worden. Die Schwellenwerte ≥ 3 und ≥ 5 *CTC* im peripheren Blut ergaben ebenfalls eine signifikante Korrelation der beiden Methoden für das M1 Kollektiv. Letzlich wird eine *Follow Up*- Studie zeigen müssen, welcher Schwellenwert den größten prognostischen Wert hat.

Die Darstellung der einzelnen Parameter zur näheren Beschreibung der Patientinnenkollektive (TNM- Status etc.) dienten lediglich zur Darstellung der jeweiligen Patientinnen- (unter-) gruppe. Die statistische Auswertung der Daten und die Verknüpfung mit den *CTC*- Ergebnissen, für die einzelnen Gruppen wurde jeweils der Vollständigkeit wegen erhoben, sie zeigen in fast keinem Kollektiv einen statistischen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und *CTC*- Detektionsrate. Es muss aber letztlich angemerkt werden, dass die jeweiligen Untergruppen zu klein ausfielen. Bei entsprechender Fragestellung müsste jeweils die entsprechende Stichprobe gewählt und auf die *CTC*- Verteilung hin untersucht werden.

Das vierte Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden inwieweit die Ergebnisse der Ariol- Methode mit denen einer PCR-basierten Methode vergleichbar sind.

Die MM- RT PCR gilt als eines der sensitivstes Werkzeug zur Bestimmung des *CTC*- Status (Molloy *et al.* 2008) bei Brustkrebspatientinnen und sollte sowohl mit den Ergebnissen der *CellSearch*- als auch mit den Ergebnissen der Ariol- Methode korrelieren. Die PCR basierten Untersuchungen wurden ebenfalls mit Proben aus dem M1 Patientinnenkollektiv vorgenommen und sowohl mit der Ariol- als auch der *CellSeach*- Methode verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass bei den 10 gesunden Probanden, die untersucht wurden, mit keiner der angewandten Methoden Tumorzellen gefunden wurden. Die Detektionsrate für das M1 Kollektiv korrelierten signifikant zwischen *CellSearch*- und Ariol- Methode, unterschieden sich jedoch in den Detektionsraten zu Gunsten der Ariol- Methode, welche die höhere Rate aufwies. Die Ariol- Methode und die MM- PCR wiesen keine Korrelation auf. Die *CellSearch*- Methode und PCR wiesen ebenfalls keine Korrelation in dieser Kohorte auf, die Detektionsraten

unterschieden sich signifikant. In absoluten Zahlen gibt es innerhalb der 28 untersuchten Fälle 7 Übereinstimmungen innerhalb der drei angewandten Methoden: 2 positiv und 5 negativ.

Wie für die vorangegangenen Fragestellungen muss auch hier wieder zwischen biologischen und methodischen Ursachen für die abweichenden Ergebnisse gesucht werden: Biologisch auffällig ist sicherlich, dass Ariol- und *CellSearch*- Methode korrelieren, jeweils aber keine Korrelation mit der PCR aufweisen. Trotzdem man davon ausgehen kann, dass die MM- PCR in diesem Versuchsaufbau das empfindlichste Werkzeug darstellt, ermittelt die Ariol- Methode mit 57% die höchste Detektionsrate (zum Vergleich: *CellSearch*- Methode: 32%, MM- PCR: 54%). Erfreulicherweise werden von allen drei Methoden die gesunden Probanden als gesund eingestuft. Es ist nun fraglich, ob die verwendeten Targets bei der Aufarbeitung der Proben das Problem darstellen. Allen drei Methoden gemein ist, dass sie *EpCam* als Zielstruktur verwenden, da es sich im Falle der *CellSearch*- Methode hierbei sogar, um den einzigen *Catcher* handelt, sollte eigentlich anzunehmen sein, dass die PCR- Methode zumindest alle von *CellSearch* als positiv eingestuften Patientinnen ebenfalls als positiv wertet. Diese Beobachtung wurde ebenfalls nicht gemacht, es gibt durchaus Fälle in denen die *CellSearch*- Methode eine Patientin positiv wertet, die PCR hingegen nicht.

Es bleibt die Betrachtung des methodischen Vorgehens:

Methodisch ist sicherlich ein schwieriger Drei- Methoden Vergleich angestrebt worden, bei dem die dritte untersuchende Partei die notwendigen Untersuchungen in den Niederlanden vornehmen musste, so dass zusätzlich zu den vorherig beschriebenen störenden Einflussfaktoren der Probentransport in die Niederlande hinzukommt. Die verwendeten Proben stellten desweiteren lediglich einen Ausschnitt des eigentlichen Kollektivs dar.

Der von Molloy *et al.* beschriebende MM-PCR basierte Assay zur Detektion von *CTC* zeigte in einer 39 Personen umfassenden Stichprobe mit metastasierten Brustkrebspatientinnen eine Detektionsraten von 84% (Molloy *et al.* 2008), die Abweichung von den in dieser Studie untersuchten Patientengruppe (Detektionsrate 54%) ist auffällig. Die verzeichneten Abweichungen innerhalb der Methoden muss sorgfältig geprüft und immer wieder kritisch hinterfragt werden, um eine möglichst umfassende Detektion von *CTC* zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Die Detektion zirkulierender Tumorzellen wird aufgrund ihrer in der klinischen Anwendung mittels Blutentnahme einfachen Durchführung, als ein viel versprechendes Werkzeug zur Überwachung der Brustkrebskrankung gehandelt. Diese Arbeit vergleicht eine neue Methode (Ariol- Methode), deren Vorteil in der Tumorzellanreicherung mit zwei unterschiedlichen immunomagnetischen *Catchern* (Anti- *CK* Antikörper und Anti- *EpCam* Antikörper) liegt, mit einer bereits etablierten, *FDA*- akkreditierten Methode (*Cell-Search*- Methode), indem das Patientenblut aus zwei unterschiedlichen Patientenkollektiven (Patientinnen in metastasierter (n= 28) und in nicht metastasierter (n= 43) Situation) von beiden Methoden untersucht und deren Ergebnisse verglichen wurden. 28 Proben von M1 Patientinnen konnten zusätzlich mit einer *Multimarker Realtime PCR* untersucht und verglichen werden. Nach Durchführung dieses Methodenvergleichs wurde zusätzlich das Blut von 41 Patientinnen mit nicht metastasierten Tumoren nach der Tumorsektion untersucht, um die Frage zu beantworten, ob 24 Stunden post- OP noch Zellen epithelialen Ursprungs in relevanten Maße mit der Ariol- Methode nachweisbar sind.

Die Untersuchungsergebnisse der Ariol- und *CellSearch*- Methode zeigten eine signifikante Korrelation für die Patientinnen im M1 Stadium. Betrachtet man alle positiv getesteten Patientinnen fand die *CellSearch*- Methode 63% mehr *CTC*. Wiederholt untersuchte Patientinnen des M1 Kollektivs zeigten sowohl eine Abnahme, eine Zunahme als auch ein Gleichbleiben der Tumorzellzahlen, oft auch über einen langen Zeitraum (bis zu 207 Tagen) hinweg, ein Hinweis, dass die Ariol- Methode sich als Monitoringtool eignen könnte und für Fragestellungen in diesem Bereich denkbar wäre. Die im Drei- Methoden Vergleich untersuchten M1 Proben (inklusive gesunder Probanden) zeigten eine signifikante Korrelation zwischen Ariol- und *CellSearch*- Methode, jedoch nicht zu der MM- PCR. Die Untersuchungsergebnisse der vor der Operation untersuchten M0 Patientinnen zeigten keine signifikante Korrelation zwischen der Ariol- und *CellSearch*- Methode, die Detektionsraten wiesen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf. Im Vergleich der positiven Proben detektierte die Ariol- Methode 96% mehr *CTC* in dieser Stichprobe. Im Vergleich der absoluten Zellzahlen fand die Ariol- Methode innerhalb dieses Kollektivs (unabhängig, ob vor oder nach Operation) mehr *CTC*, was sie zu einem interessanten Werkzeug in der schwierigen Bearbeitung von Blutproben macht, die in nicht metastasierter Situation gewonnen werden. Abschließend konnte innerhalb des untersuchten Zeitfensters prä und post OP mit der Ariol- Methode kein signifikanter Anstieg von *CK* positiven Zellen epithelialen Ursprungs nachgewiesen werden. Insgesamt kann man schlussfolgern, dass die Ariol- Methode aufgrund ihres geringen Automatisierungsgrades und ihres leicht modulierbaren Anreicherungsprotokolls wegen, ein gutes Forschungstool darstellt. Die beiden hauptsächlich verglichenen Methoden weisen sicherlich jeweils Vorzüge gegenüber der anderen Methode auf.

7. Literaturverzeichnis

Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AGJ, Uhr JW, Terstappen LWMM (2004) **Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients with Nonmalignant Diseases.** *Clinical Cancer Research* 15: 6897-6904

Banys M, Krawczyk NH, Wallwieder D, Becker S, Solomeyer EF, Fehm T (2008) **Disseminierte und Zirkulierende Tumorzellen bei Patientinnen mit Mammakarzinom.** In:

57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe

Benoy ICH, Elst H, Van Dam P, Scharpe S, Van Marck E, Vermeulen PB, Dirix LY: **Detection of Circulating Tumour Cells in Blood by Quantitative Real-Time RT-PCR: Effect of Pre-Analytical Time,** *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 2006; 44; 1082-7

Bernards R & Weinberg A (2002) **A Progression Puzzle.** *Nature* 418: 823

Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, Diel I, Solomayer EF, Theoharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder E, Marolleau JP, Garcia J, Pantel K (1999) **Standardization of the Immunocytochemical Detection of Cancer Cells in BM and Blood. I. Establishment of Objective Criteria for the Evaluation of Immunostained Cells.** *Cytotherapy* 5: 377-388

Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CRM, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G, Cytokeratin (2000) **Positive Cells in the Bone Marrow and Survival of Patients with Stage I, II or III Breast Cancer.** *New England Journal of Medicine* 8: 525-533

Braun S, Vogl F, Naume B, Janni W, Osborne M, Coombes C, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K (2005) **A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer.** *New England Journal of Medicine* 353: 793-802

Brugger W, Bross K, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L (1994) **Mobilization of Tumour Cells and Hematopoietic Progenitor Cells into Peripheral Blood of Patients with Solid Tumors.** *Blood*: 83; 636-640

Camara O, Kavallaris A, Nöschel H, Rengsberger M, Jörke C, Pachmann K (2006) **Seeding of Epithelial Cells into Circulation During Surgery for Breast Cancer: The Fate of Malignant and Benign Mobilized Cells**. World Journal of Surgical Oncology 67: Epub

Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osbourne MP (1991) **Prediction of Early Relapse in Patients With Operable Breast Cancer by Detection of Occult Bone Marrow Metastasis**. Journal of Clinical Oncology 9: 1749-56

Cristofanilli M, Budd T, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller C, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM, Hayes D (2004) **Circulating Tumor Cells, Disease Progression and Survival in Metastatic Breast Cancer**. New England Journal of Medicine 351: 781-791

Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Metra J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW (2005) **Circulating Tumour Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer**. Journal of Clinical Oncology 23: 1420- 1430

Davis JW, Nakanishi H, Kumae VS, Bhakamkar VA, McCormack R, Fritsche HA, Handy B, Gornet T, Babaian RJ (2008) **Circulating Tumour Cells in Peripheral Blood Samples From Patients with Increased Serum Prostate Specific Antigen: Initial Results in Early Prostate Cancer**. Journal of Urology 179: 2187- 2191

Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF (2008) **Enrichment with Anti-Cytokeratin Antibodies Significantly Increases the Sensitivity for Circulating Tumor Cell Detection in Metastatic Breast Cancer Patients**. Breast Cancer Research 10: Epub

Effenberger KE, Eulenburg C, Borgen E, Bartowiak K, Grosser A, Synnestvedt M, Kaaresen R, Brandt B, Nesland JM, Pantel K, Naume B (2011) **Detection and Clinical Relevance of Early Disseminated Breast Cancer Cells Depend on Their Cytokeratin Expression Pattern**. Breast Cancer Research and Treatment 729-38

Elston CW, Ellis IO (1991) **Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer I. The Value of Histological Grade in Breast Cancer: Experience from a Large Study With Long-Term Follow-Up**. Histopathology 19: 403-410

Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E (2002) **Cytogenetic Evidence that Circulating Epithelial Cells in Patients with Carcinoma are Malignant**. Clinical Cancer Research 8: 2073- 2083

- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007) **Estimates of Cancer Incidence and Mortality in Europe 2006**. Annals of Oncology 18; 581-592
- Fidler IJ (2002) The Pathogenesis of Cancer Metastasis **The „Seed and Soil“ Hypothesis Revisted**. Nature Reviews Cancer 3: 1-6
- Fidler IJ, Kripke ML (1977) **Metastasis Results from Preexisting Variant Cells Within a Malignant Tumour**. Science 179: 49-54
- Harris L (2007) **American Society of Clinical Oncology 2007 Update of the Recommendations for thze Use of Tumor Markers in Breast Cancer**. Journal of Clinical Oncology 25: 5287- 5312
- Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL (1975) **Estrogen Control of Progesterone Receptor in Human Breast Cancer**. Endocrinology 103: 1742-1751
- Hu XC, Wang Y, Shi DR, Loo TY, Chow LWC (2003) **Immunomagnetic Tumor Cell Enrichment Is Promising in Detecting Circulating Breast Cancer Cells**. Oncology 64: 160-165
- Ignatiadis M, Sotiriou C (2008) **Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade**; Pathobiology 75: 104-111
- Janni W, Rack B, Schindelbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K(2005) **The Persitence of Isolated Tumour Cells in the Bone Marrow from Patients with Breast Carcinoma Predicts an Increased Risk for Recurrence**. Cancer 103: 884-891
- Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, Grunfeld E, Muss HB, Vogel VG, Halberg F, Somerfield MR, Davidson NE (2008) **American Society of Clinical Oncology 2006 Update of the Breast Cancer Follow-Up and Management Guidelines in the Adjuvant Setting**. Journal of Clinical Oncology 24: 5091-5097
- Klein CA, Schmidt- Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G (1999) **Comparative Genomic Hybridization, Loss of Heterozygosity and DNA Sequence Analysis of Single Cells**. Proceedings of the National Academy of Science USA 96: 4494-4499

Lakiewicz S, Rivero BG, Bocher O (2006) **Quantitative RT- PCR of disseminated Tumour Cells in Combination with Immunomagnetic Cell Enrichment.** Molecular Biotechnology 34:15- 27

Litinov SV, Velder MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warmaqar SO (1994) **Ep-CAM: A Human Epithelial Antigen is a Homophilic Cell- Cell Adhesion Molecule.** Journal of Cell Biology 125: 437- 446

Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C (2002) **Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase- Type Plasminogen Activator and its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients.** Journal of the National Cancer Institute; 94: 116-128

Meng S, Triphany D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J (2004)

Her- 2 Gene Amplification can be Acquired as Breast Cancer Progresses. Proceedings of the National Academy of Sciences in the USA: 9393-9398

Miksicek RJ, Myal Y, Watson PH, Walker C, Murphy LC, Leygue E (2002) **Identification of a Novel Breast- and Salivary Gland- Specific, Mucin- Like Gene Strongly Expressed in Normal and Tumor Mammary Epithelium.** Cancer Reseach 62: 2736- 2740

Moll R (1993) **Cytokeratins as Markers of Differentiation, Expression Profiles in Epithelia and Epithelial Tumors.** Pathologie 143: 1-197

Molloy TJ, Bosma AJ, van't Verer LJ (2008) **Towards an Optimized Platform for the Detection, Enrichment and Semi- Quantitation of Circulating Tumor Cells.** Breast Cancer Research and Treatment 112: 297- 307

Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T (1996) **Molecular Detection of Circulating Solid Carcinoma Cells in the Peripheral Blood: The Concept of Early Systemic Disease.** International Journal of Cancer 68: 739-743

Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K (2003) **Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Correlation to Bone Marrow Micrometastases, Heterogeneous Response to Systemic Therapy and Low Proliferative Activity**. *Clinical Cancer Research* 5: 3678- 3685

Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irima D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Diumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M (2007): **Isolation of Rare Circulating Tumour Cells inn Cancer Patients by Microchip Technology**. *Nature* 450: 1235- 1241

Naume B, Borgen E, Beiske K, Herstad TK, Ravnas G, Renolen A, Trachsel S, Thrane- Stehen K, Funderud S, Kvalheim G(1997) **Immunomagnetic Techniques for the Enrichment and Detection of Isolated Breast Carcinoma Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood**. *Journal of Hematotherapy* 6: 103- 104

Paget, S (1889) **The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast**, *Lancet*: 571-573

Pantel K, Braakenhoff RH (2004) **Dissecting the Metastatic Cascade**. *Nature* 4: 448- 456

Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008) **Detection, Clinical Relevance and Specific Biological Properties of Disseminating Tumor Cells**. *Nature Reviews Cancer* 8: 329-440

Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, GathH, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G (1994) **Methodological Analysis of Immunocytochemical Screening for Disseminated Epithelial Tumor Cells in Bone Marrow**. *Journal of Hematotherapy* 3: 165- 173

Payne SJR, Bowen RL, Jones JL, Wells CA (2008) **Predictive Markers in Breast Cancer- The Present**. *Histopathology* 52: 82-90

Pierga JY, Bonneton C, Vincent- Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thierry JP, Magdelenat H (2004) **Clinical Significance of Immunocytochemical detection of Tumor Cells Using Digital Microscopy in Peripheral Blood and Bone Marrow of Breast Cancer Patients**. *Clinical Cancer Research* 10: 1392- 1400

- Polascik TJ, Wang ZP, Shue M, Di S, Gurganus RT, Hortopan SC, Tsò PO, Partin AW (1999) **Influence of Sextant Prostate Needle Biopsy or Surgery on the Detection and Harvest of Intact Circulating Prostate Cancer Cells.** Journal of Urology 162: 749- 752
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW (1998) **Detection and Characterization of Carcinoma Cells in the Blood.** Proceedings of the National Academy of Science in the USA 95: 4589-4594
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR (2002) **A Molecular Signature of Metastasis in Primary Solid Tumors.** Nature Genetics 33: 49-54
- Ravdin PM, green S, Dorr TM (2003) **Prognostic Significance of Progesterone Receptor Levels in Estrogen Receptor-Positive Patients with Metastatic Breast Cancer Treated with Tamoxifen: Results of a Prospective Southwest Oncology Group Study.** Journal of Clinical Oncology: 21 1284-1291
- Regierer A.C., Possinger K (2005) **Mammakarzinom- Manual Diagnostik und Therapie.** Deutscher Ärzteverlag 2005: 19-28
- Retsky MW, Demicheli R, Hrushesky WJM, Baum M, Gukas ID (2008) **Dormancy and Surgery- Driven Escape from Dormancy Help Explain Some Clinical Features of Breast Cancer.** Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica scandinavica 116: 730- 741
- Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindelbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Critofanilli M, Pantel K (2007) **Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the *CellSearch* System.** Clinical Cancer Research 13: 920- 982
- Riethdorf S, Pantel K (2008) **Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow and Circulating Tumor Cells in Blood of Breast Cancer Patients: Current State of Detection and Characterization.** Pathology 75: 140- 148
- Ring AE, Zabalgo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowset (2005) **Detection of Circulating Epithelial Cells in the Blood of Patients with Breast Cancer: Comparison of Three Techniques.** British Journal of Cancer 92: 906- 912

Rio MC, Bellocq JP, Daniel JY, Tomasetto C, Lathe R, Chenard MP, Batzenschlager A, Chambon P (1988) **Breast Cancer- Associated pS2 Protein: Synthesis and Secretion by Normal Stomach Mucosa**. Science 247: 705-708

Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2008) **Krebs in Deutschland 2005/ 2006 Häufigkeiten und Trends, 7. Überarbeitete Auflage**

Rolle A, Günzel R, Pachmann U, Willen B, Höffken K, Pachmann K (2004) **Increase in Number of Circulating Disseminated Epithelial Cells After Surgery for Non Small Cell Lung Cancer Monitored by MAINTRAC→ is a Predictor for Relapse: A Preliminary Report**. World Journal of Surgical Oncology 18: Epub

Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE, Sweet D (1993) **Detection and Viability of Tumor Cells in Peripheral Blood Stem Cell Collections from Breast Cancer Patients Using Immunohistochemical and Clonogenetic Assay Techniques**. Blood 82: 2605-2610

Schmidt- Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJF, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Müller P, Bischoff J, Harich M, Schlimok G, Riethmüller G, Eils R, Klein CA (2003) **From Latent Disseminated Cells to Overt Metastasis: Genetic Analysis of Systemic Breast Cancer Progression**. Proceedings of the National Academy of Science in the USA 100: 7737-42

Shipistsin M, Polyak K (2008) **The Cancer Stem Cell Hypothesis: in Search of Definitions, Markers and Relevance**. Laboratory Investigations 88: 459- 463

Statistisches Bundesamt (2008/2009) **Todesursachen in Deutschland Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen, Fachserie 12 Reihe 4**

Sieuwarts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, Martens JWM, Gratama J-W, Sleijfer S, Foekens JA (2009) **Anti- Epithelial Cell Adhesion Molecule Antibodies and the Detection of Circulating Normal- Like Breast Tumor Cells**. Journal of the National Cancer Institute 61-66

- Slade MJ Payne R, Riethdorf S, Ward B, Zaidi SA, Stebbing J, Palmieri C, Sinnett HDPitfield T, McCormack RT, Pantel K, Coombes RC (2009) **Comparison of Bone Marrow, Disseminated Tumour Cells and Blood- Circulating Tumour Cells in Breast Cancer Patients After Primary Treatment.** Journal of Breast Cancer 160-6
- Strieber P, Untch M, Heinemann V, Ebeling F, Sauer H (2004) **Praxisrelevante und Evidenz- basierte prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom** In Untch M, Sittek H, Bauerfeind I, Reiser M, Hepp H (Hrsg) **Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms State of the Art 2004.** W. Zuckerschwerdt Verlag S 309- 326
- Strieber P, Untch M, Heinemann V, Ebeling F, Sauer H (2004) **Tumormarker beim Mammakarzinom- welche sind wann und unter welchen Voraussetzungen sinnvoll?** In Untch M, Sittek H, Bauerfeind I, Reiser M, Hepp H (Hrsg) **Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms State of the Art 2004.** W. Zuckerschwerdt Verlag S 667-685
- Swabata N, Okumura M, Utsumi T, Inoue M, Shiono H, Miniami M, Nishida T, SawaY (2007) **Circulating Tumour Cells in Peripheral Blood Caused By Surgical Manipulation of Non- Small Cell Lung Cancer: Pilot Study Using ImmunoCytology Method.** General Thoracic Cardiovascular Surgery 55: 189-192
- Taubert H, Blümke K, Bilkenroth U, Meye A, Kutz A, Bartel F, Lautenschläger C, Ulbricht EJ, Nass N, Holzhausen HJ, Koelbl H, Lebrecht A (2004): **Detection of Disseminated Tumor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer: Correlation to Nodal Status and Occurance of Metastases.** Gynecologic Oncology 92: 256-261
- Theisinger B, Seitz G, Dooley S, Welter C (1996) **A Second Trefoil Protein, ITF/hP1b, is Transcribed in Human Breast Cancer.** Breast Cancer Research and Treatment 83: 145- 51
- Thurm, H, Ebel S, Kentenich, C Hensen A, Riethdorf S, Coith C, Wallwiener D, Braun S, Oberhoff C, Jänicke F, Pantel K (2003) **Rare Expression of Epithelial Cell Adhesion Molecule on Residual Micrometastatic Breast Cancer Cells After Adjuvant Chemotherapy.** Clinical Cancer Research: 2598- 604
- Tibbe AGJ, de Grooth BG, Greve J, Dolan GJ, Rao C, Terstappen LWMM (2002) **Magnetic Field Design for Selecting and Aligning Immunomagnetic Labeled Cells.** Cytometry 47: 163- 172

Tibbe AGJ, Miller MC, Terstappen WMM (2007) **Statistical Considerations for Enumeration of Circulating Tumor Cells.** Cytometry Part A 71A: 154- 162

Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijer MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Peterse HJ, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts Cm Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2001): **Gene Expression Profiling Predicts Clinical Outcome of Breast Cancer.** Nature 415: 530- 536

Vincent-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY (2008) **Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer: Review of Detection Methods, Prognostic Impact and Biological Issues.** Journal of Clinical Pathology 5: 570-576

Watson MA, Fleming TP (1996) **Mammaglobin, a Mammary- Specific Member of the Uteroglobin Gene Family, is Overexpressed in Human Breast Cancer.** Cancer Research 56:

860- 865

Weckermann D, Polzer B, Ragg T, Blana A, Schlimok G, Arnholdt H. Bertz S, Harzmann R, Klein CA (2009) **Periopertative Activation of Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow of Patients with Prostate Cancer.** Journal of Clinical Oncology 27: 1549-1556

Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, Rodenhuis S, van't Veer LJ (2003) **Marker Genes for Circulating Tumour Cells Predict Survival in Metastasized Breast Cancer Patients.** Journal of Breast Cancer 88: 1091- 1094

Wiedswang G, Borgen E., Karessen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B (2003) **Detection of Isolated Tumor Cells in Bone Marrow Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer.** Journal of clinical Oncology 18:

3469-3478

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B (2004) **Isolated Tumor Cells in the Bone Marrow Three Years After Diagnosis in Disease- Free Breast Cancer Patients Predict Unfavourable Clinical Outcome.** Clinical Cancer Research 10: 5342-5348

Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Naume (2006) **Comparison of the Clinical Significance of Occult Tumor Cells in the Blood and Bone Marrow in Breast Cancer.** International Journal of Cancer 118: 2013-2019

Willipinski- Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, Heukeshoven J, Pantel K. (2005) **Changes in Cytoskeletal Protein Composition Indicative of an Epithelial- Mesenchymal Transition in Human Micrometastatic and Primary Breast Carcinoma Cells.** Clinical Cancer Research: 8006-14.

Wulfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L, Brandt B (2006) **Her-2- positive Circulating Tumour Cells Indicate Poor Clinical Outcome in Stage I to III Breast Cancer Patients.** Clinical Cancer Research 12: 1715-1720

8. Abkürzungsverzeichnis

Anti-EpCam	Anti Epithelian Adhesion Molecule
AK	Antikörper
APAAP	Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase
BK	Brustkrebs
CA	Karzinom
CA 15-3	Cancer Antigen 15-3
CEA	Carcinoembrionic Antigen
CK	Cytokeratin
CTC	Zirkulierende Tumorzellen
DAPI	4'6- diamino-2-phenylindole
DTC	Disseminierte Tumorzellen
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline
ENCR	European Network of Cancer Registries
EGP-2	Epitheliales Glykoprotein 2
FDA	Food and Drug Administration of the USA
ICD 10	International Classification of Diseases Vol. 10
LJ	Lebensjahre
M0	Patient/-in ohne bekannte Fernmetastasen (TNM)
M1	Patient/-in mit bekannter/-n Fernmetastase/-n (TNM)
MACS	Magnetic Cell Separation/ Metallic Matrix-Assisted Cell Sorting
MM- PCR	Multimarker - PCR
NKI	Netherlands Cancer Institute, Amsterdam
OT	Objektträger
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor- 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLL	Poly-L-Lysin
RKI	Robert Koch Institut
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time Polymerasekettenreaktion
SBEM	Samll Breast Epithelial Mucin
SLN	Sentinel Lymph Node
TNM	Tumor, Nodus (Lymphknotenbefall), (Fern-) Metastasierung
uPA/R	Urokinase Plasminogen Aktivator/ Rezeptor

Danksagung

Herrn Professor Dr. K. Pantel, Direktor des Instituts für Tumorbologie des Zentrums für Experimentelle Medizin der Universitätsklinik Hamburg- Eppendorf, danke ich für die Überlassung des Themas, die umsichtige wissenschaftliche Unterstützung, und die Bereitstellung der Räumlichkeiten.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner Betreuerin Dr. K. Harms- Effenberger für die sehr gute Betreuung und unermüdliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Außerdem Danke ich Dr. S. Riethdorf für ihren Rat und die freundliche Bereitstellung der *CellSearch* Vergleichsdaten. Dr. T. Molloy vom Netherlands Cancer Center in Amsterdam danke ich dafür, seine Daten ebenfalls zum Vergleich hinzugezogen haben zu dürfen. C. Coith, S. Schwentesius und S. Hoppe aus dem Institut für Tumorbologie danke ich für die vielen Ratschläge und das nette Arbeitsklima im Labor.

Für die Hilfe und den großen Einsatz bei der statistischen Auswertung der Daten möchte ich mich gerne bei Christine Gräfin zu Eulenburg aus dem Institut für Biometrie und Epidemiologie der Universitätsklinik Eppendorf bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch PD Dr. V. Müller, Dr. J. Zeitz und Antje Keller aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für ihren unermüdlichen Einsatz und die Bereitstellung der Patientenproben- und -daten.

Diese Arbeit wurde durch Forschungsmittel der Firma Genetix aus San Jose (USA) ermöglicht, mein Dank gilt besonders Dr. G. Deng und Dr. J. Burke (Genetix).

Abschließend möchte ich Monika, Jens und Oliver Kohlmorgen danken; ohne die Hilfe, Fürsorge und Geduld meiner Familie hätte ich diese Arbeit sicherlich nicht anfertigen können- Ich danke Euch dafür und für vieles mehr

Lebenslauf

Name:		Britta Kohlmorgen
Geburtsdatum:		09.06.1984
Geburtsort:		Offenbach a.M.
Abitur:	2000-2003	Gesamtschule Walddörfer
Universität:	2004- 2010	Universität Hamburg Studium der Humanmedizin
Dissertation:	seit Nov 2007	Doktorandin Institut für Tumorbiologie Zentrum für experimentelle Medizin Uniklinikum Hamburg Eppendorf
Praktisches Jahr:	Aug- Sep 2009	Asklepios Klinik Wandsbek, Hamburg Unfallchirurgie
	Okt- Dez 2009	Mater Dei Hospital, Malta Allgemeinchirurgie
	Dez 2009- Jan 2010	Royal London Hospital, London GB Innere Medizin/ Nephrologie
	Jan - März 2010	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf Innere Medizin /Hämato- Onkologie
	März- Juli 2010	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf Wahlfach: Anästhesiologie
Berufserfahrung:	Juli 2007- Okt 2009	Evangelisches Krankenhaus Alsterdorf studentische Hilfskraft
	Okt 2008- Feb 2009	Institut für Tumorbiologie, UKE studentische Hilfskraft
	seit Jan 2011	Westküstenklinikum Heide Assistenzärztin Innere Medizin
Auslandserfahrung:	Okt 2003- Juni 2004	Work and Travel Programm, Australien

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln, nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: