

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Tumorbiologie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Untersuchungen zur Wertigkeit von EGFR und ERBB2 als Detektionsmarker für zirkulierende Tumorzellen beim metastasierenden Mammakarzinom mit mesenchymalem Phänotyp

Dissertation

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

vorgelegt von:

Yasmina El-Bekkai
aus Cuxhaven

Hamburg 2017

Doktorvater: Prof. Dr. med. Klaus Pantel
Wissenschaftliche Betreuung: Dr. Simon A. Joosse

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.03.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Klaus Pantel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ingo Müller

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2 Risikofaktoren	2
1.3 Histopathologie.....	2
1.4 Staging des Mammakarzinoms	3
1.5 Grading.....	6
1.6 Pathologische Marker	6
1.7 Molekulargenetische Differenzierung von Mammakarzinomen	9
1.7.1 Auswirkungen der genetischen Subtypen auf Wachstumsverhalten von Tumoren.....	11
1.8 Metastasierung des Mammakarzinoms.....	12
1.9 Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms	15
1.10 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)- Bedeutung als prognostischer Marker	19
1.11 CTC Detektionsmarker	21
2. Arbeitsansatz und Fragestellung	25
3. Methoden	26
3.1 Vorversuch mit EGFR bzw. ERBB2 positiven Zelllinien.....	26
3.1.1 Separierung der mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugierung...	26
3.1.2 Zellkultur.....	27
3.1.3 Westernblot.....	28
3.2 Hauptversuch	30
3.2.1 Patientenakquirierung und Probengewinnung	30
3.2.2 Magnetische Zellseparation	30
3.2.3 Antikörper.....	31
3.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie	32
3.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung	33
3.2.6 Analyse der Objektträger	33
4. Material	34
4.1. Zellkultur	34
4.2 Western Blot	35

4.2.1 Feststoffe	35
4.2.2 Lösungen	36
4.3 Aufarbeitung der Patientenproben.....	38
4.3 Material magnetische Zellseperation	39
4.4 Immunzytochemische Färbung und Analyse	40
5. Ergebnisse.....	41
5.1. Gesamtergebnisübersicht	41
5.2 Ergebnisse der Zelllinienversuche.....	41
5.3 Proof of Principle bei triple negativen Patienten.....	45
5.4 Ergebnisse des Hauptversuchs.....	47
5.4.1 klinische Parameter und CTC-Ausbeute des Patientenkollektivs.....	47
5.4.2 Metastasierung.....	51
5.4.3 Grading	51
5.4.4 ERBB2	52
5.4.5 Anstieg/Abfall der CTC-Anzahl im Verlauf.....	52
6. Diskussion	58
6.1 Ergebnisbetrachtung.....	59
6.1.1 Vergleich mit Literatur Detektionsraten.....	59
6.1.2 Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTCs und dem Staging.....	61
6.1.3 Vergleich der CTC-Detektion	62
6.1.4 Korrelation des CTC Verlaufs mit dem Krankheitsverlauf	63
6.2 Limitationen und methodische Einschränkungen	65
6.2.1 Probenvolumen	65
6.2.2 Probenmenge	66
6.2.3 Wiederfindungsrate	66
6.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie	67
6.3 Ausblick.....	69
6.4 Fazit	71
7. Zusammenfassung	73
8. Summary.....	75
9. Anhang.....	77

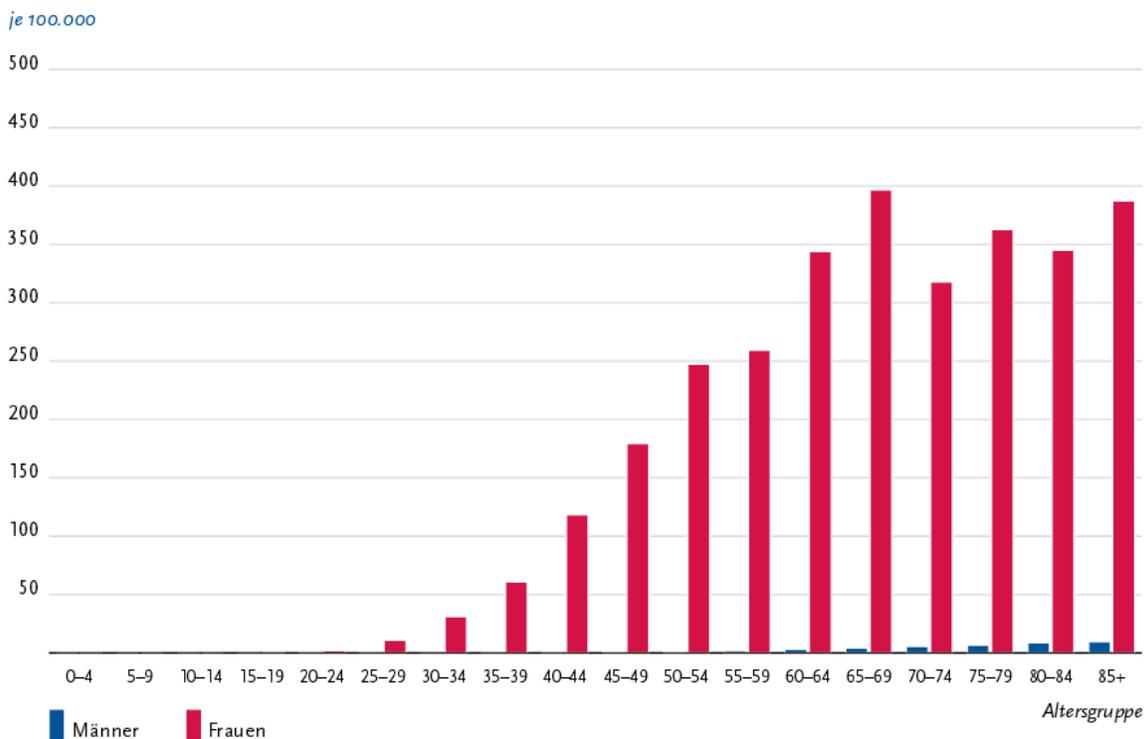
9.1. Abkürzungsverzeichnis.....	77
9.2. Abbildungsverzeichnis.....	78
9.3. Tabellenverzeichnis	79
9.4 Literaturverzeichnis.....	80
9.5 Bilderquellen	89
10. Danksagung	90
11. Lebenslauf.....	92
12. Eidesstattliche Versicherung.....	94

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist mit 70.000 Neuerkrankungen jährlich die häufigste maligne Erkrankung der Frau, an dessen Folgen jedes Jahr in Deutschland etwa 17.000 Frauen und 500 Männer versterben (RKI, 2013). Bei Frauen im mittleren Alter (35-55 Jahre) stellt das Mammakarzinom sogar die häufigste Todesursache in der westlichen Welt dar und ist für rund 20% aller Krebstodesfälle bei Frauen verantwortlich (Kreienberg et al., 2006). Jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens und ist dabei im Durchschnitt 64 Jahre alt, wobei jede zehnte sogar unter 45 Jahren erkrankt (RKI, 2013). Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate beträgt hierbei im Mittel 79 % und ist stark vom Tumortyp und Metastasierung abhängig.

Abbildung 1 Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht, ICD-10 C50, Deutschland 2011 – 2012 je 100.000



Quelle: Krebs in Deutschland 2011/2012 (RKI, 2015)

1.2 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer malignen Neoplasie der Brust gelten grundsätzlich eine positive Familienanamnese und die Länge der Exposition gegenüber Östrogenen, da wie das gesunde Brustgewebe auch das Mammakarzinom durch Östrogene hormonell stimuliert wird. Deshalb korrelieren das Auftreten von einer frühen Menarche und späten Menopause, sowie Nulliparität, Adipositas und das Alter der Patienten, mit dem Brustkrebsrisiko (Yue et al, 2003). Protektiv wirken hingegen Multiparität und lange Stillperioden. Die hereditäre Form des Brustkrebses wird durch zahlreiche verschiedene Mutationen in verschiedenen Genen verursacht. Rund 5% der an Brustkrebs erkrankten Patienten haben eine Mutation in dem Tumorsuppressorgen *BRCA1* oder *BRCA2* (Breast Cancer gene), welche autosomal-dominant an 50% der Nachkommen vererbt wird. Meist im mittleren Erwachsenenalter (nach im Mittel 45 Jahren) kann es nach Inaktivierung des Wildtypallels in einer Zelle des Brustgewebes, zur Tumorinitiation kommen (Kreienberg *et al.*, 2006). Wichtig für die Detektion dieser Patienten ist eine möglichst vollständige Erfassung der Familienanamnese in Bezug auf Krebsleiden und eine anschließende humangenetische Beratung mit ggf. molekulargenetischer Untersuchung.

1.3 Histopathologie

Die Prädilektionsstelle des Mammakarzinoms ist mit 55% der obere äußere Quadrant, gefolgt vom oberen inneren Quadranten bzw. retro-aureolären Bereich (15%) und dem unteren äußeren Quadranten (10%). Dabei tritt es meist einseitig und bevorzugt auf der linken Seite auf. Es wächst in bis zu 25% der Fälle multizentrisch und Zweitkarzinome lassen sich in bis zu 10% in der kontralateralen Brust finden (Bühling et Friedmann, 2009). Histopathologisch ist das Mammakarzinom in 95% ein Adenokarzinom. Prognostisch günstigere Sonderformen stellen das muziöse, medulläre und tubuläre Karzinom dar die mit insgesamt ca. 2% der Fälle aber eine untergeordnete Rolle spielen (Böcker *et al.*, 2012). Weiterhin lassen sich non-invasive Präkanzerosen (Carcinoma in Situ) und invasive Karzinome unterscheiden. Das häufigste invasive Karzinom ist in 80% der Fälle, dass sich aus den Drüsen-

gängen entwickelnde duktales Karzinom, welches häufig aus einem duktalem Carcinoma In Situ (DCIS) entsteht. In 20% der Fälle entwickeln sich die Tumorzellen aus den Drüsenläppchen zu einem invasiven lobulären Karzinom, die sich mit bis zu 80% häufiger multizentrisch manifestieren als das duktales Karzinom (Böcker *et al.*, 2012). Die beiden Präkanzerosen oder Carcinoma In Situ DCIS (95%) und LCIS (5%) unterscheiden sich von den invasiven Formen durch ihr Unvermögen die Basalmembran zu überschreiten und zu metastasieren und können sich ab einer bestimmten Ausdehnung radiologisch als Mikrokalk manifestieren.

1.4 Staging des Mammakarzinoms

Für die Therapieentscheidung und Prognoseabschätzung ist es äußerst relevant genau über die Größe, Infiltration und mögliche Filialisierung des Tumors Kenntnis zu erhalten.

Die Grundlage für den in Deutschland geltenden Standard bezüglich der Klassifikation von Tumorstadien stellt die seit 1997 geltende TNM Klassifikation der französischen „Union Internationale Contre le cancer“ (UICC) dar, mit der auch die für diese Arbeit beurteilten Karzinome vom pathologischen Institut der Universität Hamburg-Eppendorf klassifiziert wurden. Das T-Stadium bezieht sich auf die Ausdehnung des Primärtumors und reicht von Tis (Carcinoma in situ) bis T4d (inflammatorisches Karzinom). Dabei korreliert die Tumorgöße statistisch signifikant mit dem regionären Lymphknotenbefall und der Überlebensrate der Patienten (Carter *et al.*, 1989). Das N-Stadium bezieht sich auf das Vorhandensein von Metastasen in regionären Lymphknoten. So sinkt das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der Zahl der betroffenen axillären Lymphknoten (Kreienberg *et al.*, 2006). Das M-Stadium beschreibt das Vorhandensein von Fernmetastasen und ist mit einem drastischen Abfall der 5-Jahres- Überlebensrate verbunden.

Zur Unterscheidung zwischen klinischem und pathologischem Staging werden die Präfixe p und c verwendet und die Suffixe sn, i und mol beschreiben das Nachweisverfahren (Sentinel Lymphknotentechnik, immunhistochemie oder Real-Time PCR). Die Einteilung der Er-

krankung in Krankheitsstadien erfolgt basierend auf der TNM-Klassifikation und erleichtert eine Prognoseabschätzung und Therapieplanung (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 TNM Klassifikation des Mammakarzinoms

Bezeichnung	Bedeutung
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	(DCIS) duktales Carcinoma in situ (LCIS) lobuläres Carcinoma in situ (Paget's) Morbus Paget
T1	Tumor von ≤ 20 mm Größe
T1mic	Mikroinvasiv von 1 mm oder weniger
T1a	> 1 mm bis 5 mm
T1b	> 5 mm bis 10 mm
T1c	> 10 mm bis 20 mm
T2	Tumor > 20 mm bis 50 mm
T3	Tumor > 50 mm
T4	Tumor jeder Größe, mit direkter Ausdehnung zur a) Brustwand oder b) Haut
T4a	Ausdehnung zur Brustwand (nicht ausschließlich auf die Pektoralismuskulatur)
T4b	Mit Ödem der Haut, Ulzeration der Haut oder Satellitenmetastasen der Haut der ipsilateralen Brust
T4c	Beide Kriterien aus T4a und T4b
T4d	Inflammatorisches Karzinom
pNx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Lymphknotenmetastase in 1-3 ipsilaterale Lymphknoten oder mikroskopische Metastasen im Sentinellymphknoten
N1mic	Mikrometastasen 0,2mm- 2 mm
N1a	Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten (> 2mm)
N1b	Lymphknoten entlang der Arteria thoracica interna mit mikroskopischer Metastase im Sentinallymphknoten
N1c	Vorliegen von N1 a und N1 b ipsilateral
N2	Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten oder Entlang der A. thoracica interna
N2a	Lymphknotenmetastase in 4-9 Lymphknoten (min. eine eine >2mm)

N2b	Lymphknotenmetastasen im Abflussgebiet der A. thoracica interna auch bei fehlender axillärer Beteiligung
N3	Lymphknotenmetastase in > 10 Lymphknoten im Abflussgebiet der A. Thoracica interna, oder ipsilateralen infraclaviculären Lymphknotenmetastasen
N3a	Lymphknotenmetastase > 10 Lymphknoten oder Metastasen in infraclaviculären Lymphknoten
N3b	Klinische Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten der A. Thoracica interna und 1-3 axilläre oder in mehr als 3 axillären Lymphknoten und Metastasen in Sentinel Lymphknoten der A. thoracica interna
N3c	Metastasen in ipsilateralen supraclaviculären Lymphknoten
Mx	Fernmetastasen nicht klassifiziert
M0	Keinen klinischen oder radiologischen Anhalt für Fernmetastasen
cM0(i+)	Keinen klinischen oder radiologischen Anhalt für Fernmetastasen, aber molekular oder mikroskopisch Nachgewiesene Tumorzellen im Blut, Knochenmark oder nichtregionären Lymphknoten (< 0,2 mm) in einem Patienten ohne klinische Symptomatik
M1	Fernmetastase (> 0,2 mm)

Nach: Management des Mammakarzinoms, Kreienberg *et al.*, 2006; und American Joint Committee on Cancer „Breast Cancer staging“, 2009

Tabelle 2 Tumorstadien nach UICC für das Mammakarzinom

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen	5-JÜR
0	Tis	N0	M0	99%
I	T1mic	N0	M0	92%
	T1a (1 - 5 mm)	N0	M0	
	T1b (6 - 10 mm)	N0	M0	
	T1c (11 - 20 mm)	N0	M0	
IIA	T0, T1mic, T1	N1	M0	82%
	T2	N0	M0	
IIB	T2	N1	M0	65%
	T3	N0	M0	
IIIA	T0, T1mic, T1, T2	N2	M0	47%
	T3	N1	M0	
IIIB	T4	N0 - 2	M0	44%
IIIC	alle T	N3	M0	
IV	alle T	alle N	M1	14%

Nach: Harrison's Principles of Internal Medicine, Longo *et al.*, 2005

1.5 Grading

Um eine Pathogenitätsbestimmung vorzunehmen, werden die Tumorzellen anhand von morphologischen und strukturellen Eigenschaften und der Mitoserate in drei Malignitätsgrade (Gradings) eingeteilt. Dabei gelten Tumorzellen die den Ursprungszellen morphologisch noch sehr ähneln als gut differenziert und wachsen sehr langsam und wenig aggressiv (G1). Tumorzellen die kaum noch Ähnlichkeit mit dem Ursprungsgewebe haben, gelten als undifferenziert und wachsen schnell und führen zu einem besonders aggressiven Krankheitsverlauf (G4) (Bloom et Richardson, 1957). Für die Prognoseabschätzung bedeutet dies, je höher das Grading der Tumorzellen, umso aggressiver der Verlauf der Erkrankung.

1.6 Pathologische Marker

Ki-67

Als pathologischer Marker hat sich in den letzten Jahren der Proliferationsmarker Ki-67 bzw. der Ki-67-Labeling-Index (LI) etabliert. Das nukleäre Protein Ki-67 wird nur in proliferierenden Zellen exprimiert und der Anteil proliferierender Zellen wird mittels immunhistochemischen Methoden bestimmt. Dabei zeigt sich eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe der Ki-67 Expression (über 10%) und der proliferativen Aktivität des Tumors (Scholzen et Gerdes, 2000).

So zeigen die Studien von Lux *et al.* und Inwald *et al.*, deutliche Korrelationen zwischen Ki-67-Index und einem reduzierten Krankheitsfreien- (DFS) und Gesamtüberleben (OS) sowohl bei nodal-positiven als auch bei nodal-negativen Mammakarzinompatienten. Die prognostische Bedeutung der Messung des Ki-67 Status beim Mammakarzinom, wird zwar von vielen Studien belegt, jedoch verhindern unterschiedliche Analysemethoden und fehlende Auswertungsstandardisierung eine ausreichende Vergleichbarkeit der Studienergebnisse, weshalb sie weder in die nationalen (S 3-Leitlinien) noch in die internationalen (ASCO) Leitlinien als Empfehlung von Routinebiomarkern aufgenommen wurden (Yerushalmi *et al.*, 2010).

Östrogenrezeptorstatus

Die Bedeutung des Östrogen und Progesteronrezeptorstatus für die Prognose des Mammakarzinoms wurde erstmals 1977 von Knight *et al.* untersucht. Er gehört heute zu den bedeutendsten etablierten Prognosemarkern und wird standardmäßig immunhistochemisch im Tumorgewebe nachgewiesen. Es hat sich gezeigt, dass neben der qualitativen Diagnose (ER+ vs. ER-), die Ergänzung von quantitativen Scores genauere Aussagen bezüglich der Prognose erlauben. Um eine Indikation für eine endokrine Therapie zu stellen, müssen mindestens 10% der Zellkerne im Tumorpräparat Östrogen-positiv sein (Goldhirsch *et al.*, 2005). Die ASCO empfiehlt hingegen schon die Einstufung als Positiv bei mindestens 1% positiver Tumorzellkerne (Hammond *et al.*, 2010). Die genutzten Cut-off –Werte basieren jedoch nicht auf der funktionellen Aktivität des Östrogen Signalweges, nichtsdestotrotz lassen sich signifikante Korrelationen zwischen Ansprechraten der endokrinen Therapie und der Stärke der ÖR- Expression finden (Bartlett *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2011). Die Auswertung erfolgte bei den in dieser Arbeit berücksichtigten Daten anhand des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner, bei dem ein Produkt aus der Färbeintensität und dem Prozentsatz der Hormonrezeptor positiven Zellkerne gebildet wird (Remmele et Stegner, 1987). Eine Punktezahl unter 3 wird als negativer Hormonrezeptor-Status gewertet, ein Score von 3 oder größer gilt als positiver Hormonrezeptor-Status.

Tabelle 3 Immune reactive score; Immunhistochemischer Hormonrezeptornachweis

Anzahl der positiven Zellkerne		Färbeintensität	
0 positive Kerne	0 Punkte	keine	0 Punkte
<10% pos. Kerne	1 Punkt	schwache	1 Punkt
10 - 50%	2 Punkte	mäßige	2 Punkte
51 - 80%	3 Punkte	starke	3 Punkte
> 80%	4 Punkte		
Bewertung des immunreaktiven Scores (IRS=SI * PP)			Score
negativ			0-2
positiv			3- 12

Nach: Remmele et Stegner, 1987

Der 1986 von McCarthy entwickelte H-Score hingegen differenziert 300 Scoring- Stufen (McCarthy *et al.*, 1986). Bestimmt wird der H-Score über die Bildung des Produktes aus den Prozentsätzen der jeweiligen Färbeintensitätsstufe mit einem Faktor der die Intensität der Färbung widerspiegelt (1 für schwach, 2 mittelmäßig und 3 für stark).

Tabelle 4 H-Score; semiquantitativer immunohistochemischer Score

H-Score	
% Zellen mit schwacher Färbung x 1 +	Höchst-Score: 300 0 - 50 negativ 51 - 100 schwach positiv 101 - 200 mäßig positiv 201 - 300 stark positiv
% Zellen mit mittlerer Färbung x 2 +	
% Zellen mit starker Färbung x 3	

Nach: McCarthy *et al.*, 1986

Der heutzutage international meistetablierte Score ist der Total Score nach Allred, bei dem die Summe aus Färbeintensität und dem Anteil der positiven Zellkerne gebildet wird und einen score von 0-8 Punkten ergibt (Fernö *et al.*, 1996).

Tabelle 5 Allred-Score; Score nach Färbeintensität

Anzahl der positiven Zellkerne		Färbeintensität	
keine positiven Kerne	0 Punkte	keine Färbung	0 Punkte
< 1% positive Kerne	1 Punkt	schwache Färbeintensität	1 Punkt
1 -10%	2 Punkte	mäßige Färbeintensität	2 Punkte
11-33%	3 Punkte	starke Färbeintensität	3 Punkte
34-66%	4 Punkte		
>66%	5 Punkte		

Nach Meden, 2009

Die Prognose ist bei hormonrezeptorpositiven Tumoren deutlich günstiger, u.a. wurde für diese Patienten ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben nachgewiesen (Pfeiderer *et al.*, 2007; Jänicke et. Müller, 2006). Gerade nach dem Auftreten von Metastasen beim Mammakarzinom, stellt der Hormonrezeptorstatus den stärksten Prognosefaktor für die

Dauer der Überlebenszeit des Patienten (Jänicke et Müller, 2006). Zudem ist die Bestimmung auch äußerst relevant für die Therapieentscheidung, da sie entscheidet ob der Patient für eine antihormonelle Therapie durch Östrogenrezeptor-modulatoren oder Aromatasehemmer in Frage kommt. Für junge Frauen unter 35 Jahren ist der positive Hormonrezeptorstatus unabhängig vom Grading des Tumors mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Walker *et al.*, 1996). Erklärt wird das Phänomen durch eine insuffiziente anti-Hormontherapie hervorgerufene persistierende Ovarialfunktion (Jänicke et Müller, 2006).

ERBB2

Rund 20-30% aller invasiven Mammakarzinome zeigen eine Überexpression des Onkoproteins ERBB2 welches auf die Amplifikation des Protoonkogenes c erb-2 zurückzuführen ist. Es lässt sich eine Assoziation zu fortgeschrittenem Tumorstadium, Fehlen von Östrogen und Progesteronrezeptoren und einer geringen Differenzierung feststellen. Deshalb ist eine Überexpression von ERBB2 mit einer schlechteren Prognose assoziiert und es wurde 2005 in der Konsensus-Konferenz von St. Gallen empfohlen, ihn als negativen Prognosefaktor in die Therapieentscheidung miteinzubeziehen (Goldhirsch *et al.*, 2005). Andererseits können Patienten mit ERBB2-Überexpression von einer Therapie mit einem monoklonalen Antikörper gegen den extrazellulären Teil des ERBB2-Rezeptors (Trastuzumab) profitieren. Die Bestimmung des ERBB2-Status erfolgt anhand der immunhistochemischen Färbintensität und kann im Zweifelsfall mittels In situ Hybridisierung bestätigt werden (Hudis *et al.*, 2007).

1.7 Molekulargenetische Differenzierung von Mammakarzinomen

Aktuell kann das Mammakarzinom in drei für die Therapie relevante Gruppen eingeteilt werden, die sich hinsichtlich ihrer Therapiemöglichkeiten und Prognose stark unterscheiden.

Östrogenrezeptorpositive Tumoren können häufig mit Hormonantagonisten (z.B. Tamoxifen) und Tumore mit Amplifikation des ERBB2-Gens mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Herceptin) therapiert werden. Die dritte Gruppe beinhaltet die Tumore, die sowohl

Östrogenrezeptor als auch ERBB2-negativ sind und deshalb obligat chemotherapiert werden müssen.

Die Identifizierung von molekularen Subtypen des Mammakarzinoms brachte 2000 einen entscheidenden Schritt zur weiteren Klassifizierung und Charakterisierung von Mammakarzinomen auf Basis individueller genetischer Profilmuster.

So konnte die Veröffentlichung von Perou *et al.* erstmals beweisen, dass Mammakarzinome die sich in ihrer Morphologie unterscheiden, häufig auch auf molekularer Ebene differente Expressionsmuster (Gene Expression Pattern) zeigen (Perou *et al.*, 2000). Diese genetische Tumorklassifikation ergänzt somit die etablierten pathologischen Parameter wie z.B. Tumorart, Größe, Staging, Grading, Ki-67-Proliferationsindex, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und die Überexpression von ERBB2-Rezeptoren, welche schon seit Jahren als prognostische Faktoren im klinischen Gebrauch sind (Fischer et Baum, 2014).

Perou *et al.* unterschieden zunächst 6 Gruppen, die sich in ihren Genexpressionsmustern unterscheiden:

1.) Der **luminal-epitheliale Typ**, welcher Östrogenrezeptor positiv ist und die typisch luminalen Keratine (K) 8 und K18 exprimiert. Dieser wird weiter differenziert in

- a. **Luminal A:** mit erhöhter Expression von Östrogen- oder Progesteron-Rezeptoren und niedriger Proliferationsrate. Sie sprechen meist gut auf eine antihormonelle Therapie an.
- b. **Luminal B:** Diese zeichnen sich vor allem über eine hohe Proliferationsrate aus und deshalb wird eine zusätzliche Chemotherapie empfohlen.

Cheang *et al.* konnten anhand des Ki-67- Index Luminal A von Luminal B Tumoren differenzieren. Dabei stellte sich heraus, dass ein Ki-67 Index von 14% oder mehr einem Luminal B Subtyp und unter 14% einem Luminal A Subtyp entsprach (Cheang *et al.*, 2009).

3.) der **Basaltyp (Basal-like)**, welcher Östrogen-, Progesteronrezeptor und ERBB2 negativ ist und Basalzellkeratine wie z.B. K5, K6 oder K17 und/ oder EGFR exprimiert. Zudem spre-

chen sie weder auf eine antihormonelle- noch auf eine gegen ERBB2 gerichtete Therapie an und werden deshalb als triple-negativ bezeichnet.

4.) der **Her2/neu+Typ (ERBB2)**, welcher östrogenrezeptornegativ ist und eine Amplifikation oder Überexpression von Her2/neu (ERBB2) aufweist.

5.) „**normalbreast-like**“ **Typ**, welcher ähnliche Expressionsmuster zeigt, wie das Bindegewebe der Mamma.

6.) „**Claudin-low**“ **Typ**: Dieser Subtyp wird vor allem durch seine niedrige Expression an Genen die für Zell-Zell-Adhäsion zuständig sind (u.a.drei verschiedene Claudin Gene) charakterisiert (Prat et Perou, 2010). Ähnlich wie basal-like Tumoren zeigen diese eine hohe genomische Instabilität, niedrige Expression von ERBB2 und luminaler Keratine wie 8 und 18. Er zeigt zudem eine hohe genomische Heterogenität. So sind u.a. eine hohe Anzahl von ER-positiven und nicht-Triple negativen Tumoren in diesem Subtyp zu finden.

1.7.1 Auswirkungen der genetischen Subtypen auf Wachstumsverhalten von Tumoren

Der Differenzierung der neuen Subtypen folgten wenig später Studien, die eine Korrelation zwischen den genetischen Subtypen und der Prognose des Mammakarzinoms aufzeigten und somit die klinische Relevanz unter Beweis stellten (Sorlie *et al.* 2001). So stellte sich heraus, dass die beiden östrogenrezeptornegativen Subtypen „basal-like“ und HER2/neu positiv, die schlechtesten Ergebnisse in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) und das Gesamtüberleben (OS) zeigten. Besonders die Basal-like Karzinome stellen in der Klinik eine erhebliche Herausforderung dar, da sie meist keine Expression von ERBB2, ER oder PR aufweisen und somit „triple negative“ sind. Zudem zeigen sie häufig eine niedrige Differenzierung (Grading). Dieser Subtyp ist deshalb besonders aggressiv, tritt vor allem bei jungen Patientinnen auf und ist häufig mit *BRCA1* Mutationen assoziiert (Badve *et al.*, 2010). Die unterschiedlichen Charakteristika wie Proliferationsraten und Wachstumsgeschwindigkeit, haben ihre Ursache in den unterschiedlichen Tumorstammzellen der jeweiligen Tumoren. So entwickeln sich die „basal-like“ Tumoren häufig aus undifferenzierten Progenitorzellen, wohingegen sich die „luminal-typ“ Tumoren aus ausdifferenzierten lumi-

nalenen Zellen entwickeln (Holliday et Speirs, 2011). Nichtsdestotrotz zeigen jedoch viele luminal Tumore bzw. ER-positive Tumore trotz ihres positiven Hormonstatus und langsamen Proliferationsraten kein Therapieansprechen. Lindström *et al.* zeigten dass, ca. ein Drittel, respektive 15%, der Metastasen im Vergleich zu ihren Primärtumoren eine Änderung im ER- und ERBB2-Status aufwiesen (Lindström *et al.*, 2012). Da die die Therapieplanung und die Prognose der Patienten, sich größtenteils auf die Biopsien des Primärtumors beziehen, stellt dies ein grundlegendes Problem der Behandlung dar.

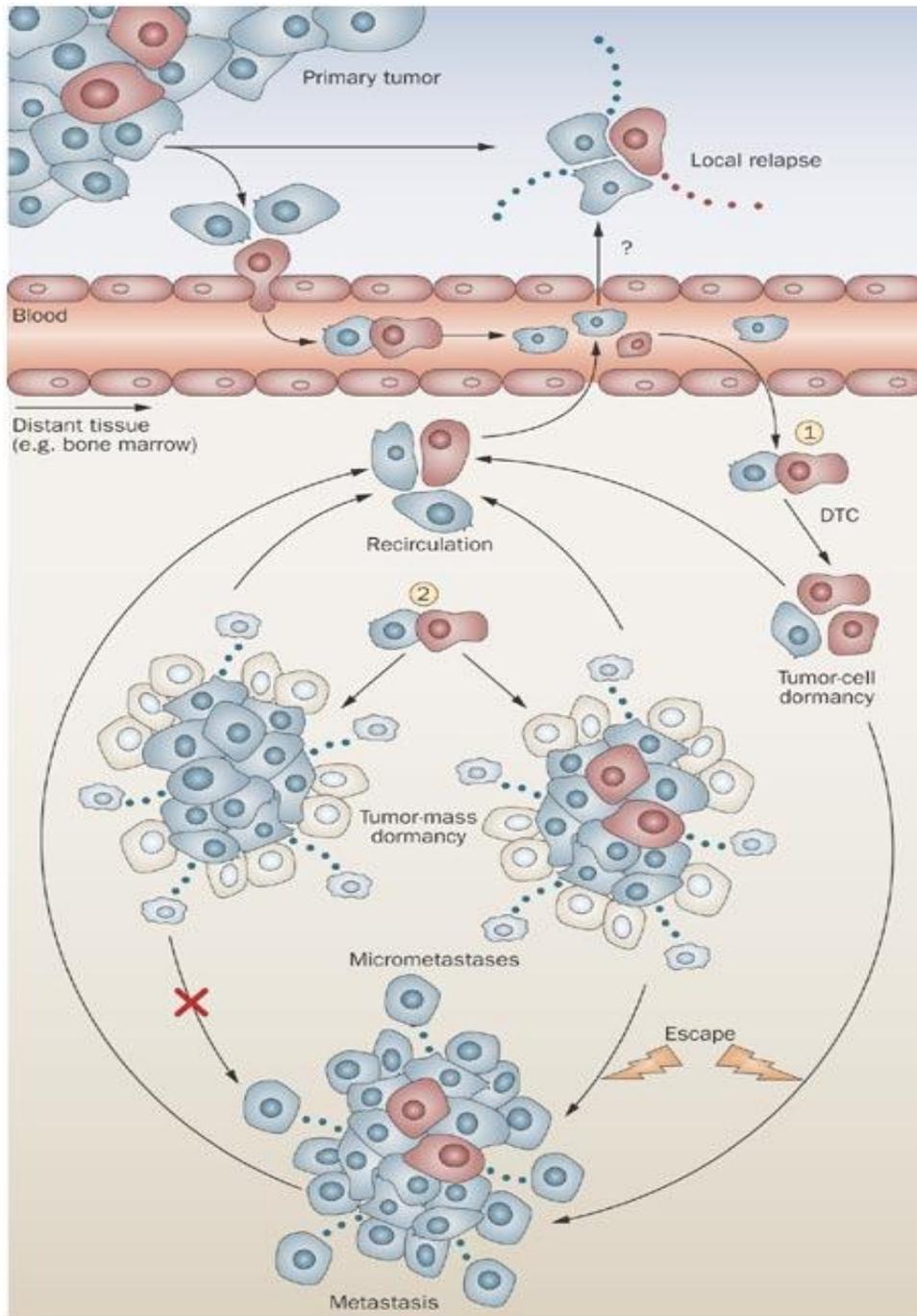
1.8 Metastasierung des Mammakarzinoms

Die häufigste Todesursache beim Mammakarzinom stellen Rezidive dar, die selbst nach langer Latenzzeit auftreten können. Circa 40% der Patienten erleben ein Rezidiv, an dem die meisten Patienten versterben (Alix-Panabieres *et al.*, 2007). In den ersten Jahren nach Diagnose des Primärtumors ist das Risiko ein Rezidiv zu erleiden am höchsten, wobei es sich in 60-70 % der Fälle um Fernmetastasen handelt (Christiansen *et al.*, 2008). Maßgeblichen Einfluss auf die Lokalisation und Häufigkeitsverteilung der Metastasen, haben neben initialem Tumorstadium und dem molekularen Subtyp, auch die Sensitivität der Diagnostik (Cheang *et al.*, 2008). Dabei lassen sich grundsätzlich zwei unterschiedliche Metastasierungsmodelle unterscheiden:

- 1) Das lineare Progressionsmodell, besagt dass die Zellen schrittweise mutieren, epigenetische Veränderungen durchmachen und dadurch irgendwann die Fähigkeit erlangen in Gewebe zu infiltrieren und autonom zu proliferieren.
- 2) Das parallele Progressionsmodell besagt, dass die Dissemination frühzeitig von dem Primärtumor erfolgt und das Wachstum von Metastasen und Primarius parallel erfolgt und sich unterschiedliche Eigenschaften und Resistenzen entwickeln.

Für die Theorie der frühen Dissemination sprechen Studien von Sanger *et al.* und Pantel *et al.*, die gezeigt haben, dass in Patienten mit gutartigen Vorstufen des Mammakarzinoms (DCIS) und des Kolonkarzinoms, CTC im Blut detektiert werden konnten (Sänger *et al.*, 2011; Pantel *et al.*, 2012).

Abbildung 2 Modell der Tumorzirkulation und Tumor-Dormancy



Quelle: Pantel et al., 2009

Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften (in Rot) und ohne Stammzeleigenschaften (in blau) werden vom Primärtumor freigesetzt. Nach der Stammzelltheorie können nur Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften Mikrometastasen bilden und aus dem Ruhezustand (Tumor Dormancy) entkommen, um große Metastasen zu bilden (Pantel et al., 2009).

Epitheliale Mesenchymale Transition

Damit Tumorzellen sich aus ihrem Ursprungsgewebe lösen können, ist es notwendig, dass sie ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und eine mesenchymale Form annehmen. Dieser Differenzierungsvorgang wird als epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) bezeichnet und beschreibt den Prozess der Herunterregulation von epithelialen Markern (z.B. EpCAM) und Heraufregulation der Expression von mesenchymalen Proteinen (z.B. N-Cadherin) (Yang et Weinberg, 2008). Besonders bei Mammakarzinom ist die Herunterregulierung der EpCAM Expression erforderlich für das invasive Wachstum von Brustkrebs (Tauben *et al.*, 2010). Erst die EMT befähigt die Zellen die Adhäsion an die Basalmembran zu lösen um entweder hämatogen oder lymphogen zu disseminieren. In anderen Geweben können diese Zellen sich zurück verwandeln und eine Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET) beschreiten, um solide Metastasen zu bilden.

Nach u.a. Bacelli *et al.*, sind die Tumorzellen die Metastasen initiieren meist Zellen, die die EMT durchlaufen haben und somit typische epitheliale Marker entweder gar nicht oder mit geringer Expressionsrate exprimieren (Bacelli *et al.*, 2012). Dabei verlassen jedoch sowohl Tumorzellen den Tumor welche die EMT durchgemacht haben, als auch epitheliale Zellen den Tumor (Joosse et Pantel, 2012). Besonders gefährlich sind jedoch Zellen die eine hohe Plastizität aufweisen, und je nach äußeren Bedingungen zwischen EMT und MET wechseln können, in dem sie äußerst dynamisch je nach Bedarf epitheliale Marker hoch- oder runterregulieren (Mani *et al.*, 2008).

Theorien der Metastasierung

Die Metastasierung des Mammakarzinoms erfolgt sowohl hämatologisch als auch lymphogen. Dabei sind häufig die axillaren Lymphknotenstationen entlang der Vena axillaris betroffen. Der erste Lymphknoten im Abflussgebiet des Tumors wird als Sentinellymphknoten bezeichnet und dient während der OP als Marker für die Notwendigkeit einer axillären Lymphknotenresektion. Eine Grundlage der Malignität des Mammakarzinoms ist jedoch die Fähigkeit der Tumorzellen zur frühen hämatogenen Streuung (Kreienberg *et al.*, 2006). Basierend auf der Theorie der frühen Disseminierung beschrieben Pantel und Brakkendorf 2004 zwei Modelle der Metastasierung:

Nach dem ersten Modell entstehen Fernmetastasen durch zunächst lymphogen in die Lymphknoten gestreute Metastasen, welche zu einem späteren Zeitpunkt hämatogen disseminieren. Die primär hämatogen disseminierten Tumorzellen haben dieser Theorie nach nicht das Potential Metastasen zu bilden, da ihnen die Determinierung durch das Mikromillieu (Microenvironment) der Lymphknoten fehlt.

Die zweite Theorie besagt, dass auch die hämatogen gestreuten Tumorzellen die Eigenschaft besitzen Fernmetastasen zu bilden. Untermauert wird diese Theorie durch die klinische Beobachtung von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom, die trotz eines negativen Nodalstatus Fernmetastasen ausbilden. Studien zeigen, dass die Detektion dieser Tumorzellen im Blut, vor allem bei nodalnegativen Patienten, mit einer schlechteren Prognose verbunden sind (Cristofanilli *et al.*, 2004; Müller et Pantel, 2005). Diese Theorie betrachtet demnach den Nodalstatus und Fernmetastasen als zwei unabhängige Prognosefaktoren, welche nicht zwangsläufig übereinstimmende Informationen für eine Prognose oder Therapieoption liefern.

1.9 Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms

Grundsätzlich werden lokale Rezidive kurativ behandelt, Fernmetastasen hingegen gelten als unheilbar und werden hauptsächlich palliativ behandelt. Hauptaufgabe der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms ist die Linderung der durch die Metastasen hervorgerufenen Beschwerden um die Lebensqualität der Patienten wiederherzustellen oder zu erhalten. Das mediane Überleben von metastasierten Brustkrebspatienten hat sich aufgrund der verbesserten Therapiemöglichkeiten kontinuierlich verbessert und liegt aktuell bei 20-28 Monaten (Gennari *et al.*, 2005).

Patienten mit primär metastasierten Mammakarzinomen haben meist eine schlechtere Prognose als die Patienten mit sekundär metastasierten Karzinomen. Bei diesen kann durch eine Tumorresektion (R0) das Gesamtüberleben um 40-50% gesteigert werden (Ruiterkamp *et al.*, 2009).

Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie empfiehlt primär eine Biopsie des Rezidivs, um eine Neuevaluation des Rezeptorstatus zu ermöglichen, da es häufig im Laufe

der Metastasierung zu Änderungen des Östrogen-, Progesteronrezeptors und HER2/neu Expression kommt (Broom *et al.*, 2009). Die Objektivierung des Therapieansprechens erfolgt alle 3 Monate anhand des längsten Durchmessers aller Metastasen anhand der RECIST Kriterien (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (Therasse *et al.*, 2000).

Da das 5-Jahres-Überleben nach Thoraxwandrezidiven 68 % und bei intramammären Metastasen sogar 81 % beträgt, wird das lokale Rezidiv kurativ therapiert (Kamby *et al.*, 1988). Angestrebt werden sollte eine Resektion im Gesunden (R0) oder bei intramammären Metastasen eine Mastektomie. Im Falle einer unmöglichen Nachresektion bei R1 kommen sowohl Chemotherapie, Antikörper oder Strahlentherapie in Betracht.

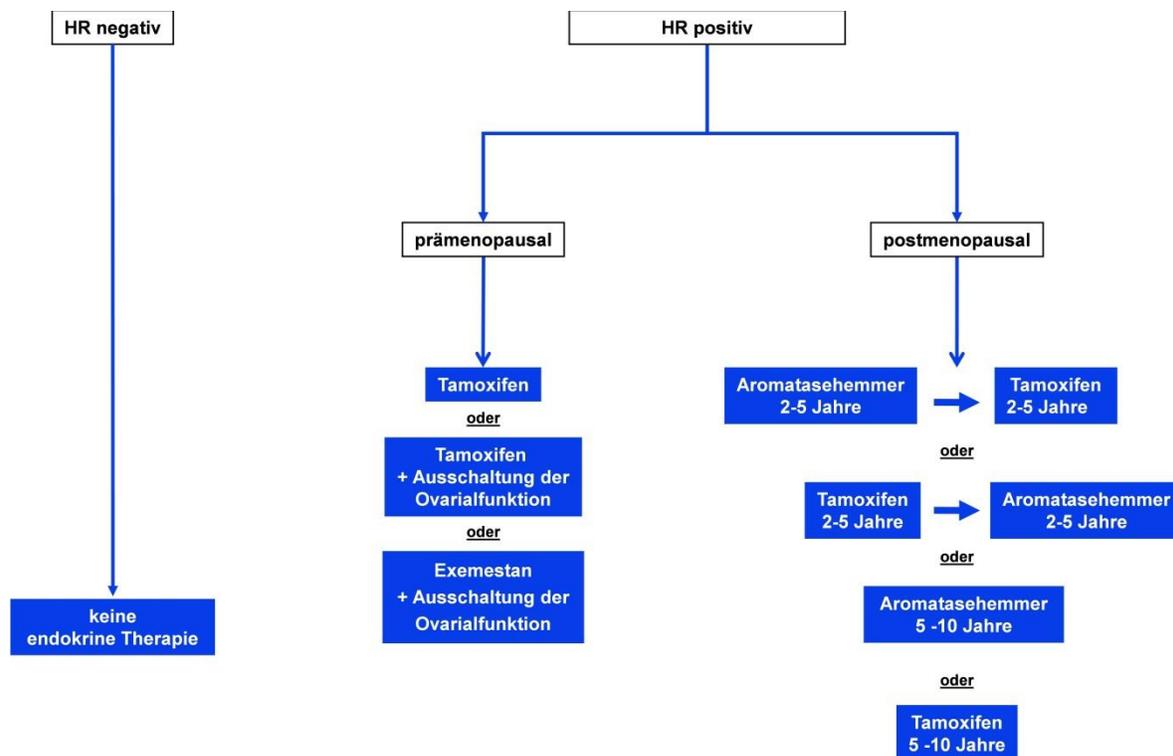
Endokrine Therapie

Aufgrund des maßgeblichen Einflusses von Östrogenen (insbesondere ER-positive) auf die Prognose des Mammakarzinoms, wurde schon 1896 die Beobachtung gemacht, dass ovariectomierte Frauen eine deutliche Verbesserung der Prognose beobachteten (Beastson, 1896). Eine 2013 veröffentlichte Metaanalyse der Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) zeigt, dass durch eine 5-jährige Therapie mit Tamoxifen, die Mortalität in einem Beobachtungszeitraum von 15 Jahren um etwa ein Drittel gesenkt werden kann (Darby *et al.*, 2011).

Deshalb gehört die endokrine Therapie, genauso wie Bestimmung des Hormonrezeptorstatus gehört heute zum Standard in der Diagnostik des Mammakarzinoms. Die wichtigsten Vertreter sind die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) wie z.B. Tamoxifen und die sogenannten Aromataseinhibitoren wie z.B. Anastrozol. Die anti-östrogene Wirkung des Tamoxifens beruht auf der Konkurrenz mit Oestradiol um den Östrogenrezeptor. Dabei wirkt es als selektiver Inhibitor des ER mit teils Östrogenantagonistischen teils - agonistischen Wirkungen, wobei die AF1-Domäne aktiviert wird und die AF2-Domäne inaktiv bleibt. Da das Brustdrüsengewebe zu den AF2 dominierenden Geweben gehört, kommt es dort größtenteils zu einem antagonistischen Effekt (Sakamoto *et al.*, 2002). Tamoxifen ist für prämenopausale Frauen der Gold-Standard in der adjuvanten Therapie und zur Be-

handlung des metastasierenden Mammakarzinoms. Bei postmenopausalen Frauen wird Tamoxifen mit Aromatasehemmern in einer sogenannten sequenziellen Therapie kombiniert. Dabei nimmt die Patientin z.B. für 3 Jahre einen Aromatasehemmer ein und wechselt anschließend in eine 2-3 jährige Tamoxifen Therapie. Aromatasehemmer sind in der Lage die Umwandlung von Östrogenen aus Androgenen zu hemmen. Durch die Hemmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Umwandlung, wird der Östrogen Serumspiegel gesenkt. Zudem zeigen sich im Mammakarzinom Gewebe sowohl höhere Östrogenkonzentrationen, als auch höhere Aktivitäten der Aromatase (Lu *et al.*, 1996). Die Aromataseinhibitoren lassen sich in steroidale und nicht-steroidale Aromataseinhibitoren unterteilen, wobei die steroidalen eine irreversible und die nicht-steroidalen eine reversible Hemmung der Aromatase bewirken (Hamilton *et al.*, 2011).

Abbildung 3 Algorithmus für die adjuvante endokrine Systemtherapie des Mammakarzinoms



Quelle: Leitlinie Mammakarzinom der Frau (onkopedia.de, 2016)

Bei negativen Hormonrezeptorstatus erfolgt keine endokrine Therapie. Bei positivem Hormonrezeptorstatus und prämenopausalen Patientinnen erfolgt meist eine Tamoxifentherapie. Bei postmenopausalen Patientinnen wird entweder zuerst Tamoxifen

eingesetzt und danach eine Aromataseinhibitor-therapie angeschlossen oder andersherum. Es kann jedoch auch eine Einzeltherapie mit entweder Tamoxifen oder Aromataseinhibitoren erfolgen (onkopedia, 2016).

Chemotherapie

Die Indikation für eine Chemotherapie sind u.a. ein aggressiver Krankheitsverlauf, Nodalpositivität, Hormonrezeptornegativität und Progress unter endokriner Therapie. Dabei ist die Therapie in den meisten Fällen eine Monotherapie, da die Kombinationschemotherapien bei MBRC keinerlei Überlebensvorteil beschert (Jones *et al.*, 2006). Als Chemotherapeutika eignen sich für nicht vorbehandelte metastasierte Mammakarzinome Antrazykline (z.B. Doxorubicin) oder Taxane (z.B. Paclitaxel). Auch für sekundär metastasierte Patienten eignen sie sich falls die adjuvante Therapie mehr als 2 Jahre her ist. Dabei gilt die Regel nach Erstlinientherapie mit Taxanen, wird in der Zweitlinientherapie Anthrazykline gegeben, vice versa. Als Drittlinie eignen sich z.B. Capecitabine.

Die zusätzliche Gabe von Anti-VEGFR-Antikörpern (Bevacicumab) in der Erstlinie verlängert zwar das progressionsfreie Überleben, aber nicht das Gesamtüberleben (Miller *et al.*, 2007).

ERBB2- Positive Mammakarzinome

Bei ERBB2-Überexpression ist jedoch die Kombination aus dem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen den ERBB2-Rezeptor (Trastuzumab) in Kombination mit Taxanen Standard und führen zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens (Slamon *et al.*, 2001). Sollte es zu einem Progress unter Trastuzumab- Therapie kommen wird eine Umstellung auf Lapatinib und Capecitabin empfohlen.

Knochenmetastasen

Zur Vermeidung ossärer Degeneration sind bei ossären Metastasen derzeit zusätzlich zur Therapie des Tumors Bisphosphonate indiziert. Bei starken Beschwerden können die Knochenmetastasen strahlentherapeutisch behandelt werden, wodurch pathologischen Frakturen und Mobilitätseinbußen vermieden werden.

ZNS- Metastasen (Metastasen im zentralen Nervensystem)

Operable ZNS Metastasen sollten anschließend bestrahlt werden, da dadurch das Gesamtüberleben signifikant verlängert werden kann.

Keine der angesprochenen Therapiemöglichkeiten hat den Anspruch auf Heilung und so bleiben Langzeitremissionen von Patienten mit metastasiertem Brustkrebs eine Rarität. Die schlechte Prognose ist zum einen der relativ späten Detektion von Metastasen durch bildgebende Verfahren geschuldet und könnte durch frühzeitige Detektion von zirkulierenden Tumorzellen möglicherweise in Zukunft maßgeblich verbessert werden.

1.10 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)- Bedeutung als prognostischer Marker

Als zirkulierende Tumorzellen (Circulating Tumor Cells „CTCs“) werden Zellen bezeichnet die sich meist im Zusammenhang einer Metastasierung, vom Primärtumor oder Metastasen loslösen und in die Blutzirkulation eintreten. Erstmals beobachtet wurden sie 1869 von dem australischen Forscher Thomas Ashworth in Blutproben von Krebspatienten (Ashworth, 1869). Patel *et al.* konnten an kolorektalen Karzinomen zeigen, dass die meisten CTCs höchstens 24 Stunden im Blutkreislauf überleben (Patel *et al.* 2002). Dies impliziert die Annahme eines permanenten Zuflusses von CTCs aus dem Tumorgewebe und macht CTCs deshalb zu einem wertvollen potenziellen diagnostischen Marker für die frühzeitige Detektion von Metastasen.

2007 empfahl die ASCO (American Society of Clinical Oncology) die Bestimmung der CTCs als Tumormarker im Rahmen der Detektion der Minimal Residual Disease (Harris *et al.*, 2007). Grundlage dieser Empfehlung bildeten Studien wie die prospektive Studie von Cristofanilli *et al.*, welche zeigen konnte, dass der Nachweis von CTCs signifikant mit einer schlechteren Überlebensrate korreliert und somit die prognostische Relevanz der CTC-Detektion unter Beweis stellte. Es wurde gezeigt, dass schon 5 Zellen pro 7,5 ml Blut vor Therapiebeginn mit einem verkürzten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben bei metastasierten Patienten korrelieren (Cristofanilli *et al.*, 2004; De Bono *et al.*, 2008). Der Nachweis von CTCs nach Therapiebeginn war zugleich mit einem schlechteren Outcome assoziiert, sodass der Nachweis von CTCs auch helfen könnte ein Therapieversagen

frühzeitig zu erkennen. Auch in der adjuvanten Situation ist der CTCs Nachweis ein unabhängiger prognostischer Faktor, wie die Ergebnisse der SUCCESS-A Studie, welche den prognostischen Wert von CTCs bei Primärpatienten vor Therapiebeginn prospektiv untersuchte, beweisen konnten (Andergassen *et al.*, 2013). Die Anzahl der CTC im Blut von Primärpatientinnen vor Beginn der adjuvanten Therapie korrelierte eindeutig mit einem längeren krankheitsfreien Überleben (Disease free Survival DFS) und Gesamtüberleben (Overall Survival OS) (Rack *et al.*, 2010). Jedoch konnte der in der SWOG (Southwest Oncology Group) S0500–Studie überprüfter Zusammenhang eines Überlebensvorteils durch Therapiewechsel bei CTC-Persistenz, nicht bestätigt werden. Verglichen wurden Patienten, die einen Therapiewechsel erst bei bildlich sichtbaren Metastasen bekamen, mit denen die allein auf Grundlage der CTC-Detektion von ≥ 5 Tumorzellen in 7,5 ml Blut, behandelt wurden (Smerge *et al.*, 2013). Eine 2012 gestartete multizentrische prospektive Studie (DETECT III) zur Bedeutung der Anti-ERBB2-basierten Therapie bei Patienten mit ERBB2-positiven CTC bei Initial negativem ERBB2-Status wird aktuell (2017) am UKE und deutschlandweit durchgeführt (Synopsis DETECT III).

CTCs haben sich in den letzten Jahren ihre prognostische Wertigkeit in zahlreichen Studien unter Beweis gestellt. Neben ihrer Bedeutung als prognostischer Marker, haben sie zudem das Potenzial, frühe Stadien der Metastasierung manifest zu machen. Die Sensitivität der hochauflösenden bildgebenden Verfahren heutzutage reicht hierzu nicht aus. CTCs treten jedoch schon früh bei metastasierten Tumoren auf und könnten somit in der Zukunft eine Art „Metastasierungs- Marker“ bilden, der die Qualität der Krebsdiagnose um ein vielfaches erhöhen würde. Besondere Vorteile der „flüssigen Biopsie“ sind die leichte Zugänglichkeit und damit verbundene größere Compliance der Patienten. Um dies zu ermöglichen müssen zunächst höchst sensitive Detektionsmechanismen etabliert werden um eine möglichst frühzeitige Rezidivierung des Tumors zu erfassen. Die Ergebnisse der Studie um Cristofanelli *et al.* legten die Vermutung nahe, dass nicht alle CTCs ein Metastasierungspotential haben. Zwar wurde gezeigt, dass Patienten mit erhöhter CTC-Zahl vor Therapiebeginn schneller eine Progression entwickeln, jedoch fand dies in 15% der Fälle nicht statt (Cristofanelli *et al.*, 2004). Bei den detektierten Zellen bei diesen Patientinnen handelt es sich um

sogenannte „Dormancy“ –Zellen, die (so wird vermutet) entweder nach gewisser Zeit über onkogene Mutationen aktiviert werden und Metastasierungspotenzial entwickeln oder jahrelang im Somnolenz Stadium bleiben und zu keinerlei Rezidivierung führen. Dies legen auch die Ergebnisse von Meng *et al.* nahe, welche bei 13 Patientinnen 7-22 Jahren nach Auftreten des Primärtumors noch CTCs fanden, obwohl sich radiologisch oder klinisch keine Metastasen detektieren ließen (Meng *et al.*, 2004). Die Autoren schlussfolgerten aufgrund der geringen Halbwertszeit der CTCs eine Ausgewogenheit zwischen Zellreplikation und Apoptose in diesen Zellen.

1.11 CTC Detektionsmarker

EpCAM

Vor dem Hintergrund der besonders geringen Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen in Patientenproben und der hohen Dichte der hämatopoetischen Zellen, ist es nötig besonders sensitive Detektionsstrategien für die CTCs zu verfolgen. Das einzige von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassene System zur Detektion von CTCs bei metastasierten Mammakarzinom - CellSearch™ - bedient sich neben der positiven Selektion an Hand von Keratinen (K8/18/19) auch des epithelialen Markers EpCAM und der negativen Selektion von Leukozyten anhand von CD45 Antikörpern (Riethdorf *et al.*, 2007). Die positive Selektion findet anhand von mit Eisennanopartikeln gebunden Antikörpern gegen das Zelladhäsionsmolekül EpCAM statt, welche anschließend die epithelialen Zellen durch ein magnetisches Feld separiert. Das Glykoprotein EpCAM hat die Eigenschaft auf Epithelzellen und vielen epithelialen Tumoren, jedoch nicht auf hämatopoetischen Zellen exprimiert zu werden (Baeuerle et Gires, 2007). Zudem wird es in den meisten Brustkrebssubtypen überexprimiert und ist mit einem schlechterem Gesamtüberleben assoziiert (Soysal *et al.*, 2012). Die zusätzliche Bestätigung erfolgt über eine Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Kernproteine und Keratine. Die negative Selektion erfolgt mittels CD45 Immunfluoreszenzfärbung und erlaubt somit eine Differenzierung von Leukozyten und Tumorzellen. Mittels der CellSearch Methode konnten Cristofanilli *et al.* 2004 mit 5 Tumorzellen pro 7,5ml Blut einen unteren prognoseweisenden Grenzwert für das metastasierte

Mammakarzinom erstellen. Die Daten zeigten, dass Patienten mit über 5 CTC eine signifikante Korrelation mit einem verkürzten progressionsfreien und Gesamtüberleben aufwiesen (Cristofanelli *et al.*, 2004). Der Ansatz der epithelialen Selektion (u.a. EpCAM und Keratinen) von Tumorzellen lässt jedoch die Auswirkungen der EMT (Kap. 1.8) unberücksichtigt. Zwar ist die Überexpression EpCAMs mit einem schlechteren Überleben assoziiert, jedoch benötigen nur epitheliale Phänotypen der Tumorzellen EpCAM als Wachstums- und Invasionsfaktor, der mesenchymale Phänotyp kann unabhängig von EpCAM Metastasen ausbilden (Martowicz *et al.*, 2012). Angesichts der Tatsache, dass eben diese Zellen das höchste Metastasierungspotenzial besitzen, könnte dies genaue Prognosen und Charakterisierungen der CTC für die Forschung, in Bezug auf Metastasierungsprozesse erschweren (Königsberg *et al.* 2011; Gorges *et al.* 2012; Baccelli *et al.*, 2012). Bestätigt wird dies, durch die Beobachtung von Patienten, bei denen sich trotz gesicherter Metastasierung keine oder zu wenig CTCs detektieren ließen (Joosse et Pantel, 2012).

Königsberg *et al.* verglichen EpCAM abhängige (z.B. MACS HEA MicroBeads) mit EpCAM unabhängigen (z.B. OncoQuick plus) CTC Detektionsmethoden und stellten heraus, dass durch die unabhängige Methode signifikant mehr Patienten mit EpCAM negativen CTC detektiert werden konnten (Königsberg *et al.*, 2011). Sie betonten damit die Wichtigkeit der sowohl EpCAM positiven wie auch negativen Zellen für Detektion der gesamten CTC Population.

AE1/AE3

Keratine gehören zu den Intermediärfilamenten die vorwiegend in epithelialen Zellen exprimiert werden. Sie geben der Zelle Form und sind u.a. mit Desmosomen an Zell-Zellkontakten beteiligt. Die Eigenschaft der Zellen spezifische Keratine zu exprimieren, hat sie zu einem wertvollen Instrument in der Tumordiagnostik gemacht und hilft nicht nur dabei Tumorzellen epithelialen Ursprungs zu detektieren sondern auch die Herkunft des Tumors bzw. der Metastase zu bestimmen. Die Expression der verschiedenen Keratine ist vom molekularen Subtyp (siehe Kap. 1.7) abhängig und variiert auch während der Metastasierung der Brustkrebszellen. Versuche von Joosse *et al.* zeigten, dass die Keratin Expression in Primärtumoren und den dazugehörigen Lymphknotenmetastasen nur auf ein be-

stimmtes Set an Keratinen begrenzt ist, und sich diese zudem auch häufig unterscheiden (Joosse *et al.*, 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass CTCs und Brustkrebszelllinien Keratine exprimieren, die nicht zu den regulären epithelialen Markern gehören (CellSearch Keratin 18/19). In vorwiegend Basal-like-Subtyp Zelllinien wurden signifikant mehr Zellen detektiert, wenn ein Keratin-Antikörpercocktail (AE1/AE3) genutzt wurde (80% Detektionsrate im Vergleich zu 40% bzw. 57% durch die Antikörper C11 und A45-B/B3). Besonderer Vorteil des Antikörpercocktails war die zusätzliche Detektion von Keratin 14 und 16 im Gegensatz zu den anderen monoklonalen Antikörpern (Joosse *et al.*, 2012).

Tabelle 6 Antikörper gegen die häufigsten Keratine beim Mammakarzinom

K	Größe (kDa)	AE1	AE3	C11
2	65.5		•	
4	59		•	•
5	58		•	•
6	56		•	•
7	54			•
8	52.5		•	
10	56.5	•		•
13	53			•
14	50	•		
15	49	•		
16	48	•		
18	45			•

Nach Joosse *et al.*, 2012

EGFR

Bei dem EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) handelt es sich um eine membranständige Rezeptortyrosinkinase aus der ERBB-Familie (erythroblastosis oncogene B), welche bei zahlreichen epithelialen Tumoren überexprimiert wird. Die übermäßige Expression dieses Onkogens führt neben einer Erhöhung der Zellproliferationsrate und Verminderung der Apoptosebereitschaft auch zu einer erhöhten Metastasierungsbereitschaft (Bauknecht *et al.*, 1989).

EGFR als zusätzlicher Marker hat demnach vielfältige Vorteile: Zum einen eignet sich als epithelialer Marker zur Abgrenzung zu den hämatopoetischen Zellen im Blut, als memb-

ranständiges Protein ist er zudem leicht zugänglich für Detektionsmethoden und vor allem die Tatsache der Überexpression im Rahmen von Metastasierungsvorgängen ist für die Detektion von Vorteil. Besonders Interessant ist in diesem Rahmen die Tatsache, dass die besonders aggressiven Basal-like bzw. Triple-negativen Tumore häufig EGFR statt Keratinen exprimieren und somit besser detektiert werden könnten (Perou *et al.*, 2000).

ERBB2

Der routinemäßig erhobene ERBB2-Status hat eine äußerst wichtige prognostische und Therapie beeinflussende Bedeutung (siehe Kap.1.9). HER-2/neu bzw. ERBB2 gehört wie EGFR zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren und ist in 20% aller invasiven Mammakarzinome überexprimiert bzw. amplifiziert (Slamon *et al.*, 1989; Schlechter *et al.*, 1984). Fast 25% aller Mammakarzinome zeigen eine ERBB2 Überexpression welche meist mit aggressiverem Tumorwachstum und schlechterer Prognose assoziiert ist (Menard *et al.*, 2001). Viele ERBB2 positive Tumore werden mit der Zeit resistent gegen Trastuzumab, ein möglicher Resistenzmechanismus ist die Hochregulation von EGFR, wobei ein gewisser Schwellenwert der EGFR Expression überschritten wird (Dua *et al.*, 2010). Zudem ließen sich in zahlreichen Studien, wie die von Meng *et al.* und Fehm *et al.*, bei metastasierten Patienten mit negativem ERBB2- Status im Primärtumor, ERBB2-positive CTC nachweisen (Meng *et al.*, 2004; Fehm *et al.*, 2010). Dies zeigt, dass die Transformationsfähigkeit der Tumorzellen in Bezug auf Metastasierungsprozesse von besonderem klinischen- und Forschungsinteresse ist. Neben der Funktion als reinen Detektionsmarker, könnte somit auch die Fähigkeit von CTC als Biomarker zur Reevaluation des ERBB2-Status evaluiert und mit den Status der Metastase und des Primarius korreliert werden.

2. Arbeitsansatz und Fragestellung

Um die relevante EpCAM bzw. Keratin-negative Tumorzellpopulation während der Detektion von CTCs nicht zu verlieren, müssen alternative Strategien zur Anreicherung von Tumorzellen im Blut gefunden werden. Das CellSearch System erwies sich bei epithelialen Tumoren zwar als deutlich sensitiv in der Detektion von CTCs, jedoch ist es für die umfassende und präzise quantitative Erfassung von Tumorzellen mit mesenchymalen Phänotyp nicht ausreichend (Balic *et al.*, 2005). Zudem exprimieren Östrogenrezeptor-negative CTCs oftmals keine bzw. wenig Keratine (K5/6) oder überexprimieren *EGFR* stattdessen (Perou *et al.*, 2000): Wir verfolgen deshalb in unserer Arbeit den Ansatz der Separierung kernhaltiger Zellen mittels Dichtegradienzentrifugierung (FICOLL) und anschließender negativer Depletion der Leukozyten mittels magnetischen gekoppelten CD45-Antikörpern. Dies hat den Vorteil, dass sowohl CTC mit mesenchymalen als auch epithelialen Phänotyp selektiert werden können. Zur anschließenden immunzytochemischen Detektion der zirkulierenden Tumorzellen wurde ein Cocktail aus verschiedenen Anti-Keratin- (AE1/AE3), EGF-Rezeptor- und ERBB2 –Antikörpern verwendet um eine möglichst breite Selektion der Tumorzellen zu gewährleisten. Die folgenden Analysen der zirkulierenden Tumorzellen im Blut der Patientinnen sollten zur Beantwortung folgender Fragestellungen beitragen:

-Eignen sich die genutzten Marker (EGFR und ERBB2) zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen bei metastasierten, östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom-Patienten?

-Können unter Verwendung von EGFR bzw. ERBB2-Antikörpern signifikant mehr Zellen detektiert werden als mit der alleinigen Detektion auf Basis der Keratine?

-Kann im Hinblick auf Krankheitsprogression und Therapieresistenz ein signifikanter Vorteil der zusätzlichen ERFR/ERBB2 Detektionsmarker im Verlauf der Erkrankung gezeigt werden?

3. Methoden

3.1 Vorversuch mit EGFR bzw. ERBB2 positiven Zelllinien

Für die Vorexperimente zur Erarbeitung eines optimalen Färbeprotokolls für die Immunfluoreszenzfärbung mittels der monoklonalen Antikörper EGFR, ERBB2, AE1/AE3 wurden an 5 verschiedenen, bereits im Labor etablierten und in der Literatur als EGFR- bzw. ERBB2-positiv bezeichneten Brustkrebszelllinien (SKBR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-231, BT-747, BT-20), die optimalen Konzentrationen und Färbeschritte angepasst und die Expression mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Dies dient im Besonderen der Affinitätstestung unterschiedlicher Antikörperklone.

Tabelle 7 genutzte Mammakarzinom Zelllinien mit Hormonstatus u.a.

Zelllinie	Molekulare Subtyp	ERBB2-Status	EGFR-Status	ER	K5/6
BT-20	Basal-like2	-	+	-	-
SKBR-3	Luminal	+	+	-	-
MDA-MB-468	Basal-like2	-	+	-	-
MDA-MB-231	Basal-like	-	+	-	-
BT-474	Luminal B	+	+	-	-

Nach: Riaz *et al.*, 2009; Finn *et al.*, 2009

3.1.1 Separierung der mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugierung

Um möglichst realistische Experimentalbedingungen zu schaffen, wurden parallel aus 7,5 ml gesundem Probandenblut Leukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugierung extrahiert. In ein 50 ml Falconröhrchen mit Leukosep Filter (Greiner Bio-one) wurden 16 ml Ficollreagenz (GE Healthcare) gefüllt und anschließend für 1 Minute bei 1000 G bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Röhrchen wird daraufhin mit Patientenblut aufgefüllt und bis 50 ml mit PBS mit EDTA Zusatz (1 l PBS +3,6 g EDTA) aufgefüllt. Anschließend wurde das Röhrchen bei 1000 G für 1 Minute zentrifugiert, wobei sich die Erythrozyten und das Ficollreagenz (GE Healthcare) unterhalb des Filters ansammeln und die mononukleären Zellen oberhalb als heller, milchiger Ring sichtbar werden. Der Überstand wurde vorsichtig mittels

einer unsterilen Pasteurpipette in ein 50 ml Falcon pipettiert und mit PBS bis 50 ml aufgefüllt. Im nächsten Schritt wird das Röhrchen bei 300 G für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Das entstandene Pellet wird in 30ml H-Lysepuffer (R&D Systems) zur Lyse eventuell vorhandener Erythrozyten für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 300G für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 50 ml PBS resuspendiert.

3.1.2 Zellkultur

Die von der American Type Culture Collection akquirierten Zelllinien wurden zunächst in 75 cm² Zellkulturflaschen mit ca. 12 ml DMEM Medium (PAA Laboratories), welches mit 10 % fetalem Rinderserum ergänzt wurde, gezüchtet und bei 37 °C und 10 % CO₂ Gehalt im Brutschrank inkubiert. Unter regelmäßigem Austausch des Mediums wurden nach Erreichen der gewünschten Zelldichte die Zellen trypsinisiert und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 50 ml PBS (Gibco) resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. Hierfür wurden 10 µl der Lösung mit 10 µl Trypan Blue Solution vermischt und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren, die Anzahl der gefärbten Zellen ermittelt.

Mittels Neubauer Zählkammer wird nun auch die Zahl der Leukozyten (nach der Separierung mononukleärer Zellen von gesundem Probandenblut (siehe unten) ermittelt und ein adäquates Volumen der Tumorzellsuspension hinzugegeben, sodass ein Verhältnis von 5000 Tumorzellen: 500.000 Leukozyten pro Objektträger vorliegt.

Anschließend werden je 200 µl der Lösung auf Objektträger gegeben und für 3 Minuten bei 170 G zentrifugiert. Der Überstand wird abgeklopft und die Objektträger werden für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 4°C bis zur Färbung verwahrt.

3.1.3 Westernblot

Proteingewinnung

Um Proteine aus den Zelllinien zu gewinnen, müssen diese zunächst mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml PBS und einem Zellkratzer von der Flasche gelöst werden. Die entstandene Zelllösung wird abpipettiert und in eine 1,5 ml Eppendorftube transferiert und 2 Minuten bei geringer Drehzahl zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wird 1 ml Proteinlysepuffer und 10 µl Proteaseinhibitor (Thermo Scientific) hinzugegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Lösung 10 Minuten bei 13.200 RPM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird auf beschriftete 0,5 ml Eppendorftubes aufgeteilt und entweder bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Zur Befüllung des Sammelgels werden 50 µg Protein benötigt. Deshalb wird eine nach ihrer Proteinkonzentration entsprechenden Menge der Proteinlösung mit Lämmli (6x) versetzt und die Proben bei 95°C für 5 Minuten denaturiert.

SDS Proteinwanderung

Um Proteine zu identifizieren müssen sie zunächst dem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden. Dies geschieht mittels eines SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), bei der die Proteine sich im elektrischen Feld in Richtung Anode bewegen und aufgetrennt werden.

Zunächst wird ein Trenngel nach dessen Ersteifen das Sammelgel (Siehe Material) zwischen 2 gespannte Glasplatten (Biorad, München) gegossen und ein Trennkamm eingesetzt. Diese enthalten u.a. Acrylamidketten, die nach der Zugabe von APS und TEMED zu polymerisieren beginnt und nach ca. 1-2 h eine gelartige Konsistenz erlangen. Nach Auspolymerisierung der Gele kann der Kamm entfernt werden und die Gele werden in eine Laufkammer (Biorad, München) gespannt und mit Laufpuffer nach Lämmli bis zur Markierung gefüllt. In die entstanden Geltaschen werden die Proteinlösungen und ein Molekularge-

wichts Standardmarker aufgetragen. Anschließend wird eine Spannung von 120 V für ca. 1 h angelegt.

Western Blot

Durch das Westernblot Verfahren werden nun die Proteine von dem Gel mittels Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wird das Gel zusammen mit der Nitrocellulosemembran, Filterpapier und Fiber Pad in eine Blotting-Kassette gesteckt. Diese wird anschließend in einen Blotting-Tank (Biorad, München) mit 1 l Transferpuffer entsprechend der Ladungsverhältnisse gesteckt. Der Transfer der Proteine erfolgt bei einer elektrischen Spannung von 100 V für 1 Stunde bei 4 °C Umgebungstemperatur. Hierbei wandern die negativ geladenen Proteine von dem Gel in Richtung Anode bzw. Nitrocellulosemembran. Nach Abschluss des Blottens, wird die Nitrocellulosemembran 1 h in 5%-iger Milchpulverlösung (in TBS) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen für die anschließende Primärantikörperbehandlung zu blockieren. Nach dem Blockieren wird die Membran 10 Minuten in TBS-T gewaschen und bei 4 °C Umgebungstemperatur über Nacht mit den jeweiligen Primär-Antikörper inkubiert. Die primären murinen Anti-EGFR, Anti- ERBB2 respektive Anti-AE1/AE3 Antikörper werden dafür im Verhältnis von 1:200 respektive 1:500 5 % iger Milch gemischt. Nach Waschen der Membran in TBST wird die Membran anschließend mit Sekundärantikörper gegen die Primärantikörper, welche mit Peroxidase gekoppelt ist, inkubiert. Die murinen anti-IgG Antikörper wird im Verhältnis von 1:1500 in TBS verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um die detektierten Proteine sichtbar zu machen wird die Membran für 10 Minuten in die Chemolumineszenzlösung (siehe Material) eingetaucht und anschließend wird ein Röntgenfilm (Kodak) für ca. 20 Sekunden in einer Röntgenkassette mit der Membran entstandenen Lumineszenz exponiert. Der Film wird anschließend im Dunkeln mit einem Chemoluminiszenzgerät (AGFA-Healthcare) entwickelt und die Proteinbanden somit sichtbar gemacht.

3.2 Hauptversuch

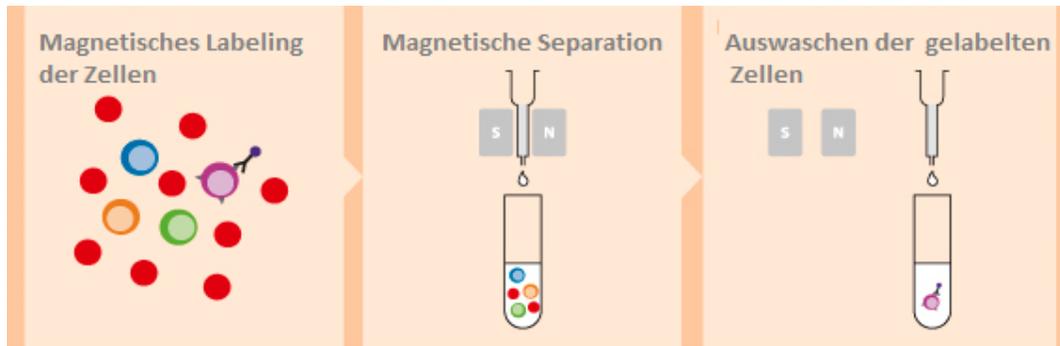
3.2.1 Patientenakquirierung und Probengewinnung

Das gesamte Patientenkollektiv wurde aus der Tagesklinik des Brustzentrums der Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf rekrutiert. Es wurden im Zeitraum Juli 2014-2015 15 Patienten untersucht. Die Einschlusskriterien beinhalten Metastasierung eines Mammakarzinoms vor Therapiebeginn, Primärmetastasiertes Mammakarzinom vor Therapiebeginn und Östrogenrezeptor negative metastasierte Mammakarzinompatienten. Anschließend wird der Verlauf mittels Blutproben im Abstand von 3 Monaten beobachtet. Um diese Patienten zu rekrutieren, wurden die Patientenlisten der Tagesklinik täglich und das 2 mal wöchentlich stattfindende interdisziplinäre Tumorboard besucht bzw. mittels des Klinikinformationssystems SOARIAN nach den infrage kommenden Patienten durchsucht. Anschließend werden 3 Röhrchen á 10ml EDTA Röhrchen mit einer eigens vergebenen „Gyn“ Nummer versehen und damit pseudonymisiert. Nach Patientenaufklärung, Einwilligung und Abnahme des Blutes durch einen Arzt in der Tagesklinik, wurde das Patientenblut zügig in das Institut für Tumorbioogie gebracht und am selben Tag nach Protokoll verarbeitet.

3.2.2 Magnetische Zellseparation

Das bei der Dichte-Gradienten Zentrifugierung resultierte Sediment bestand hauptsächlich aus der Fraktion mononukleärer Zellen (Leukozyten und ggf. CTCs). Um die potenziellen Tumorzellen besser detektieren zu können, muss eine Depletion der überzähligen Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten erfolgen. Die geschieht mittels der humanen Magnetic-beads-gekoppelte CD45, CD235a respektive CD61-Antikörper (Miltenyi).

Abbildung 4 magnetische Zellseparation



nach: miltenyibiotec.com

Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 280 G und Raumtemperatur wurde das Zellpellet mit 800 μ l MACS-Puffer (Miltenyi) resuspendiert und nach Zugabe von je 20 μ l anti-human magnetic-beads gekoppelten CD45-, CD235a- und CD61-Antikörper bei 8 °C für 30 Minuten in einem 50 ml Falconröhrchen (Falcon) stehend inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 10 Minuten bei 300 G und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde nachfolgend mit mindestens 300 μ l MACS Puffer (Miltenyi) resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung in LS-Säulen (Miltenyi) mit einer Matrix aus ferromagnetischen Sphären pipettiert, welche an einem speziellen Magnet Separator (Miltenyi) befestigt ist. Dieser verursacht ein starkes magnetisches Feld in der Kolonne, welches die an magnetischen Beads gekoppelten Zellen zurückhält. Dann wurden die Zellen gezählt, um eine gleichmäßige Verteilung von 500.000-700.000 Zellen pro Objektträger zu gewährleisten. Die Nachfolgende Zentrifugation erfolgte bei 300 G und Raumtemperatur für 10 Minuten.

3.2.3 Antikörper

Der Anti-Pan-Keratin (Klon AE1/AE3) (Ebioscience) ist ein muriner monoklonaler des Typs IgG1. Er ist mit Alexa Fluor 488 konjugiert, sein Emissionslicht hat die Wellenlänge 488nm und erscheint damit im blauen Laser grün. Beim Alexa Fluor 488 handelt es sich um ein fluoreszierendes Molekül, welches Licht der Wellenlänge bis maximal 495 absorbiert und Licht der Wellenlänge 519nm emittiert und deshalb Cyan-grün erscheint.

Der Anti-EGFR-Antikörper Klon LA1 (Millipore) ist ebenfalls ein muriner monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG1, welcher mit Alexa Fluor 488 konjugiert ist.

Der Anti-ERBB2-Antikörper Klon Tyr 1248 (Millipore) ist ein aus dem Kaninchen stammender monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG, welcher mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 488 konjugiert ist. Der verwendete Anti-CD45-Antikörper (Klon HI30) ist ein muriner monoklonaler Antikörper, welcher mit PE konjugiert ist und deshalb Licht der Wellenlänge 488 absorbiert und Licht der Wellenlänge 767 nm emittiert. Bei Phycoerythrin (E) handelt es sich um ein aus Blaualgen gewonnenes rotes Pigment. Der CD45-Antikörper dient in den Experimenten zur negativen Selektion der nach der magnetischen Depletion übrigen Leukozyten insbesondere im Hinblick auf geringe Keratin Expression von Basal-like (bzw. Triple-negative) CTCs. Der fluorochrome Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-2 HCl) bindet an Adenin-Tymin reiche Domänen der DANN, interkaliert dort und führt zu einer charakteristischen blauen Anfärbung von Zellkernen. Mit Licht der Wellenlänge 355nm kann DAPI angeregt werden und emittiert daraufhin blaues Licht der Wellenlänge 460nm, welches mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann.

3.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Als Auswertungsmodalität wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie gewählt. Dies basiert auf der Eigenschaft von Fluorochromen bei der Bestrahlung einer bestimmten Wellenlänge Licht zu absorbieren und anschließend Licht mit erhöhter Wellenlänge zu emittieren. Da Absorption und Emissionsspektrum getrennt sind, lassen sich die gewünschten Wellenlängen leicht durch Filter trennen. Die CTC-Detektionsmarker EGFR, AE1/AE3 und ERBB2 sind allesamt mit Alexa-Fluor 488 konjugiert, welche blaues Laserlicht in grünes Licht der Wellenlänge 519 nm umwandeln und somit die Unterscheidung zu Leukozyten ermöglichen. Der CD-45-Antikörper wurde mit PE konjugiert, welcher grünes Laserlicht absorbiert und rotes bzw. orangenes Licht, der Wellenlänge 767 nm emittiert und eine farbliche Abgrenzung zu den Tumorzellen erlaubt, welche kein CD45 exprimieren. Mittels Einzelfilter wurde Licht definierter Wellenlängen hergestellt und somit die Zellen beurteilt. Gegebenenfalls

wurden die Zellen mittels Bildprogramm IS-Capture (Lexus) fotografiert und mittels Bildbearbeitungsprogramm Image J (NIH) dokumentiert und überlagert.

3.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Zunächst wurden an den Objektträgern mit den Tumorzelllinien zahlreiche Versuche gemacht, in denen Antikörperkonzentration, Fixierung, Blockierung, Inkubationszeiten an zahlreichen EGFR- und ERBB2-Antikörper Klonen getestet wurden, um ein optimales Ergebnis zu gewährleisten. Das folgende Protokoll und die folgenden Antikörperklone zeigen die besten Ergebnisse: Die Objektträger werden zunächst die Zellbereiche mit einem Fettstift dem DAKO-Pen (DAKO) umrandet, der das Auslaufen der Reagenzien verhindern soll. Fixiert wird das Präparat 10 Minuten mit 0,5%igem PFA und wird anschließend 3-mal für je 3 Minuten in TBS gewaschen. Zur Blockierung wird 10%iges steriles AB-Serum verwendet und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu werden die Antikörper gegen EGFR 1:100, ERBB2 1:100, AE1/AE3 1:400, CD45 1:800 und DAPI 1:1000 mit 10 % AB-Serum vermischt und resuspendiert. Nach Bedecken der Zellen mit der Antikörperlösung werden die Objektträger im Dunkeln bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Am folgenden Tag werden die Objektträger vorsichtig für 3 mal 3 Minuten in TBS gewaschen und anschließend mikroskopisch ausgewertet.

3.2.6 Analyse der Objektträger

Die gefärbten Objektträger wurden mittels eines Immunfluoreszenzmikroskopes Axioskop 2 FS Plus mit Quecksilberdampflampe HBO 103 Watt (Zeiss) und Axioskop (Zeiss) analysiert und mit der Kamera Digitalkamera AxioCam MRm (Zeiss) und Programm ImageJ Version 1.49b (National Institute of Health) bildlich festgehalten. Die Objektträger wurden hauptsächlich mit der 40x Objektiv (Zeiss) in einem abgedunkelten Raum betrachtet und so die Anzahl der vorhandenen CTC durch den Einsatz des Filtersets 49 (Exzitation G365 und Emission BP 445/50) für DAPI, des Filtersets 44 (Exzitation BP 475/40 und Emission 530/40) für die Keratinfärbung und des Filtersets 43 für die Kontrolle CD45 Leukozyten (Exzitation BP 545/25 und Emission 605/70).

4. Material

4.1. Zellkultur

Material	Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4500 mg/l Glukose, 584 mg/l L-Glutamin, 110 mg/l Pyruvat)	Gibco BRL, Eggenstein
Dulbecco's PBS	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories
Kulturflaschen 25 cm ³ , 75cm ³	Sarstedt, Nümbrecht
Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B Gibco BRL	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Rottotfix 32 Zentrifuge	Hettich, Tübingen
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein
Hank's Balanced Salt Solution, Ca ²⁺ /Mg ²⁺ frei (HBSS-)	Gibco BRL, Eggenstein
Zelllinien SKBR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-231, BT-747, BT-20	American Type Culture Collection

4.2 Western Blot

4.2.1 Feststoffe

Material	Bezugsquelle
0,5ml, 2ml Sterile Eppendorftubes	Eppendorf, Hamburg
APS 10%	Sigma-Aldrich, St. Louis
Blotgerät Biorad Bio Rad Power Pack HC	BioRad, Hercules (USA)
Cell Scraper 25cm	Sarstedt, Newoton (USA)
Entwicklungsgerät CURIX60 Type 9462/106	AGFA-Healthcare, Belgium
Entwicklungskassette	Kodak, Rochester (USA)
Erlenmeyerkolben 250ml, 500ml	VWR, Radnor (USA)
Filter Paper	BioRad, Hercules (USA)
Halt Protease Inhibitor	Thermo Scientific Waltham, (USA)
Anti-Hsc70 Antibody (ab137806)	Abcam, Cambridge, (GB)
Methanol ACS Reagent Grade	JT Baker, Center Valley (USA)
Milchpulver Blotting Grade Fettarm Art.-Nr: T145.2	Carl Roth GmbH & Co
Polyclonal swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Millipore, Darmstadt
Proteaseinhibitor, Halt	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Polyklonaler Ant-phospho-erb-2/ERBB2 Antikörper (Klon Tyr1248)	Millipore, Darmstadt
Nano Drop ND-1000 V3.8.1	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Nitrocellulose Membran Protran BA83 Membranes	GE Healthcare Watman
Polyclonal Swine Anti-Gout Immunoglobulins/HRP DAKO Lot#050(201)	DAKO, Glostrup (DK)
Polyclonal Swine Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP DAKO	DAKO Glostrup (DK)

Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	DAKO Glostrup (DK)
Röntgenfilm	Fuji, Tokio (JP)
SDS 20% reinst Lot:4J011190	AppliChem Panreac, gatersleben
TBST 1 X (TBS + 0.05% Tween-20)	
Thermo Scientific Rage ruler Plus Prestained protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Thermo Scientific Rage ruler Plus Prestained protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

4.2.2 Lösungen

Laemli (6x) 62,5 ml 0,5 M Tris pH 6,8 10% Glycerol 2% SDS 5% β -Mercaptoethanol 0,001% Bromphenolblau 10 ml Aqua dest.	
Running Buffer (10x) 30,3 g Tris Base 144,2 g Glycin 50ml SDS 20% 1000ml Aqua dest.	
Samplegel 12% 4 ml 30% Acrilamid/Bis-acrylamid 3,4 ml Aqua dest. 1,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,1 ml 10% SDS (Sodium Dodecyl sulfate Polyacrylamide) 50 μ l 10% (W/v) APS (Ammonium-Persulfat) 5 μ l TEMED (Tetramethylethylendiamin)	

<p>Lyse Puffer Proteinextraktion</p> <p>3ml NaCl</p> <p>5ml 1M Tris/HCl</p> <p>1ml 1%Nonidet P-40</p>	
<p>Stackgel 4%</p> <p>0,67 ml 30% Acrylamid</p> <p>3,075 ml Aqua dest.</p> <p>1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8</p> <p>0,025 ml 10% SDS</p> <p>0,025 ml 10% (W/v) APS (Ammonium-Persulfat)</p> <p>0,005ml TEMED (Tetramethylethylendiamin)</p>	
<p>TBS 20 mM Trizma Base</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>TBST TBS</p> <p>0,01% Tween 20</p>	
<p>Transfer Buffer (10x)</p> <p>5,81 g Tris Base</p> <p>2,93 g Glycin</p> <p>1,85 ml SDS 20%</p> <p>200ml Methanol</p> <p>1000ml Aqua dest.</p>	
<p>Chemolumineszenzlösungen</p> <p>Stock:</p> <p>0,22g Luminol in 10ml DMSO</p> <p>0,15g p-Cumaricacid in 10ml DMSO</p> <p>Lösung 1</p> <p>100 µl Luminol-Stock</p> <p>44µl p-Cumaric Acid-Stock</p> <p>1ml 1M Tris/HCl pH 8,5</p> <p>8,85ml Aqua dest.</p> <p>Lösung 2</p> <p>6µl 30% H2O2</p> <p>1ml 1M Tris/Hcl pH 8,5</p> <p>9ml Aqua dest.</p>	

4.3 Aufarbeitung der Patientenproben

Material	Bezugsquelle
15ml, 50ml Falcon Röhrchen	BD-Bioscience, Franklin Lakes (USA)
AutoMACS Running Buffer (contains Bovine Serum Albumin, EDTA, Phosphate Buffered Saline, pH 7,2)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD235a (Glycophorin A) MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD45 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD61 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EDTA KE 7,5ml Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Ficoll MediumFicoll-Plaques Plus Tm	GE Healthcare, Uppsala
Leucosep®	Greiner Bio-one, Kemsminster (Österreich)
LS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer-Zählkammer (0,0025mm ² /0,1mm)	Zeiss, Jena
Standard Pasteur Pipetten, ungraduiert unsteril #E305.1	Carl Roth, Karlsruhe
SuperMACS™ II Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich, Tuttlingen
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 1X	Gibco, Carlsbad (USA)
EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid ACS reagent, 99+% powder	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)

4.3 Material magnetische Zellseparation

AutoMACS Running Buffer (contains Bovine Serum Albumin, EDTA, Phosphate Buffered Saline, pH 7,2)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD45 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD235a (Glycophorin A) MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD61 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
LS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
SuperMACS™ II Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

4.4 Immunzytochemische Färbung und Analyse

Material	Bezugsquelle
0,5ml, 2ml Sterile Eppendorftubes	Eppendorf, Hamburg
AB-Serum 10%	Biotest, Dreieich
Bildaufnahmeprogramm ImageJ Version 1.49b	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
Dako-Pen	DAKO, Glostrup (DK)
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma, Diesenhofen
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Digitalkamera AxioCam MRm	Zeiss, Oberkochen
Filter Filter Set 43 (Ex: BP 545/25, Em: BP 605/70) Filter Set 44 (Ex: BP 475/40, Em: BP 530/50) Filter Set 49 (Ex: G 365, Em: BP: 445/50)	Zeiss, Oberkochen
Glycergel, Mounting Medium	DAKO, Glostrup (DK)
Immunfluoreszenzmikroskop Axio Scope.A1	Zeiss, Oberkochen
Monoklonaler Anti-CD45 Mouse Anti-Human Antikörper (Klon HI30), PE Conjugate MHCD4504	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Monoklonaler anti-EGFR Antikörper (Klon LA1, Alexa Fluor 488 conjugate,	Millipore, Darmstadt
Monoklonaler Anti-Pancytokeratin Alexa Fluor Antikörper 488 (Klon AE1 /AE3)	Ebioscience, San Diego (USA)
Monoklonaler ERBB2 / ErbB2 Antikörper, (Klon Tyr 1248), Alexa Fluor 488 conjugate,	Millipore, Darmstadt
Objekträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Paraformaldehyd (PFA) 0,5%	Suesse, Gudensberg
TBS 292,7ml NaCl 4,24g Tris 26 g TrisHCl 1000ml Aqua dest.	
Triton 0,3% X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

5. Ergebnisse

5.1. Gesamtergebnisübersicht

Insgesamt wurden 35 Blutproben von 15 Patientinnen mittels der etablierten Detektionsmethode, bestehend aus Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, magnetischer Leukozyten-depletion und anschließender Immunfluoreszenzfärbung im Verlauf untersucht. Alle Patienten hatten ein Östrogenrezeptor-positives Mammakarzinom (ER-positiv), welches bereits metastasiert war (M1). Im Mittel waren die Patientinnen 53,4 Jahre alt, wobei die Jüngste 35 und die älteste Patientin 81 Jahre alt ist. Bei 62% respektive 40% der Proben ließen sich CTCs detektieren, wobei 40% CTC-Detektionsrate anhand von Keratinantikörpern und 62% anhand der zusätzlichen Marker EGFR/ERBB2 detektiert werden konnten. Neun Patientenproben (25,7%) waren bei beiden Ansätzen CTC-positiv und 8 Proben (22,8%) bei beiden Färbungen negativ, was eine Konkordanz von 48,6% ergibt. Im Durchschnitt wurden 1,9 respektive 1,6 CTC/ml Vollblut mit dem anti-Keratin Cocktail bzw. additive EGFR/ERBB2 Antikörpern detektiert. Dabei ging die Spannbreite von 0-50 respektive 0-14 CTCs pro Probe. Die Proben wurden alle manuell verarbeitet (siehe Methoden) und visuell einzeln per Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

5.2 Ergebnisse der Zelllinienversuche

Für den Vorversuch wurden exemplarisch fünf verschiedene Mammakarzinom Zelllinien (BT-20, SKBR-3, MDA MB 468, MDA MB 231, BT474) mit hoher EGFR-Expression kultiviert, in das Vollblut von gesunden Probanden gegeben, um ein möglichst realitätsnahes Ergebnis zu imitieren. Danach wurden die Proben aufgearbeitet und anschließend immunzytochemisch gefärbt und mikroskopiert. Dabei wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen, Inkubationszeiten und Reagenzien u.a. zur Fixierung experimentiert und das optimale Protokoll erarbeitet (siehe Abbildung 2). Zur Detektion der CTC wurde ein Pankeratinantikörper Cocktail (AE1/AE3), C11 (detektieren zusammen Keratin 2-8 und 10-18) und EGFR bzw. ERBB2-Antikörper verwendet. Um die Spezifität der Färbung zu verifizieren, wurden die entsprechenden Mammakarzinom-Zelllinien mit dem entsprechenden Antikörper gefärbt

(Abbildung 5) und das Ergebnis anschließend per Westernblot (Abbildung 8) bestätigt.

Abbildung 5 Tumorzelllinien mit Anti-AE1/AE3 +EGFR+ ERBB2 Antikörper gefärbt+ CD45 Gegenfärbung für Leukozyten

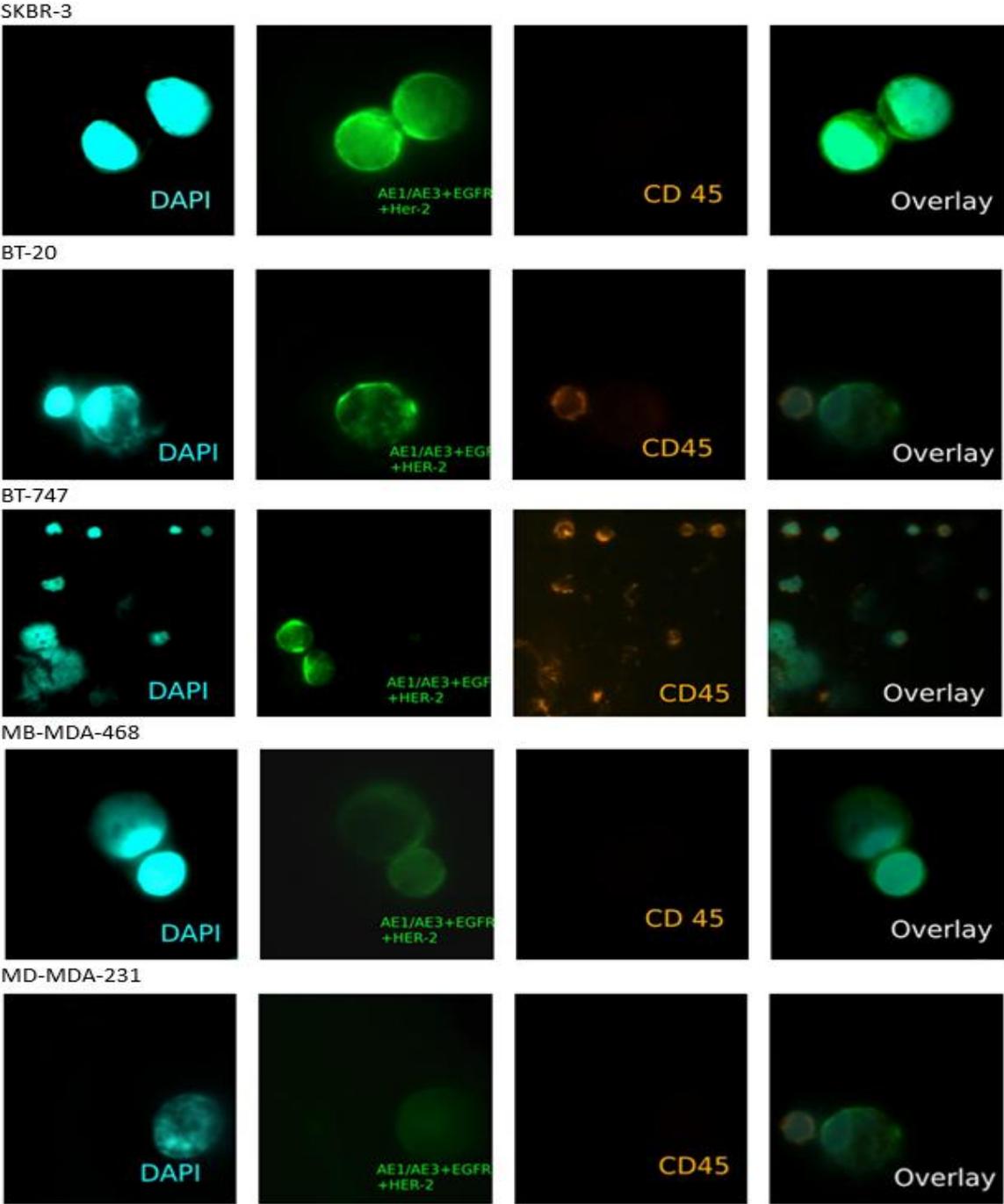
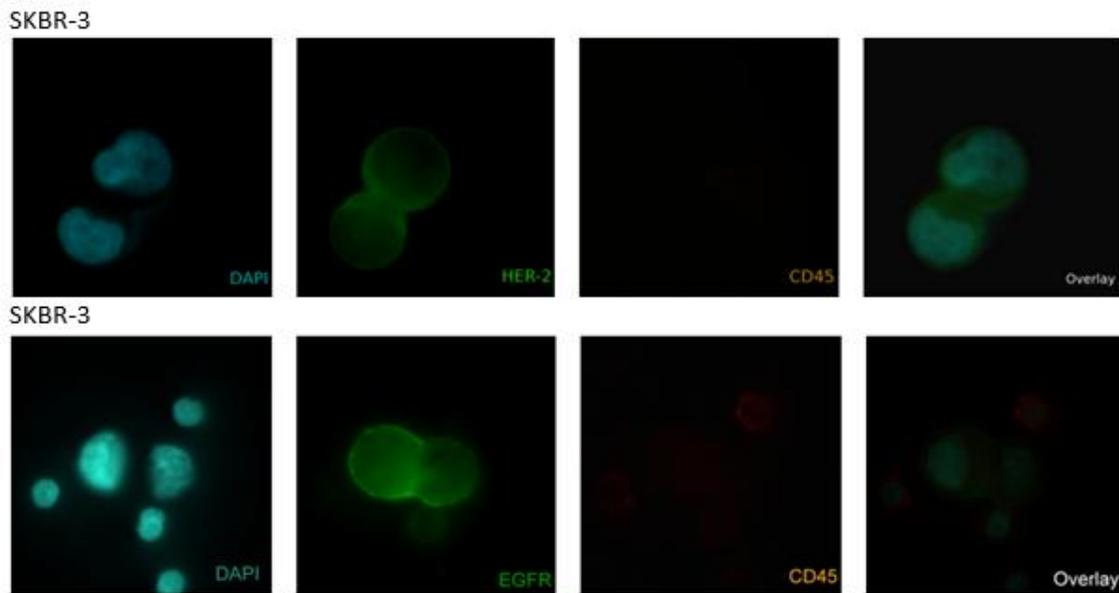


Abbildung 6 Tumorzelllinie SK-BR-3 mit EGFR bzw. ERBB2 Färbung, CD45 Gegenfärbung für Leukozyten



In der Abbildung 5 bzw. 6 entspricht die Farbe Blau die Zellkernfärbung mittels DAPI, die Farbe Grün färbt Keratine, EGFR und ERBB2 mittels fluoreszierender Antikörper und die Farbe Orange entspricht der Färbung mit CD45-Antikörper, einem Oberflächenprotein der Leukozyten. Eine Tumorzelle ist definiert durch ihre Positivität für DAPI und den Antikörpercocktail bestehend aus Antikörpern gegen Keratin (AE1/AE3), EGFR, ERBB2 und eine Negativität für CD45.

Es wurden zudem auch testweise einzelne EGFR- und ERBB2-Färbungen gemacht, die eine Spezifität der jeweiligen Färbung anzeigen sollten. Das beste Ergebnis erzielte eine Konzentration von 1:100 (EGFR) und 1:200 (ERBB2) bei einer Inkubation der Antikörper über Nacht. Die Zelllinie SK-BR-3 hat sowohl eine gesteigerte EGFR also auch ERBB2 Expression (Riaz *et al.*, 2009). Es wurden deshalb zur Bestätigung Färbungen mit EGFR-Antikörper bzw. ERBB2- Antikörpern angefertigt (siehe Abbildung 6).

Tabelle 8 Übersicht der genutzten Zelllinien

Zelllinie	Molekularer Subtyp	ERBB2 Status	EGFR-Status
BT-20	Basal-like	-	+
SKBR-3	Luminal	+	+
MDA MB 468	Basal-like	-	+
MDA MB 231	Basal-like	-	+
BT-474	Luminal	+	+

Riaz et al. BMC Cancer 2009

Abbildung 8 zeigt eine exemplarische CTC eines Patienten welche mittels einer Glaskapillare gepikt wurde. Gepikte CTCs können beispielsweise eingefroren oder direkt analysiert und charakterisiert werden (z.B. Einzelzellanalyse mittels DNA-Sequenzierung).

Abbildung 7 CTC eines Patienten

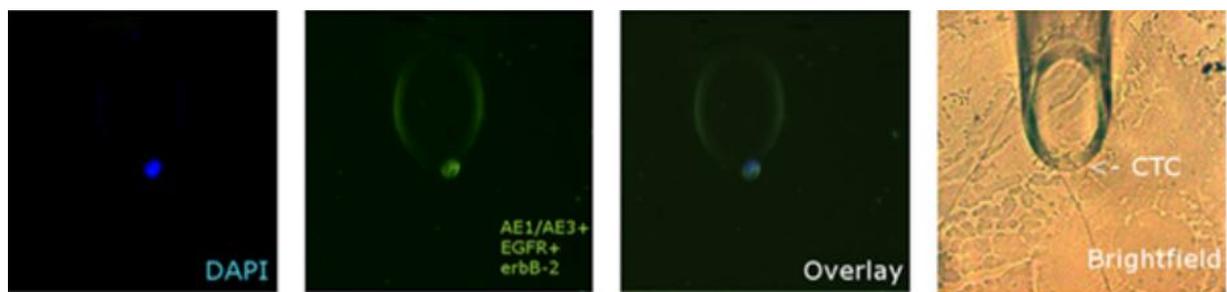
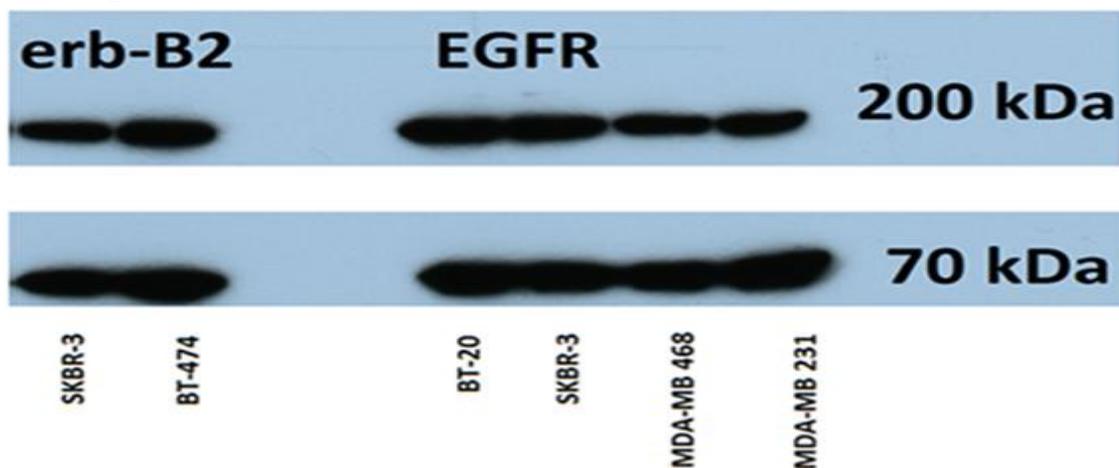


Abbildung 8 Western Blots der Proteine aus Ziellinien. Oben mit Anti EGFR/Erb-B2 Antikörpern unten Anti-Hsp-70 (als Loading Control)



Um die Spezifität der Bindung der Antikörper gegen den EGFR- und ERBB2-Rezeptor zu beweisen, wurde anhand der Proteinexpression von zwei ERBB2-positiven Ziellinien (SKBR-

3 und BT-474) und vier EGFR-positiven Ziellinien (BT-20, SKBR-3, MDA-MB 468 und MDA MB 231) mittels Western-Blot, die spezifische Bindung der Antikörper nachzuweisen. So zeigte sich eine deutliche Bande bei etwa 200 kD welche der Größe des EGFR- und ERBB2-Rezeptors entspricht. Als Loading-Kontrolle wurde ein Hitzeschockprotein (Hsp 70) gewählt, welches ubiquitär exprimiert wird.

5.3 Proof of Principle bei triple negativen Patienten

In diesem Vorversuch wurde ein Kollektiv aus 8 triple-negativen (Östrogen-, Progesteron- und ERBB2-Rezeptor negativ) Mammakarzinom-Patientinnen ausgewählt und ihr Blut auf CTC untersucht. Dabei wurden die Proben jeder Patientin in zwei Gruppen eingeteilt und eine Hälfte mit ausschließlich Keratin-Antikörpern gefärbt und die andere mit zusätzlicher Nutzung von EGFR/ERBB2-Antikörpern (siehe Tabelle 9).

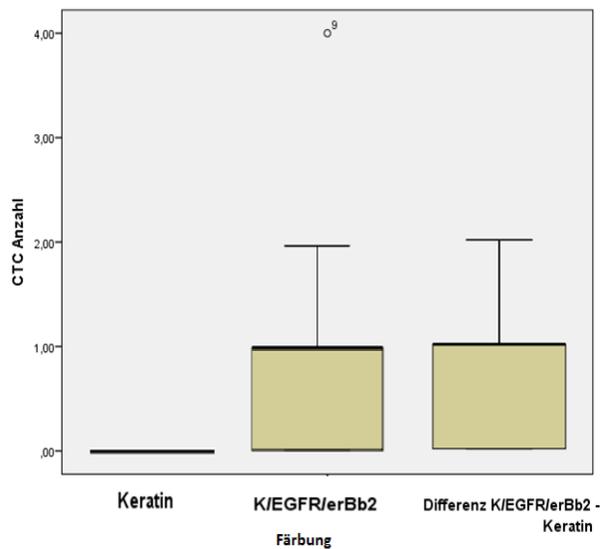
Dieses Kollektiv wurde gewählt, da tripel-negative Mammakarzinom Zellen häufig EGFR exprimieren; damit sollte dieser Vorversuch die prinzipielle Machbarkeit bzw. den Vorteil der Nutzung der EGFR/ERBB2-Antikörper unter Beweis stellen. Trotz des kleinen Kollektivs, konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,039$) festgestellt werden (Abbildung 9). Mit EGFR/ERBB2 Färbung waren 50 % der Proben CTC positiv und ohne EGFR/ERBB2 nur 12,5 % der Proben.

Tabelle 9 Ergebnis CTC-Detektion bei triple negativen Mammakarzinom-Patientinnen

Pat	AE1/AE3 ⁺ *	AE1/AE3 ⁺ EGFR ⁺ ERBB2 ⁺ *	Differenz
1	0	1	1
2	0	0	0
3	1	0	1
4	0	1	1
5	0	0	0
6	0	2	2
7	0	0	0
8	0	1	0
Ge- samt	1	5	4
CTC+ *	12,5 %	50 %	

*+DAPI+ +CD45-

Abbildung 7 Triple negative; Boxplot mit CTC Anzahl in Abhängigkeit zur Anfärbung



5.4 Ergebnisse des Hauptversuchs

5.4.1 klinische Parameter und CTC-Ausbeute des Patientenkollektivs

In diesem Abschnitt soll das gewählte Patientenkollektiv anhand klinischer Parameter vorgestellt werden (siehe Tabelle 10). Die klinischen Parameter der Patientinnen stammen aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Zum Zeitpunkt der primären Diagnose waren 20 % der Patientinnen prämenopausal und 80% Patientinnen postmenopausal. Bei 46,7% der Patientinnen war der Primärtumor im T1 Stadium, d.h. kleiner als 2 cm. In 20% der Patienten fand sich ein T4 Stadium mit Ausdehnung des Tumors auf die Brustwand. Die Lymphknoten waren in 73,3 % befallen. Alle Patientinnen hatten zu Beginn der Untersuchung Fernmetastasen (M1) und waren Östrogenrezeptor-positiv, aber nur 46,6 % der Patientinnen waren ERBB2-positiv. Bei der Gesamtzahl der CTC zeigten sich bei der Keratinfärbung 67 CTC und bei der Keratin/EGFR/ERBB2-Färbung 58 CTC. Im Mittel wurden 1,9 CTC bei alleiniger Keratinfärbung und 1,7 CTC bei Keratin/EGFR/ERBB2-Färbung detektiert. Der Median lag für die Keratinfärbung bei 0 (Spannbreite 0-50) und bei der Keratin/EGFR/ERBB2-Färbung bei 1 CTC (Spannbreite 0-14) pro 7,5ml Blutvolumen.

Tabelle 10 Klinische Parameter des gesamten Patientenkollektivs und CTC Detektionsrate

	Anzahl der Patienten (Anteil relativ)	K		K/EGFR/erbB2	
		CTC +	CTC-	CTC+	CTC-
Altersgruppen					
Prämenopausal	3 (20 %)	3	4	4	3
Postmenopausal	12 (80 %)	11	17	18	10
T-Stadium					
T0	1 (6.7 %)	2	1	2	1
T1	7 (46.7 %)	6	16	9	8
T2	2 (13.3 %)	1	2	2	1
T3	2 (13.3 %)	2	2	4	0
T4	3 (20 %)	2	6	5	3
N-Stadium					
N0	4 (26,7 %)	3	7	4	6
N1	7 (46.7 %)	7	8	15	3

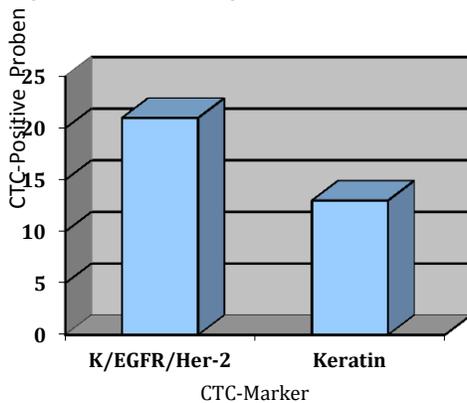
N2	3 (20 %)	4	3	4	1
N3	1 (6.7 %)	0	3	1	2
M-Stadium					
M0	0	0	0	0	0
M1	15 (100 %)	13	21	22	13
Ossär	12 (80 %)	16	10	9	17
Hepatisch	5 (33.3 %)	9	2	7	4
Lymphogen	6 (40 %)	10	5	6	13
Pulmonal	3 (20 %)	5	4	2	1
1 Organ betroffen	7 (46.7 %)	10	5	3	14
2 Organe betroffen	2 (13.3 %)	4	3	3	4
3 Organe betroffen	6 (40 %)	7	4	5	7
Grading					
G1	0	0	0	0	0
G2	12 (80 %)	12	16	17	11
G3	3 (20 %)	2	5	5	2
Hormonrezeptorstatus					
Östrogenrez. positiv	15 (100 %)	13	21	22	13
Progesteronrez. positiv	10 (66.7 %)	7	10	9	7
Progesteron negativ	5 (33,3 %)	6	11	13	6
ERBB2 positiv	7 (46,6 %)	7	10	9	8
ERBB2 negativ		7	11	13	5
Median		4	7	5	3

Abbildung 10 und Tabelle 11 beschreiben die absolute Anzahl der detektierten CTCs bzw. die absolute und relative Anzahl der CTC-positiven Proben bei jeweils Nutzung von anti-Keratin-Antikörpern oder zusätzlichem EGFR/ERBB2-Antikörpern. Dabei waren bei Färbung mit Keratin/EGFR/ERBB2 62,8 % der Proben CTC-positiv und bei alleiniger Keratin-basierter Detektion nur 40 % der Proben.

Tabelle 11 Absolute Anzahl der detektierten CTC und der relative Anteil der CTC-positiven Proben

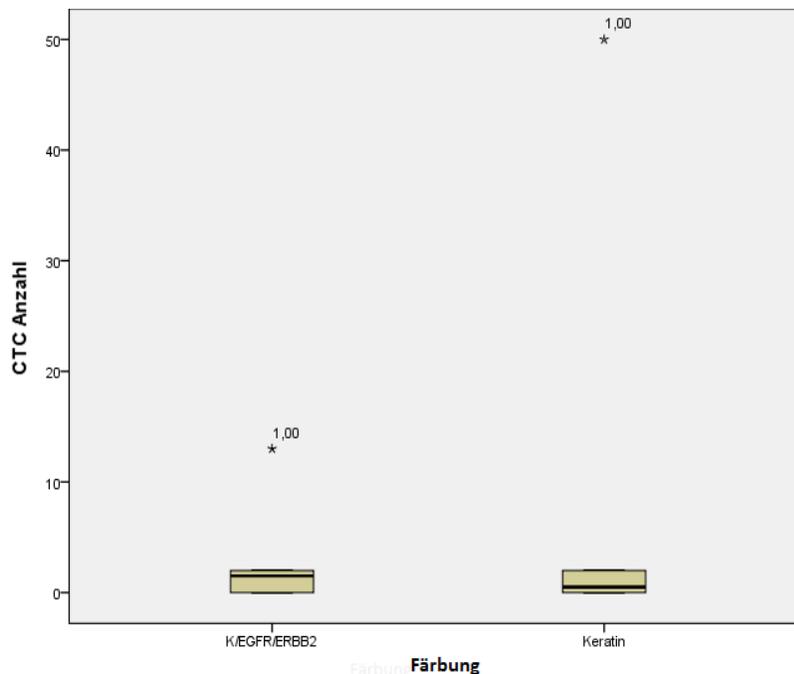
	Anzahl CTC	Mittlere Anzahl pro Patient	Median	Absolute Anzahl CTC-positiver Proben	Prozentualer Anteil der CTC+ Proben
+EGFR/ERBB2	58	1,7	1	21	62,8 %
-EGFR/ERBB2	67	1,9	0	14	40 %

Abbildung 8 Balkendiagramm Vergleich CTC positive Patientenproben



Ob sich die Positivitätsraten auch statistisch signifikant unterscheiden und somit ein Vorteil der CTC-Detektion durch die ERBB2/EGFR-Färbung vorhanden ist, soll die Abbildung 11 zeigen. Verglichen wurden dabei die Differenzen der CTC-Anzahl jeder Probe. Dabei ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der K/EGFR/ERBB2- bzw. Keratin-Färbungen ($p=0,007$, Wilcoxon-Test).

Abbildung 9 Boxplot CTC Anzahl K/EGFR/ ERBB2 vs. K



Bei insgesamt 17 Proben (Tabelle 12) gab es eine Übereinstimmung hinsichtlich CTC-Positivität bzw. CTC-Negativität (9 von 20 bzw. 8 von 20), dies entspricht 48,6 % der Proben. Durch Zufall errechnet sich ein Wert von 47,4 %. Der Cohens-Kappa-Test zeigt eine schwache Übereinstimmung bzw. zufallsbedingte Übereinstimmung.

Tabelle 12 Anzahl der Übereinstimmungen in CTC-Positivität und Negativität der Proben

		+EGFR/ERBB2	
		CTC+	CTC-
-EGFR/ERBB2	CTC+	9	5
	CTC-	13	8

Durch den Cohens-Kappatetest wurde errechnet, dass wenn das Ergebnis nur zufällig zustanden gekommen wäre, eine Übereinstimmung von 47,4% der Fall wäre.
 $\kappa:0,022$, SE von $\kappa:0,152$, 95%iges Konfidenzintervall [-0,276; 0,319].

Tabelle 13 zeigt die klinischen Daten der einzelnen Patienten. Dabei erkennt man im Alter eine Spannweite von 35-81 Jahren (Mittelwert 53,4 Jahre) bei einem Median von 48,5 Jahren. 50 % der Patientinnen sind ERBB2-negativ und 79 % weisen ein G2 und 21 % ein G3-Grading auf. 11 der 15 Patientinnen haben ossäre Metastasen, gefolgt von 6 Patientinnen mit lymphogener Metastasierung, 5 Patientinnen mit hepatischen Metastasen und 3 Patientinnen mit pulmonalen Metastasen.

Tabelle 13 klinische Angaben zu individuellen Patienten

Patient	Alter	ER	PR	ERBB2	TNM	Grading	Metastasierungsort
1	35	+	+	+	cT1c, cN0	G2	ossär
2	66	+	+	-	pT1c, N0	G2	hepatisch
3	47	+	+	-	cT1, cN0	G2	ossär
4	43	+	+	+	ypT1a, N1	G2	ossär, lymphogen, hepatisch
5	46	+	-	+	pT1c,pN1a	G2	ossär, lymphogen, hepatisch
6	65	+	-	-	pT1b, pN0	G2	ossär, Peritoneum
7	62	+	+	-	PT3,pN1	G3	ossär
8	47	+	+	-	cT4, cN1	G2	ossär, lymphogen, hepatisch
9	46	+	-	+	pT1, pNa2	G3	lymphatisch, pul-

							monal
10	56	+	+	-	cT4c, cN1	G2	ossär, lymphogen, pulmonal
11	50	+	+	-	pT3, pN2a	G2	ossär
12	81	+	-	+	pT2, pN2a	G3	ossär
13	69	+	+	+	cT4d, cN3	G2	Ossär, pulmonal, lymphogen
14	35	+	+	+	ypT0 ,N1	G2	Hepatisch
15	42	+	-	-	cT2, cN1	G2	Kutan, ossär

5.4.2 Metastasierung

Die Patientinnen hatten alle Metastasen und 7 von ihnen in jeweils einem Organ, eine Patientin in 2 Organen und 6 in 3 Organen. Dabei korrelierte die Anzahl der CTC-positiven Proben mit der Anzahl der Metastasenorte, jedoch aber nicht signifikant ($p=0,9$ vs. $p=0,31$). Es fand sich zudem auch keine Korrelation bezüglich CTC-Anzahl mit den verschiedenen Metastasierungsorten Leber, Knochen, Lunge und Lymphknoten ($p=0,6$ vs. $0,23$).

5.4.3 Grading

Als G3 wird ein Tumor klassifiziert mit einem hohen Malignitätsgrad bzw. niedriger Differenzierung der Zellen. Als G2 bezeichnet einen mittleren Malignitätsgrad. Die getesteten Patientinnen hatten zu 80 % ein G2 und 20 % ein G3-Grading (Tabelle 14). Bei Keratin/EGFR/ERBB2-Nutzung waren 71,4 % der Proben der G3-Patientinnen CTC-positiv, wohingegen die alleinige Nutzung von Keratin lediglich 40 % der Proben CTC-positiv war. Damit korrelierte die Zahl der gefundenen CTC zwar mit dem Grad der Dedifferenzierung, jedoch nicht signifikant ($p=0,7$ Keratin vs. $p=0,7$ Keratin/EGFR/ERBB2).

Tabelle 14 Grading der Tumore der Patientenproben

Grading K/E/H	CTC-positive Proben	CTC-negative Proben	Proben gesamt	Grading Keratin	CTC-positive Proben	CTC-negative Proben
1	0	0	0	1	0	0
2	17 (60,7 %)	11 (39,3 %)	28	2	12 (42,85 %)	16 (57,89 %)
3	5 (71,4 %)	2 (28,6 %)	7	3	2 (40 %)	5 (60 %)

P-Wert=0,7 [McNemar-Test]

5.4.4 ERBB2

Die Anzahl der CTCs bzw. die Anzahl der CTC-positiven Patienten korrelierte mit dem Vorhandensein eines ERBB2-positiven Status. Dabei fanden sich bei Keratin/EGFR/ERBB2-Färbung in 53 % der ERBB2-positiven Patienten CTCs bzw. bei Keratinfärbung lediglich 41,17 % der ERBB2-positiven Patienten (Tabelle 15). Nach statistischer Prüfung mittels des *Fishers exact test* ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz dieser Beobachtung ($p=0,99$ Keratin vs. $p=0,3$ Keratin/EGFR/ERBB2).

Tabelle 15 Prozentuale Anzahl der CTC-positiven und negativen Proben bezogen auf die Färbung

(K/E/H)	CTC-positiv	CTC-negativ	Patientinnen gesamt	K	CTC-positiv	CTC-negativ
ERBB2-positiv	9 (52,9 %)	8 (47,1 %)	17	ERBB2-positiv	7 (41,17 %)	10 (58,82 %)
ERBB2-negativ	13 (72,2%)	5(27,7 %)	18	ERBB2-negativ	7 (41,17 %)	11

5.4.5 Anstieg/Abfall der CTC-Anzahl im Verlauf

Es stellte sich die Frage, ob durch die zusätzliche Nutzung von EGFR/ERBB2-Antikörper ein Unterschied hinsichtlich der Prädiktion eines Krankheitsprogresses durch einen CTC-Anstieg feststellbar ist. Hierzu wurden die Differenzen der CTC-Anzahl jeweils der Visite 1 zu Visite 2 (Tabelle 17) und von Visite 2 zu Visite 3 analysiert (Tabelle 16).

Der Vergleich der CTC-Anzahl-Differenzen zwischen Visite 2 und 3 zeigte aufgrund der geringen Fallzahl (nur 6 von 15 Patienten), kein signifikantes Ergebnis ($p=0,705$). Der Vergleich der Differenzen zwischen Visite 1 und 2 hingegen, zeigte jedoch ein eindeutig signifikantes Ergebnis ($p= 0,026$). Somit konnte gezeigt werden, dass ein statistisch signifikanter Vorteil der EGFR/ERBB2-Nutzung in Bezug auf Prädiktion einer Progression der Erkrankung vorliegt.

Tabelle 16 Differenz CTC Anzahl Visite 1 und 2

V1-> V2	K/EGFR/erBb-2			K		
	Visit 1	Visit 2	Diff	Visit 1	Visit 2	Diff
Pat 1	0	0	0	0	0	0
Pat 2	1	2	1	0	2	2
Pat 3	0	1	1	0	0	0
Pat 4	2	2	0	0	1	1
Pat 5	0	3	3	1	1	0
Pat 6	1	0	1	0	1	1
Pat 7	1	1	0	0	0	0
Pat 8	2	1	1	1	0	1
Pat 9	0	2	2	0	0	0
Pat 10	0	1	1	0	0	0
Pat 11	2	4	2	2	2	0
Pat 12	0	2	2	1	0	1
Pat 13	2	0	2	0	0	0
Pat 14	7	2	5	1	0	1
Pat 15	1					

Anzahl der detektierten CTC zur Visite 1 bzw. Visite 2 und die Differenz (Anstieg bzw. Abfall der CTC) . Links für die Färbung mit Keratin, EGFR und erBb-2, rechts Keratin.

Abbildung 10 Boxplot CTC Anzahl Differenz Visite 1 und 2

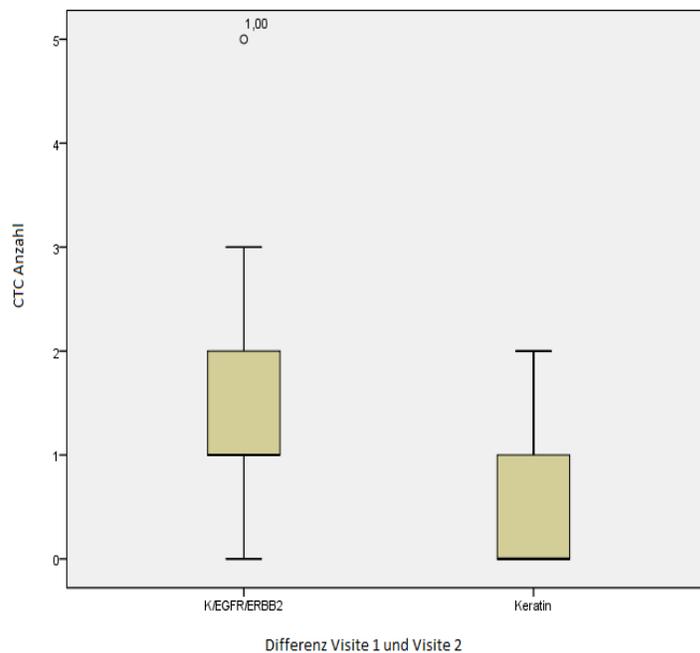
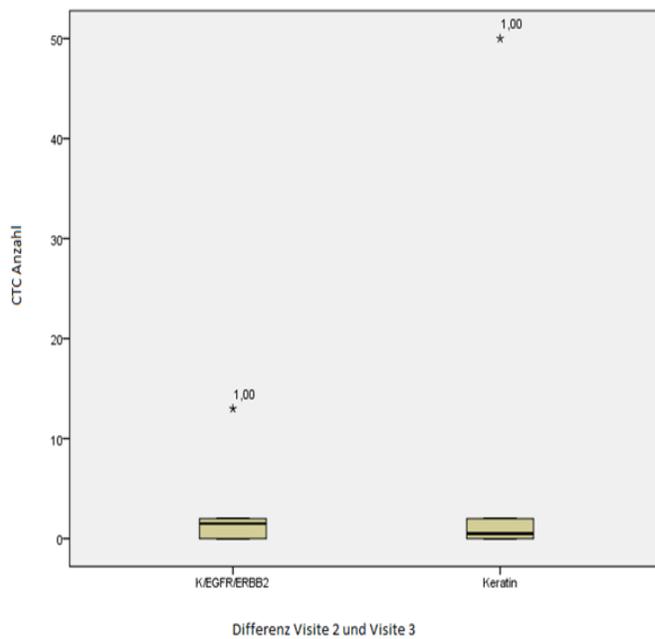


Tabelle 17 Differenz CTC Anzahl Visite 2 und 3

V2->V3	K			K/EGFR/erBb2		
	Visit 2	Visit 3	Diff	Visit 2	Visit 3	Diff
Pat 1						
Pat 2						
Pat 3	1	0	1	0	0	0
Pat 4						
Pat 5						
Pat 6	0	0	0	1	1	0
Pat 7						
Pat 8						
Pat 9	2	4	2	0	2	2
Pat 10	1	14	13	0	50	50
Pat 11						
Pat 12						
Pat 13	0	0	0	0	0	0
Pat 14	2	0	2	0	1	1
Pat 15						

Anzahl der detektierten CTC zur Visite 2 bzw. Visite 3 und die Differenz (Anstieg bzw. Abfall der CTC) . Links für die Färbung mit Keratin, EGFR und erBb-2, rechts Keratin.

Abbildung 11 Boxplot CTC Anzahl Differenz Visite 1 und 2



In Tabelle 18 wurde das klinische Ansprechen der Patientinnen auf die Therapie anhand von computertomographischen Aufnahmen der radiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorfs beurteilt. Dabei wurde bei 9 Patienten ein Follow-Up von insgesamt 2 Proben und bei 5 Patienten ein Follow-Up von 3 Proben analysiert. Dabei zeigte sich zu den in 64 % der zweiten Proben ein klinischer Progress und bei 14,3 % Remission und 21,4 % eine stabile Erkrankung (stable Disease).

Tabelle 18 klinischer Verlauf und Verhalten der CTC Anzahl

		Detektierte CTC bei +E/H	Detektierte CTC bei K	Differenz Detektion	Therapie Ansprechen	Zeitraum in Tagen
Pat. 1	Visit 1	0	0	0	Remission	
	Visit 2	0	0	0	Remission	85
Pat. 2	Visit 1	1	0	1	Progress	
	Visit 2	2	2	0	Progress	204
Pat. 3	Visit 1	0	0	0	ED Metast.	
	Visit 2	1	0	1	Progress	119
	Visit 3	0	0	0	Progress	84
Pat. 4	Visit 1	2	0	2	Progress	
	Visit 2	2	1	1	Remission	366
Pat. 5	Visit 1	0	1	1	Progress	
	Visit 2	3	1	2	Progress	189
Pat. 6	Visit 1	1	0	1	ED Metast.	
	Visit 2	0	1	1	Progress	172
	Visit 3	0	1	1	Progress	86
Pat. 7	Visit 1	1	0	1	ED Metast.	
	Visit 2	1	0	1	stable	110
Pat. 8	Visit 1	2	1	1	ED Metast.	
	Visit 2	1	0	1	Progress	100
Pat. 9	Visit 1	0	0	0	ED Metast.	
	Visit 2	2	0	2	Regress	77
	Visit 3	4	2	2	Progress	160
Pat. 10	Visit 1	0	0	0	Progress	
	Visit 2	1	0	1	Progress	177
	Visit 3	14	50	36	Progress	150
Pat. 11	Visit 1	2	2	0	Progress	
	Visit 2	4	2	2	Progress	349
Pat. 12	Visit 1	0	1	1	ED Metast.	

	Visit 2	2	0	2	SD	254
Pat. 13	Visit 1	2	0	2	ED Metast.	
	Visit 2	0	0	0	SD	197
	Visit 3	0	0	0	SD	62
Pat. 14	Visit 1	7	1	6	Progress	
	Visit 2	2	0	2	Progress	122
	Visit 3	0	1	1	Progress	86
Pat. 15	Visit 1	1	0	1	ED	
Gesamt/ Durchschnitt		58	67			156

1) (AE1/AE3+DAPI-CD45-) vs. 2) (AE1/AE3+Her 2 +EGFR +DAPI-CD45-) Detektionsrate

Die Tabelle 19 zeigt den Zusammenhang zwischen computertomographisch beurteiltem Krankheitsverlauf und der Anzahl detektierter CTCs bei der Detektion mittels Keratinantikörpern. 13 Patientenproben wurden zum Zeitpunkt abgenommen, in dem ein klinischer Progress radiologisch verifiziert wurde. 6 dieser 13 Proben (46 %) zeigten zu diesem Zeitpunkt einen Anstieg der CTC-Anzahl zur vorherigen Probe, wohingegen es bei 7 Proben (53,8%) zu einem Abfall bzw. gleichbleibender CTC-Anzahl kam. Die statistische Prüfung (mittels Fisher's exact test) zeigte jedoch keine signifikante Korrelation ($p=0,6$).

Tabelle 19 Vergleich CTC-Anzahl und klinischer Verlauf bei Nutzung von Keratin als Marker

	Anstieg CTC Anzahl	Abfall/= CTC Anzahl	Gesamt
Keratin			
CT graphisch Progress	6	7	13
CT graphisch kein Progress	2	5	7
Gesamt	8	13	20

Bei den Proben die mit zusätzlichen EGFR/ERBB2-Antikörpern behandelt wurden, zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen klinischem Progress und Anstieg der CTC Anzahl in den jeweiligen Proben (Tabelle 20). So zeigte sich bei 9 von 11 Proben (81,8 %) bei denen die Patienten einen klinischen Progress diagnostiziert bekamen, auch ein Anstieg der CTC Anzahl. Auch konnte bei klinischer Stagnation der Erkrankung in 5 von 7 Fällen (71,4 %) ein Abfall der CTC-Anzahl beobachtet werden. Jedoch war das Ergebnis bei einem p-Wert von 0,16 als nicht statistisch signifikant anzusehen.

Tabelle 20 Vergleich CTC Anzahl und klinischer Verlauf bei Nutzung von Keratin+ EGFR/ERBB2

	Anstieg CTC Anzahl	Abfall/= CTC Anzahl	Gesamt
+EGFR/ERBB2+ Keratin			
CT graphisch Progress	9	4	13
CT graphisch kein Progress	2	5	7
Gesamt	11	9	20

6. Diskussion

Die Assoziation der Expression des Markers EGFR bzw. ERBB2 in Bezug auf EMT und Metastasierung wurde schon eingehend im Kapitel 1.11 Abschnitt: EGFR erläutert und ist vor allem bei Tripel-negativen Mammakarzinomen weitreichend untersucht (Cluz *et al.*, 2009; Rodriguez-Panilla *et al.*, 2007; Magkou *et al.*, 2008). Auch bei den wesentlich häufigeren Östrogenrezeptor-positiven Tumoren konnte eine gesteigerte EGFR-Expression im metastasierten Stadium beobachtet werden (Nadal *et al.*, 2009). Neben der Bedeutung für Metastasierung ist die Assoziation der EGFR-Expression mit einer gesteigerten Resistenzentwicklung gegenüber endokriner Therapie von klinischem Interesse. So konnte gezeigt werden, dass EGFR-negative Tumoren höhere Remissionsraten aufweisen und dass das Auffinden von EGFR-positiven CTCs mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert ist (Kreienberg *et al.*, 2006).

Der Vorteil der Nutzung der Marker EGFR/ERBB2 für die Detektion von CTCs im Vergleich zu regulären Keratinen sollte Gegenstand dieser Arbeit sein. Interessant ist weiterführend die Frage, inwiefern die Ergebnisse eine Korrelation zur Progression der Erkrankung erlauben. In Bezug auf die Nutzung von EGFR/ERBB2 im Vergleich zur Keratin-basierten Detektion ließen sich keine vergleichbaren Untersuchungen in der Literatur finden. Jedoch deuten einige Arbeiten die Wichtigkeit bzw. Bedeutung von EGFR als Detektionsmarker an. So untersuchten Payne *et al.* die Stabilität der EGFR-Expression bei CTCs an 33 Blutproben von metastasierten Brustkrebspatienten. Es konnte mittels Cell-Search-Technologie die EGFR-Expression mit Anti-EGFR-Antikörpern auf der Oberfläche der CTCs gemessen und eine Konsistenz der EGFR-Expression im Verlauf gezeigt werden (Payne *et al.*, 2009). Unit *et al.* konnten mittels PCR-basiertem AdnaTest durch den Zusatz von EGFR- und ERBB2-Antikörpern (+EPCAM/MUC1-Antikörpern) die Rate an CTC-positiven Proben signifikant steigern und somit auf die Bedeutung als möglichen Detektionsmarker hinweisen (Unit *et al.*, 2015).

6.1 Ergebnisbetrachtung

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sollen im Folgenden diskutiert und bewertet werden.

6.1.1 Vergleich mit Literatur Detektionsraten

Die in dieser Arbeit ermittelten Detektionsraten stimmen weitestgehend mit denen in der Literatur überein. So zeigte sich in dem Kollektiv von 35 Proben von 15 metastasierten Patienten eine CTC-Positivitätsrate bei der Nutzung von K/EGFR/ERBB2-Antikörpern von 62,8 % und ohne EGFR/ERBB2-Antikörper 40 %. Heyes *et al.* und Müller *et al.* konnten an einem wesentlich größeren Kollektiv mittels CellSearch-Technologie (Marker: ERBB2, EpCAM+, CK 8, 18,19) in nur 49 % bzw. 50 % der untersuchten Patientinnen CTCs detektieren (Heyes *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2012). Die höchste Detektionsrate erreichten Witzig *et al.* mit 76 % der 25 analysierten Patientinnen. Diese nutzten ein digitales Mikroskopie-gestütztes Analyse Assay (ACIS), welches mittels Immunfluoreszenz die Marker EpCAM+, CK 8,18,19 detektiert. Jedoch beruhen diese Ergebnisse auf geringen Fallzahlen von n=25 und müssen in weiteren größeren Kohorten validiert werden. Zudem liegt im Gegensatz zu anderen Detektionsmethoden ein deutlich geringerer Cut-off-level von ≤ 1 CTC pro 7,5 ml vor. Bei den meisten der vielen Detektionsmethoden stehen eindeutige Validierungsstudien aus. Die hohe Anzahl unterschiedlicher Anreicherungsverfahren (EpCAM-basiert, negative Selektion von Leukozyten, nach Zellgröße), Detektionsmarker (z.B. EpCAM, Keratine, MUC, Oberflächenmarker oder RNA/DNA) und Assaysysteme (FACS, PCR, FISH, CellSearch, Adna-Test, Immunzytochemie) für die Detektion von CTCs macht es schwierig, diese Ergebnisse eindeutig miteinander zu vergleichen.

Abbildung 12 Vergleich Detektionsraten von CTC bei metastasierendem Mammakarzinom mit Literatur

Publikation/ Detektionsmethode	CTC – Positivitätsrate	n (mBRC)	Cut-off- level	Targets
Siehe oben	62,8 %	15 Pat. 35 Proben	≥ 1 CTC pro 7,5ml	Immunfluoreszenz: ERBB2+, EGFR+, AE1/AE3+, DAPI+
<i>Müller et al., 2012</i>		221 69% ER+ 50% ERBB2+		
-CellSearch	50%	116	≥5 CTC pro 7,5ml	Immunfluoreszenz: ERBB2, EpCAM+, CK 8,18,19
-AdnaTest	40%	88	≥5 CTC pro 7,5ml	RT-PCR: ERBB2, MUC1, GA733-2, b-actin. Tu- mor assoziiert mRNA
<i>Cristofanilli et al., 2004</i>		177 64% ER + 26% ERBB2+		
-CellSpotter Analyser	52% -51% der ER+ -43% der ERBB2+		≥ 5 CTC pro 7,5ml	Immunfluoreszenz: CK 8,18,19
<i>Witzig et al., 2002</i>				
-ACIS Digital microscopy- assisted analysis	76%	25	≥ 1 CTC pro 7,5ml	Immunfluoreszenz: EpCAM+, CK 8,18,19
<i>Hayes et al., 2006</i>				
-CellSearch System	49%	177	≥ 5 CTC pro 7,5ml	Immunfluoreszenz EpCAM+, CK 8,18,19
Mittelwert	53,4%	540		

6.1.2 Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTCs und dem Staging

Ob sich das Staging bzw. TNM-Daten mit der CTC-Anzahl korrelieren lassen, soll der folgende Abschnitt beantworten. In beiden Färbungen (Keratin oder Keratin/EGFR/ERBB2) zeigte sich, dass es bei Patientinnen mit einem undifferenzierten Primarius (G3) häufiger CTCs detektiert wurden als bei differenzierten Tumoren (G2). Fehm et al. (Marker: GA 733-2, MUC-1, Her-2; Detektion: Adnatest) konnten bei 431 Patientinnen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einem niedrigen Grading und einer erhöhten CTC-Anzahl beim Mammakarzinom feststellen (Fehm et al., 2009). In unseren Untersuchungen konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Grading der Primärtumoren und der Anzahl der CTC festgestellt werden ($p=0,7$ Keratin vs. $p=0,6$ Keratin/EGFR/ERBB2). Bezüglich der Metastasierungsorte zeigte sich ein gemischtes Bild. Bei Patientinnen mit 3 Metastasierungsorten (40 %) ließen sich in 7 von 12 Fällen (Keratin) bzw. 5 von 12 (Keratin+EGFR/ERBB2) CTCs detektieren. Überraschenderweise ließen sich bei den Patientinnen mit nur einem Metastasierungsort in 10 von 15 (Keratin) bzw. 3 von 15 (Keratin/EGFR/ERBB2) Fällen CTCs finden. Ein eindeutiger Trend oder statistischer Zusammenhang konnte sich in diesen Daten nicht zeigen ($p=0,9$ Keratin vs. $0,3$ Keratin/EGFR/ERBB2). Peeters et al. (Marker: EpCAM, CK 8, 18, 19; Detektion: CellSearch) untersuchten an 154 Mammakarzinom-Patientinnen u.a. ob < 3 und ≥ 3 Metastasierungsorte signifikante Unterschiede in der CTC-Detektion aufwiesen. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation von mehr als 3 Metastasierungsorten und einem häufigeren Auffinden von CTCs. Zudem konnten Peeters et al. eine signifikant höhere Anzahl von CTCs beim Vorhandensein von Knochenmetastasen detektieren (Peeters et al., 2014).

Ein positiver ERBB2-Rezeptorstatus beim metastasierten Mammakarzinom ist in den meisten Studien, wie auch bei Lang et al. (Marker: EpCAM, CK 8, 18, 19; Detektion: CellSearch), mit einer erhöhten Detektionsrate von CTCs assoziiert (Lang et al., 2009). Bei den untersuchten Patientinnen zeigte sich, dass über die Hälfte (53 %) der ERBB2-positiven Patientinnen CTC positiv waren, wohingegen nur rund 40 % bei alleiniger Keratinfärbung. Interessanterweise wurde in vielen CTC-Studien festgestellt, dass bei einigen Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mit initial negativem ERBB2-Status ERBB2 auf den CTCs

exprimiert wurde. So zeigten Meng *et al.* (Marker: CKs 4, 5, 6, 8, 10, 13, and 18; Detektion: Immunfluoreszenzmikroskopie), dass 9 bzw. Fehm *et al.*, dass 21 ERBB2-negativ getestete Patientinnen ERBB2-positive CTCs aufwiesen (Meng *et al.*, 2004; Fehm *et al.*, 2007). Dies zeigt, dass CTCs auch ein mögliches Werkzeug sein können die Patientenkohorte zu erweitern die von einer zusätzlichen Therapie mit Trastuzumab profitieren könnte. Zudem kann es aufgrund der Expressionsänderung auch als zusätzlicher Detektionsmarker dienen, da ERBB2 ein eher „EMT-stabiler“ Marker ist bzw. teilweise sogar an der EMT beteiligt (Ingthorsson *et al.*, 2015).

6.1.3 Vergleich der CTC-Detektion

Die Frage, ob eine additive Nutzung von EGFR/ERBB2 als Detektionsmarker einen signifikanten Vorteil in der Detektionsrate von CTC bietet, soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden. Die Detektion von CTCs mit „klassischer“ Immunzytochemie mittels Anti-Keratin-Antikörpern (z.B. AE1/AE3) wird schon seit über zehn Jahren für die Detektion von CTC angewandt und ist als standardisierte Methode etabliert. Auch das CellSearch-System detektiert CTCs mittels Immunzytochemie und ist dabei ein für die Prognoseabschätzung beim Mammakarzinom von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassenes Werkzeug.

Die Detektion von CTCs mittels immunzytochemischer Keratinfärbung ergab bei 31 Patientenproben (von insgesamt 14 Patienten) einen positiven CTC-Fund (40 %). Im Vergleich dazu konnte die additive Nutzung von EGFR- und ERBB2-Antikörpern bei 35 Proben (von insgesamt 21 Patienten) CTCs detektieren (62,8 %). Die Beobachtung der größeren Detektionsrate erwies sich als statistisch signifikant ($p=0,007$) und deutet damit einen Mehrwert der zusätzlichen EGFR/ERBB2-Nutzung als Marker an.

Beim Mammakarzinom ist die EGFR Expression variabel. So zeigte eine Studie von Magkou *et al.* an 154 invasiven Mammakarzinomproben bei 47 % der malignen Zellen eine EGFR-Expression, und Rimawi *et al.*, konnten sogar bei lediglich 18 % der 2.567 getesteten Proben eine EGFR-Expression messen (Magkou *et al.*, 2008; Rimawi *et al.*, 2010). EGFR-positive zirkulierende Tumorzellen konnten in einer Studie von Nadal *et al.* an 98 nicht-metastasierten Mammakarzinomen in 27,5 % der Fälle nachgewiesen werden (Nadal *et al.*,

2012). Viele ERBB2-negative bzw. Triple-negative (meist basal-like Subtyp) Mammakarzinome zeigen eine ausgeprägte EGFR-Überexpression (Gluz *et al.*, 2009; Rodriguez-Pinilla *et al.* 2007). Bei Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen hingegen ist jedoch eine negative Korrelation von EGFR- und Östrogenrezeptorexpression festgestellt worden (Magkou *et al.*, 2008; Rimawi *et al.*, 2010). Interessanterweise konnten Nadal *et al.* bei zirkulierenden Tumorzellen eine signifikante Korrelation zwischen Tumoren vom Luminal-Subtyp (meist ER-positiv) und der EGFR-Expression der CTCs feststellen (Nadal *et al.*, 2012). Dies lässt vermuten, dass die veränderte Expression von EGFR mit Metastasierungsprozessen assoziiert sein könnte. Dies soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

6.1.4 Korrelation des CTC Verlaufs mit dem Krankheitsverlauf

Im Folgenden sollte sich der Frage genähert werden, ob sich der Verlauf der CTC-Anzahl mit dem Krankheitsverlauf korrelieren lässt.-> Weglassen stimmt das? (oder ob EGFR/ERBB besser korreliert mit Progress?) Des Weiteren sollte herausgestellt werden, ob die Nutzung von EGFR/ERBB2 einen signifikanten Vorteil in der Detektion von CTCs bei Krankheitsprogression bzw. Therapieresistenz aufweist.

Der Vergleich des Anstiegs der detektierten CTCs zwischen Visite 1 und 2 zeigte einen signifikanten Vorteil ($p=0,026$) der Nutzung von EGFR/ERBB2-Antikörpern (gegenüber alleiniger Keratinfärbung) hinsichtlich der Prädiktion eines Krankheitsprogresses. Die Ergebnisse der Färbung mit EGFR/ERBB2 korrelierten also besser mit dem tatsächlichen klinischen Progress der Patienten. Jedoch ließ sich der signifikante Vorteil mangels ausreichender dritter Proben nicht für die Visite 2/3 bestätigen ($p=0,7$). Durch EGFR/ERBB2 konnte in 9 von 13 Fällen ein Anstieg der CTC-Anzahl bei klinischer Progression nachgewiesen werden, die Standardfärbung hingegen konnte nur in 6 von 13 Fällen den klinischen Progress bestätigen.

Für EGFR ist bekannt, dass eine gesteigerte EGFR-Expression bei Mammakarzinomen positiv mit einem schlechteren Gesamtüberleben und einer Hochexpression von Proteinen der Metastasierungskaskade korreliert (Magkou *et al.*, 2008). Andere Untersuchungen an

Mammakarzinomen haben gezeigt, dass die EGFR-Expression zudem mit einer gesteigerten Resistenzentwicklung gegenüber endokriner Therapie einhergeht und EGFR-negative Tumoren höhere Remissionsraten aufweisen (Kreienberg *et al.*, 2006).

Die Arbeit von Serrano *et al.* hat bei 78 Patientinnen mit nicht metastasiertem Mammakarzinomen gezeigt, dass eine hohe EGFR-Expression die Expression EMT-assoziiierter Proteine wie Twist, Snail und Slug induziert (Serrano *et al.*, 2014). Zudem wurde gezeigt, dass die EGFR-Inhibition, die EMT unterdrückt und die konsekutive Zellmigrations- und Invasionsfähigkeit vermindert. Auch wurde bei 40 % der Patienten ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem positiven EGFR-Status und der Kombination aus K-/VIM+/Slug+ herausgestellt. Dies bestätigt die Tatsache, dass eine EGFR-Expression negativ mit der Expression von Keratinen korreliert. Durch die experimentelle Aktivierung des EGFR-Signalweges in Mammakarzinom-Zelllinien (MCF-7) ist es zudem nicht nur gelungen, den EMT-Phänotyp zu induzieren, sondern auch die Keratin-Expression zu vermindern. Die Ergebnisse zeigten, dass Patienten mit K- negativen CTCs mit erhöhter EGFR-Expression ein schlechteres progressionsfreies Überleben aufwiesen.

Die endokrine Therapie basiert auf der Tatsache, dass Östrogenrezeptor-positive Tumoren hauptsächlich den ER-Signalweg für Proliferation und Wachstum nutzen. Neben dem Verlust der ER-Transkription ist besonders der Crosstalk zwischen dem EGFR und ER-Signalweges für das Verständnis des Therapieversagens wichtig. Die Kinasen des EGFR-Signalweges (MAPK/ERK) sind in der Lage, den Östrogenrezeptor (oder andere weiter stromabwärts liegende Mitglieder) posttranslational zu phosphorylieren und damit die Effizienz der endokrinen Therapie dramatisch zu senken (Dixon *et al.*, 2014). Auch ist bekannt, dass eine ERBB2-Überexpression zu einer ligandenunabhängigen Runterregulierung von ER führt (Musgrove et Sutherland, 2009). Dies erklärt, dass eine Kombinationstherapie mit EGFR/ERBB2-Inhibitoren das Outcome der Hormontherapie signifikant verbessern könnte (Musgrove et Schiff, 2009). Auch ist bekannt, dass ligandengebundener ER assoziiert ist mit einer Repression der EGFR/ERBB2-Transkription, sodass eine endokrine Therapie die Expression von EGFR/ERBB2 verstärken könnte (Osbourne et Schiff, 2011). Zudem konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die verminderte Expression des PAX2-Genes in

endokriner Therapie mit dem Auffinden resistenter Zellen mit einer erhöhten Expression von ERBB2 korreliert (Hurtado *et al.*, 2008). Dies könnte darauf hindeuten, dass aggressive ERBB2-positive Tumoren sich aus ER-positiven Luminal-Tumoren entwickeln könnten. Tumorzellen machen zahlreiche Veränderungen im Metastasierungsprozess durch. EGFR ist dabei sowohl mit der Metastasierung als auch mit der Therapieresistenz gegen endokrine Therapie assoziiert. Die Versuche zeigten, dass signifikant mehr CTCs durch die zusätzliche Nutzung von EGFR/ERBB2-Antikörpern detektiert werden konnten. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein statistisch signifikanter Vorteil bei der CTC-Detektion bei Patienten in Progression vorliegt, falls EGFR/ERBB2-Antikörper ergänzt werden. Dies zeigt die Bedeutung von EGFR/ERBB2 als Marker für CTCs und potenzieller Prognose- bzw. Detektionsmarker bei Therapieversagen bei östrogen-positiven Mammakarzinom-Patienten.

6.2 Limitationen und methodische Einschränkungen

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und deren Limitationen kritisch betrachtet werden.

6.2.1 Probenvolumen

Eine Schwierigkeit war die Gewinnung von ausreichend Probenmaterial. Zwar wurden jeweils 7,5 ml fassende EDTA-Röhrchen bereitgestellt, jedoch gelang es u.a. aufgrund zahlreicher klinisch wichtiger Blutabnahmen nicht immer die Röhrchen immer entsprechend zu füllen bzw. überhaupt zu füllen. Selbst bei 7,5 ml ergeben sich im Hinblick auf 5 Liter Gesamtblutvolumen, Zweifel um eine angemessene Repräsentierbarkeit zum tatsächlichen CTC-Vorhandensein im Blut. Tibbe *et al.* berechneten, dass unter der Annahme es befänden sich 500 CTCs in Zirkulation, die Wahrscheinlichkeit eine CTCs in 7,5ml zu finden etwa 50% sei. Nach diesen mathematischen Berechnungen, steige durch die Abnahme von vier statt einem Probenröhrchen, die Wahrscheinlichkeit auf bis zu 95% CTCs zu finden (Tibbe *et al.*, 2007). Auch Lalmahomed *et al.* zeigten bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen, dass eine Erhöhung der Probengröße von 7,5ml auf 30ml bei 20% mehr Patienten CTC finden ließen (Lalmahomed *et al.*, 2010). Dementsprechend wäre eine Erhöhung des Proben-

volumen eine Möglichkeit die CTC-Positivitätsrate zu steigern. Jedoch würde dies an der Patientencompliance und gesundheitlichen Zumutbarkeit für die Patienten scheitern. So ist die Tumoranämie eine häufige Begleiterscheinung von Tumor-Erkrankungen und zudem müssen sich die Patienten regelmäßig zahlreichen Blutentnahmen aussetzen. Eine Erhöhung auf 30 ml pro Patient erscheint daher nicht sinnvoll oder klinisch umsetzbar. Eine eleganter Lösungsansatz dieses Problem zeigt der CellCollector der mittelseines EpCAM bemantelten Stabes intravasal appliziert wird und dadurch das vorbeiströmende Blut befindliche CTCs anhand des EpCAM Antikörpern detektiert. Die klinische Anwendung und Patientenbereitschaft muss jedoch noch klinisch validiert werden und die EpCAM-negative CTC-Population würde nicht eingeschlossen.

6.2.2 Probenmenge

Daten die auf kleinen Fallzahlen beruhen sollten stets vorsichtig interpretiert werden; ob die Ergebnisse klinische Bedeutung haben, müssen weitere größere Untersuchungen mit größerer Fallzahl zeigen. Da die Einschlusskriterien für die Patientinnen waren eng: So mussten die Patientinnen einen Östrogenrezeptor-positiven Primarius haben, vor dem Beginn der Therapie stehen, die weiterführende Therapie musste am UKE ablaufen und die Patientinnen mussten zahlreichen zusätzlichen Blutentnahmen zustimmen. Jedoch nahmen viele der Vorausgewählten keine weiteren Termine in Hamburg wahr oder den Patientinnen erging es klinisch so schlecht, dass sie den zusätzlichen Blutabnahmen nicht zustimmten. Einige der Patienten verstarben sogar während des Beobachtungszeitraums aufgrund ihrer fortgeschrittenen Erkrankung. Kritisch angemerkt werden muss, dass die Abnahmeintervalle stark variierten.

6.2.3 Wiederfindungsrate

CTCs sind extrem seltene Ereignisse mit ca. 1 CTC pro 10^6 - 10^7 Blutzellen (Hong et Zu, 2013). Die mehrschrittige Prozessierung bzw. Präparation kann zu Verlust und Beschädigung der Zellen führen. Bei der geringen Menge kann dies einen durchaus signifikanten Unterschied darstellen. Durch Spiking-Experimente mit Mammakarzinom-Zelllinien (u.a.

MCF-7) in Blut von gesunden Probanden (Blutspender des Instituts für Transfusionsmedizin am Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf), sollte die Recoveryrate des Protokolls zunächst optimiert werden. Das beste Ergebnis entsprach einer Recoveryrate von 70-80 % und entsprechen damit weitestgehend den Ergebnissen aus der Literatur. Riethdorf *et al.*, zeigten dass das Cellsearch System eine Recoveryrate (SK-BR-3) von etwa 80 % aufweist (Riethdorf *et al.*, 2007). Die beiden auf Dichtegradientenzentrifugierung basierenden Systeme Onkoquick und Ficoll Dichtegradienten wiesen ähnliche Recoveryrates zwischen 70-90 % auf (Gertler *et al.* 2003). Die in unserem Protokoll anschließende Depletion von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten mittels von magnetischer Beads die mit CD45, CD235 und CD61 gekoppelt sind, kann zudem zu weiteren möglichen Zellverlusten führen. Je mehr Präparationsschritte umso mehr Zellverlust und Zerstörung (durch Zentrifugierung etc.) ist möglich. Ein optimales Protokoll sollte dementsprechend möglichst wenig Schritte und vor allem Umfüllungen des Probenmaterials aufweisen.

6.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie basiert auf spezifischen Interaktionen zwischen Antikörpern und Zielstruktur. Bei der Frequenz von ca. 1 Tumorzelle / 1.000.000 Leukozyten kann es jedoch gelegentlich zu unspezifischen Ablagerungen der Antikörper kommen, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Dies wäre problematisch im Hinblick auf die spätere klinische Durchführbarkeit bzw. die Nutzung als POCT-Tool (Point-of-Care-Testing). Die CTCs werden visuell nach dem Formel $(K/EGFR/ERBB2)^+/CD45-/DAPI+$ identifiziert. Marrinucci *et al.* fanden jedoch, selbst bei gesunden Kontrollpatienten zwar sehr wenige, aber dennoch vermeintliche CTC mittels Immunfluoreszenz $(K+/CD45-/DAPI+)$. Sie gehen deshalb sogar soweit nicht von zirkulierenden Tumorzellen sondern zirkulierenden epithelialen Zellen zu sprechen (Marrinucci *et al.*, 2012). Das lässt drauf schließen, dass möglicherweise auch Gesunde eine gewisse Anzahl von Zellen epithelialen Ursprungs im Blut aufweisen. Trotz Leukozytendepletion ist jedoch eine Vielzahl an Leukozyten vorhanden, die die Suche nach den CTCs verkomplizieren. Es sollten weitere Untersuchungen zur Methodenoptimierung der magnetischen Zelldepletion angestrebt werden. Das

Problem hierbei ist, dass die physikalischen Kräfte die dort wirken (Magnetismus) unweigerlich zu unspezifischen weiteren Zellverlusten, u.a. Tumorzellen, führen. Das Ziel der weiteren Weiterentwicklung sollte die Optimierung eines sensitiveren und spezifischeren Protokolls zur Anreicherung der Tumorzellen sein, um die Recoveryrate zu erhöhen.

Da viele Schritte manuell durchgeführt werden bietet dies eine Lücke für systemische Fehler. Im Gegensatz dazu stehen automatisierte und damit auch standardisierte Computer gesteuerten Verfahren wie CellSearch. Zudem könnte es zu interindividuellen Diskrepanzen kommen, da es auch von der Subjektivität des Betrachters abhängt, ob die Zelle nun eine Tumorzelle gewertet wird oder nicht. Zudem wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dadurch erschwert.

6.3 Ausblick

Im Allgemeinen ist die Detektion von CTCs eine sehr elegante Möglichkeit, anhand derer man zukünftig mit geringer Invasivität (und damit auch Belastung für den Patienten) schon sehr früh prognostische und möglicherweise therapiebeeinflussende Entscheidungen treffen könnte. Zudem stellen die CTCs eine Kohorte von Tumorzellen dar, die mit dem Potenzial der hämatogenen Metastasierung ausgestattet sind und deshalb sehr interessant für die weitere Analyse z.B. im Hinblick auf mögliches Stammzellpotenzial oder Targets für zielgerichtete Therapien sind. Viele der genutzten Detektionsmarker, wie die klassischen Keratine und EpCAM, scheinen der Heterogenität der CTC-Subpopulationen nicht ausreichend Rechnung zu tragen. Sowohl im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung als auch für die Forschung scheinen EGFR und ERBB2 aus vielerlei Hinsicht interessante Marker zu sein. Besonders EGFR ist mit einem mesenchymalen Phänotyp der CTCs und mit Proteinen der Metastasierungskaskaden assoziiert und scheint eine wichtige Rolle bei der Resistenzentstehung gegen endokrine Therapie zu spielen. So konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass durch die Zugabe von EGFR/ERBB2-Antikörpern in signifikant mehr Proben CTCs detektiert werden konnten. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein statistisch signifikanter Vorteil der EGFR/ERBB2-Antikörperfärbung – im Vergleich zur Keratin-basierten Färbung - in Bezug auf Prädiktion einer Progression der Erkrankung vorliegt. Sie könnten hoffnungsvolle Detektionsmarker für CTCs mit (semi-) mesenchymalem Phänotyp sein und somit eine sinnvolle Ergänzung für die etablierten Marker (Keratine und EpCAM) darstellen, um die Detektionsrate von CTCs zu steigern.

Es ließ sich ein vielversprechender Trend aufzeigen, bei dem es sich lohnt, ihm in weiteren Untersuchungen an größeren Kohorten nachzugehen. So könnten zukünftig anhand molekularer Charakterisierungen- z.B. anhand des Nachweises von Amplifikation des EGFR-Gens in den CTCs - klinische Konsequenzen gezogen werden. Baselga *et al.* zeigten beispielsweise, dass die Ergänzung des EGFR-Inhibitors Cetuximab zu einer Cisplatinbasierten-Chemotherapie versus Cisplatin- Monotherapie einen signifikanten Unterschied in der Ansprechrate bei triple-negativen Mammakarzinomen aufwies (Baselga

et al., 2013). Auch beim metastasierten Kolonkarzinom konnten Gasch *et al.* zeigen, dass viele CTCs eine gesteigerte EGFR-Expression aufwiesen. Bei einigen CTCs konnten sogar EGFR-Amplifikationen mittels Single-Cell-Analysis in den CTCs nachgewiesen werden (Gasch *et al.*, 2013). Es zeigte sich dort jedoch eine erhebliche intra- und interpersonelle Heterogenität bezüglich der EGFR- Expression, welche das unterschiedliche Ansprechen auf die Cetuximabtherapie (trotz KRAS-Wildtyp) erklären könnten.

Die molekulare Phänotypsierung der CTCs könnte auch klinisch genutzt werden, um z.B. die Patienten mittels resistenzassoziierten Genen bzw. deren Transskripten (z.B. EGFR) in den CTCs zu überwachen oder den Marker-Status (ERBB2, ER *etc.*) zu reevaluieren. Dadurch könnte eine rechtzeitige Therapieintensivierung oder Umstellung empfohlen werden. So zeigten Lindström *et al.*, dass 33 % der untersuchten metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen einen Switch im Hormon bzw. ERBB2-Rezeptorstatus in den Metastasen - verglichen mit dem Primarius - aufweisen (Lindström *et al.*, 2012). Auch bei Gasch *et al.* zeigte sich beispielsweise bei 8,4 % der CTC-positiven Mammakarzinom-Patienten mindestens einen CTC mit starker ERBB2-Expression trotz negativem ERBB2-Status beim Primärtumor (Gasch *et al.*, 2016). Dank Sanger-Gensequenzierung konnten einzelne CTCs auf Veränderungen im ERBB2-Genbereich untersucht werden, um damit eine mögliche Therapieresistenz gegen *Trastuzumab* festzustellen. Zudem konnte eine Heterogenität bezüglich zahlreicher Gene wie ERBB2 oder PIK3CA der intraindividuellen CTCs festgestellt werden. Diesen Umstand untersucht die zurzeit (2017) noch laufende multizentrische DETECTIII Studie (clinicaltrials.gov). Diese soll zeigen, ob Patienten mit ERBB2-negativen Primarius und ERBB2-positiven CTC von einer Lipatinib (Tyrosinkinaseinhibitor am EGFR und ERBB2) Therapie profitieren können (Gregorio *et al.*, 2013).

Die TREAT CTC-Studie untersucht hingegen, ob ERBB2-negative Patientinnen die nach OP bzw. Chemotherapie persistierend CTC aufweisen von einer Therapie mit *Trastuzumab* (Antikörper gegen ERBB2) profitieren. Auch dort stehen derzeit (2017) noch Ergebnisse aus. Neben der Heterogenität und Variabilität der ERBB2-Expression zeigt auch die Östrogenrezeptorexpression erhebliche Varianzen. Babayan *et al.* konnten zeigen, dass bei

initial ER-positiven Patienten ER-negative CTCs gefunden wurden und sich sogar bei einigen Patientinnen ausschließlich ER-negative CTCs detektieren ließen. Auch dies lässt auf eine heterogene ER-Expression schließen und könnte die Therapieresistenz ER-positiver Tumoren erklären.

Bis jetzt gibt es nur klinische Studien die phänotypische Eigenschaften und deren Einfluss auf die Therapie untersuchen. Zukünftig wäre es sehr interessant, die gefunden CTC noch weiter zu charakterisieren und auf genetischer Ebene zu analysieren. Dazu könnten die schon im wissenschaftlichen Setting genutzten Methoden wie Einzelzellanalysen (Single-Cell analysis) bzw. *Next Generation Sequencing* genutzt werden, durch die in kürzester Zeit das gesamte Tumor-Genom sequenziert werden könnte. Jedoch sind vor Anwendung im klinischen Setting noch große multizentrische Studien nötig, um das Potential dieser Methoden für die Praxis zu bestätigen. Die prognostische Relevanz von CTCs gilt bei standardisierten Bedingungen z.B. unter Verwendung von CellSearch (Cut-off >5CTC pro 7,5 ml Blut) beim Mammakarzinom als gesichert (Gonzales *et al.*, 2011; Goldkorn *et al.*, 2014). Somit hat schon jetzt die alleinige quantitative Analyse der CTC-Anzahl das Potential das Fortschreiten der Erkrankung schneller bzw. sensitiver aufzuzeigen als die radiologische Bildgebung. Dies könnte in naher Zukunft eine verbesserte Prognoseeinschätzung, Therapieplanung und vor allem Patientenberatung ermöglichen. Die weitere Forschung an verbesserten Detektionsmethoden bzw. Markern wird dazu einen entscheidenden Schritt beitragen, den betroffenen Patientinnen eine bessere Behandlung zu ermöglichen.

6.4 Fazit

Da die Krankheitsprogression im metastasierten Stadium beim Mammakarzinom mit erheblichen Änderungen der phänotypischen Ausstattung der CTCs einhergehen kann (u.a. Verlust der Keratinexpression), ist es wichtig möglichst stabile Marker bzw. Marker die mit aggressivem Wachstum assoziiert sind, zu finden. Die in dieser Arbeit untersuchten Marker EGFR und ERBB2 scheinen das Potenzial zu haben, das Spektrum für die Detektion von CTCs bei Östrogen-positiven Mammakarzinomen zu erweitern. Besonders

bei gemeinsamer Nutzung könnte so eine breite Masse von vorher nicht oder nur schlecht detektierbaren CTCs erfassbar werden. Der in dieser Arbeit dargestellte signifikante Vorteil in Bezug auf Detektion ($p=0,007$) und bessere Korrelation zum Krankheitsverlauf ($p=0,026$) im Vergleich zu alleinigen Keratin-basierten Detektion, zeigt, dass es wichtig ist diese Beobachtungen weiter zu verfolgen bzw. in größeren Kohorten zu bestätigen. Nichtsdestotrotz ist es von Bedeutung im Auge zu behalten, dass der relativ kleine Probenumfang und -zeitraum nur in eingeschränktem Maße erlaubt, Aussagen bezüglich der klinischen Relevanz machen zu können. Trotzdem könnten diese Erkenntnisse in Zukunft für den klinischen Gebrauch und weitere Forschungen eine wertvolle Hilfe sein, da nicht detektierte CTCs in der Klinik falsche Sicherheit vortäuschen könnten und bei klinischer Anwendung z.B. vorzeitigen Therapieabbruch oder fehlende Therapieintensivierung o.ä. nach sich ziehen könnten.

7. Zusammenfassung

Im Laufe der Metastasierung von Karzinomzellen des Mammakarzinoms kommt es häufig zu einer Veränderung des Expressionsmusters der für die Zellteilung und Proliferation wichtigen Proteine, wie z.B. des Östrogenrezeptors und des ERBB2-Rezeptors (im Weiteren ERBB2). Diese Veränderungen zeigen sich in Expressionsunterschieden zwischen Proben von Primärtumor und Metastasen oder klinisch in Therapieversagen endokriner Therapien. Zudem ist bekannt, dass Krebszellen eine sogenannte EMT (Epithelial-mesenchymale Transition) vollziehen können, die durch die Veränderung der Expression vor allem epithelialer Marker die Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTCs) vor erhebliche Probleme stellt.

Wichtig für diese Arbeit ist die Tatsache, dass die Expression von EGFR bei einer EMT gesteigert werden kann und dass eine gesteigerte Expression von EGFR oder ERBB2 zudem mit einer Resistenz gegenüber endokriner Therapie korreliert. Ziel dieser Arbeit war es, anhand von Blutproben von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom die Bedeutung von EGFR und ERBB2 als zusätzliche Detektionsmarker zu explorieren und eine mögliche Korrelation zwischen Expressionssteigerung und Versagen einer endokrinen Therapie aufzuzeigen. Dazu wurden 35 Blutproben von 15 Patientinnen des UKE mit primär metastasiertem Mammakarzinom mit positivem Östrogenrezeptor-Status vor und während der Therapie auf das Vorhandensein von CTCs mittels Immunzytochemie untersucht. Um den Nutzen von EGFR und ERBB2 als zusätzliche Detektionsmarker für CTCs zu bestimmen, wurden die Proben in zwei Gruppen geteilt: Keratin-Färbung vs. Keratin+EGFR+ERBB2-Färbung. Daneben stellte sich auch die Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen Progredienz der Erkrankung (computertomographische Aufnahmen beurteilt nach RACIST-Kriterien) und einer erhöhten Detektionsrate durch zusätzliche Nutzung von EGFR/ERBB2-Antikörpern bei der Detektion.

Die Ergebnisse zeigen eine Detektionsrate an CTCs von 62,8 % bei Nutzung von additiven EGFR/ERBB2-Antikörpern. Der konventionelle epitheliale Marker Keratin hingegen konnte nur in 40 % der Proben CTCs detektieren. Die Beobachtung der größeren Detektionsrate

erwies sich als statistisch signifikant ($p=0,007$) und deutet damit einen Mehrwert der zusätzlichen EGFR/ERBB2-Antikörper Nutzung als Marker an. Es wurde zudem der mögliche Vorteil der Nutzung von EGFR/ERBB2 in Bezug auf den klinischen Verlauf untersucht. Der Vergleich des Anstiegs der detektierten CTCs zwischen Visite 1 und 2 zeigte einen signifikanten Vorteil ($p=0,026$) der Nutzung von EGFR/ERBB2. Somit konnte gezeigt werden, dass ein statistisch signifikanter Vorteil der EGFR/ERBB2-Nutzung in Bezug auf Prädiktion einer Progression der Erkrankung vorliegt.

Die Ergebnisse scheinen viel versprechend im Hinblick auf die vermehrte Detektion von CTCs bei Erweiterung des Spektrums der Detektionsmarker und sollten dementsprechend in größeren Kohorten validiert werden, auch, um die Bedeutung der frühzeitigen Detektion einer Therapieresistenz mittels CTCs weiter zu explorieren.

8. Summary

During dissemination and metastasis formation, tumor cells often undergo a change in expression of proteins that are essential for cell-division and proliferation like e.g., estrogen-receptor (ER) or ERBB2-receptor. Clinically, this change can be observed as failure of endocrine therapy or experimentally by observing different expression profiles of samples of primary tumors and metastasis. On top of that, it is known that tumor cells can undergo a so called epithelial-mesenchymal transition (EMT) and especially the expression of epithelial markers such as keratins is downregulated which challenges the detection of circulating tumor cells (CTCs). Essentially for this work was the fact that expression of EGFR is often increased in breast cancer tumor cells and that increased expression of EGFR or ERBB2 is correlated with resistance against endocrine therapy.

The purpose of this study was to explore the significance of EGFR and ERBB2 as additional detection marker and possible correlation between their expression patterns and failure of endocrine therapy. For this study, blood from patients with metastasized breast cancer was investigated. In total, 35 blood samples from 15 patients of the gynecologic department of the UKE were included. All patients were diagnosed with an estrogen receptor positive primary tumor and their blood was examined before and during therapy for CTCs by immunocytochemistry.

To determine the advantage of EGFR and ERBB2 as additional detection markers for CTC, the samples were divided into two groups (keratin vs. keratin+ EGFR+ERBB2). In addition, the question arose whether there is a correlation between disease progression (as evaluated by CT-scan using RACIST criteria) and increased detection rate of EGFR and ERBB2 as additional markers. The usage of EGFR- and ERBB2-antibodies showed detection rate of CTCs (62.8%). Whereas the conventional epithelial marker keratin could only detect CTCs in 40% of the samples. The observation of a greater detection rate was statistically significant ($p=0.007$) which showed the potential added value of EGFR and ERBB2. On top that, we examined the possible correlation of EGFR/ERBB2 expression and the patient's clinical outcome. The comparison of increase in CTC amount between the patients' first and sec-

ond visit showed a significant association ($p=0.026$) with keratin/EGFR/ERBB2 detected cells compared keratin only. Although our results are very promising in respect to increased detection of CTCs by widening the spectrum of detection markers, these findings should be further investigated in larger cohorts to explore the importance of CTC detection as a tool for early detection of therapy resistance.

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE1/AE3	anti-Pan Keratin
BRCA-Gen	BRCA Cancer gene
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
CK	Cytokeratin
CTC	Circulating Tumor Cell(s)
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DFS	Disease free survival
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	epitheliale Mesenchymale Transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ER	Estrogenreceptor
ET	Endokrine Therapie
h	Stunde
ERBB2	human epidermal growth factor receptor 2, ERBB2
L	Liter
MACS	Magnetic Cell Isolation and Cell Separation
MAPK/ERK pathway	mitogen-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinases
mBRC	Metastasized Breast Cancer
min	Minute
OS	Overall survival
PAX-2 Gen	Paired Box gene 2
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
Tabelle	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le cancer
z.B.	Zum Beispiel

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Altersspezifische Erkrankungsraten nach Geschlecht, ICD-10 C50, Deutschland 2011 – 2012 je 100.000.....	1
Abbildung 2 Modell der Tumorzirkulation und Tumor-Dormancy.....	13
Abbildung 3 Algorithmus für die adjuvante endokrine Systemtherapie des Mammakarzinoms	17
Abbildung 4 magnetische Zellseparation	31
Abbildung 5 Tumorzelllinien mit Anti-AE1/AE3 +EGFR+ ERBB2 Antikörper gefärbt+ CD45 Gegenfärbung für Leukozyten	42
Abbildung 6 Tumorzelllinie SK-BR-3 mit EGFR bzw. ERBB2 Färbung, CD45 Gegenfärbung für Leukozyten	43
Abbildung 7 CTC eines Patienten	44
Abbildung 8 Western Blots der Proteine aus Ziellinien. Oben mit Anti EGFR/Erb-B2 Antikörpern unten Anti-Hsp-70 (als Loading Control)	44
Abbildung 9 Triple negative; Boxplot mit CTC Anzahl in Abhängigkeit zur Anfärbung.....	46
Abbildung 10 Balkendiagramm Vergleich CTC positive Patienten	49
Abbildung 11 Boxplot CTC Anzahl K/EGFR/ ERBB2 vs. K	49
Abbildung 12 Boxplot CTC Anzahl Differenz Visite 1 und 2	53
Abbildung 13 Boxplot CTC Anzahl Differenz Visite 1 und 2	54
Abbildung 14 Vergleich Detektionsraten von CTC bei metastasierendem Mammakarzinom mit Literatur.....	60

9.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TNM Klassifikation des Mammakarzinoms	4
Tabelle 2 Tumorstadien nach UICC für das Mammakarzinom	5
Tabelle 3 Immune reactive score; Immunhistochemischer Hormonrezeptornachweis.....	7
Tabelle 4 H-Score; semiquantitativer immunohistochemischer Score.....	8
Tabelle 5 Allred-Score; Score nach Färbeintensität.....	8
Tabelle 6 Antikörper gegen die häufigsten Keratine beim Mammakarzinom	23
Tabelle 7 genutzte Mammakarzinom Zelllinien mit Hormonstatus u.a.	26
Tabelle 8 Übersicht der genutzten Zelllinien	44
Tabelle 9 Ergebnis CTC Detektion triple negativen.....	46
Tabelle 10 Klinische Parameter des gesamten Patientenkollektivs und CTC Detektionsrate.....	47
Tabelle 11 Absolute Anzahl der detektierten CTC und der relative Anteil der CTC-positiven Proben	49
Tabelle 12 Anzahl der Übereinstimmungen in CTC-Positivität und Negativität der Proben	50
Tabelle 13 klinische Angaben zu individuellen Patienten.....	50
Tabelle 14 Grading der Tumore der Patientenproben.....	51
Tabelle 15 Prozentuale Anzahl der CTC-positiven und negativen Proben bezogen auf die Färbung	52
Tabelle 16 Differenz CTC Anzahl Visite 1 und 2	52
Tabelle 17 Differenz CTC Anzahl Visite 2 und 3	54
Tabelle 18 klinischer Verlauf und Verhalten der CTC Anzahl.....	55
Tabelle 19 Vergleich CTC-Anzahl und klinischer Verlauf bei Nutzung von Keratin als Marker	56
Tabelle 20 Vergleich CTC Anzahl und klinischer Verlauf bei Nutzung von Keratin+ EGFR/ERBB2	57

9.4 Literaturverzeichnis

Alix-Panabieres C, Muller V, Pantel K. 2007, Current status in human breast cancer micrometastasis. *Current opinion in oncology*;19(558-63).

Andergassen U, Kasprowicz NS, Hepp P, Schindlbeck C, Harbeck N, Kiechle M, et al. 2013, Participation in the SUCCESS-A Trial Improves Intensity and Quality of Care for Patients with Primary Breast Cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*;73(63-9).

Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, et al. 2011, Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Molecular cancer research : MCR*;9(997-1007).

Ashworth TR. 1869, A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*;14(146-9).

Babayan A, Hannemann J, Spötter J, Müller V, Pantel K, Joosse SA, 2013, Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *PLoS One.* 2013 Sep 18;8(9)

Baccelli I, Trumpp A. 2012, The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *The Journal of cell biology*;198(281-93).

Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. 2010, Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*;24(157-67).

Baeuerle PA, Gires O. 2007, EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British journal of cancer*;96(417-23).

Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, et al. 2005, Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*;68(25-30).

Bartlett JMS, Rea D, Rimm DL. 2011, Quantification of hormone receptors to guide adjuvant therapy choice in early breast cancer: better methods required for improved utility. *Journal of Clinical Oncology*;29(3715-6).

Baselga J, Gomez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM, et al. 2013, Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.;31(20):2586-92.

Bauknecht T, Kohler M, Janz I, Pfeleiderer A. 1989, The occurrence of epidermal growth factor receptors and the characterization of EGF-like factors in human ovarian, endometrial, cervical and breast cancer. EGF receptors and factors in gynecological carcinomas. *Journal of cancer research and clinical oncology*;115(193-9).

Beatson G. 1896, On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment . The Lancet;148(162-5).

Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. 2012, Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. Cancer metastasis reviews;31(673-87).

Bloom HJG, Richardson WW. 1957, Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. British journal of cancer;11(359).

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Pathologie: Elsevier, Urban und Fischer; 2008 2012.

Broom RJ, Tang PA, Simmons C, Bordeleau L, Mulligan AM, O'Malley FP, et al. 2009, Changes in estrogen receptor, progesterone receptor and ERBB2/neu status with time: discordance rates between primary and metastatic breast cancer. Anticancer research;29(1557-62).

Bühling KJ, Friedmann W. Intensivkurs, Gynäkologie und Geburtshilfe; Urban und Fischer; 2. Auflage; 2009.

Butters DJ, Ghersi D, Wilcken N. 2006, Addition of drug/s to a chemotherapy regimen for metastatic breast cancer. status and date. Cochrane Database Syst Rev. 2010 Nov 10;(11)

Carter CL, Allen C, Henson DE. 1989, Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer;63(181-7).

Cheang MC, Voduc D, Tyldesley S, Gelmon KA, Ellis MJ, Bernard PS, et al. 2008, editors. Breast cancer molecular subtypes and locoregional recurrence. ASCO Annual Meeting Proceedings.

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. 2009, Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2009 May 20;101(10).

Christiansen P, Al-Suliman N, Bjerre K, Moller S. 2008, Recurrence pattern and prognosis in low-risk breast cancer patients--data from the DBCG 89-A programme. Acta oncologica (Stockholm, Sweden);47(691-703).

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. 2004, Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. The New England journal of medicine;351(781-91).

Cristofanilli, M., et al. 2005. "Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer." J Clin Oncol 23(7): 1420-1430.

Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, et al. 2011, Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. Lancet;378(1707-16).

Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al. 2011, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G: Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*;378(771-84).

de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. 2008, Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*;14(6302-9).

de Gregorio N, Schochter F, Melcher C, Hagenbeck C, Friedl T, Jäger B, et al. 2013, Abstract OT1-1-11: DETECT III-A multicenter, randomized, phase III trial to compare standard therapy alone versus standard therapy plus lapatinib in patients with initially HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells. *Cancer Research*.;73(24 Supplement):OT1--11-OT1-1-.

Dixon JM. 2014, Endocrine Resistance in Breast Cancer. *New Journal of Science*;2014(27).

Dua R, Zhang J, Nhonthachit P, Penuel E, Petropoulos C, Parry G. 2009, EGFR over-expression and activation in high HER2, ER negative breast cancer cell line induces trastuzumab resistance. *Breast cancer research and treatment*;122(685-97).

Dua R, Zhang J, Nhonthachit P, Penuel E, Petropoulos C, Parry G. 2009, EGFR over-expression and activation in high HER2, ER negative breast cancer cell line induces trastuzumab resistance. *Breast cancer research and treatment*;122(685-97).

Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer E, Wallwiener D, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2009, Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Research*: 11(5):109

Fehm T, Muller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, et al. 2010, HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast cancer research and treatment*;124(403-12).

Fernö M, Andersson C, Fallenius G, Idvall I. 1996, Oestrogen receptor analysis of paraffin sections and cytosol samples of primary breast cancer in relation to outcome after adjuvant tamoxifen treatment. *Acta Oncologica*;35(17-22).

Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, et al. 2009, PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res*;11(R77).

Fischer U, Baum F. Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms: Georg Thieme Verlag; 2014, S.34-45.

Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert AM, Mauermann O, Izbicki JR, Pantel K, Riethdorf S., 2013, Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and

mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. Clin Chem. 2013 Jan;59(1):252-60.

Gasch C, Oldopp T, Mauermann O, Gorges TM, Andreas A, Coith C, Müller V, Fehm T, Janni W, Pantel K, Riethdorf S, 2016, Frequent detection of PIK3CA mutations in single circulating tumor cells of patients suffering from HER2-negative metastatic breast cancer. Mol Oncol. 2016 Oct;10(8):1330-43

Gennari A, Conte P, Rosso R, Orlandini C, Bruzzi P. 2005, Survival of metastatic breast carcinoma patients over a 20-year period: a retrospective analysis based on individual patient data from six consecutive studies. Cancer;104(1742-50).

Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. 2003, Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer.;162:149-55.

Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. 2009, Triple-negative breast cancer--current status and future directions. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO;20(1913-27).

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. 2005, Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. Annals of oncology;16(1569-83).

Goldkorn A, Ely B, Quinn DI, Tangen CM, Fink LM, Xu T, et al. 2014, Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.;32(11):1136-42.

Gonzales JC, Fink LM, Goodman OB, Jr., Symanowski JT, Vogelzang NJ, Ward DC 2011, Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. Clinical genitourinary cancer.;9(1):39-45.

Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. 2012, Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. BMC cancer;12(178).

Hamilton A, Volm M. 2001, Nonsteroidal and steroidal aromatase inhibitors in breast cancer. Oncology (Williston Park, NY);15(965-72; discussion 72, 77-9).

Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. 2010, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). Archives of pathology & laboratory medicine;134(e48-e72).

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. 2007, American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*;25(5287-312).

Hayes, D. F., et al. 2006, Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 1): 4218-4224.

Holliday DL, Speirs V. 2011, Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*;13(215).

Hudis CA. 2007, Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine*;357(39-51).

Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, et al. 2008, Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature*;456(663-6).

Ingthorsson S, Andersen K, Hilmarsdottir B, Maelandsmo GM, Magnusson MK, Gudjonsson T 2015, HER2 induced EMT and tumorigenicity in breast epithelial progenitor cells is inhibited by coexpression of EGFR. *Oncogene*.

Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Gerstenhauer M, Ortman O. 2012, Ki-67 als Prognoseparameter in der Routineversorgung von Frauen mit primärem Mammakarzinom? *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*;9(A73).

Jann W. 2012, DETECT III – Multizentrische, prospektiv randomisierte Phase III Studie zum Vergleich einer antineoplastischen Therapie allein versus einer aneoplastischen Therapie plus Lapatinib bei Patientinnen mit initial HER2-negativem metastasiertem Brustkrebs und HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen.

Joose SA, Hannemann J, Spotter J, Bauche A, Andreas A, Muller V, et al. 2012, Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*;18(993-1003).

Joose SA, Pantel K. 2013, Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer research*;73(8-11).

Kaatsch, P, Spix, C, Hentschel S, Katalinic, A, Luttmann, S, Stegmaier C, Hansmann J, 2015. Krebs in Deutschland (RKI) 2011/2012.

Kallergi G, Papadaki M, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. 2011, Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*;13(R59).

Kamby C, Ejlertsen B, Andersen J, Birkler NE, Rytter L, Zedeler K, et al. 1988, The Pattern of Metastases in Human Breast Cancer Influence of systemic adjuvant therapy and impact on survival. *Acta Oncologica*;27(715-9).

Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. 2011, Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta oncologica*;50(700-10).

Kreienberg R, Jonat W, Volm T, Möbus V, Alt D. Management des Mammakarzinoms: Springer; 2006.

Lalmahomed ZS, Kraan J, Gratama JW, Mostert B, Sleijfer S, Verhoef C 2010, Circulating tumor cells and sample size: the more, the better. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.*;28(17):e288-9.

Lang JE, Mosalpuria K, Cristofanilli M, Krishnamurthy S, Reuben J, Singh B, et al. 2009, HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. *Breast cancer research and treatment.*;113(3):501-7.

Lin N, Winer E. 2004, New targets for therapy in breast cancer: Small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Res*;6(204 - 10).

Lindstrom LS, Karlsson E, Wilking UM, Johansson U, Hartman J, Lidbrink EK, et al. 2012, Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol*;30(2601-8).

Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine: McGraw Hill Professional; 2011 2011.

Lu Q, Nakamura J, Savinov A, Yue W, Weisz J, Dabbs DJ, et al. 1996, Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology*;137(3061-8).

Magkou C, Nakopoulou L, Zoubouli C, Karali K, Theohari I, Bakarakos P, et al. 2008, Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Research*;10(R49).

Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. 2008, The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*;133(704-15).

Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A, Luttgen MS, Malchiodi M, Baehring F, et al. 2012, Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Physical biology.*;9(1):016003.

McCarty KS, Szabo E, Flowers JL, Cox EB, Leight GS, Miller L, et al. 1986, Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer research*;46(4244s-8s).

Meden H. Mammakarzinom: Neue Aspekte zur Diagnostik und Therapie: Walter de Gruyter; 2009.

Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. 2003, Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene*;22(6570-8).

Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. 2004, Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clinical cancer research*;10(8152-62).

Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. 2007, Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*;357(2666-76).

Müller V, Pantel K. 2005, BM micrometastases and circulating tumor cells in breast cancer patients: where have we been, where are we now and where does the future lie? *Cytotherapy*;7(478-82).

Muller, V., et al. 2012, "Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System and AdnaTest Breast in metastatic breast cancer patients: the DETECT study." *Breast Cancer Res* 14(4): R118

Musgrove EA, Sutherland RL. 2009, Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*;9(631-43).

Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, Salido M, Rodriguez M, Garcia-Puche J, et al. 2012, Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Research*;14(R71).

O'Shaughnessy JA. 2014, Highlights in Metastatic Breast Cancer From the 2013 San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS).

Osborne CK, Schiff R. 2011, MECHANISMS OF ENDOCRINE RESISTANCE IN BREAST CANCER. *Annual review of medicine*;62(233-47).

Pantel K, Brakenhoff RH. 2004, Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*;4(448-56).

Pantel K, Deneve E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, et al. 2011, Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clinical chemistry*;58(936-40).

Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S, 2009, Cancer micrometastases, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 339–351

Patel H, Le Marer N, Wharton RQ, Khan ZA, Araia R, Glover C, et al. 2002, Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Annals of surgery*;235(226-31).

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. 2000, Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*;406(747-52).

Peeters DJ, van Dam PJ, Van den Eynden GG, Rutten A, Wuyts H, Pouillon L, et al. 2014, Detection and prognostic significance of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer according to immunohistochemical subtypes. *British journal of cancer.*;110(2):375-83.

Pfleiderer A, Kaufmann M, Breckwoldt M. Gynäkologie und Geburtshilfe: Georg Thieme Verlag; 2007.

Rack BK, Schindlbeck C, Andergassen U, Schneeweiss A, Zwingers T, Lichtenegger W, et al. 2010, Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: the SUCCESS trial. *J Clin Oncol*;28(1003).

Remmele W, Stegner HE. 1987, Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe*;8(138-40).

Riaz M, Elstrodt F, Hollestelle A, Dehghan A, Klijn JG, Schutte M. 2009, Low-risk susceptibility alleles in 40 human breast cancer cell lines. *BMC cancer*;9(236).

Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. 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(920-8).

Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. 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 : an official journal of the American Association for Cancer Research.*;13(3):920-8.

Rimawi MF, Shetty PB, Weiss HL, Schiff R, Osborne CK, Chamness GC, et al. 2010, Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer.*;116(5):1234-42.

Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Honrado E, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Calero F, et al. 2006, Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. *Journal of clinical pathology*;60(1006-12).

Ruiterkamp J, Ernst MF, Van de Poll-Franse LV, Bosscha K, Tjan-Heijnen VCG, Voogd AC. 2009, Surgical resection of the primary tumour is associated with improved survival in patients with distant metastatic breast cancer at diagnosis. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*;35(1146-51).

Sakamoto T, Eguchi H, Omoto Y, Ayabe T, Mori H, Hayashi S. 2002, Estrogen receptor-mediated effects of tamoxifen on human endometrial cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*;192(93-104).

Sänger N, Effenberger KE, Riethdorf S, Van Haasteren V, Gauwerky J, Wiegatz I, et al. 2011, Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ. *International Journal of Cancer*;129(2522-6).

- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al.** 1984, The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*;312(513-6).
- Scholzen T, Gerdes J.** 2000, The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*;182(311-22).
- Serrano MJ, Ortega FG, Alvarez-Cubero MJ, Nadal R, Sanchez-Rovira P, Salido M, et al.** 2014, EMT and EGFR in CTCs cytokeratin negative non-metastatic breast cancer. *Oncotarget*;5(7486-97).
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al.** 1989, Studies of the ERBB2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (New York, NY)*;244(707-12).
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al.** 2001, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*;344(783-92).
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al.** 2001, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;98(10869-74).
- Soysal SD, Muenst S, Barbie T, Fleming T, Gao F, Spizzo G, et al.** 2013, EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2(+), basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. *British journal of cancer*;108(1480-7).
- Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, et al.** 2010, Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*;107(15449-54).
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al.** 2000, New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*;92(205-16).
- Tot T.** *Breast Cancer: A Lobar Disease* 2010, Springer; (766).
- Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW** 2007, Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology.*;71(3):154-62.
- Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ.** 1996, Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *British journal of cancer*;74(1796).
- Witzig, T. E., et al.** 2002, "Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy." *Clin Cancer Res* 8(5): 1085-1091.

Wörmann B, Aebi S, Decker T, Fehm T, Greil R, Harbeck N, Krug B, Overkamp F, Rick O, Samonigg H, Wenz F, Lüftner D, 2016, Leitlinie Mammakarzinom der Frau, Onkopedia (DGHO)

Yang J, Weinberg RA. 2008, Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*;14(818-29).

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. 2010, Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology*;11(174-83).

Yue W, Santen RJ, Wang JP, Li Y, Verderame MF, Bocchinfuso WP, et al. 2003, Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*;86(477-86).

9.5 Bilderquellen

Robert-Koch-Institut, „Krebs in Deutschland 2011/2012“, 2015, URL:

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile (abgerufen am 09.02.2017, 18:43)

Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S, 2009, Cancer micrometastases, *Nature Reviews Clinical Oncology* 6, S. 346

DGHO, Leitlinie Mammakarzinom der Frau, 2016, URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@view/html/index.html> (abgerufen am 09.02.2017, 18:54)

Miltenyl Biotec, Basic Principle of MACS Technology, 2017, URL:

http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Navigation/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/MACS-Technology/neu/flowchart_basic_principle_positive_selection_570.ashx (abgerufen am 09.02.2017, 18:59)

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Simon Joose für die gewissenhafte intensive Betreuung und geduldige Bereitschaft zur jederzeitigen Hilfestellung bei Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit. Ich habe mich sehr über die freundliche Aufnahme und die ausgesprochen angenehme Atmosphäre in die Arbeitsgruppe gefreut und bin mir sicher, dass diese maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pantel, dem Direktor des Instituts für Tumorbologie des Zentrums für experimentelle Medizin am UKE möchte ich mich für die freundliche Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit am Institut für Tumorbologie zu promovieren herzlich bedanken.

Prof. Dr. med. Volkmar Müller und dem gesamten Team der Gynäkologischen Tagesklinik am Universitätskliniken Hamburg-Eppendorf, danke ich vielmals für die Bereitstellung und Hilfe bei der Akquisition der Patientenproben und die große Hilfsbereitschaft die Sie dabei an den Tag gelegt haben.

Bei Anna Babayan möchte ich mich für die geduldige und professionelle Einführung in sämtliche immunzytochemische Arbeiten bedanken. Die angenehme kollegiale Arbeitsatmosphäre und geduldige Hilfestellungen erleichterten mir die Arbeit ungemein und ihre konstruktiven Anregungen führten maßgeblich zum Gelingen der Experimente.

Bei Maha Elazezy, Retno Ningsi, Prof. Dr. Marcilei Eliza Buim, Sven Sönksen, Zeena Hagel, Dr. rer. nat. Kai Bartkowiak, Annkathrin Hanssen und Oliver Mauermann möchte ich mich zudem für die Hilfsbereitschaft und kollegiale Zusammenarbeit in einer äußerst angenehmen Atmosphäre herzlich bedanken!

Bei Freunden und Familie bedanke ich mich herzlich für die Ermutigungen, Ausdauer, Ruhe und Geduld in dieser Zeit. Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend zur Seite standen.

Zu Letzt möchte ich auch die vielen Patientinnen der gynäkologischen Tagesklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die Bereitstellung Ihrer Blutproben zum Zwecke der Forschung bedanken. Ohne sie wäre die Arbeit nicht möglich gewesen und es verdient den größten Respekt, dass sie sich in solch schweren Zeiten dennoch dazu bereit erklärt haben, der Krebsforschung einen Dienst zu erweisen. Ich wünsche diesen Frauen und allen anderen Patientinnen viel Kraft und Hoffnung im Kampf gegen diese Erkrankung und hoffe durch meine Arbeit einen kleinen Anteil daran zu haben, die Krankheit Brustkrebs besser zu verstehen und in naher Zukunft besser therapieren zu können.

11. Lebenslauf

-Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen-

-Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen-

12. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: